



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências

# **Caraterização Fitoquímica e Avaliação das Propriedades Antimicrobianas da Urze e Feto Comum**

**Anabela da Silva Santos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

**Bioquímica**

(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Doutora Ana Paula Coelho Duarte

Coorientadora: Doutora Susana Margarida Paraíso Ferreira

Covilhã, outubro de 2017



# Agradecimentos

A elaboração da presente dissertação envolveu um percurso longo, com momentos felizes e menos felizes, mas com o apoio de diversas pessoas. Por isso, deixo aqui a minha gratidão para todas aquelas que, de qualquer modo, contribuíram para o crescimento deste trabalho e para o meu crescimento como pessoa.

Começo por agradecer às minhas orientadoras, professora doutora Ana Paula Duarte e doutora Susana Ferreira, por todo o acompanhamento científico, pela acessibilidade e disponibilidade para esclarecer todas as minhas dúvidas, pelo apoio, pela forma como contribuíram para o desenvolvimento do meu espírito crítico e científico e por todos os momentos de boa disposição. Além das minhas orientadoras, quero agradecer também ao doutor Ângelo, aquela “ponte” entre as plantas e a microbiologia e aquela pessoa que sempre se mostrou disponível para ensinar e ajudar, partilhando os seus conhecimentos, ajudando e ensinando sempre da melhor forma. Mesmo não sendo meu orientador, acabou por o ser, e sou grata por isso.

Aos meus colegas de trabalho: ao pessoal da síntese orgânica e às meninas da microbiologia. Foi muito o tempo passado no laboratório, mas o tempo passa mais depressa quando há boa energia à volta. A entreaajuda foi enorme, o companheirismo, a alegria a trabalhar (ou a lavar a loiça), as brincadeiras, a partilha de experiências e conhecimentos, a amizade que se cria e a força que se multiplica para darmos uns aos outros, e sermos uns para os outros. Obrigada a todos os que me acompanharam e que se cruzaram comigo ao longo deste ano, obrigada pelos sorrisos e pela boa disposição que encontrei ao longo dos laboratórios pelos quais passava, e pela alegria que espalhavam nos corredores! Obrigada ao pessoal do CICS, às técnicas, às senhoras da limpeza e a todos os investigadores com quem troquei algumas dicas.

Um obrigada ao Gonçalo e à Ana, aqueles meus “sub-orientadores” que me ajudaram com a sua experiência, que me incentivaram e me motivaram quando precisei.

Aos meus pais, pelos quais sinto uma enorme gratidão e orgulho! Ao meu pai, por todo o amor que sempre teve comigo e pelos os ensinamentos que me deixou, principalmente, pelo seu exemplo que guardo sempre e tento seguir. É de facto, para mim, uma inspiração, uma referência, e agradeço a força que eu acredito que ele me continua a transmitir. À minha mãe, aquele “pilar” da família, que por menos bem que esteja, mostra sempre aquela postura firme e forte. Obrigada a ela, por desempenhar o papel de mãe tão bem, ser amiga e conselheira. É um exemplo de força e perseverança para mim. Agradeço aos meus irmãos, por todo o apoio e empurrões que me deram. Agradeço especialmente à minha irmã, aquela melga predileta, que tanto aturou os meus momentos maus, e apesar da minha impaciência nesses momentos, insistia sempre por me ver bem e estava sempre lá para me ouvir, para me erguer de novo, levantar o astral e dar uma lição de vida. À Matilde, a criança com mais sabedoria que conheci até hoje,

tanta que por vezes me sinto pequena ao lado dela. Agradeço a toda a minha família, pelo apoio e pela força que me deram.

Obrigada às minhas colegas de casa, às minhas arquitetas preferidas, por todos os bons momentos ao longos destes, e pela paciência nos momentos menos bons. Obrigada também, por terem trazido outras pessoas para o nosso ambiente, com as quais, todas juntas, apesar da entropia gerada, os momentos passados foram inesquecíveis.

Obrigada aos meus amigos mais próximos, aos que estiveram comigo nos momentos mais difíceis e inesperados. Obrigada aos que apareceram como por magia, e deixaram tanto deles e fizeram tanto por mim. Sou grata por ter tido pessoas que me ajudaram, que me tentaram mostrar algo positivo no meio da tempestade e tinham sempre um abraço. Obrigada à Daniela, por todo apoio neste ano, por me ajudar a ver as coisas de um jeito mais simples e bonito. Um obrigada do tamanho do mundo à Sofia, por ser aquela amiga de sempre, por me ajudar a manter a minha essência, me ajudar cada vez que me senti perdida, obrigada pelo apoio incondicional!

Assim, sou grata pela oportunidade de ter desenvolvido este trabalho, pelas pessoas que encontrei e as quais guardo com carinho. Este trabalho é meu e é de todos aqueles que o acompanharam de perto. Obrigada!

## Resumo

As plantas são usadas na medicina popular desde cedo e constituem uma fonte de centenas a milhares de compostos com potencial terapêutico. Numa época em que os microrganismos estão constantemente a desenvolver mecanismos de resistência aos agentes antimicrobianos, torna-se fundamental a pesquisa por novos agentes antimicrobianos. Todas as estratégias devem ser exploradas e os produtos naturais constituem uma fonte de agentes terapêuticos inovadores que vêm de encontro a esta necessidade. A urze e o feto comum estão descritos na literatura como sendo utilizados na medicina tradicional no tratamento de feridas e como antissépticos, revelando-se assim candidatos interessantes para a pesquisa de agentes antimicrobianos. Assim, o objetivo global da presente dissertação passou pela caracterização fitoquímica dos extratos da urze e do feto comum, bem como pela avaliação da sua capacidade antioxidante e propriedades antimicrobianas.

Desta forma, as plantas foram sujeitas a extração metanólica, e a partir do extrato bruto obtido foi realizado o fracionamento por passagem sucessiva de solventes de polaridade crescente, originando quatro frações. Os extratos brutos foram caracterizados fitoquimicamente, nomeadamente quanto ao seu conteúdo em fenóis totais e em flavonóides totais, pelos métodos colorimétricos de *Folin-Ciocalteu* e do cloreto de alumínio, respetivamente. De seguida, os extratos brutos foram avaliados quanto à sua atividade antioxidante por dois métodos diferentes: método do DPPH e método do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. Os extratos e as respetivas frações foram sujeitos a cromatografia em camada fina (TLC), em que os cromatogramas obtidos foram revelados com reagente de *Folin-Ciocalteu* e com reagente de DPPH. No que toca à avaliação da atividade antimicrobiana, primeiro realizou-se o ensaio de difusão em disco, seguido da avaliação da concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos e respetivas frações e foi realizada ainda a bioautografia destes. Perante a atividade antimicrobiana verificada pelos ensaios de difusão em disco e pela avaliação da CMI, procedeu-se à avaliação do modo de ação do extrato bruto e respetivas frações com maior atividade antimicrobiana, por ensaio de curvas de morte em *L. monocytogenes*, e foi testado o efeito destes extratos na formação de biofilmes e na tolerância a condições de stress (pH ácido e temperaturas elevadas) desta bactéria.

Os resultados evidenciam um alto teor em fenóis e em flavonóides totais, com as flores da urze apresentando o maior conteúdo fenólico, e a urze e as suas flores o maior conteúdo em flavonóides totais. Relativamente à atividade antioxidante, a urze e as suas flores apresentaram uma atividade antioxidante forte, e o feto comum moderada, pelo método do DPPH. Pelo método do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, o feto comum revelou a maior atividade antioxidante. Quanto à avaliação da atividade antimicrobiana, os extratos da urze e das suas flores mostraram o maior potencial antimicrobiano, nomeadamente contra bactérias gram positivas e contra leveduras, e os extratos do feto comum contra leveduras. O ensaio de curvas

de morte revelou que os quatro extratos testados (fração 4 da urze, extrato bruto e frações 2 e 4 das flores da urze) reduzem o crescimento de *L. monocytogenes*, e que todos os extratos de forma geral inibem significativamente a formação de biofilmes da mesma bactéria. O estudo da influência destes mesmos extratos na tolerância de *L. monocytogenes* a condições adversas revelou que todos eles aumentam a suscetibilidade em condições ácidas, sendo que, no que toca a temperaturas elevadas, o efeito não é tão notório.

Em conclusão, todos os extratos apresentam alto conteúdo em compostos fenólicos e flavonóides, e apresentam potencial antioxidante. O feto comum apesar de não ter demonstrado atividade antibacteriana revelou atividade antifúngica. A urze e as suas flores apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias gram positivas e contra leveduras, sendo de destacar a atividade evidenciada pelas flores da urze. O estudo mais aprofundado dos extratos com maior atividade antimicrobiana indicou um potencial uso da fração 4 da urze e do extrato bruto e frações 2 e 4 das flores da urze contra *L. monocytogenes*. Assim, pode-se concluir que a urze e o feto comum podem ser uma fonte de novos compostos com potencial antimicrobiano.

## Palavras-chave

Extratos, Urze, Feto comum, Fenóis totais, Flavonóides totais, Atividade antioxidante, Atividade antimicrobiana, Curvas de morte, Biofilmes, Tolerância a condições adversas

# Abstract

Plants are used in folk medicine since early and they are a source of hundreds to thousands of compounds with therapeutic potential. At a time in which microorganisms are constantly developing mechanisms of resistance to antimicrobial agents, research into new antimicrobial agents becomes essential. All strategies must be explored and natural products are presented as a source of innovative therapeutic agents that meet this need. Heather and common bracken are described in the literature as being used in traditional medicine in the treatment of wounds and as antiseptics, thus proving to be interesting candidates for the research of antimicrobial agents. Thus, the overall aim of this dissertation was the phytochemical characterization of heather and common bracken extracts, and the evaluation of their antioxidant capacity and antimicrobial properties.

In this way, the plants were subjected to methanolic extraction, and from the crude extract was carried out the fractionation by successive passage of solvents of increasing polarity, being obtained four fractions. The crude extracts were characterized phytochemically, regarding to their content in total phenols and total flavonoids, by the colorimetric methods of *Folin-Ciocalteu* and aluminium chloride, respectively. Subsequently, crude extracts were evaluated for their antioxidant activity by two different methods: DPPH method and  $\beta$ -carotene/linoleic acid system method. The extracts and their fractions were subjected to thin layer chromatography (TLC), where the chromatograms obtained were revealed with *Folin-Ciocalteu* reagent and DPPH reagent. Regarding the evaluation of the antimicrobial activity, the disc diffusion test was first performed, followed by the minimum inhibitory concentration (MIC) evaluation of crude extracts and respective fractions, and bioautography. In view of the antimicrobial activity verified by the disc diffusion assays and by the MIC evaluation, the mode of action of the crude extract and its fractions with better antimicrobial activity were evaluated by the time-kill curves in *L. monocytogenes*, and the effect of these extracts was tested in the biofilms formation and tolerance to adverse conditions (acid pH and high temperatures) of this bacterium.

The results evidenced a high content of phenols and total flavonoids, with heather flowers having the highest phenolic content, and heather and its flowers with the highest total flavonoid content. Concerning the antioxidant activity, heather and its flowers had a strong antioxidant activity, and the moderate common bracken, by the DPPH method. By the  $\beta$ -carotene/linoleic acid method, the common bracken revealed the highest antioxidant activity. Regarding the evaluation of the antimicrobial activity, extracts of heather and its flowers showed the highest antimicrobial potential, specifically against gram positive bacteria and against yeasts, and extracts of the common bracken against yeasts. The time-kill curves analysis revealed that the four extracts tested (fraction 4 of heather, crude extract and fractions 2 and 4 of heather flowers) reduced the growth of *L. monocytogenes*, and that all extracts in general inhibited

significantly the biofilms formation of the same bacterium. The study of the influence of these extracts on the tolerance of *L. monocytogenes* to adverse conditions revealed that they all increase the susceptibility under acidic conditions, with a not so evident effect regarding high temperatures.

In conclusion, all the extracts present high content in phenolic compounds and flavonoids, and present antioxidant potential. Common bracken, despite not showing antibacterial activity, revealed antifungal activity. The heather and its flowers have antimicrobial activity against gram positive bacteria and against yeasts, highlighting the activity evidenced by the heather flowers. Further study of extracts with higher antimicrobial activity indicated a potential use of fraction 4 of heather and crude extract and fractions 2 and 4 of heather flowers against *L. monocytogenes*. Thus, it can be concluded that heather and the common bracken may be a source of new compounds with antimicrobial potential.

## Keywords

Extracts, Heather, Common bracken, Total phenols, Total flavonoids, Antioxidant activity, Antimicrobial activity, Time-kill curves, Biofilms, Tolerance to adverse conditions

# Índice

Capítulo I .....	1
Introdução.....	1
1. Potencial das plantas .....	1
1.1. Urze ( <i>Erica spp.</i> ) .....	3
1.1.1. Características da urze .....	3
1.1.2. A urze na medicina tradicional .....	3
1.1.3. Evidências científicas das propriedades biológicas da urze.....	4
1.2. Feto comum ( <i>Pteridium aquilinum</i> ) .....	5
1.2.1. Características do feto comum.....	5
1.2.2. O feto comum na medicina tradicional.....	5
1.2.3. Evidências científicas das propriedades biológicas do feto comum .....	6
2. Compostos bioativos .....	6
2.1. Compostos fenólicos.....	6
2.2. Alcaloides .....	8
2.3. Terpenóides.....	8
3. Métodos de extração dos compostos bioativos.....	9
3.1. Extração com ultrassons .....	11
4. Atividade antioxidante .....	11
4.1. Radicais livres e importância do estudo da atividade antioxidante .....	11
4.2. Antioxidantes .....	12
4.2.1. Antioxidantes sintéticos.....	13
4.2.2. Antioxidantes naturais.....	13
5. Atividade antimicrobiana .....	14
5.1. Necessidade de novos agentes antimicrobianos .....	14
5.1.1. Resistência a antibióticos.....	15
5.1.2. Biofilmes .....	16
Capítulo II .....	19
Objetivo .....	19
Capítulo III .....	21
Material e Métodos .....	21
1. Preparação das plantas.....	21

2. Processo de extração .....	21
3. Determinação dos fenóis totais .....	21
4. Determinação dos flavonóides totais .....	23
5. Determinação da atividade antioxidante .....	24
5.1. Método do DPPH .....	24
5.2. Método do sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.....	28
6. Fracionamento dos extratos.....	29
7. Cromatografia em camada fina (TLC) .....	30
8. Determinação da atividade antimicrobiana .....	30
8.1. Microrganismos e extratos de plantas usados e condições de armazenamento .....	30
8.2. Teste de suscetibilidade a antimicrobianos por difusão em disco .....	31
8.2.1. Para bactérias.....	31
8.2.2. Para leveduras .....	32
8.3. Avaliação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) por método de microdiluição em meio líquido .....	32
8.3.1. Para bactérias.....	32
8.3.2. Para leveduras .....	33
8.4. Bioautografia direta .....	34
8.5. Ensaio de curvas de morte .....	34
8.6. Ensaio de inibição da formação de biofilmes .....	35
8.7. Avaliação da tolerância a condições adversas .....	36
8.7.1. Ensaio do desafio de pH.....	36
8.7.2. Ensaio do desafio de Calor.....	37
9. Análise estatística.....	37
Capítulo IV .....	39
Resultados e Discussão.....	39
1. Processo de extração .....	39
2. Caracterização fitoquímica .....	40
3. Avaliação da atividade antioxidante .....	42
3.1. Método do DPPH .....	43
3.2. Método do sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.....	44
4. Fracionamento dos extratos brutos .....	45
5. Determinação da atividade antimicrobiana .....	50
5.1. Teste de suscetibilidade a antimicrobianos por difusão em disco .....	50

5.1.1. Para bactérias.....	51
5.1.2. Para leveduras .....	52
5.2. Avaliação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) .....	53
5.2.1. Para bactérias.....	53
5.2.2. Para leveduras .....	57
5.3. Bioautografia direta .....	58
5.4. Estudo de curvas de morte.....	60
5.5. Estudo da inibição da formação de biofilmes .....	64
5.6. Avaliação da tolerância a condições adversas .....	67
Capítulo V .....	71
Conclusão .....	71
Capítulo VI .....	73
Referências bibliográficas.....	73
Anexo I.....	83
Cálculo de IC <sub>50</sub> e de AAI.....	83
Anexo II .....	95
Comunicação oral.....	95



# Lista de Figuras

Figura 1 - Imagens representativas da urze. ....	3
Figura 2 - Imagens representativas do feto comum. ....	5
Figura 3 - Estrutura química da quercetina, com os anéis A, B e C típicos da estrutura dos flavonóides. ....	7
Figura 4 - Exemplo da estrutura de alguns alcaloides conhecidos: a cafeína (esquerda) e a morfina (direita). ....	8
Figura 5 - Exemplos de estruturas cíclicas (a) limoneno e (b) mentol, e de estruturas acíclicas (c) linalool e (d) mirceno. ....	9
Figura 6 - Curva de calibração utilizada para a determinação dos fenóis totais. ....	22
Figura 7 - Curva de calibração utilizada para a determinação dos flavonóides totais. ....	23
Figura 8 - Curva de calibração utilizada para a determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH. ....	25
Figura 9 - Percentagem de inibição (% I) do extrato bruto metanólico da urze para a solução de DPPH 0,08 mM. ....	26
Figura 10 - Percentagem de inibição (% I) do extrato bruto metanólico da urze para a solução de DPPH 0,12 mM. ....	27
Figura 11 - Percentagem de inibição (% I) do extrato bruto metanólico da urze para a solução de DPPH 0,20 mM. ....	27
Figura 12 - Esquema representativo do fracionamento do extrato bruto. ....	30
Figura 13 - Conteúdo de fenóis totais nos extratos brutos metanólicos da urze, flores da urze e feto comum. ....	40
Figura 14 - Conteúdo de flavonóides totais nos extratos brutos metanólicos da urze, flores da urze e feto comum. ....	41
Figura 15 - Atividade antioxidante dos extratos metanólicos de urze, flores da urze, feto comum e padrão BHT, representada pela percentagem de inibição (% I). ....	44
Figura 16 - Cromatograma resultante da TLC do extrato bruto metanólico da urze e frações, eluído com clorofórmio/acetato de etilo 1:1 (esquerda) e acetato de etilo/metanol 1:1 (direita). ....	46
Figura 17 - Cromatograma resultante da TLC do extrato bruto metanólico das flores da urze e frações, eluído com clorofórmio/acetato de etilo 1:1 (esquerda) e acetato de etilo/metanol 1:1 (direita). ....	46
Figura 18 - Cromatograma resultante da TLC do extrato bruto metanólico do feto comum e frações, eluído com clorofórmio/acetato de etilo 1:1 (esquerda) e acetato de etilo/metanol 1:1 (direita). ....	46

Figura 19 - Cromatograma resultante da TLC do extrato bruto metanólico da urze e frações, eluído com clorofórmio/acetato de etilo 10:4 (esquerda) e clorofórmio/acetato de etilo 4:10 (direita). .....	47
Figura 20 - Cromatograma resultante da TLC do extrato bruto metanólico das flores da urze e frações, eluído com clorofórmio/acetato de etilo 10:4 (esquerda) e clorofórmio/acetato de etilo 4:10 (direita). .....	47
Figura 21 - Cromatograma resultante da TLC do extrato bruto metanólico do feto comum e frações, eluído com clorofórmio/acetato de etilo 10:4 (esquerda) e clorofórmio/acetato de etilo 4:10 (direita). .....	47
Figura 22 - Cromatogramas dos extratos brutos metanólicos e frações de (a) urze, (b) flores da urze e (c) feto comum, eluídos com clorofórmio/acetato de etilo 4:10 e revelados com reagente de <i>Folin-Ciocalteu</i> . .....	48
Figura 23 - Cromatogramas dos extratos brutos metanólicos e frações de (a) urze, (b) flores da urze e (c) feto comum, eluídos com clorofórmio/acetato de etilo 4:10 e revelados com reagente de DPPH. ....	49
Figura 24 - Cromatogramas do extrato bruto metanólico das flores da urze e frações (a) e do antibiótico tetraciclina (b) revelados com suspensão celular de <i>Bacillus cereus</i> . ....	58
Figura 25 - Cromatogramas do extrato bruto metanólico da urze e frações (a), flores da urze e frações (b) e do antibiótico tetraciclina (b) revelados com suspensão celular de <i>Listeria monocytogenes</i> . .....	59
Figura 26 - Cromatogramas do extrato bruto metanólico da urze e frações (a), das flores da urze e frações (b), do feto comum (c) e antibiótico anfotericina B (d) revelados com suspensão celular de <i>Candida tropicalis</i> . ....	60
Figura 27 - Curva de morte de <i>Listeria monocytogenes</i> incubada com a fração 4 do extrato bruto da urze. ....	61
Figura 28 - Curva de morte de <i>Listeria monocytogenes</i> incubada com o extrato bruto das flores da urze. ....	62
Figura 29 - Curva de morte de <i>Listeria monocytogenes</i> incubada com a fração 2 do extrato bruto das flores da urze. ....	62
Figura 30 - Curva de morte de <i>Listeria monocytogenes</i> incubada com a fração 4 do extrato bruto das flores da urze. ....	63
Figura 31 - Avaliação do efeito da fração 4 do extrato bruto metanólico da urze sobre a formação de biofilmes de <i>Listeria monocytogenes</i> . ....	64
Figura 32 - Avaliação do efeito do extrato bruto metanólico das flores da urze sobre a formação de biofilmes de <i>Listeria monocytogenes</i> . ....	65
Figura 33 - Avaliação do efeito da fração 2 do extrato bruto metanólico das flores da urze sobre a formação de biofilmes de <i>Listeria monocytogenes</i> . ....	65
Figura 34 - Avaliação do efeito da fração 4 do extrato bruto metanólico das flores da urze sobre a formação de biofilmes de <i>Listeria monocytogenes</i> . ....	66

Figura 35 - Avaliação do efeito da fração 4 do extrato bruto metanólico da urze, extrato bruto e frações 2 e 4 das flores da urze em <i>Listeria monocytogenes</i> submetida a pH ácido 2,4 durante 60 minutos. ....	67
Figura 36 - Avaliação do efeito da fração 4 do extrato bruto metanólico da urze, extrato bruto e frações 2 e 4 das flores da urze em <i>Listeria monocytogenes</i> submetida a temperaturas elevadas (55 °C) durante 120 minutos. ....	68
Figura 37 - Percentagem de inibição (% I) do extrato bruto metanólico das flores da urze para a solução de DPPH 0,08 mM. ....	83
Figura 38 - Percentagem de inibição (% I) do extrato bruto metanólico das flores da urze para a solução de DPPH 0,12 mM. ....	84
Figura 39 - Percentagem de inibição (% I) do extrato bruto metanólico das flores da urze para a solução de DPPH 0,20 mM. ....	84
Figura 40 - Percentagem de inibição (% I) do extrato bruto metanólico do feto comum para a solução de DPPH 0,08 mM. ....	85
Figura 41 - Percentagem de inibição (% I) do extrato bruto metanólico do feto comum para a solução de DPPH 0,12 mM. ....	86
Figura 42 - Percentagem de inibição (% I) do extrato bruto metanólico do feto comum para a solução de DPPH 0,20 mM. ....	86
Figura 43 - Percentagem de inibição (% I) da rutina para a solução de DPPH 0,08 mM. ....	87
Figura 44 - Percentagem de inibição (% I) da rutina para a solução de DPPH 0,12 mM. ....	88
Figura 45 - Percentagem de inibição (% I) da rutina para a solução de DPPH 0,20 mM. ....	89
Figura 46 - Percentagem de inibição (% I) do trolox para a solução de DPPH 0,08 mM. ....	89
Figura 47 - Percentagem de inibição (% I) do trolox para a solução de DPPH 0,12 mM. ....	90
Figura 48 - Percentagem de inibição (% I) do trolox para a solução de DPPH 0,20 mM. ....	91
Figura 49 - Percentagem de inibição (% I) do ácido gálico para a solução de DPPH 0,08 mM. .	91
Figura 50 - Percentagem de inibição (% I) do ácido gálico para a solução de DPPH 0,12 mM. .	92
Figura 51 - Percentagem de inibição (% I) do ácido gálico para a solução de DPPH 0,20 mM. .	93



# Lista de Tabelas

Tabela 1 - Exemplo de alguns compostos bioativos extraídos por diferentes solventes .....	10
Tabela 2 - Concentrações das soluções de DPPH em metanol usadas para a construção da curva de calibração, em mM e em $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ . .....	24
Tabela 3 - $\text{IC}_{50}$ e AAI do extrato bruto metanólico da urze para a solução de DPPH 0,08 mM. 26	
Tabela 4 - $\text{IC}_{50}$ e AAI do extrato bruto metanólico da urze para a solução de DPPH 0,12 mM. 27	
Tabela 5 - $\text{IC}_{50}$ e AAI do extrato bruto metanólico da urze para a solução de DPPH 0,20 mM. 28	
Tabela 6 - Rendimento das extrações realizadas. ....	39
Tabela 7 - Concentração de amostra necessária para promover 50% de inibição ( $\text{IC}_{50}$ ) e índice de atividade antioxidante (AAI) do extrato bruto metanólico da urze, flores da urze, feto comum e padrões (Rutina, Trolox e ácido gálico) e, respectivo potencial antioxidante. ....	43
Tabela 8 - Halo de inibição formado em milímetros (mm) pelo ensaio de difusão em disco para os extratos brutos metanólicos da urze, flores da urze e feto comum em bactérias .....	51
Tabela 9 - Halo de inibição formado em milímetros (mm) pelo ensaio de difusão em disco para os extratos brutos metanólicos da urze, flores da urze e feto comum em leveduras. ....	52
Tabela 10 - Concentração mínima inibitória (CMI) do extrato bruto metanólico da urze e respectivas frações para as bactérias em estudo.....	53
Tabela 11 - Concentração mínima inibitória (CMI) do extrato bruto metanólico das flores de urze e respectivas frações para as bactérias em estudo. ....	55
Tabela 12 - Concentração mínima inibitória (CMI) do extrato bruto metanólico do feto comum e respectivas frações para as bactérias em estudo. ....	56
Tabela 13 - Concentração mínima inibitória (CMI) do extrato bruto metanólico da urze e respectivas frações para as leveduras em estudo.. ....	57
Tabela 14 - Concentração mínima inibitória (CMI) do extrato bruto metanólico das flores de urze e respectivas frações para as leveduras em estudo. ....	57
Tabela 15 - Concentração mínima inibitória (CMI) do extrato bruto metanólico do feto comum e respectivas frações para as leveduras em estudo.....	57
Tabela 16 - $\text{IC}_{50}$ e AAI de extrato bruto metanólico de flores da urze para a solução de DPPH 0,08 mM. ....	83
Tabela 17 - $\text{IC}_{50}$ e AAI de extrato bruto metanólico das flores da urze para a solução de DPPH 0,12 mM. ....	84
Tabela 18 - $\text{IC}_{50}$ e AAI de extrato bruto metanólico das flores das urze para a solução de DPPH 0,08 mM. ....	85
Tabela 19 - $\text{IC}_{50}$ e AAI de extrato bruto metanólico do feto comum para a solução de DPPH 0,08 mM.....	85
Tabela 20 - $\text{IC}_{50}$ e AAI de extrato bruto metanólico do feto comum para a solução de DPPH 0,12 mM.....	86

Tabela 21 - IC <sub>50</sub> e AAI de extrato bruto metanólico do feto comum para a solução de DPPH 0,20 mM.....	87
Tabela 22 - IC <sub>50</sub> e AAI da rutina para a solução de DPPH 0,08 mM. ....	88
Tabela 23 - IC <sub>50</sub> e AAI da rutina para a solução de DPPH 0,12 mM. ....	88
Tabela 24 - IC <sub>50</sub> e AAI da rutina para a solução de DPPH 0,20 mM. ....	89
Tabela 25 - IC <sub>50</sub> e AAI do trolox para a solução de DPPH 0,08 mM. ....	90
Tabela 26 - IC <sub>50</sub> e AAI do trolox para a solução de DPPH 0,12 mM. ....	90
Tabela 27 - IC <sub>50</sub> e AAI do trolox para a solução de DPPH 0,20 mM. ....	91
Tabela 28 - IC <sub>50</sub> e AAI do ácido gálico para a solução de DPPH 0,08 mM. ....	92
Tabela 29 - IC <sub>50</sub> e AAI do ácido gálico para a solução de DPPH 0,12 mM. ....	92
Tabela 30 - IC <sub>50</sub> e AAI do ácido gálico para a solução de DPPH 0,20 mM. ....	93

# Lista de Acrónimos

% I	Porcentagem de Inibição
AAI	Índice de atividade antioxidante (do inglês <i>Antioxidant Activity Index</i> )
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHA	Hidroxianisol butilado
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BHIA	<i>Brains Heart Infusion agar</i>
BHT	Hidroxitolueno butilado
CLSI	<i>Clinical &amp; Laboratory Standards Institute</i>
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DO	Densidade ótica
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
IC <sub>50</sub>	Concentração de amostra necessária para promover 50 % de inibição
McF	<i>McFarland</i>
MHA	<i>Müller-Hinton agar</i>
MHB	<i>Müller-Hinton Broth</i>
NCCLS	<i>National Commitee for Clinical Standards Institute</i>
PG	Propil galato
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês <i>ribonucleic acid</i> )
rpm	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDA	<i>Sabouraud dextrose agar</i>
TBHQ	Ter-butilhidroquinona
TLC	Cromatografia em camada fina (do inglês <i>Thin Layer Cromatography</i> )
UFC	<i>Unidades formadoras de colónias</i>
UV	Ultravioleta
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>



# Capítulo I

## Introdução

As plantas são amplamente usadas na medicina popular desde há muito tempo, e o seu uso tem assumido cada vez mais uma posição na sociedade moderna (Chikezie *et al.*, 2015). Inicialmente as pessoas utilizavam as plantas para fins nutricionais, contudo posteriormente, com a descoberta das propriedades medicinais, a flora tornou-se numa fonte de cura de doenças e de melhoria para a saúde (Azmir *et al.*, 2013).

Dado o desenvolvimento da resistência microbiana aos fármacos, os investigadores voltaram-se para a etnofarmacologia, onde encontraram centenas a milhares de compostos químicos com diversas atividades biológicas (Sasidharan *et al.*, 2011; Sassi *et al.*, 2007). O estudo de extratos de plantas para a atividade antimicrobiana revela que estas constituem uma fonte de novos compostos com potencial antimicrobiano (Sassi *et al.*, 2007). No entanto, os estudos clínicos são essenciais para a demonstração da eficácia de um determinado composto bioativo e na verificação das alegadas propriedades no uso tradicional. Estes estudos direcionam-se para a compreensão da farmacocinética, biodisponibilidade, eficácia, segurança e interações com outros fármacos, uma vez que os compostos bioativos e os extratos de onde são provenientes requerem uma avaliação cuidadosa (Sasidharan *et al.*, 2011).

### 1. Potencial das plantas

Devido ao aumento da resistência aos antibióticos, existe uma necessidade urgente de desenvolver novos e inovadores agentes antimicrobianos (Djeussi *et al.*, 2013). A pesquisa de novos agentes antimicrobianos deve ser continuada e todas as estratégias possíveis devem ser exploradas. Além das substâncias sintéticas, os produtos naturais constituem uma fonte de agentes terapêuticos inovadores para várias condições, incluindo doenças infecciosas (Cos *et al.*, 2006). Os extratos de plantas e os óleos essenciais serviram de base para o desenvolvimento de muitas aplicações atualmente existentes, como a conservação de alimentos crus e processados, produtos farmacêuticos, medicamentos alternativos e terapias naturais (Savoia, 2012).

A atividade antimicrobiana dos extratos de plantas pode ser devida a diversos compostos bioativos presentes (Negi, 2012). A concentração, composição, estrutura e os grupos funcionais destes compostos desempenham um papel importante na determinação da atividade antimicrobiana (Hintz *et al.*, 2015). Os mecanismos de ação dos compostos ativos dos extratos de plantas ainda não são completamente compreendidos. No entanto, existem três aspetos nos quais a maioria dos autores concorda em atribuir a capacidade inibitória: a presença de grupos hidroxilo (-OH) capazes de formar ligações de hidrogénio que têm efeitos sobre as enzimas, modificando uma variedade de funções intracelulares; alterações na permeabilidade das

membranas celulares, granulação do citoplasma e ruptura da membrana citoplasmática nas bactérias; e nos fungos atuam na sua morfologia devido a interações com enzimas de membrana, resultando na perda de rigidez e integridade da parede das hifas (da Cruz Cabral *et al.*, 2013). As bactérias gram positivas apresentam-se mais suscetíveis à ação dos extratos e óleos essenciais das plantas em geral, do que as bactérias gram negativas, essencialmente devido às diferenças estruturais da sua parede celular (Cos *et al.*, 2006; Delaquis *et al.*, 2002).

Dentro dos compostos bioativos, os compostos fenólicos têm uma grande diversidade estrutural e, portanto, diferem na sua eficácia antibacteriana contra microrganismos patogênicos. Assim, a atividade antimicrobiana de extratos de plantas pode ser devida à presença de compostos fenólicos ou outros componentes hidrofóbicos nos óleos essenciais (Gyawali and Ibrahim, 2014). Há evidências de que o número de grupos hidroxilo e a sua posição no anel fenólico está relacionado com o grau de toxicidade para microrganismos, devido ao aumento de hidroxilação (Hintz, Matthews and Di, 2015). Assim, a presença de grupos hidroxilo (-OH) em compostos fenólicos aparenta ser a causa da ação inibitória, uma vez que esses grupos podem interagir com a membrana celular das bactérias, interrompendo a sua estrutura e causando o vazamento de componentes celulares (Gyawali and Ibrahim, 2014). Alguns extratos de plantas também demonstraram atividade antifúngica contra variados fungos (Negi, 2012). Por outro lado, os óleos essenciais contêm uma mistura de compostos terpênicos, que inclui álcoois, acetonas, fenóis, ácidos, aldeídos e ésteres, os quais demonstraram ter propriedades antibacterianas, antifúngicas, antivirais e antioxidantes (Negi, 2012; Prabuseenivasan *et al.*, 2006). Alguns alcaloides encontrados em plantas também foram utilizados como agentes antimicrobianos em alimentos (Hintz *et al.*, 2015).

Muitos agentes antimicrobianos produzidos pela indústria farmacêutica foram baseados em compostos naturais, como o ácido benzóico do arando, ácido sórbico de sorvas, ácido cítrico de limões, ácido málico de maçãs e ácido tartárico de uvas (Negi, 2012). Diferentes espécies do género *Hypericum* contêm compostos como hiperforina, hiperenona A e hipercalina B responsáveis pela atividade antibacteriana em *Staphylococcus aureus* resistente e também em *Mycobacterium tuberculosis* (Osman *et al.*, 2012; Shiu *et al.*, 2012).

Os compostos naturais apresentam potencial não apenas contra células planctônicas, mas também contra populações microbianas em biofilmes. Um exemplo disso são quatro compostos (dois alcaloides e dois compostos fenólicos) isolados de partes aéreas e de raízes de *Krameria lappacea*, *Aesculus hippocastanum*, *Chelidonium majus* e *Macleya cordata* os quais revelaram uma atividade potencialmente interessante sobre biofilmes de *Staphylococcus aureus* (Artini *et al.*, 2012; Savoia, 2012).

## 1.1. Urze (*Erica spp.*)

### 1.1.1. Características da urze



Figura 1 - Imagens representativas da urze (fotografias da autora).

O género *Erica* (família *Ericaceae*) é representado por mais de 800 espécies no mundo e é o maior género de plantas com flor (figura 1) (Mugrabi De Kuppler *et al.*, 2015). As espécies pertencentes a este género encontram-se distribuídas geograficamente pela Europa, Médio Oriente e África, e ainda se estendem para o leste da Turquia, Líbano e também no sudoeste da Arábia (McGuire and Kron, 2005). Dentro deste género, a *Erica arborea* é nativa de vários países na Europa, África, Ásia temperada, e também nas ilhas britânicas, na Austrália e na Nova Zelândia. É um arbusto que geralmente mede até quatro metros de altura, podendo ser ainda maior nas matas nativas, e que produz numerosas pequenas flores (Demirkiran *et al.*, 2010; Guendouze-Boucheffa *et al.*, 2015). Esta espécie é a única do género que é generalizada na Europa, África e zonas temperadas da Ásia (Demirkiran *et al.*, 2010). Outra espécie comumente encontrada e que é endémica do sudoeste da Península Ibérica, é a *Erica andevalensis*, considerada edafo-endémica de solos enriquecidos em ácido e metal (Márquez-García and Cordoba, 2010). A *Erica multiflora* é comumente encontrada na área mediterrânea e é conhecida como a “urze de muitas flores” com folhas de forma semelhante a uma agulha, e é usada em vários estudos (Guendouze-Boucheffa *et al.*, 2015; Mugrabi De Kuppler *et al.*, 2015).

### 1.1.2. A urze na medicina tradicional

As propriedades medicinais para algumas espécies desta família têm sido reconhecidas ao longo do tempo, o que incluiu a urze no grupo das plantas medicinais. Estas propriedades das espécies de *Erica spp.* são geralmente atribuídas à abundância em compostos fenólicos (Guendouze-Boucheffa *et al.*, 2015). Do género *Erica*, a *Erica arborea* e a *Erica multiflora* são as espécies mais referidas como sendo usadas para vários fins terapêuticos, em particular no tratamento de feridas e queimaduras. A *Erica arborea* é considerada adstringente e as suas partes aéreas são tradicionalmente usadas contra úlceras, como agente antimicrobiano, citotóxico, anti edema, antidiarreico e cicatrizador. As folhas e flores são usadas em vários países como

diuréticos, antisséticos urinários e contra a prisão de ventre (Guendouze-Bouchefa *et al.*, 2015). Também a espécie *Erica multiflora* é usada em Marrocos como diurético, antissético urinário, como alternativa no tratamento de hiperlipemia e, em Espanha, no tratamento de feridas. As suas flores são igualmente usadas nos tratamentos referidos e adicionalmente no tratamento de aterosclerose e cancro da próstata, como antissético e sedativo (Guendouze-Bouchefa *et al.*, 2015; Harnafi *et al.*, 2007; Turgay and Esen, 2015). Por exemplo, um copo de 5 % de infusão ou decocção das folhas de *Erica arborea* é sugerido depois das refeições para eliminar os edemas em formulações de emagrecimento (Akkol *et al.*, 2008). No tratado do século I de Dioscórides “*De Materia Medica*”, já foi referido o uso de cataplasma preparado com folhas de espécies de *Erica* como cura para mordida de serpentes (citado em Akkol, Yeşilada and Güvenç, 2008).

### **1.1.3. Evidências científicas das propriedades biológicas da urze**

O estudo fitoquímico de diferentes espécies de *Erica spp.* demonstrou que os taninos, protoantocianidóis e flavonóides representam a maioria dos compostos das flores. Baseado neste estudo e nos usos reportados tradicionalmente, esta família pode ser uma fonte de agentes antioxidantes e antibacterianos clinicamente relevantes (Guendouze-Bouchefa *et al.*, 2015). A atividade anti-inflamatória da urze foi demonstrada para várias espécies de *Erica*, num estudo que envolveu ratos aos quais foram induzidos vários estados de inflamação e administrada oralmente a amostra (Akkol *et al.*, 2008). Os compostos fenólicos, nomeadamente flavonóides, são os principais compostos isolados da espécie *Erica arborea*, a qual também contém óleos essenciais (Guendouze-Bouchefa *et al.*, 2015).

## 1.2. Feto comum (*Pteridium aquilinum*)

### 1.2.1. Características do feto comum



Figura 2 - Imagens representativas do feto comum (fotografias da autora).

Os fetos (figura 2) são um grupo de plantas esporádicas com, aproximadamente, 12000 espécies extensivamente distribuídas pelo mundo (Qi *et al.*, 2015). *Pteridium* é o género mais distribuído dentro do filo *Pteridophyta* e contém as espécies de plantas vasculares mais largamente distribuídas (Marrs and Watt, 2006). A espécie *Pteridium aquilinum* pertence à família *Dennstaedtiaceae*, tem um alcance mundial, encontrando-se presente em todos os continentes à exceção da Antártida (Marrs and Watt, 2006; Tourchi-Roudsari, 2014). Esta planta cresce sobretudo em solos ácidos de floresta, áreas quentes e escuras de zonas tórridas e subtórridas, em madeiras e margens das estradas. O feto comum possui um sistema de rizoma subterrâneo extenso repetidamente ramificado, e habitualmente cresce até 0,3 a 0,9 metros de altura, contudo pode alcançar os 4,3 metros. Esta planta apresenta folhas largas que se dividem geralmente em três níveis (Marrs and Watt, 2006).

### 1.2.2. O feto comum na medicina tradicional

A espécie *Pteridium aquilinum* é usada tradicionalmente em aplicações diversas, desde em medicina popular a aditivos alimentares (Kardong *et al.*, 2013). É usado no tratamento de doenças crónicas, como infusão com propriedades adstringentes contra a diarreia e anti-helmíntico. (Xu *et al.*, 2009). O feto comum é tradicionalmente usado em casos de hepatite, no tratamento de tumefação da pele, e como antipirético (Qi *et al.*, 2015). Externamente, as folhas do feto comum são aplicadas em preparações tópicas no tratamento de infeções fúngicas na Tanzânia, e também como analgésicos (Hamza *et al.*, 2006; Kardong *et al.*, 2013). Além destas aplicações, as folhas também são usadas como aditivos na preparação tradicional de bebidas alcoólicas, e os rizomas e folhas são usados como alimentos, consumidos frescos, enlatados secos ou em conserva (Kardong *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2009).

### 1.2.3. Evidências científicas das propriedades biológicas do feto comum

As folhas do feto comum têm vindo a ser utilizadas como aditivos alimentares e os estudos revelam que o feto possui compostos com propriedades antioxidantes, que podem ter grande potencial nesta aplicação e como nutracêuticos (Kardong *et al.*, 2013). Esta planta possui atividades anti-inflamatórias, anticancerígenas e antivirais documentadas (Qi *et al.*, 2015). Também existem evidências quanto à sua atividade antibacteriana, apontadas por um estudo em que o feto comum foi sujeito a extração com diferentes solventes, sendo que os extratos etanólicos e de éter de petróleo revelaram atividade antibacteriana contra quatro das cinco bactérias testadas (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* e *Bacillus subtilis*) (Kardong *et al.*, 2013).

## 2. Compostos bioativos

Os compostos bioativos são os responsáveis pelas atividades e benefícios das plantas medicinais (Chikezie *et al.*, 2015). Assim, os extratos provenientes das plantas ou os compostos puros proporcionam inúmeras oportunidades para novos medicamentos, devido à inúmera disponibilidade e diversidade química destes compostos nas plantas (Sasidharan *et al.*, 2011).

Qualquer ser vivo processa diversos compostos químicos para a sua sobrevivência e subsistência, sendo que os compostos químicos processados pelas plantas, podem ser divididos em dois grupos principais: metabolitos primários e metabolitos secundários. Os metabolitos primários são substâncias químicas destinadas ao crescimento e desenvolvimento, como os hidratos de carbono, aminoácidos, proteínas e lípidos (Azmir *et al.*, 2013). Os metabolitos secundários são produzidos na fase posterior ao crescimento, não estão envolvidos no crescimento e metabolismo no entanto assumem um papel na defesa da planta contra organismos patogénicos e predadores herbívoros (Azmir *et al.*, 2013; Chikezie *et al.*, 2015). Dentro dos metabolitos secundários, existem algumas substâncias que exercem efeitos nos sistemas biológicos e por isso são considerados compostos bioativos. Assim, os compostos bioativos podem ser definidos como sendo metabolitos secundários de plantas que provocam efeitos farmacológicos ou tóxicos em humanos ou animais (Paulsen, 2010).

A classificação de compostos bioativos em diferentes categorias diverge de autor para autor, contudo são sugeridas três classes principais: os compostos fenólicos, os alcaloides e os terpenóides (Azmir *et al.*, 2013).

### 2.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são a classe mais largamente distribuída pelas plantas, estando ubiqüamente presentes e são também uma das maiores classes (Lattanzio, 2013; Vardhan and Shukla, 2017). Estes compostos têm um papel relevante na fisiologia das plantas, assumindo papéis na pigmentação, sabor, crescimento, reprodução e resistência a agentes patogénicos e

predadores (Paulsen, 2010). Alguns deles possuem atividade antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, antisséptica, anti-helmíntica e outras propriedades biológicas e farmacológicas (Vardhan and Shukla, 2017). Os compostos fenólicos englobam uma vasta gama de substâncias orgânicas em que o anel aromático se encontra ligado a pelo menos um grupo hidroxilo (Ramawat *et al.*, 2009). O composto de origem é o fenol e os fenóis simples ( $C_6$ ) incluem o catecol e o floroglucinol, contudo estes compostos isolados não são comuns nas plantas e aparecem habitualmente como parte de estruturas mais complexas (Lattanzio, 2013; Mann *et al.*, 1994).

Muitos compostos fenólicos são polimerizados em moléculas maiores originando os polifenóis. Os polifenóis são muito abundantes na natureza e apresentam uma grande diversidade (Vardhan and Shukla, 2017). Entre os polifenóis das plantas, os flavonóides formam um grande grupo destes produtos naturais, com mais de 8000 compostos identificados, encontram-se amplamente distribuídos pelas plantas e são conhecidos pela forte atividade antioxidante (Chikezie *et al.*, 2015; Lattanzio, 2013). Os flavonóides constituem os pigmentos das plantas e, na maior parte destas, são responsáveis pela exibição de cores fortes nas pétalas de flores e pela emissão de fluorescência brilhante quando as células das plantas verdes são excitadas pela luz ultravioleta (UV) (Chikezie *et al.*, 2015). A estrutura química destes compostos é baseada no esqueleto  $C_6-C_3-C_6$ , contendo dois anéis benzênicos unidos por uma unidade propano (figura 3) (Lattanzio, 2013; Ramawat *et al.*, 2009). Os flavonóides incluem, de acordo com a estrutura, flavonas, flavonóis, isoflavonas, flavanonas, flavanonóis e antocianidinas (Shahidi and Ambigaipalan, 2015). Dentro dos flavonóides mais comuns insere-se a quercetina (figura 3) (Chikezie *et al.*, 2015), que possui uma excelente atividade antioxidante, reduz a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), é vasodilatador e anticoagulante do sangue (Ansar *et al.*, 2016; Rubió *et al.*, 2013).

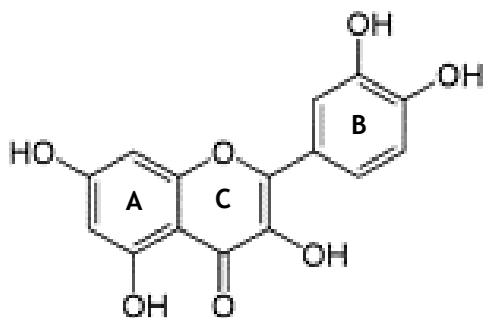


Figura 3 - Estrutura química da quercetina, com os anéis A, B e C típicos da estrutura dos flavonóides (adaptado de Ozkan *et al* 2016).

Outro grupo importante dentro dos compostos fenólicos é o grupo dos ácidos fenólicos, que tem como estrutura base  $C_6-C_1$ . Os ácidos fenólicos mais comuns são o ácido gálico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido vanílico e ácido siríngico. São tipicamente componentes de estruturas complexas como a lignina e taninos hidrolisáveis (Lattanzio, 2013).

## 2.2. Alcaloides

Os alcaloides são moléculas heterocíclicas que contêm azoto, as quais normalmente apresentam atividade biológica marcada e sabor amargo, podendo atuar como compostos de defesa em plantas e sendo eficientes contra patógenos e predadores devido à sua toxicidade (Chikezie *et al.*, 2015; Matsuura and Fett-Neto, 2017). As mesmas propriedades tóxicas observadas no cenário de defesa da planta podem ser usadas no desenvolvimento de novos medicamentos (Gupta and Prakash, 2014). Os efeitos tóxicos, em geral, dependem de dosagem específica, tempo de exposição e características individuais, como sensibilidade, local de ação e estágio de desenvolvimento. Por vezes, os efeitos de toxicidade podem ser prejudiciais e benéficos dependendo do contexto ecológico ou farmacológico (Matsuura and Fett-Neto, 2017). A potente atividade fisiológica de muitos alcaloides levou ao seu uso como produtos farmacêuticos, estimulantes, narcóticos e venenos (Ramawat *et al.*, 2009). Os alcaloides estão divididos em vários grupos, cada um com propriedades clínicas diversas (Chikezie *et al.*, 2015). São vários os alcaloides aplicados medicinalmente como anestésicos locais, estimulantes (como a cafeína e a nicotina), psicadélicos, analgésicos (como a morfina e a codeína) (figura 4), bactericidas (como a piperidina), fármacos anticancerígenos (como a camptotecina e a vimblastina), agentes hipertensivos, vasodilatadores (como a rutaecarpina), antiarrítmicos, antiasmáticos e antimaláricos (como a quinina) (Chikezie *et al.*, 2015).

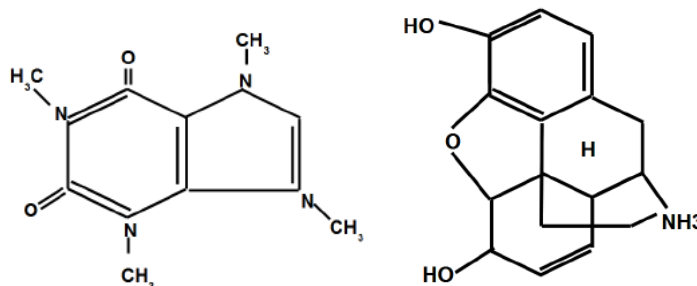


Figura 4 - Exemplo da estrutura de alguns alcaloides conhecidos: a cafeína (esquerda) e a morfina (direita).

Nas plantas, os alcaloides podem estar presentes sistematicamente na planta inteira ou podem encontrar-se acumulados em grandes quantidades em órgãos específicos como em raízes, na casca do caule e em sementes, e são predominantes em plantas com flores (Chikezie *et al.*, 2015; Ramawat *et al.*, 2009).

## 2.3. Terpenóides

Os terpenóides são talvez a classe mais estruturalmente variada encontrada nas plantas, com mais de 30000 estruturas conhecidas, incluindo terpenos, esteróides e carotenóides (Croteau *et al.*, 2000; Rubió *et al.*, 2013; Vardhan and Shukla, 2017). Estes compostos são derivados de unidades de isopreno de 5 carbonos que se aglomeram em numerosas combinações para originar uma vasta gama de derivados de terpenos, que são coletivamente referidos como isoprenóides

(Chikezie *et al.*, 2015). Todos os compostos derivados desta categoria são lipofílicos e tendem a volatilizar com facilidade (Chikezie *et al.*, 2015). Habitualmente os óleos essenciais são compostos por monoterpênicos (duas unidades de isopreno) ou sesquiterpênicos (três unidades de isopreno) e são muito usados em fragrâncias e perfumes, possuindo odor e sabor forte (Ramawat *et al.*, 2009; Rubió *et al.*, 2013). Estes compostos têm associadas ações diversificadas, como atividade antimicrobiana, antifúngica, antiparasitária, antiviral, antialérgica, antiespasmódica, anti-hiperglicêmica, anti-inflamatória e propriedades modulatórias do sistema imunitário (Chikezie *et al.*, 2015). Exemplos de estruturas cíclicas incluem o limoneno, o mentol, cânfora e pineno e de estruturas acíclicas o linalool, o mircenol e o geraniol (alguns exemplos na figura 5) (Ludwiczuk *et al.*, 2017).

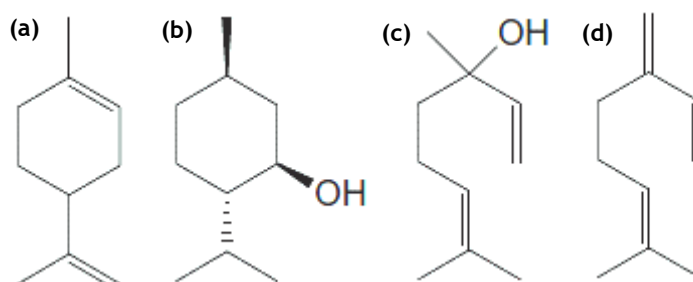


Figura 5 - Exemplos de estruturas cíclicas (a) limoneno e (b) mentol, e de estruturas acíclicas (c) linalool e (d) mircenol (Ludwiczuk *et al.*, 2017).

### 3. Métodos de extração dos compostos bioativos

A extração é o primeiro passo crucial na análise de plantas medicinais, pois é necessário extrair os componentes químicos desejados da matéria vegetal, dando assim origem aos extratos de plantas. Uma vez que os extratos geralmente contêm uma combinação de vários tipos de compostos bioativos com polaridades diferentes, o fracionamento surge como um passo importante para a caracterização e identificação (Sasidharan *et al.*, 2011). Assim, o extrato bruto pode ser separado em várias frações contendo compostos de polaridades ou tamanhos moleculares semelhantes. Para o fracionamento inicial de qualquer extrato bruto, é aconselhável não gerar muitas frações, pois pode distribuir um composto alvo em muitas frações, acabando por ficarem concentrações demasiado baixas para a sua deteção. Assim Devem-se coletar apenas algumas frações maiores do extrato bruto (Gray, 2012).

Apesar do desenvolvimento de técnicas como a cromatografia e espectrofotometria que facilitam a análise de compostos bioativos, o sucesso da análise destes compostos ainda depende dos métodos de extração (Azmir *et al.*, 2013). Assim durante o processo de extração devem ser tomadas medidas adequadas para assegurar que potenciais componentes ativos não sejam perdidos, degradados ou destruídos durante a preparação do extrato de amostras de plantas (Sasidharan *et al.*, 2011). Os parâmetros que mais afetam o processo de extração são

as propriedades da matriz da parte da planta, solvente, temperatura, agitação, pressão e tempo de extração (Azmir *et al.*, 2013).

Diferentes solventes estão disponíveis para extrair compostos bioativos de plantas (Cos *et al.*, 2006), sendo a polaridade do composto alvo o fator mais importante para a escolha do solvente. A afinidade molecular entre solvente e soluto, transferência de massa, uso de co solvente, segurança ambiental, toxicidade humana e viabilidade financeira também devem ser consideradas na seleção do solvente para extração de compostos bioativos (Azmir *et al.*, 2013). Assim, a extração de compostos hidrofílicos usa solventes polares, como água, metanol, etanol ou acetato de etilo. Para a extração de compostos mais lipofílicos, é utilizado, por exemplo, diclorometano ou mistura de solventes como por exemplo diclorometano/metanol em proporção de 1:1. Em alguns casos, a extração com hexano é usada para remover clorofila (Cos *et al.*, 2006). Na tabela 1 encontram-se alguns exemplos de compostos bioativos extraídos com diferentes solventes.

Tabela 1 - Exemplo de alguns compostos bioativos extraídos por diferentes solventes (Azmir *et al* 2013).

Água	Etanol	Metanol	Clorofórmio	Diclorometanol	Éter	Acetona
Antocianinas	Taninos	Antocianinas	Terpenóides	Terpenóides	Alcaloides	Flavonóides
Taninos	Polifenóis	Terpenóides	Flavonóides		Terpenóides	
Saponinas	Flavonóis	Saponinas				
Terpenóides	Terpenóides	Taninos				
	Alcaloides	Flavononas				
		Polifenóis				

A extração do material vegetal pode ser realizada através de métodos não convencionais e de métodos convencionais. Os métodos não convencionais são mais “amigos” do ambiente devido à diminuição do uso de químicos sintéticos e orgânicos, reduzido tempo operacional e melhor rendimento e qualidade da extração. Entre estes métodos encontram-se a extração com ultrassons, em campo elétrico pulsado, por digestão enzimática, por extrusão, com aquecimento por micro-ondas, com aquecimento óhmico, com fluido supercrítico e com solventes acelerados. Por outro lado, existem os métodos convencionais, como a maceração, hidrodestilação e a extração em *Soxhlet*. A extração em *Soxhlet* é ainda considerado como método de referência para comparação de sucesso e desenvolvimento de novas metodologias (Azmir *et al.*, 2013).

### **3.1. Extração com ultrassons**

Na presente dissertação, a técnica utilizada para a extração recorreu ao uso de um banho de ultrassons. Nesta técnica a extração é facilitada pelo uso de ultrassons, um tipo especial de onda sonora além da audição humana (20 kHz) (Azmir *et al.*, 2013; Gray, 2012). Como outras ondas, os ultrassons passam através de um meio por criação de compressão e expansão, onde este processo produz um fenómeno designado por cavitação, que significa produção, crescimento e colapso de bolhas (Azmir *et al.*, 2013). Assim, os ultrassons são usados para induzir stress nas células através da produção de cavitação na amostra. A degradação celular aumenta a solubilização de compostos no solvente e melhora os rendimentos de extração (Gray, 2012). A principal vantagem da extração recorrendo a ultrassons reside na energia destas ondas que facilita a lixiviação de compostos orgânicos e inorgânicos da matriz da planta. O mecanismo de extração por ultrassons envolve dois fenómenos físicos: a difusão através da parede celular e a lavagem do conteúdo da célula depois da destruição das paredes. Fatores como o teor de humidade da amostra, grau de moagem, tamanho das partículas e proporção de solvente influenciam a extração eficiente e efetiva. Além disso, a temperatura, pressão, frequência e tempo de sonicação são os fatores determinantes para a ação dos ultrassons. As vantagens deste método incluem redução no tempo de extração, na energia necessária e na quantidade de solvente. A energia ultrassonográfica para extração também facilita a mistura mais eficaz, transferência de energia mais rápida, reduzidos gradientes térmicos e temperatura de extração, extração seletiva, tamanho reduzido do equipamento, resposta mais rápida ao controlo de extração de processo, início rápido, aumento da produção e eliminação de passos do processo. Foi demonstrada a eficácia desta técnica para a extração de compostos bioativos (Azmir *et al.*, 2013).

## **4. Atividade antioxidante**

### **4.1. Radicais livres e importância do estudo da atividade antioxidante**

Sob stress, o nosso organismo produz mais espécies reativas (como as espécies reativas de oxigénio e as de azoto) do que antioxidantes enzimáticos (como superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase), levando a um desequilíbrio (Shahidi and Ambigaipalan, 2015). As espécies reativas de oxigénio (radicais de aniões superóxido, radicais hidroxilo e peróxido de hidrogénio) são consideradas as principais causadoras de várias doenças associadas à idade, incluindo doenças cardiovasculares, cancro e doenças degenerativas do sistema nervoso como a doença de Parkinson e de Alzheimer. Estes radicais livres causam danos em lípidos, proteínas, DNA e pequenas moléculas (Rubió *et al.*, 2013). Nos últimos anos, as doenças relacionadas com o stress oxidativo têm vindo a ganhar especial atenção (Martins *et al.*, 2016).

A nível alimentar, a oxidação lipídica é uma das principais causas da deterioração e da redução da qualidade dos alimentos e, também da formação de odores e aromas desagradáveis, diminuindo o período de vida útil, alterando a textura e a cor e diminuindo o valor nutricional dos alimentos (Shahidi and Ambigaipalan, 2015). Vários estudos têm sido desenvolvidos com o propósito de compreender os mecanismos de ação dos radicais livres, bem como descobrir substâncias efetivas para prevenir e até reverter a ocorrência de danos oxidativos e desenvolver métodos para controlar a taxa e extensão da oxidação lipídica em alimentos (Martins *et al.*, 2016; Shahidi and Ambigaipalan, 2015).

## 4.2. Antioxidantes

Os antioxidantes surgiram como substâncias capazes de contrariar os danos oxidativos, sem afetar as reações oxidativas normais essenciais à vida que ocorrem no nosso corpo. Um antioxidante é definido como sendo “um composto oxidante-redutor ativo que limita o stress oxidativo através de reações não enzimáticas com um oxidante reativo” (Paulsen, 2010). Os antioxidantes são clinicamente relevantes uma vez que podem ajudar na proteção do organismo humano contra danos causados pelas espécies reativas de oxigénio. Além disso, têm-se revelado como um grupo de aditivos alimentares indispensáveis, principalmente devido às suas capacidades de aumentar o tempo de vida útil dos produtos alimentares, sem qualquer efeito adverso sobre as suas qualidades sensoriais ou nutricionais. De acordo com o Código de Regulamentação Federal do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos surge assim outra definição, que refere que “os antioxidantes são substâncias usadas para preservar alimentos, retardando a deterioração, o ranço ou a descoloração devido à oxidação”. Neste contexto, existem compostos antioxidantes sintéticos e naturais (Shahidi and Ambigaipalan, 2015).

As defesas inatas do corpo podem precisar de ser apoiadas por uma grande variedade de antioxidantes ingeridas na dieta, e muitas delas provenientes das plantas. Assim, moléculas antioxidantes naturais podem combater as espécies reativas de oxigénio diretamente ou impulsionar sistemas regenerativos para restaurar a capacidade antioxidante (Rubió *et al.*, 2013). Certos estudos epidemiológicos fornecem evidências de que certos alimentos detêm numerosos benefícios para a saúde, podendo prevenir várias doenças e até mesmo reverter ou bloquear processos degenerativos (Martins *et al.*, 2016; Prakash and Sharma, 2014). Os estudos também indicam que uma dieta rica em antioxidantes está associada com uma baixa incidência de doenças degenerativas. A dieta alimentar assume assim um papel preponderante na saúde. A maior fonte de compostos fenólicos na dieta são em bebidas (sumos de frutas, chá, café, cacau, cerveja e vinho), frutas, oleaginosas (sementes de colza, canola, linhaça e azeitonas), vegetais, legumes (cevada, milho, nozes, aveia, arroz, sorgo, trigo, feijão e leguminosas) e cereais (Prakash and Sharma, 2014).

### 4.2.1. Antioxidantes sintéticos

Exemplos de antioxidantes sintéticos atualmente permitidos para uso em alimentos são hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), propil galato (PG) e ter-butilhidroquinona (TBHQ) (Shahidi and Ambigaipalan, 2015). Contudo, alguns estudos têm demonstrado que os antioxidantes sintéticos podem apresentar efeitos tóxicos. Por isso, a investigação tem-se direcionado mais para os antioxidantes naturais, ou seja, na descoberta de produtos naturais com propriedades antioxidantes que possam substituir ou associar-se aos antioxidantes sintéticos (Luís *et al.*, 2009), abrindo a porta para a pesquisa de antioxidantes nas plantas.

### 4.2.2. Antioxidantes naturais

Muitas plantas medicinais detêm uma larga quantidade de compostos com atividade antioxidante, como os compostos fenólicos, alcaloides, terpenóides, vitaminas, entre outros metabolitos endógenos (Ozkan *et al.*, 2016).

A atividade antioxidante é dos potenciais mais estudados dos compostos fenólicos e estes constituem os compostos mais representativos em termos de antioxidantes na nossa dieta (Martins *et al.*, 2016; Paulsen, 2010). Estima-se que ingerimos uma grama de compostos fenólicos por dia, no qual cerca de 1/3 corresponde a ácidos fenólicos e os restantes 2/3 correspondem maioritariamente a flavonóides (Paulsen, 2010). Os compostos fenólicos são principalmente sequestradores de radicais livres que retardam ou inibem o passo de iniciação ou interrompem o passo de propagação da oxidação lipídica, diminuindo assim a produção de espécies reativas de oxigênio formadas em vários sistemas *in vitro* e *in vivo* (Rubió *et al.*, 2013; Shahidi and Ambigaipalan, 2015). A nível alimentar proporcionam, assim, a diminuição da formação de produtos de decomposição voláteis que causam ranço (Shahidi and Ambigaipalan, 2015).

Recentemente, os flavonóides têm vindo a ganhar interesse como potenciais agentes terapêuticos contra uma grande variedade de doenças, a maioria das quais envolvendo danos oxidativos. Os flavonóides podem interferir não só na propagação de reações de radicais livres, mas também na formação de radicais. Os flavonóides mais comuns presentes nas plantas medicinais e alimentos incluem quercetina, canferol, luteolina e apigenina (Ozkan *et al.*, 2016). No caso dos alimentos, os flavonóis constituem o grupo de flavonóides mais amplamente representado. Os frutos normalmente contêm cinco a dez diferentes glicosídeos de flavonol (forma glicosilada dos flavonóis) (Paulsen, 2010). A capacidade dos flavonóides serem efetivos como antioxidantes deve-se à presença de grupos hidroxilo do tipo catecol no anel B (figura 3) (Shahidi and Ambigaipalan, 2015).

Dentro dos terpenóides existem várias classes com atividade antioxidante, nomeadamente os carotenoides. Um exemplo, é o  $\beta$ -caroteno que devido à sua interação com radicais livres,

parece oferecer proteção contra o cancro do pulmão, do colo retal, da mama, do útero e da próstata. (Ludwiczuk *et al.*, 2017).

Vários alcaloides apresentam atividade antioxidante e alguns deles ajudam as plantas na desintoxicação de espécies reativas de oxigénio geradas por diferentes stresses. Dentro dos alcaloides com atividade antioxidante é de salientar a cafeína (Matsuura and Fett-Neto, 2017).

## 5. Atividade antimicrobiana

### 5.1. Necessidade de novos agentes antimicrobianos

As bactérias patogénicas sempre foram consideradas como uma das principais causas de morbidade e mortalidade em seres humanos (Djeussi *et al.*, 2013). Durante o século XX, com a descoberta dos antibióticos houve uma grande redução de ameaças de doenças infecciosas. No entanto, ao longo dos anos muitos antibióticos frequentemente usados no passado tornaram-se menos efetivos contra os agentes patogénicos, devido à resistência gerada pelos microrganismos aos fármacos (Luís *et al.*, 2014; Savoia, 2012). O problema da resistência microbiana está a crescer e as perspetivas para o uso de fármacos antimicrobianos no futuro ainda são incertas (Negi, 2012). Embora as indústrias farmacológicas tenham produzido uma série de novos antibióticos nas últimas décadas, a produção tem vindo a diminuir, e a resistência aos antibióticos pelos microrganismos aumentou (Fair and Tor, 2014; Negi, 2012). A resistência microbiana é revelada pelas bactérias mas também por outros microrganismos, como fungos, parasitas e vírus (Levy and Marshall, 2004).

Apesar da disponibilidade de uma ampla gama de antibióticos, os microrganismos estão constantemente a desenvolver mecanismos de resistência a estes agentes, dificultando o combate a doenças infecciosas. Estes mecanismos de resistência têm vindo a aumentar de nível e complexidade (Mabhiza *et al.*, 2016). Os mecanismos clássicos de resistência incluem: a inativação de fármacos por hidrólise ou por modificação; a alteração do alvo do fármaco dentro da célula; a alteração da permeabilidade de membrana e o efluxo do fármaco, nomeadamente por ação de bombas de efluxo (Penesyán *et al.*, 2015). Para além dos mecanismos de resistência, as bactérias detêm estruturas que colaboram para o potencial infeccioso, como cápsulas, flagelos, *pili* e sistemas de secreção tipo III (Hill, 2012).

Perante os antibióticos existentes e o aumento da resistência microbiana, verifica-se a existência de uma falta de diversidade no alvo celular de todos os antibióticos conhecidos. Quase todos os antibióticos clinicamente utilizados inibem a síntese de DNA, RNA, proteína ou parede celular, e existem menos de vinte e cinco alvos moleculares que são responsáveis pela sua atividade. Aproximadamente metade de todos os antibióticos têm como alvo a parede celular. No entanto, novos antibióticos que estão em conformidade com as classes estabelecidas são frequentemente sujeitos a algumas das mesmas resistências observadas em membros anteriores da classe. Posto isto, surge a necessidade de desenvolver novos agentes

antimicrobianos (Fair and Tor, 2014). Neste momento, as áreas de particular interesse terapêutico incluem pequenas moléculas para atenuar a virulência bacteriana e perturbar a formação de biofilmes, a terapia com bacteriófagos, o potencial de produtos naturais, a identificação de alvos de drogas que selecionam a redução da aptidão bacteriana durante o desenvolvimento da resistência microbiana e o aprimoramento de respostas imunes do hospedeiro, incluindo terapia dirigida pelo hospedeiro (Holmes *et al.*, 2016).

### 5.1.1. Resistência a antibióticos

Os antibióticos são definidos como compostos que podem efetivamente inibir o crescimento de microrganismos (Penesyan *et al.*, 2015). Estes compostos são utilizados para o tratamento de doenças bacterianas desde o início do século XX e são os fármacos mais comumente prescritos na medicina humana. Após a introdução da penicilina, muitas classes de antibióticos foram descobertas e a maioria das doenças infecciosas foram controladas. Contudo, o uso excessivo e indevido de antibióticos constitui o fator principal para a resistência microbiana (Holmes *et al.*, 2016; Penesyan *et al.*, 2015). Além disso, o uso de antibióticos na agricultura e como agentes profiláticos e promotores de crescimento em animais, resultou no aparecimento de microrganismos resistentes a fármacos, originando infecções graves e difíceis de tratar em animais, bem como em humanos (Mehendiratta and Bhalla, 2014).

Os microrganismos evidenciam a resistência como uma interação de dois elementos: o antibiótico ou agente antimicrobiano e os determinantes de resistência genética nos microrganismos selecionados pelo fármaco. A resistência a agentes antimicrobianos emerge quando estes dois elementos se reúnem num ambiente ou hospedeiro, o que pode levar a um problema clínico (Levy and Marshall, 2004).

A resistência aos antibióticos inicialmente surgiu em hospitais, onde a maioria dos antibióticos são usados. As bactérias entéricas, nomeadamente *Escherichia coli*, *Shigella* e *Salmonella*, e em adição, *Pseudomonas aeruginosa*, foram provavelmente as primeiras bactérias nas quais foi detetada resistência a múltiplos antibióticos (Levy and Marshall, 2004; Rossolini *et al.*, 2014). Dentro das bactérias gram positivas, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus spp.* são as espécies que atualmente representam os maiores desafios em termos de resistência a antibióticos. No que toca às bactérias gram negativas, a resistência aos antibióticos é apresentada como sendo mais grave que nas bactérias gram positivas, sendo que os fenótipos de extrema e total resistência a fármacos são mais comuns em bactérias gram negativas relacionadas com infeções associadas aos cuidados de saúde, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.* e *Enterobacteriaceae* (na maioria das vezes *Klebsiella pneumoniae*) (Rossolini *et al.*, 2014). Nas bactérias gram positivas, a parede de peptidoglicano encontra-se muito próxima da superfície celular, permitindo que o agente antimicrobiano penetre facilmente na célula. No entanto, no caso das bactérias gram negativas, a membrana externa constituída por lipopolissacarídeo atua como uma barreira para compostos hidrofóbicos, dificultando a entrada de agentes

antimicrobianos (Kouidhi *et al.*, 2015). Esta característica contribui para uma maior resistência observada em bactérias gram negativas em relação às gram positivas (Stavri *et al.*, 2007).

### 5.1.2. Biofilmes

Os microrganismos podem existir no meio ambiente como células planctónicas ou como comunidades em biofilmes, onde se encontram ligados a uma superfície e estão inseridos numa matriz complexa constituída essencialmente por material exopolimérico (Gandhi and Chikindas, 2007). A formação de biofilmes ocorre essencialmente em três passos: aderência, em que as células chegam à superfície e aderem a essa superfície; crescimento e maturação, em que as células começam a produzir o exopolissacarídeo que constitui a matriz e amadurece de microcolónias a aglomerados de células em multicamadas; e por fim, a formação do biofilme maduro. Como parte do ciclo de desenvolvimento do biofilme natural, as células dentro dos biofilmes maduros produzem compostos que podem induzir a libertação de fragmentos do biofilme e alteração para um estado planctónico. Esta mudança é essencial no processo de dispersão de biofilmes (Penesyan *et al.*, 2015).

Os biofilmes microbianos exibem uma diminuição da taxa de crescimento, variação nos genes transcritos, maior taxa de transferência de genes por conjugação, aumento da produção de exopolissacarídeo e resistência reforçada a agentes antimicrobianos e desinfetantes (Gandhi and Chikindas, 2007). A capacidade de formar biofilmes confere assim uma vantagem para que as bactérias sobrevivam em condições ambientais severas (Mabhiza *et al.*, 2016). Verifica-se que as células de um biofilme são mais resistentes ao calor, secagem, ambientes ácidos, salinidade, agentes antimicrobianos e aos conservantes de alimentos, em comparação com as células planctónicas (Jadhav *et al.*, 2013).

Habitualmente, o foco da descoberta de antibióticos tem sido direcionado na descoberta de compostos que visam mecanismos celulares no modo de crescimento planctónico. Desta forma, muitos antibióticos são menos eficazes contra os microrganismos em biofilmes (Penesyan *et al.*, 2015). Vários mecanismos foram propostos para explicar a resistência aos agentes antimicrobianos do biofilme, incluindo: penetração restrita de agentes antimicrobianos; indução da resposta geral ao stress; diminuição das taxas de crescimento e metabolismo; aumento da expressão das bombas de efluxo com reconhecimento de múltiplos fármacos; ativação de sistemas de *quorum sensing*; e alteração de perfis de proteínas de membrana externa (Kouidhi *et al.*, 2015). Tal facto constitui um problema, uma vez que os biofilmes desempenham um papel importante em muitas infeções (Penesyan *et al.*, 2015). A colonização de dispositivos médicos em hospitais através da adesão microbiana e posterior formação de biofilme pode preceder a bacteremia e a sepsis em pacientes doentes. As infeções sanguíneas relacionadas com o uso do cateter resultam em estadias hospitalares prolongadas, aumento dos custos e podem mesmo resultar em morte (Cobrado *et al.*, 2012).

Por conseguinte, foi realizado o estudo da urze e do feto comum, na sua caracterização fitoquímica e nas suas atividades biológicas, nomeadamente no potencial antioxidante e antimicrobiano.



## Capítulo II

### Objetivo

As plantas têm sido amplamente utilizadas na medicina popular desde o início e, com o aumento da resistência microbiana, a descoberta de novas estratégias para desenvolver novos agentes antimicrobianos tornou-se essencial. A urze e o feto comum são plantas usadas na medicina tradicional como antissépticos e no tratamento de feridas, no entanto, as suas propriedades biológicas, como as propriedades antimicrobianas, são ainda pouco estudadas.

Assim, o objetivo global da presente dissertação passou pela caracterização fitoquímica dos extratos da urze e do feto comum e avaliação da sua capacidade antioxidante e propriedades antimicrobianas. Assim, os objetivos específicos propostos para este trabalho foram:

- Caracterizar fitoquimicamente os extratos brutos metanólicos da urze e do feto comum, relativamente à sua composição em fenóis e em flavonóides totais;
- Analisar a atividade antioxidante dos extratos brutos metanólicos da urze e do feto comum ao nível da sequestração de radicais livres e da oxidação lipídica;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos brutos metanólicos da urze e do feto comum, bem como das respetivas frações sobre bactérias e leveduras;
- Estudar o potencial anti-*Listeria monocytogenes* dos extratos e frações mais ativos em estudo em células planctónicas e em biofilmes, assim como o eventual efeito dos extratos e frações na sobrevivência celular em condições adversas.



# Capítulo III

## Material e Métodos

### 1. Preparação das plantas

As plantas (urze e feto comum) foram colhidas nos meses de maio e junho durante a época de floração no fim da primavera, na região da Cova da Beira. Após 5 dias de secagem ao ar, as partes aéreas foram trituradas com um desintegrador de lâminas e de seguida submetidas a extração com solvente metanol. No caso da urze, as flores secas foram extraídas separadamente com o mesmo solvente.

### 2. Processo de extração

As plantas foram sujeitas a extração com metanol (Fisher Chemical) usando a planta seca ao ar e previamente triturada. A extração foi realizada em banho de ultrassons (Bransonic® Ultrasonic Bath) a 40 °C, durante uma hora, com agitação frequente, usando os métodos descritos por Qi e Parekh e respetivos colaboradores (Parekh *et al.*, 2005; Qi *et al.*, 2015), com algumas modificações. Para tal, pesaram-se 10 g da planta para 200 mL de solvente, ou seja, na proporção de 1:20. Depois da extração, os resíduos foram separados por decantação e sujeitos a uma nova extração, repetindo-se o processo por mais três vezes até a mistura obtida ser quase incolor, juntando as três fases do solvente com o extrato no final.

De forma a retirar as impurezas de resíduo, o solvente com extrato de cada planta foi centrifugado a 7000 × g, durante 20 minutos, a 4 °C (Beckman Coulter Allegra™ 25R Centrifuge). Após centrifugação, os extratos foram concentrados por evaporação do solvente no evaporador rotativo a 40 °C (evaporador rotativo Buchi R-251). Os extratos foram armazenados na arca frigorífica a -20 °C, até serem analisados.

O rendimento da extração foi calculado com base na seguinte fórmula:

$$\% \text{ Rendimento} = \frac{\text{massa final}_{\text{extrato}}}{\text{massa inicial}_{\text{planta}}} \times 100 \quad (1)$$

### 3. Determinação dos fenóis totais

A determinação dos fenóis totais foi efetuada recorrendo ao método colorimétrico de *Folin-Ciocalteu*, seguindo o protocolo usado por Luís *et al.*, 2014. Este método baseia-se na oxidação dos fenóis em meio alcalino, pelo ácido fosfomolibdotúngstico presente no reagente de *Folin-Ciocalteu* (coloração amarela). É efetuada a medição colorimétrica da cor resultante da reação, ou seja, a alteração para azul originada pela oxidação dos fenóis (Cicco *et al.*, 2009).

Primeiramente, procedeu-se à construção de uma curva de calibração a partir de soluções metanólicas de ácido gálico (Acros Organics), utilizado como padrão fenólico. Desta forma, foram preparadas soluções com as seguintes concentrações: 50, 100, 125, 150, 200, 225, 250, 300, 325, 350, 400 e 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A 50  $\mu\text{L}$  das soluções anteriores adicionaram-se 450  $\mu\text{L}$  de água destilada e 2,5 mL de reagente de *Folin-Ciocalteu* 0,2 N (preparado a partir da solução comercial de 2 N por diluição com água destilada) (Sigma-Aldrich). A mistura foi deixada em repouso à temperatura ambiente, durante 5 minutos. Após este tempo, adicionaram-se 2 mL de solução aquosa de carbonato de sódio a 75  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  e colocou-se num banho a 30 °C, durante 90 minutos e com agitação ocasional. O branco foi preparado de igual forma, substituindo apenas os 50  $\mu\text{L}$  iniciais das soluções por 50  $\mu\text{L}$  de metanol. Finalizado o período de incubação, leram-se as absorvâncias das misturas reacionais no espectrofotómetro (Thermo Scientific Evolution 160 UV-Vis) ao comprimento de onda de 765 nm. Todas as determinações foram realizadas em triplicado. Desta forma, construiu-se a curva de calibração, representada na figura 6, em que o eixo das abcissas corresponde às concentrações de ácido gálico ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e o eixo das ordenadas à absorvância a 765 nm.

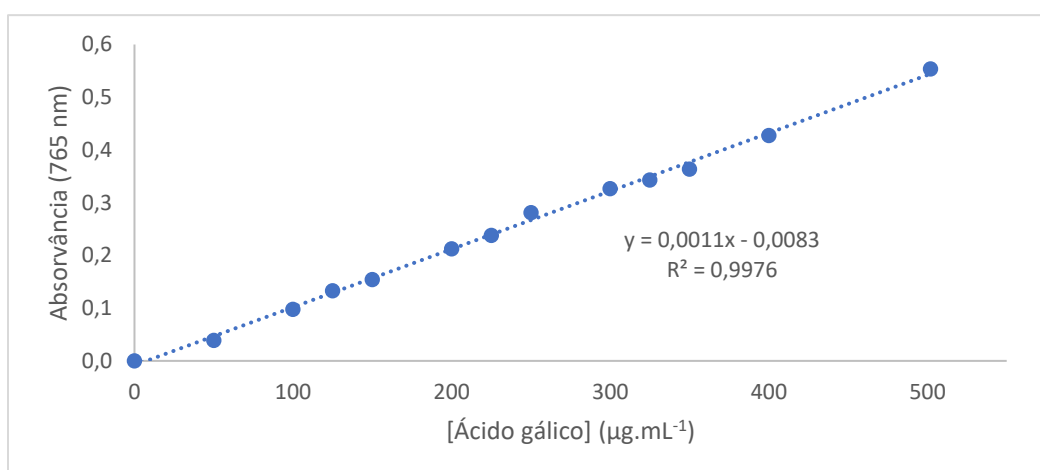


Figura 6 - Curva de calibração utilizada para a determinação dos fenóis totais.

Uma vez feita a curva de calibração, procedeu-se à determinação dos fenóis totais nos extratos. Para tal foi realizado o procedimento anteriormente descrito, substituindo os 50  $\mu\text{L}$  iniciais por 50  $\mu\text{L}$  de cada uma das soluções metanólicas dos extratos, em que a gama de concentrações usada corresponde à gama das concentrações das soluções preparadas para o padrão fenólico. Todas as determinações foram realizadas em triplicado.

O cálculo da quantidade de fenóis totais em cada extrato foi feito recorrendo à equação da curva de calibração, sendo que o resultado é apresentado em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de matéria seca.

## 4. Determinação dos flavonóides totais

A determinação dos flavonóides totais foi efetuada recorrendo ao método colorimétrico do cloreto de alumínio, seguindo o protocolo descrito por Luís *et al.*, 2014. Este método baseia-se na formação de complexos do ião  $Al^{3+}$  proveniente do cloreto de alumínio com os flavonóides, resultando numa cor amarela intensa (Fernandes *et al.*, 2012).

Primeiramente procedeu-se à construção de uma curva de calibração a partir de soluções metanólicas de quercetina (Sigma-Aldrich), usada como padrão, com as seguintes concentrações: 12,5; 30; 50; 70; 100; 130; 150 e 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A 500  $\mu\text{L}$  das soluções anteriores adicionaram-se 1,5 mL de metanol, 0,1 mL de solução aquosa de cloreto de alumínio 10 % (Scharlau), 0,1 mL de solução aquosa de acetato de potássio 1 M (Fisher Chemical) e 2,8 mL de água destilada. A mistura foi deixada em repouso à temperatura ambiente durante 30 minutos, com agitação ocasional. O branco foi preparado de igual forma, substituindo os 500  $\mu\text{L}$  de solução padrão por 500  $\mu\text{L}$  de metanol. Finalizado o período de incubação, leram-se as absorvâncias das misturas reacionais no espectrofotómetro (Thermo Scientific Evolution 160 UV-Vis) ao comprimento de onda de 415 nm. Todas as determinações foram realizadas em triplicado. Assim sendo, foi possível elaborar a curva de calibração, em que no eixo das abcissas se encontram as concentrações de quercetina ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e no eixo das ordenadas a absorvância a 415 nm, tal como representado na figura 7.

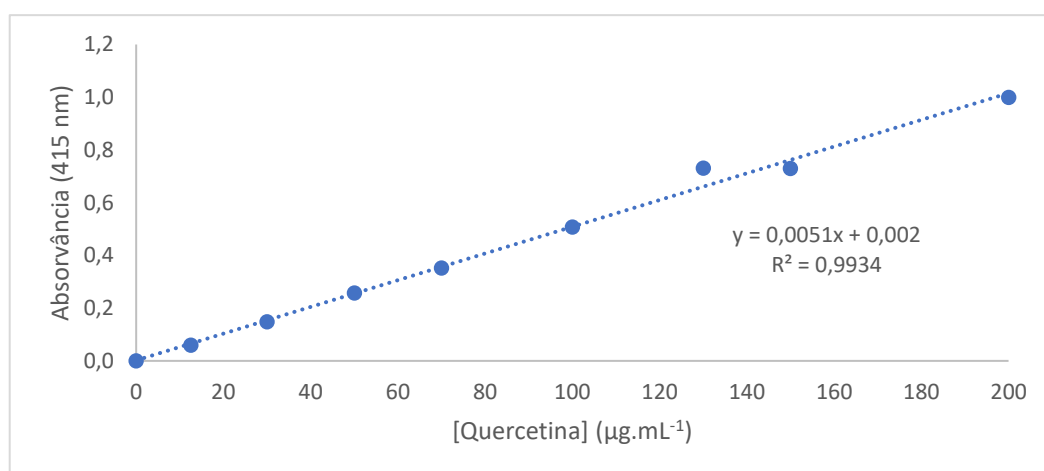


Figura 7 - Curva de calibração utilizada para a determinação dos flavonóides totais.

Uma vez feita a curva de calibração, procedeu-se à determinação da concentração de flavonóides totais nos extratos. Para tal seguiu-se o procedimento descrito anteriormente, substituindo os 500  $\mu\text{L}$  iniciais por 500  $\mu\text{L}$  de cada uma das soluções metanólicas dos extratos, com igual gama de concentrações às soluções preparadas para a quercetina. Todas as determinações foram realizadas em triplicado.

O cálculo da quantidade de flavonóides em cada extrato foi feito recorrendo à equação da curva de calibração e o resultado é apresentado em miligramas de equivalentes de quercetina por gramas de matéria seca.

## 5. Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada por dois métodos: método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) e pelo método que usa o sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.

### 5.1. Método do DPPH

Este método baseia-se na sequestração do DPPH (radical livre estável que reage com compostos doadores de um átomo de hidrogénio), através da adição de uma espécie radical ou um antioxidante, dando origem à diminuição da intensidade de cor da solução de DPPH. Assim, a atividade antioxidante é medida espectralmente pela diminuição da cor (Krishnaiah *et al.*, 2011).

Para a determinação da atividade antioxidante segundo o método do DPPH foi seguido o protocolo usado por Luís *et al.*, 2014, foi necessária a construção de uma curva de calibração. Deste modo, preparou-se uma solução mãe de DPPH (Sigma-Aldrich) em metanol, de concentração  $85,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$  ou  $0,217 \text{ mM}$ , a partir da qual se prepararam soluções com as concentrações representadas na tabela 2.

Tabela 2 - Concentrações das soluções de DPPH em metanol usadas para a construção da curva de calibração, em mM e em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

[DPPH] (mM)	[DPPH] ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
0,00	0,00
0,01	4,28
0,02	8,56
0,04	17,11
0,07	25,67
0,09	34,23
0,11	42,78
0,13	51,34
0,15	59,90
0,17	68,45
0,20	77,01
0,22	85,57

As absorvâncias das soluções preparadas foram lidas no espectrofotômetro (Thermo Scientific Evolution 160 UV-Vis) ao comprimento de onda de 517 nm, contra o ensaio em branco que contém apenas metanol. As leituras foram feitas em triplicado. Após a medição de todas as absorvâncias, construiu-se assim a curva de calibração que representa a absorvância em função da concentração de DPPH ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), representada no gráfico da figura 8.

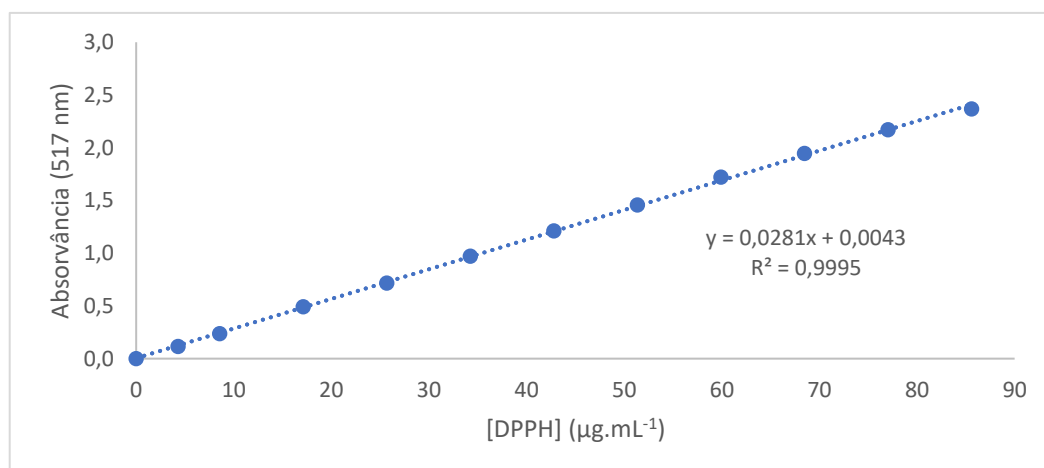


Figura 8 - Curva de calibração utilizada para a determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH.

De forma a determinar a atividade antioxidante dos extratos, foram preparadas três soluções de DPPH em metanol com as concentrações de 0,08, 0,12 e 0,20 mM. Cada extrato foi pesado e misturado com metanol, de forma a obter soluções com seguintes concentrações: 25, 50, 100, 150, 200 e 250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Feito isto, para cada solução de DPPH e para cada concentração de cada extrato, adicionaram-se 3,9 mL de solução de DPPH a 0,1 mL de amostra. Esta mistura foi colocada em incubação durante 90 minutos à temperatura ambiente, no escuro. Foi preparado um controlo para cada solução de DPPH, em que os 0,1 mL de amostra foram substituídos por 0,1 mL de metanol. Após o período de incubação, leram-se as absorvâncias das misturas reacionais a 517 nm. As absorvâncias foram lidas contra um branco que continha apenas metanol. Todos os ensaios foram realizados em triplicado. O cálculo da percentagem de inibição (% I) foi efetuado de acordo com a seguinte equação:

$$\% I = \frac{Abs_0 - Abs_1}{Abs_0} \times 100 \quad (2)$$

Na equação  $Abs_0$  corresponde à absorvância do controlo e  $Abs_1$  à absorvância da amostra, ambas aos 90 minutos.

Na determinação da atividade antioxidante através deste método foram utilizados determinados compostos antioxidantes que funcionaram como controlos positivos, os quais foram submetidos ao mesmo processo que as amostras de extrato. Os compostos antioxidantes usados foram a rutina (50, 100, 200, 300, 400 e 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), trolox (5, 10, 25, 50 e 75  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e ácido gálico (10, 25, 50, 75, 100 e 150  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), preparados em metanol.

Os resultados da atividade antioxidante avaliada por este método são representados pela concentração de amostra necessária para promover 50% de inibição ( $IC_{50}$ ) do radical livre do DPPH, índice de atividade antioxidante (AAI) e respetivo potencial antioxidante. Como exemplo do cálculo para os valores de  $IC_{50}$  e de AAI são apresentados os cálculos realizados para o extrato bruto metanólico da urze. Assim, de seguida encontram-se os gráficos da percentagem de inibição (% I) em função da concentração de extrato bruto da urze na célula espectrofotométrica, para as três concentrações de DPPH (figuras 9, 10 e 11). A partir das retas traçadas foi possível calcular os parâmetros antioxidantes ( $IC_{50}$  e AAI), para cada concentração de DPPH. Os resultados apresentados no Capítulo IV no ponto 3.1. (tabela 7) tiveram por base a média de  $IC_{50}$  e AAI das três concentrações de DPPH (tabelas 3, 4 e 5). Os restantes cálculos, para o extrato bruto das flores da urze e do feto comum, assim como para os três padrões (rutina, trolox e ácido gálico) são apresentados no anexo I.

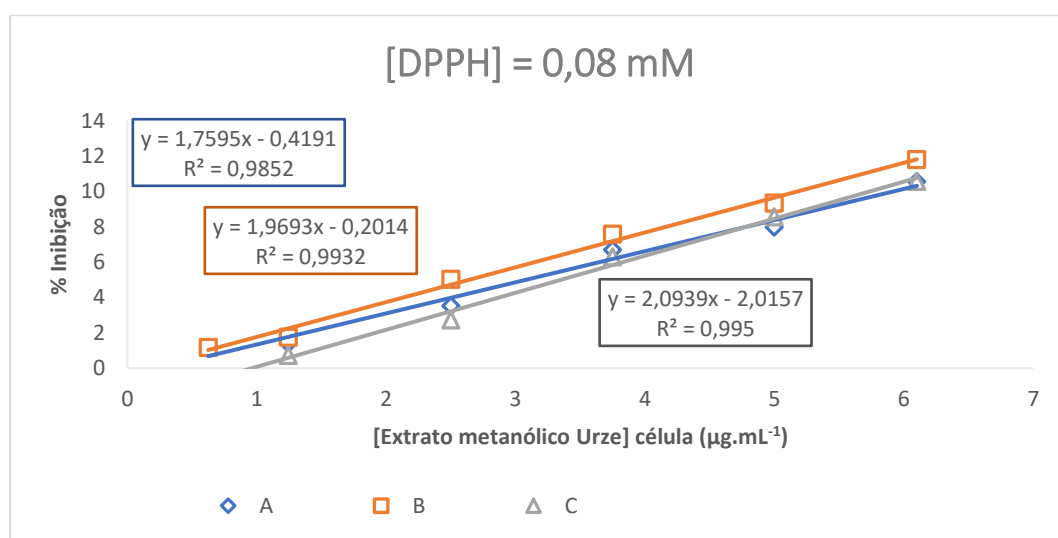


Figura 9 - Percentagem de inibição (% I) do extrato bruto metanólico da urze para a solução de DPPH 0,08 mM. A, B e C correspondem ao triplicado dos ensaios.

Tabela 3 -  $IC_{50}$  e AAI do extrato bruto metanólico da urze para a solução de DPPH 0,08 mM. A, B e C correspondem ao triplicado dos ensaios.

[DPPH] = 0,08 mM				
	A	B	C	Média ± desvio padrão
$IC_{50}$ ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	28,7	25,5	24,8	26,3 ± 2,0
AAI	1,1	1,2	1,2	1,1 ± 0,1

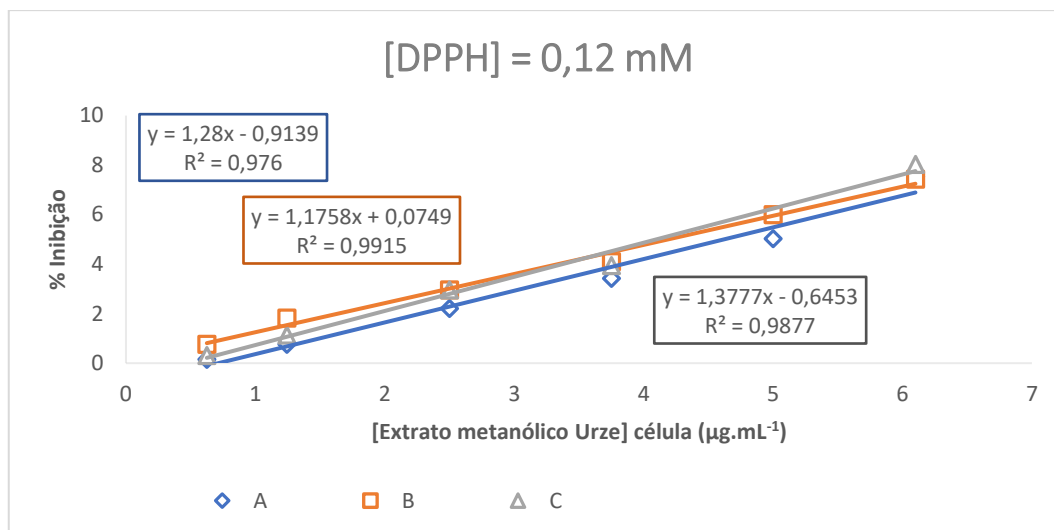


Figura 10 - Percentagem de inibição (% I) do extrato bruto metanólico da urze para a solução de DPPH 0,12 mM. A, B e C correspondem ao triplicado dos ensaios.

Tabela 4 - IC<sub>50</sub> e AAI do extrato bruto metanólico da urze para a solução de DPPH 0,12 mM. A, B e C correspondem ao triplicado dos ensaios.

[DPPH] = 0,12 mM				
	A	B	C	Média ± desvio padrão
IC <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	39,8	42,5	36,8	39,7 ± 2,9
AAI	1,2	1,1	1,3	1,2 ± 0,1

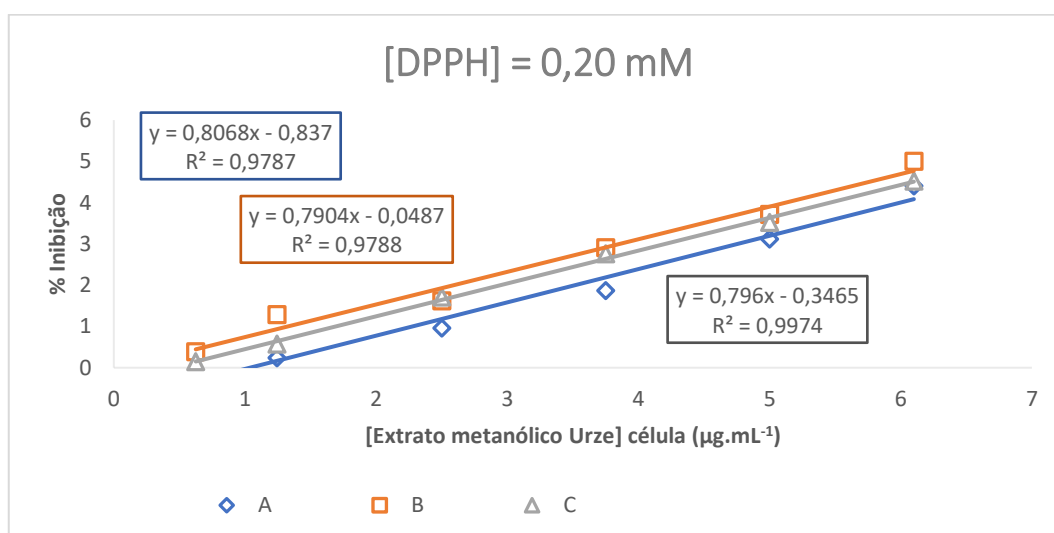


Figura 11 - Percentagem de inibição (% I) do extrato bruto metanólico da urze para a solução de DPPH 0,20 mM. A, B e C correspondem ao triplicado dos ensaios.

Tabela 5 - IC<sub>50</sub> e AAI do extrato bruto metanólico da urze para a solução de DPPH 0,20 mM. A, B e C correspondem ao triplicado dos ensaios.

[DPPH] = 0,20 mM				
	A	B	C	Média ± desvio padrão
IC <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	63,0	63,2	63,2	63,2 ± 0,2
AAI	1,2	1,2	1,2	1,2 ± 0,0

## 5.2. Método do sistema β-caroteno/ácido linoleico

Este método baseia-se na capacidade de os compostos antioxidantes presentes em extratos de plantas inibirem a formação do radical peróxido proveniente da degradação oxidativa do ácido linoleico. Este radical quando formado oxida o β-caroteno, diminuindo a intensidade de cor da emulsão (Krishnaiah *et al.*, 2011).

A determinação da atividade antioxidante usando o sistema β-caroteno/ácido linoleico teve por base o método usado por Luís *et al.*, 2014 com algumas modificações. Inicialmente foi necessária a preparação de duas emulsões: uma para o branco e outra para a amostra. A emulsão do branco foi preparada adicionando a um balão de fundo redondo 500 µL de clorofórmio (Absolve®), 40 µL de ácido linoleico (Fluka), 400 mg de Tween 40 (Scharlau) e 1 mL de clorofórmio. Para a preparação da emulsão para a amostra procedeu-se de igual forma, substituindo os 500 µL de clorofórmio iniciais por 500 µL de solução de β-caroteno (Sigma-Aldrich) (20 mg.mL<sup>-1</sup> preparada em clorofórmio). Ambas as misturas foram homogeneizadas e sujeitas a evaporação no evaporador rotativo a 45 °C, durante 5 minutos, permitindo a evaporação do clorofórmio. Terminado este passo, adicionaram-se 100 mL de água destilada saturada com oxigénio a cada emulsão, com agitação vigorosa e contínua. A absorvância da emulsão da amostra foi lida no espectrofotómetro (Thermo Scientific Evolution 160 UV-Vis) contra a emulsão do branco, a 470 nm.

Na determinação da atividade antioxidante dos extratos prepararam-se diferentes diluições de cada amostra em metanol (5, 50, 100, 250, 500, 750 e 1000 µg.mL<sup>-1</sup>). Após todas as diluições realizadas, adicionaram-se, a um tubo de ensaio, 5 mL de emulsão que contém β-caroteno e 300 µL de amostra. O mesmo procedimento foi usado para a determinação da atividade antioxidante do antioxidante sintético BHT (Acros Organics), usado como controlo positivo da atividade antioxidante. Para cada amostra é necessário elaborar um ensaio em branco e um ensaio controlo. O ensaio em branco consiste em adicionar a um tubo de ensaio 5 mL da emulsão preparada para o branco e 300 µL de metanol, e o ensaio que funciona como controlo é preparado adicionando a um tubo de ensaio 5 mL da emulsão que contém β-caroteno e 300 µL de metanol. No fim de todos os tubos de ensaio de ensaio preparados, procedeu-se à incubação

destes num banho a 50 °C, durante uma hora. Terminado o tempo, as absorvâncias foram lidas a 470 nm contra o ensaio em branco. Todos os ensaios foram feitos em duplicado.

A atividade antioxidante é representada sob a forma de percentagem de inibição (%I), e o cálculo foi efetuado segundo a seguinte fórmula:

$$\% I = \frac{Abs_{amostra}^{t=1} - Abs_{controle}^{t=1}}{Abs_{controle}^{t=0} - Abs_{controle}^{t=1}} \times 100$$

Em que  $Abs_{amostra}^{t=1}$  corresponde à absorvância da amostra após uma hora de incubação,  $Abs_{controle}^{t=0}$  corresponde à absorvância inicial do controlo e  $Abs_{controle}^{t=1}$  corresponde à absorvância do controlo após uma hora de incubação.

As percentagens de inibição foram representadas graficamente em função das respetivas concentrações.

## 6. Fracionamento dos extratos

A partir dos extratos brutos metanólicos realizou-se uma separação, de forma a obter frações que contenham compostos dentro de uma determinada gama de polaridade. Assim, o extrato bruto foi sujeito a uma passagem sucessiva de solventes de polaridade crescente. O procedimento foi baseado no método de partição de *Charaux-Paris*, descrito por Pinho e Silva, e respetivos colaboradores, com modificações (Pinho *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2012).

Desta forma, a 1 g de extrato bruto adicionou-se 50 mL de n-hexano (fração 1), procedendo-se a centrifugação a 5500 x g, durante 20 minutos, a 4 °C (Beckman Coulter Allegra™ 25R Centrifuge). Sob o resíduo repetiu-se o procedimento por mais duas vezes. De seguida foi usado éter dietílico (fração 2), e realizado o mesmo processo, regulando a velocidade da centrífuga para 7000 x g. Por fim, usou-se água destilada (fração 3) ajustando a velocidade para 12000 x g. O processo com a água destilada permitiu a formação da fração 3, que consiste na fração que solubilizou em água. A fração não solúvel corresponde à fração 4 (figura 12). Após cada centrifugação e após nova adição de solvente, os tubos foram sujeitos a sonicação e a agitação no vortex. As frações 1 e 2 foram concentradas por evaporação do solvente no evaporador rotativo a 40 °C, e as frações 3 e 4 foram liofilizadas (Scanvac CoolSafe 55-9 PRO freeze dryer).

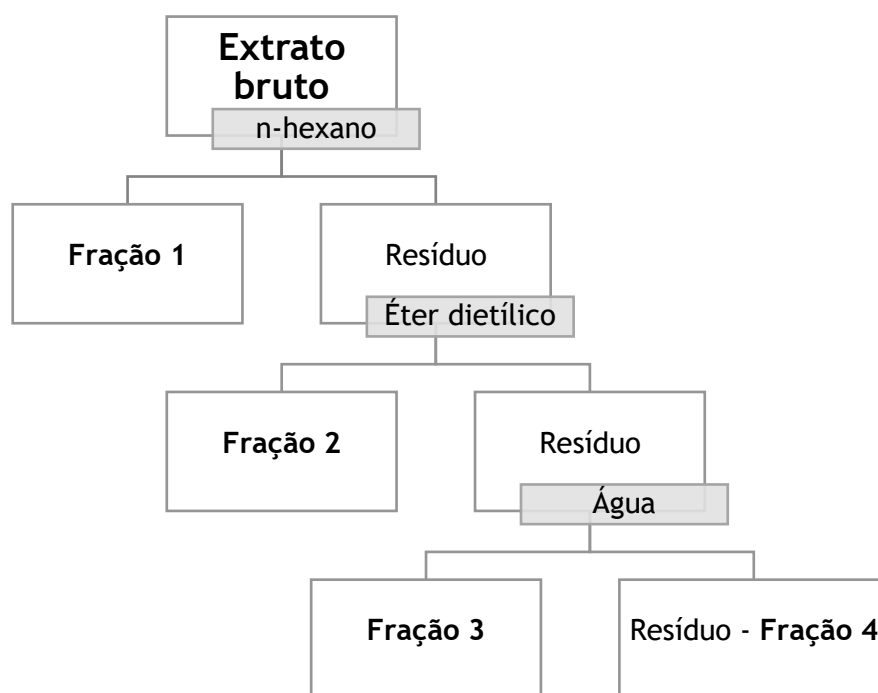


Figura 12 - Esquema representativo do fracionamento do extrato bruto.

## 7. Cromatografia em camada fina (TLC)

Os extratos brutos metanólicos e respectivas frações foram analisados por Cromatografia em Camada Fina (do inglês *Thin Layer Chromatography* - TLC) segundo o método usado por Luís *et al.*, 2016 com algumas modificações, usando placas de sílica-gel (TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub> - Merck). Os extratos brutos e frações foram dissolvidos em metanol e foram aplicadas alíquotas destes nas placas de TLC. Foram utilizadas como fases móveis as seguintes misturas de solventes: clorofórmio/acetato de etilo 1:1, acetato de etilo/metanol 1:1, clorofórmio/acetato de etilo 10:4 e clorofórmio/ acetato de etilo 4:10. Após a eluição, as placas foram visualizadas sob luz visível e na câmara reveladora de ultravioleta (254 e 365 nm) (CN-15.LC).

As placas eluídas em clorofórmio/acetato de etilo 4:10 foram reveladas com reagente de *Folin-Ciocalteu* (0,2 N) para observação da existência de compostos fenólicos, e com reagente de DPPH (40 µg.mL<sup>-1</sup>) para observação da existência de compostos com atividade antioxidante.

## 8. Determinação da atividade antimicrobiana

### 8.1. Microrganismos e extratos de plantas usados e condições de armazenamento

A atividade antimicrobiana dos extratos e respectivas frações foi avaliada para quatro bactérias gram positivas (*Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Listeria monocytogenes* LMG 16779), cinco gram negativas (*Escherichia*

*coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Acinetobacter baumannii* LMG 1025, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311) e também para duas leveduras (*Candida albicans* ATCC 90028 e *Candida tropicalis* ATCC 750). A estirpe de *L. monocytogenes* foi obtida da coleção BCCM/LMG (Bélgica) e as restantes estirpes da coleção americana “*American Type Culture Collection*” (ATCC).

O armazenamento a longo prazo dos microrganismos usados foi feito a -80 °C em tubos criogénicos com meio *Brain Heart Infusion* (BHI, Liofilchem) para bactérias ou *Yeast Peptone Dextrose* (YPD) (20 g.L<sup>-1</sup> peptona bacteriológica, 20 g.L<sup>-1</sup> extrato de levedura e 20 g.L<sup>-1</sup> glucose, em água destilada) para leveduras, com glicerol a 20 % (v/v). Todas as estirpes foram cultivadas em meio sólido adequado antes de cada ensaio, sendo que aquando da utilização a partir da cultura armazenada a -80 °C foram repicadas duas vezes antes do seu uso em ensaios. Para armazenamento a curto prazo, as estirpes repicadas em meio sólido foram conservadas no frigorífico a 4 °C envolta de película aderente durante um máximo de 7 dias para bactérias e 14 dias para leveduras, sendo repicadas para meio sólido e incubadas nas condições adequadas para posterior utilização.

Os extratos brutos e respetivas frações (de 1 a 4), obtidos no ponto 2 e 6, foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO, Fisher Chemical) a uma concentração de 100 mg.mL<sup>-1</sup>, e conservados no frigorífico a 4 °C, protegidos da luz.

## **8.2. Teste de suscetibilidade a antimicrobianos por difusão em disco**

### **8.2.1. Para bactérias**

Neste teste foram testados os extratos brutos permitindo assim a monitorização da existência de atividade antibacteriana (para quatro bactérias gram negativas e cinco gram positivas). O teste foi realizado segundo a norma M2-A8 recomendada pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) (NCCLS, 2003).

O meio de cultura usado neste ensaio foi o meio *Müller-Hinton* agar, preparado pela adição de agar (Biokar) a 15 g.L<sup>-1</sup> ao meio *Müller-Hinton broth* (MHB) (Fluka) e foram utilizados discos de celulose estéreis de 6 mm de diâmetro (Filtres Fioroni). A cada disco foram aplicados 20 µL de extrato bruto dissolvido em DMSO (100 mg.mL<sup>-1</sup>), correspondendo a 2000 µg de extrato por disco. Os discos foram colocados na superfície da placa previamente inoculada com suspensão celular. Como controlo negativo foi usado um disco carregado com 20 µL de DMSO. A suspensão celular foi preparada em solução salina estéril (NaCl 0,85%) (Fisher Chemical), por suspensão direta de colónias isoladas de cada bactéria, selecionadas de uma cultura em *Mueller-Hinton* agar (MHA) com 18-24 horas de crescimento. Para *Listeria monocytogenes* LMG 16779 o procedimento foi igual à exceção do meio cultura, em que se usou o meio *Brain Heart Infusion* agar (BHIA), preparado pela adição de agar a 15 g.L<sup>-1</sup> a *Brain Heart Infusion Broth* (BHI)

(Liofilchem). A turbidez da suspensão foi medida num densitómetro (BioSan DEN-1B) e ajustada para de 0,5 na escala de *McFarland* (McF). Uma vez ajustada a suspensão, mergulhou-se uma zaragatoa nesta e inocularam-se as placas de teste. De seguida, aplicaram-se os discos carregados às placas inoculadas e incubaram-se a 37 °C. As placas foram analisadas após 16-18 horas de incubação, e mediram-se os diâmetros dos halos de inibição, em milímetros, com o auxílio de um paquímetro, considerando como halo de inibição área total sem crescimento detetável a olho nu. Foram realizados três ensaios independentes e foi calculada a média e desvio padrão dos halos de inibição formados.

### **8.2.2. Para leveduras**

Neste teste foram testados os extratos brutos, permitindo a monitorização da existência de atividade antifúngica (para duas leveduras). O teste foi realizado segundo a norma CLSI M44A recomendada pelo *Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI)*, com algumas modificações (Rex *et al.*, 2009).

O teste de suscetibilidade por difusão para leveduras seguiu um protocolo semelhante ao descrito anteriormente para bactérias. Contudo, neste procedimento foi usado o meio de cultura *Sabouraud dextrose* agar (SDA) (Oxoid) e as placas foram analisados ao fim de 48 horas. Foram realizados três ensaios independentes e foi calculada a média dos halos de inibição formados.

## **8.3. Avaliação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) por método de microdiluição em meio líquido**

### **8.3.1. Para bactérias**

Neste teste foram testadas as atividades antimicrobianas dos extratos brutos e respetivas frações contra as quatro bactérias gram negativas e as cinco gram positivas, seguindo-se a norma M7-A6 do NCCLS (NCCLS, 2005).

O ensaio foi efetuado numa placa de 96 poços em que os extratos brutos ou respetivas frações, obtidas no ponto 2 e 6, a testar como agente antimicrobiano foram diluídos em meio de cultura. O meio de cultura usado foi MHB à exceção da *Listeria monocytogenes* LMG 16779 em que se usou o meio *Brain Heart Infusion* (BHI).

Assim, em microplaca foi adicionado o meio de cultura seguido da adição do extrato ou respetivas frações dissolvidos em DMSO e foram efetuadas diluições sucessivas num volume de 50 µL, obtendo concentrações finais numa gama de 15,6 a 2000 µg.mL<sup>-1</sup>, para um volume final de ensaio de 100 µL. O inóculo bacteriano foi preparado em solução salina estéril (NaCl 0,85%), por suspensão direta de colónias isoladas selecionadas de uma cultura em meio sólido (BHIA para a *L. monocytogenes* LMG 16779 e MHA para as restantes bactérias), com 18-24 horas de

incubação. Esta suspensão foi ajustada para uma turbidez de 0,5 na escala de McF, que corresponde a cerca de  $1 a 2 \times 10^8$  Unidades Formadoras de Colónias (UFC) por mL. A suspensão foi diluída em meio de cultura adequado (BHI para a *L. monocytogenes* LMG 16779 e MHB para as restantes bactérias) e adicionados 50 µL das suspensões à placa de forma a obter a concentração celular final de aproximadamente  $5 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

Em cada ensaio foram realizados quatro controlos: controlo de toxicidade do solvente para as estirpes usando a concentração máxima de DMSO testada, ou seja, 2%; controlo de esterilidade do composto, que consistiu na solução do extrato bruto ou respetivas frações diluídas em meio de cultura; controlo de crescimento da estirpe, com meio de cultura e suspensão celular; e controlo de esterilidade do meio de cultura, que conteve apenas meio de cultura.

Por fim, a placa foi colocada na estufa a 37 °C e foi analisada após 16-18 horas de incubação. Após incubação, as placas foram analisadas para a presença de crescimento a olho nu, sendo esta confirmada por posterior análise colorimétrica. Assim, foram adicionados a todos os poços 30 µL de solução de resazurina 0,01 % (p/v) (Sigma-Aldrich) preparada com água ultrapura estéril. No fim da adição, a placa foi reincubada por mais duas horas a 37 °C. A solução de resazurina (de coloração azul) permitiu verificar a presença de atividade metabólica por parte da bactéria pela alteração da cor para rosa/roxo. A Concentração Mínima Inibitória (CMI) foi considerada com a concentração na qual não se detetou crescimento a olho nu e confirmada pela manutenção da cor azul no ensaio colorimétrico (Chuah *et al.*, 2014).

Os ensaios foram realizados em duplicado e em três ensaios independentes, e foi considerada como CMI a moda dos valores obtidos.

### **8.3.2. Para leveduras**

Neste teste foram testados os extratos brutos e respetivas frações contra as duas estirpes de leveduras. O procedimento usado seguiu a norma M27-A2 do NCCLS (NCCLS, 2002).

A avaliação da CMI para leveduras seguiu um protocolo semelhante ao descrito anteriormente para bactérias. O meio de cultura usado foi o *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640, e foi testada a mesma gama de concentrações de extrato bruto e respetivas frações que no ponto 8.2.1., obtidas por diluições sucessivas em meio RPMI 1640, para um volume final de 200 µL. O inóculo foi preparado em solução salina estéril (NaCl 0,85%), por suspensão direta de colónias isoladas, selecionadas de uma cultura em placa de SDA com 24 horas de incubação. A suspensão foi ajustada para 0,5 McF, que corresponde, no caso das leveduras, a cerca de  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>, e diluída em RPMI 1640 de forma a obter a concentração final na placa de  $5 \times 10^2$  a  $2,5 \times 10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Em cada ensaio foram realizados os mesmos controlos mencionados anteriormente para as bactérias. Por fim, a placa foi colocada na estufa a 37 °C e foi efetuada a sua análise após 48 horas de incubação. Foi considerado o valor CMI correspondente à ausência de crescimento, ou seja, no qual não foi visível qualquer formação de colónias ou turbidez a olho nu.

Os ensaios foram realizados em duplicado e em três ensaios independentes, e foi considerada como CMI a moda dos valores obtidos.

#### **8.4. Bioautografia direta**

A bioautografia direta é uma técnica usada para detetar compostos com atividade antimicrobiana, diretamente na placa cromatográfica em que é feita a separação dos extratos brutos e respetivas frações e na qual é aplicada uma cultura microbiana. (Suleiman *et al.*, 2010).

Os extratos brutos e respetivas frações foram analisados por TLC segundo o procedimento já descrito no ponto 6. Após a eluição das placas em acetato de etilo/clorofórmio numa proporção de 4:10, estas foram submetidas a bioautografia usando culturas de bactérias e leveduras para as quais os extratos e frações tinham apresentado atividade antimicrobiana. Assim, as placas eluídas foram mergulhadas em suspensão celular por 10 segundos. Esta suspensão foi preparada a partir da suspensão direta de colónias isoladas em solução salina, com turbidez ajustada a 0,5 McF, seguida por diluição 1:10 em meio MHB no caso das bactérias (à exceção de *L. monocytogenes* em que se usou meio BHI), e em meio RPMI 1640 para as leveduras.

Posteriormente, as placas inoculadas com bactérias foram colocadas em placas de meio sólido MHA (exceto *L. monocytogenes* em que se usaram placas de BHIA) e incubadas a 37 °C, durante 18 horas. Terminado o período de incubação, as placas foram pulverizadas com solução de brometo de metiltiazolildifenil-tetrazólio (MTT, Sigma-Aldrich) a 0,2 % (p/v) com 1 gota Triton X-100 por 100 mL solução, sendo posteriormente incubadas a 37 °C durante 30 minutos (Luís *et al.*, 2016 com modificações).

As placas inoculadas com leveduras foram colocadas em placas de meio sólido SDA e incubadas a 37 °C durante duas horas, sendo no fim do tempo pulverizadas com a solução de MTT descrita anteriormente e incubadas por mais 12 horas (Shai *et al.*, 2008 com modificações).

Terminados os períodos de incubação, as placas foram analisadas. As zonas em que se observou coloração amarelada correspondem à presença de compostos com atividade antimicrobiana.

#### **8.5. Ensaio de curvas de morte**

O ensaio de curvas de morte foi realizado segundo o protocolo de Duarte *et al.*, 2013 com modificações. O efeito do extrato bruto e frações com maior atividade antimicrobiana foi avaliado no crescimento de *Listeria monocytogenes* LMG 16779.

Desta forma, a partir de uma cultura de *L. monocytogenes* LMG 16779 em meio sólido (BHIA) com 24 horas, retirou-se uma colónia e suspendeu-se em 20 mL de meio líquido BHI. Esta cultura foi incubada a 37 °C, 250 rotações por minuto (rpm), durante 16 horas. A Densidade Ótica (DO) da cultura foi lida no espectrofotómetro (UV-1700 PharmaSpect, UV-VIS Spectrophotometer,

Schimadzu) ao comprimento de onda de 600 nm e foi acertada com meio de cultura a uma  $DO_{600nm}$  de 0,01. Previamente foi estabelecida uma correlação entre  $DO_{600nm}$  e respectivas  $UFC.mL^{-1}$ , através da realização de diluições sucessivas da cultura e contagem das  $UFC.mL^{-1}$ . Em tubos com tampa de 2 mL, os extratos foram diluídos em meio BHI com as concentrações finais de 0,5x, 1x, 2x e 4x CMI e foram adicionados 100  $\mu L$  da suspensão celular, originando uma concentração final de correspondente a  $1,5-2,6 \times 10^6 UFC.mL^{-1}$ , num volume final de 1 mL. Durante o ensaio foi realizado o controlo de crescimento (meio de cultura com suspensão celular) e o controlo de toxicidade do DMSO para a estirpe, com a maior concentração de DMSO usada em teste (meio de cultura com 2% (v/v) DMSO e a suspensão celular). Todos os tubos foram colocados em incubação a 37 °C, em condições estáticas. O crescimento bacteriano foi avaliado por recolha de amostras de 20  $\mu L$  às 0, 2, 4, 6, 8 e 24 horas de incubação. A estas amostras foram realizadas diluições sucessivas decimais em microplaca de 96 poços, usando solução de NaCl 0,85%, e de cada poço de cada diluição retiraram-se 10  $\mu L$  e colocaram-se em placas de meio sólido BHIA, em triplicado. As placas foram incubadas a 37 °C e ao fim de 24 horas contaram-se as colónias, permitindo o cálculo das  $UFC.mL^{-1}$ , segundo a seguinte fórmula:

$$UFC.mL^{-1} = \frac{Média\ nº\ colónias \times Fator\ diluição}{Volume\ aplicado} \quad (3)$$

As medições foram realizadas em quatro ensaios independentes.

## 8.6. Ensaio de inibição da formação de biofilmes

Este ensaio permitiu a avaliação do efeito dos extratos e frações com maior atividade na formação de biofilmes de *Listeria monocytogenes* LMG 16779 e teve por base os métodos de Stepanović *et al.* (2004) e Jadhav *et al.* (2013), com modificações.

Assim, a partir de cultura com crescimento de 24 horas da estirpe em BHIA, retirou-se uma colónia e suspendeu-se em 20 mL de meio líquido BHI. Esta cultura foi incubada a 37 °C, 250 rpm, durante 16 horas. A partir desta cultura acertou-se a  $DO_{600nm}$  com meio líquido de forma a ter a concentração final de  $1 \times 10^9 UFC.mL^{-1}$  no ensaio. Posteriormente, em microplaca de 96 poços, procedeu-se a diluições sucessivas do extrato e frações em BHI de forma a obter as concentrações finais de 4x, 2x, 1x, 0,5x e 0,25x CMI. De seguida adicionaram-se 100  $\mu L$  da suspensão celular com a  $DO_{600nm}$  ajustada a 0,7, permitindo obter a concentração celular desejada no poço, num volume total de 200  $\mu L$ . Foi realizado o controlo de toxicidade de DMSO com a concentração máxima de DMSO em meio usada no ensaio (2% (v/v)), controlo de crescimento para a estirpe e controlo negativo. De seguida as placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas, sem agitação.

Terminado o tempo de incubação, o meio foi removido e os poços foram lavados duas vezes com 200  $\mu L$  de água destilada. De seguida, o biofilme foi fixado com 200  $\mu L$  de metanol durante 15 minutos, após remoção do metanol a placa foi deixada secar ao ar. Uma vez fixado o biofilme, procedeu-se ao passo da coloração, adicionando 200  $\mu L$  de violeta de cristal (Amresco)

a 1% (p/V) dissolvido em água com 2% (v/v) etanol e incubando durante 5 minutos. O violeta de cristal foi removido e todos os poços foram lavados três vezes com 300 µL de água destilada. No fim das lavagens deixou-se secar a placa e o corante ligado ao biofilme foi ressolubilizado com 200 µL de ácido acético glacial (Chem-Lab) a 33% (v/v). Do conteúdo das placas retiraram-se 125 µL e transferiram-se para uma nova placa e foi feita a leitura a um comprimento de onda de 570 nm no leitor de microplacas (EZ Read 400 Microplate Reader BioChrom).

Os ensaios foram realizados em quadruplicado em cinco ensaios independentes.

## 8.7. Avaliação da tolerância a condições adversas

Neste ensaio, foi avaliada a influência de uma incubação com concentração subinibitória do extrato e frações com maior atividade na tolerância de *Listeria monocytogenes* LMG 16779 a pH ácido (2,4) e a temperaturas elevadas (55 °C). Para tal, foi seguido o protocolo de Oliveira, Domingues and Ferreira (2017), com algumas modificações.

Inicialmente, procedeu-se uma cultura *overnight* a 37 °C, 250 rpm, durante 16 horas, por suspensão de uma colónia selecionada de cultura em BHIA com 24 horas. A partir desta cultura preparou-se a suspensão celular a adicionar à pré-incubação com extrato e frações a usar nos ensaios posteriores. Esta pré-incubação foi preparada em tubos aos quais foram adicionados 2700 µL de extrato diluído em meio líquido na concentração de 0,5x CMI, seguida da adição de 300 µL da suspensão celular com aproximadamente  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>, correspondendo a uma DO<sub>600nm</sub> de 0,02, acertada por diluição em meio líquido. Foi avaliado também o efeito do DMSO na concentração máxima usada em teste (2% (v/v)), funcionando como controlo. Todos os tubos foram incubados a 37 °C, durante 18 horas. No fim do tempo de incubação, as células foram recolhidas por centrifugação a 8000 × g, 4 °C, por 5 minutos (Hettich Mikro 200R). Após remoção do sobrenadante, as células foram lavadas uma vez com BHI e suspensas em meio de forma a obter a concentração de  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

### 8.7.1. Ensaio do desafio de pH

Para a avaliação da influência dos extratos à tolerância de *L. monocytogenes* a pH ácido, foram adicionados 30 µL da suspensão preparada anteriormente a 2970 µL de meio BHI acidificado com ácido clorídrico até pH 2,4, procedendo-se então a incubação a temperatura ambiente durante uma hora.

A contagem de células viáveis foi realizada por recolha de amostras aos 0 e aos 60 minutos, realizando-se diluições sucessivas decimais em microplaca de 96 poços com tampão fosfato salino (do inglês *phosphate buffer saline* - PBS), seguida da aplicação de gotas de 10 µL de cada amostra em meio BHIA. As placas foram incubadas a 37 °C, procedendo-se à contagem da UFC, 24 horas depois. Cada ensaio foi realizado em três dias independentes.

### **8.7.2. Ensaio do desafio de Calor**

Para a análise do efeito da tolerância de *L. monocytogenes* a temperaturas elevadas, foram adicionados 30 µL da mesma suspensão a 2970 µL de meio BHI, procedendo a uma incubação a 55 °C em banho termostaticado (Nahita 601/12) durante duas horas. A contagem de células viáveis foi realizada segundo o procedimento descrito anteriormente, tendo sido recolhidas amostras aos 0 e aos 120 minutos. Cada ensaio foi realizado em três dias independentes.

## **9. Análise estatística**

Os dados obtidos pelos ensaios de inibição da formação de biofilmes e da avaliação da tolerância a condições adversas foram analisados com o software GraphPad Prism v7.03, usando-se o teste *t-student* com intervalo de confiança de 95%. Os valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Todos os dados experimentais são mostrados como média  $\pm$  desvio padrão.



# Capítulo IV

## Resultados e Discussão

Desde o início dos tempos, as plantas assumem um papel importante na medicina popular e têm incitado o interesse de investigadores, que procuram uma fonte de novos compostos com potencial terapêutico para fazer face à resistência microbiana que tem vindo a aumentar ao longo dos anos.

Desta forma, seguem-se os resultados obtidos com esta dissertação, na caracterização fitoquímica da urze e do feto comum, assim como no estudo das suas atividades antioxidante e antimicrobiana.

### 1. Processo de extração

Os extratos brutos metanólicos da urze, das flores da urze e do feto comum foram obtidos por extração com metanol, sendo assim de seguida apresentados na tabela 6 os valores de rendimento obtidos. Pela análise dos valores obtidos, verifica-se que a extração das flores teve um rendimento superior às restantes extrações, e que os valores de rendimento da urze e do feto comum são muito semelhantes.

Tabela 6 - Rendimento da extrações realizadas.

		Plantas		
		Urze	Flores da Urze	Feto comum
Rendimento	Extração com Metanol	17,64 %	25,95 %	17,99 %

Os valores de rendimento obtidos são menores em relação aos encontrados na literatura para espécies de *Erica*. Um estudo de Sassi e colaboradores (2007) indica rendimentos de 38,9 % na extração metanólica de *E. multiflora* e um outro estudo de Luís e colaboradores (2011) em que se efetuou extração metanólica de cada parte aérea de *E. arborea* em separado, indica rendimentos de 12,9 % para os caules, 29,5 % para as folhas e 38,6 % para as flores . No entanto, este último estudo apresenta valores mais próximos dos obtidos na presente dissertação, e, à semelhança do obtido na presente dissertação, revela um rendimento superior para as flores da urze em relação às restantes partes da planta. A partir do estudo de Luís e colaboradores também se conclui que a parte da planta a que se submete a extração influencia o rendimento, e a que as diferenças de valores encontradas se podem dever a quantidades diferentes usadas de cada parte aérea na extração.

## 2. Caraterização fitoquímica

Os fenóis constituem um dos principais grupos de compostos com propriedades antioxidantes presentes nas plantas (Luís *et al.*, 2009), por isso, considerando que o potencial antioxidante dos extratos das plantas em estudo pode estar relacionado com estes compostos, procedeu-se assim à sua quantificação.

Na figura 13 são apresentados os resultados da quantificação dos fenóis totais para os extratos brutos metanólicos da urze, flores da urze e feto comum.

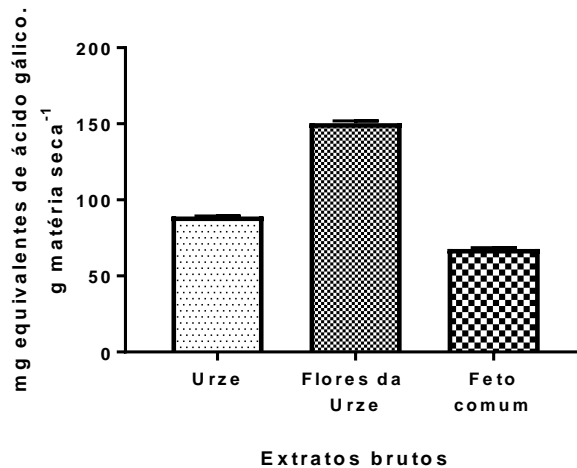


Figura 13 - Conteúdo de fenóis totais nos extratos brutos metanólicos da urze, flores da urze e feto comum (média de três determinações  $\pm$  desvio padrão).

Pela análise da figura 13, verifica-se que a quantidade de fenóis totais varia entre, aproximadamente, 68 e 150 mg equivalentes de ácido gálico por grama matéria seca, sendo que as flores da urze detêm a maior quantidade de fenóis, seguida da urze (planta) e por fim, o feto comum com a menor quantidade.

A extração com metanol foi importante para a caraterização fitoquímica, uma vez que, devido à sua polaridade, se trata do solvente que permite a extração de uma maior quantidade e variedade de compostos fenólicos (Azmir *et al.*, 2013; Nychas, 1995). Neste ensaio foi utilizado como padrão o ácido gálico, que se trata de um compostos fenólico de importância nutracêutica, dadas as suas variadas atividades biológicas, entre elas atividade antioxidante (Prakash and Sharma, 2014). Outros padrões fenólicos poderiam ter sido usados, como por exemplo o ácido cafeico, ácido o gentísico, o ácido p-cumárico, o ácido vanílico, o ácido ferúlico (Proestos and Komaitis, 2013).

Os resultados obtidos para a urze são difíceis de comparar com resultados de estudos publicados. Há estudos de *Erica spp.* usando etanol como solvente de extração (141,49 mg equivalentes ácido gálico por gramas matéria seca) ou água (4,64 mg equivalentes ácido gálico por grama matéria seca) (Luís *et al.*, 2009). Outros estudos referem espécies específicas como

*Erica manipuliflora* (260 mg equivalentes ácido gálico por grama matéria seca) (Turgay and Esen, 2015) ou *Erica arborea* com resultados na forma de miligramas de equivalentes de pirocatecol por gramas de matéria seca (144,88 µg equivalentes pirocatecol por mg matéria seca) (Ay *et al.*, 2007). As unidades usadas para o conteúdo em fenóis totais também é variável, como o estudo anterior e um outro que apresenta o resultado em miligramas de catequina por gramas de matéria seca (104 mg equivalentes catequina por grama matéria seca) (Harnafi *et al.*, 2007). Contudo, considerando estes resultados, o extrato etanólico de *Erica spp.* no estudo de Luís e colaboradores (2009) apresenta um conteúdo em compostos fenólicos de 141,49 mg equivalentes ácido gálico por grama matéria seca, próximo do obtido na presente dissertação para o mesmo género. Este estudo suporta os resultados obtidos, uma vez que as plantas foram colhidas na mesma região. Um outro estudo utiliza as flores de duas espécies de *Erica*, *E. arborea* e *E. multiflora*, e indica um conteúdo em fenóis totais de 70,8 e 68,2 mg equivalentes de ácido gálico por grama matéria seca, respetivamente, (Guendouze-Bouchefa *et al.*, 2015) menor que o obtido para as flores da urze nesta dissertação.

No que diz respeito ao feto comum, um estudo feito por Qi e colaboradores (Qi *et al.*, 2015) mostrou que extratos etanólicos de *Pteridium aquilinum* possuem um conteúdo em fenóis totais de 246,51 mg equivalentes ácido gálico por grama matéria seca, um valor muito superior ao obtido para o extrato metanólico da mesma planta nesta dissertação.

No que diz respeito aos flavonóides, estes são um dos grupos de compostos bioativos mais diversos e generalizados no mundo vegetal, sendo provavelmente os compostos fenólicos com papel mais relevante devido à sua variada gama de atividades químicas e biológicas, incluindo capacidade de eliminação de radicais (Luís *et al.*, 2009). Assim, procedeu-se à sua quantificação nos extratos brutos metanólicos em estudo. Na figura 14 encontra-se apresentado o conteúdo de flavonóides totais presente no extrato bruto metanólico da urze, flores da urze e feto comum.

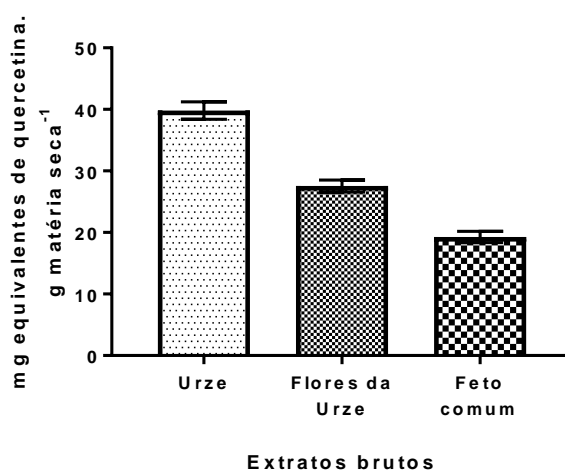


Figura 14 - Conteúdo de flavonóides totais nos extratos brutos metanólicos da urze, flores da urze e feto comum (média de três determinações  $\pm$  desvio padrão).

Os extratos testados contêm flavonóides numa gama de concentrações que varia entre 19 e 40 mg equivalentes de quercetina por grama matéria seca, sendo que o extrato que possui uma maior concentração é o extrato da urze, e, com menor concentração, o feto comum.

Um estudo de Ay e colaboradores (2007) obteve um resultado semelhante em conteúdo de flavonóides totais para o extrato metanólico de folhas e flores de *Erica arborea* (34,69 µg equivalentes de quercetina por mg matéria seca). Este resultado encontra-se ligeiramente inferior ao obtido nesta dissertação para as partes aéreas de *Erica spp.* (40 mg equivalentes quercetina por grama matéria seca) e um pouco superior ao resultado para as flores (28 mg equivalentes quercetina por grama matéria seca), o que pode ser explicado por no estudo a amostra conter uma mistura de folhas e flores. Quanto ao feto comum, o conteúdo de flavonóides totais é expresso na literatura em mg equivalentes de rutina por g matéria seca (547,46) (Qi *et al.*, 2015) e em mg hiperosídeo por 100 g matéria seca (448) (Tsumbu *et al.*, 2012), dificultando a comparação.

As diferenças observadas, em termos de conteúdos de fenóis totais e de flavonóides das plantas em estudo, entre a presente dissertação e resultados de estudos publicados, podem dever-se a uma série de fatores, tais como o tipo de solo e condições atmosféricas a que as plantas foram sujeitas (o que pode fazer variar a composição da planta de uma mesma zona de ano para ano) (Martins *et al.*, 2016). A época em que as plantas foram colhidas e, também importante salientar, as diferenças existentes nos processos de extração (tipo de extração, solvente utilizado, temperatura, pressão e período de tempo de extração) também influenciam os resultados (Azmir *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2016).

### **3. Avaliação da atividade antioxidante**

Os efeitos adversos do stress oxidativo na saúde humana são cada vez mais preocupantes, levando a danos celulares e problemas de saúde (Krishnaiah *et al.*, 2011). Adicionalmente, a oxidação lipídica é também a principal causa de deterioração dos alimentos, diminuindo o seu tempo de vida e o valor nutricional dos mesmos (Shahidi and Ambigaipalan, 2015). Nos últimos anos, os compostos antioxidantes naturais têm se tornado cada vez mais importantes, no uso em medicina preventiva e como uma alternativa aos antioxidantes sintéticos na indústria de processamento de alimentos (Krishnaiah *et al.*, 2011). Os antioxidantes naturais parecem assumir um papel preponderante na proteção contra doenças, dada a sua capacidade de contrariar os danos oxidativos, sem afetar as reações oxidativas normais essenciais à vida que ocorrem no nosso corpo (Luís *et al.*, 2014; Paulsen, 2010). Várias plantas medicinais, assim como várias ervas e especiarias, revelam potencial antioxidante semelhante ou superior em comparação com o exibido pelos antioxidantes sintéticos (Ã, 2006; Krishnaiah *et al.*, 2011).

Desta forma, procedeu-se à determinação da atividade antioxidante nos extratos brutos em estudo e, para tal, foram usados dois métodos diferentes: método do DPPH e método do sistema B-caroteno/ácido linoleico. O método do DPPH é um dos métodos mais extensivamente usados

na avaliação da atividade antioxidante em amostras de plantas e permite avaliar a atividade antioxidante na capacidade de os extratos doarem um átomo de hidrogênio. O sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico constitui também um método adequado, permitindo a avaliação da atividade antioxidante ao nível da peroxidação lipídica (Krishnaiah *et al.*, 2011).

### 3.1. Método do DPPH

Os resultados da avaliação da atividade antioxidante pelo método do DPPH encontram-se na tabela seguinte (tabela 7), representados pela concentração de amostra necessária para promover 50% de inibição ( $IC_{50}$ ) do radical livre do DPPH, índice de atividade antioxidante (AAI) e respetivo potencial antioxidante, para o extrato bruto metanólico da urze, das flores da urze e do feto comum, assim como para três compostos antioxidantes padrão, sendo eles a rutina, trolox e ácido gálico. A avaliação do potencial antioxidante teve por base a classificação de Scherer and Godoy (2009), que visa que para  $AAI < 0,5$  se tem um potencial antioxidante pobre,  $0,5 < AAI < 1,0$  potencial antioxidante moderado,  $1,0 < AAI < 2,0$  potencial antioxidante forte e  $AAI > 2,0$  potencial antioxidante muito forte.

Tabela 7 - Concentração de amostra necessária para promover 50% de inibição ( $IC_{50}$ ) e índice de atividade antioxidante (AAI) do extrato bruto metanólico da urze, flores da urze, feto comum e padrões (Rutina, Trolox e ácido gálico) e, respetivo potencial antioxidante.  $IC_{50}$  e AAI apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão.

	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	AAI	Potencial antioxidante
<b>Urze</b>	43,1 $\pm$ 13,4	1,2 $\pm$ 0,0	Forte
<b>Flores da Urze</b>	29,1 $\pm$ 9,0	1,8 $\pm$ 0,0	Forte
<b>Feto comum</b>	65,1 $\pm$ 17,2	0,8 $\pm$ 0,1	Moderado
<b>Rutina</b>	8,2 $\pm$ 2,1	6,0 $\pm$ 0,4	Muito forte
<b>Trolox</b>	7,8 $\pm$ 2,5	6,0 $\pm$ 0,1	Muito forte
<b>Ácido gálico</b>	2,0 $\pm$ 0,6	24,1 $\pm$ 1,4	Muito forte

O extrato da urze e o extrato das suas flores revelaram um potencial antioxidante forte e o extrato do feto comum demonstrou um potencial moderado. O extrato das flores da urze revelou um índice de atividade antioxidante superior ao da urze, o que está em concordância com os resultados obtidos no ponto 2., uma vez que a atividade antioxidante está relacionada com a presença de compostos fenólicos e, o extrato das flores da urze possui uma quantidade em fenóis superior ao extrato da urze. Todos os padrões testados demonstraram um potencial muito forte tal como esperado.

Um estudo publicado por Luís e colaboradores (2009) apresenta um IC<sub>50</sub> de 41,28 mg.L<sup>-1</sup> para o extrato etanólico de *Erica spp.* (Luís *et al.*, 2009), valor que suporta o obtido para o extrato de urze testado na presente dissertação (43,1 µg.mL<sup>-1</sup>). Outro estudo para o extrato metanólico de *Erica arborea* indica um IC<sub>50</sub> de 23,06 µg.mL<sup>-1</sup>, revelando uma atividade antioxidante ligeiramente superior à obtida para as flores da urze na dissertação (Ay *et al.*, 2007). Os resultados obtidos para as flores de duas espécies de urze (*Erica arborea* e *Erica multiflora*) revelam valores de IC<sub>50</sub> muito inferiores (5,7 e 10,2 mg.L<sup>-1</sup>) ao obtido no presente ensaio, no entanto permite verificar as diferenças existentes entre cada espécie do mesmo género (Guendouze-Bouchefa *et al.*, 2015). Folhas de fetos comuns da Índia obtiveram um IC<sub>50</sub> de 10,04 µg.mL<sup>-1</sup> (Panneerselvam *et al.*, 2016), evidenciando uma atividade antioxidante muito superior à exibida pela amostra de feto testada nesta dissertação. O mesmo estudo usou a rutina como padrão que também exibiu um valor de IC<sub>50</sub> de 6,35 µg.mL<sup>-1</sup>, inferior ao obtido aqui (8,2 µg.mL<sup>-1</sup>), contudo esta diferença não suporta a diferença encontrada entre as amostras do feto comum, que é muito maior. Como referido no ponto 2., tais diferenças podem dever-se a um conjunto de fatores, e neste caso as condições climáticas podem ter assumido um papel preponderante, tais como a composição da planta, uma vez que o estudo se refere a feto da Índia.

### 3.2. Método do sistema β-caroteno/ácido linoleico

A atividade antioxidante pelo método do sistema β-caroteno/ácido linoleico encontra-se na figura 15 representada pela % inibição (% I) em função da concentração de BHT e de extrato bruto da urze, das flores da urze e do feto comum.

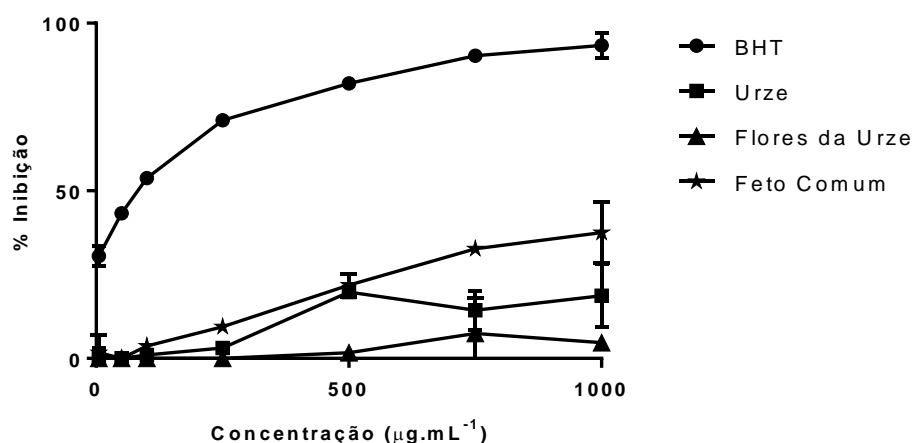


Figura 15 - Atividade antioxidante dos extratos metanólicos de urze, flores da urze, feto comum e padrão BHT, representada pela percentagem de inibição (% I). Cada ponto representa a média ± desvio padrão da % I.

Os resultados obtidos demonstram que numa gama de concentrações de 0 a 1000 µg.mL<sup>-1</sup> a % I dos três extratos varia entre aproximadamente 5 e 38, sendo que o extrato do feto comum é o

que apresenta atividade antioxidante superior por este método. Comparativamente aos resultados obtidos com o método do DPPH, com este método os extratos revelam menor potencial antioxidante e, em contraste, este ensaio mostra o extrato do feto comum como o mais ativo. No entanto, apesar de os dois métodos avaliarem a mesma propriedade (atividade antioxidante), permitem a avaliação desta a diferentes níveis, o que significa que os extratos possuem boa capacidade na sequestração de radicais livres, e menor capacidade na inibição da oxidação lipídica. Enquanto que, pelo método do DPPH, o extrato do feto comum foi o que apresentou um potencial de oxidação menor dentro dos três extratos (ainda assim moderado), é o extrato que apresenta uma maior inibição ao nível da oxidação lipídica.

Luís e colaboradores mostraram que o extrato etanólico de *Erica spp.* na concentração de 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  evidencia uma % I próxima da exibida pelo BHT, que mantém a proximidade à medida que a concentração aumenta até 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Luís *et al.*, 2009). Outro estudo do mesmo autor, onde foram estudadas as folhas, as flores e os caules de *Erica arborea* separadamente, revela uma % I menor em relação ao estudo anterior, sendo que a percentagem mais alta corresponde ao extrato dos caules e ronda os 40-50 %, e o extrato das folhas e o das flores se situam ligeiramente abaixo (Luís *et al.*, 2011). Perante estes dois estudos, os extratos da urze e das flores da urze testados na presente dissertação, revelam uma inibição menor, que pode ser explicado pelo facto de a extração ter sido realizada com solventes diferentes, alterando a composição de cada extrato. Além disso, tratam-se de espécies diferentes, com diferentes anos de colheita, o que pode levar a que planta tenha sido sujeita a condições climáticas e de solo distintas, levando a diferenças na sua composição.

## 4. Fracionamento dos extratos brutos

A extração permite a obtenção dos extratos de plantas. No entanto, o fracionamento do extrato bruto é essencial uma vez que os extratos normalmente englobam uma combinação de vários tipos de compostos bioativos com polaridades diferentes (Sasidharan *et al.*, 2011). Assim, na presente dissertação, os extratos brutos metanólicos foram sujeitos a passagem sucessiva de solventes de polaridade crescente, originando quatro frações contendo compostos ou mistura de compostos de polaridades semelhantes, sendo elas a fração 1 (n-hexano), a fração 2 (éter dietílico), a fração 3 (água) e por fim a fração 4 (resíduo não solúvel).

A TLC permitiu visualizar o fracionamento de compostos do extrato bruto e das respetivas frações das plantas em estudo, de acordo com a afinidade de cada composto ou mistura de compostos presentes no extrato, para o eluente usado. Inicialmente foram usadas duas fases móveis: clorofórmio/acetato de etilo 1:1 e acetato de etilo/metanol 1:1. Após a eluição, os cromatogramas foram visualizadas sob luz visível e sob luz ultravioleta (254 e 365 nm), pois muitos compostos de origem vegetal emitem fluorescência sob luz UV (Gray, 2012). O comprimento de onda 365 nm possibilitou uma visualização mais adequada, pois a separação de compostos ou mistura de compostos foi mais notória. Por isso todas as imagens que se

seguem correspondem à visualização sob luz ultravioleta neste comprimento de onda (figuras 16, 17 e 18).

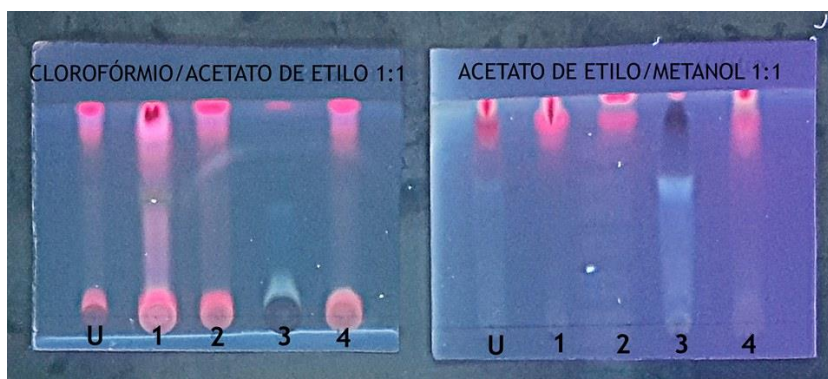


Figura 16 - Cromatograma resultante da TLC do extrato bruto metanólico da urze e frações, eluído com clorofórmio/acetato de etilo 1:1 (esquerda) e acetato de etilo/metanol 1:1 (direita). U: extrato bruto metanólico de urze; 1: fração 1; 2: fração 2; 3: fração 3; 4: fração 4.

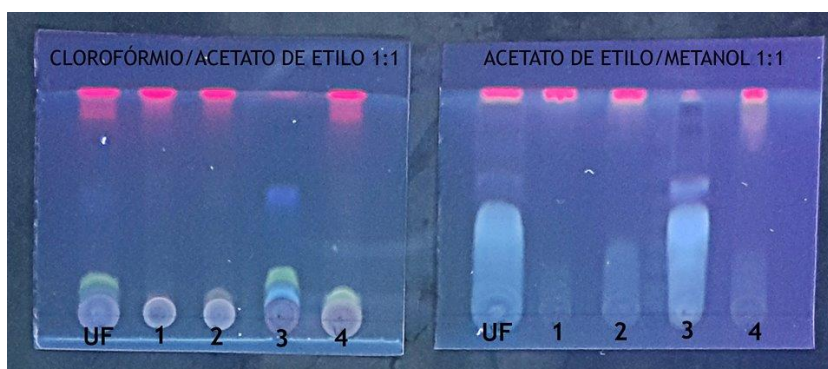


Figura 17 - Cromatograma resultante da TLC do extrato bruto metanólico das flores da urze e frações, eluído com clorofórmio/acetato de etilo 1:1 (esquerda) e acetato de etilo/metanol 1:1 (direita). UF: extrato bruto metanólico das flores de urze; 1: fração 1; 2: fração 2; 3: fração 3; 4: fração 4.

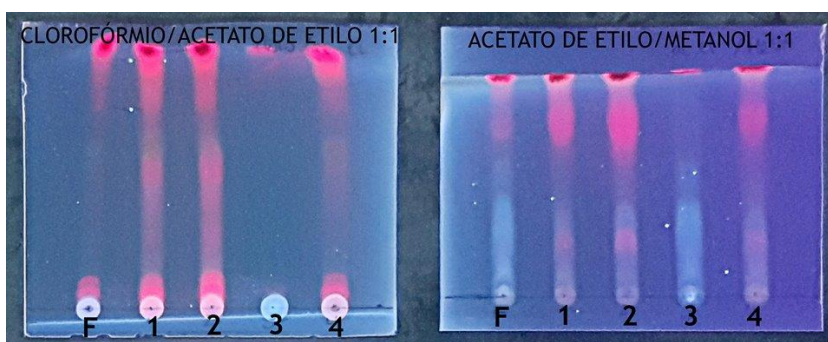


Figura 18 - Cromatograma resultante da TLC do extrato bruto metanólico do feto comum e frações, eluído com clorofórmio/acetato de etilo 1:1 (esquerda) e acetato de etilo/metanol 1:1 (direita). F: extrato bruto metanólico de feto comum; 1: fração 1; 2: fração 2; 3: fração 3; 4: fração 4.

Perante a separação obtida com as duas fases móveis, foi selecionada a fase móvel que permitiu uma melhor separação, ou seja, a que continha clorofórmio/acetato de etilo 1:1, uma vez que com a outra fase móvel há um maior arrastamento de compostos. De forma a analisar o procedimento do fracionamento, repetiu-se o procedimento usando duas proporções diferentes dos solventes presentes na fase móvel selecionada anteriormente: clorofórmio/acetato de etilo 10:4 e clorofórmio/acetato de etilo 4:10 (figuras 19, 20 e 21).

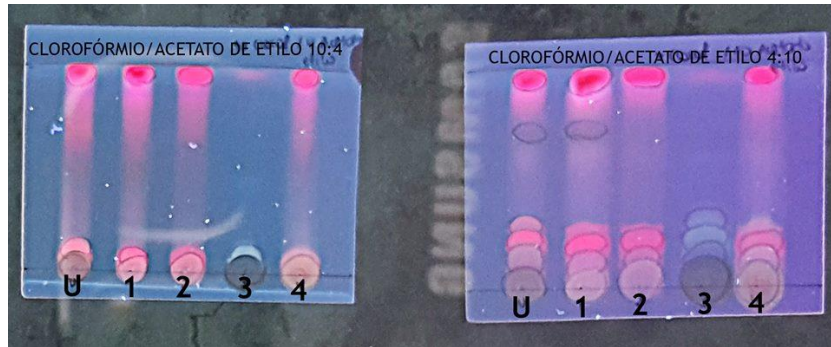


Figura 19 - Cromatograma resultante da TLC do extrato bruto metanólico da urze e frações, eluído com clorofórmio/acetato de etilo 10:4 (esquerda) e clorofórmio/acetato de etilo 4:10 (direita). U: extrato bruto metanólico de urze; 1: fração 1; 2: fração 2; 3: fração 3; 4: fração 4.

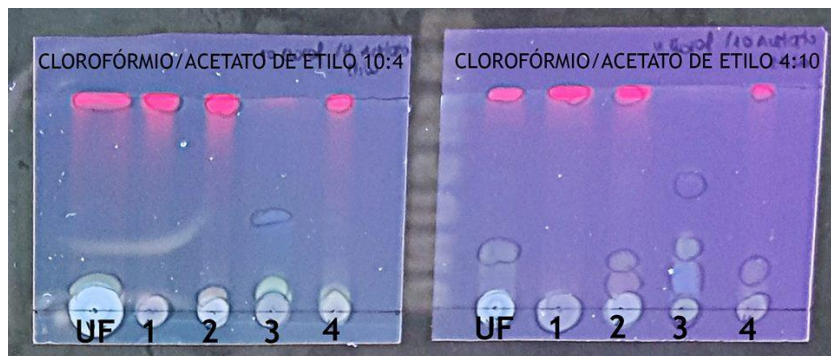


Figura 20 - Cromatograma resultante da TLC do extrato bruto metanólico das flores da urze e frações, eluído com clorofórmio/acetato de etilo 10:4 (esquerda) e clorofórmio/acetato de etilo 4:10 (direita). UF: extrato bruto metanólico das flores de urze; 1: fração 1; 2: fração 2; 3: fração 3; 4: fração 4.

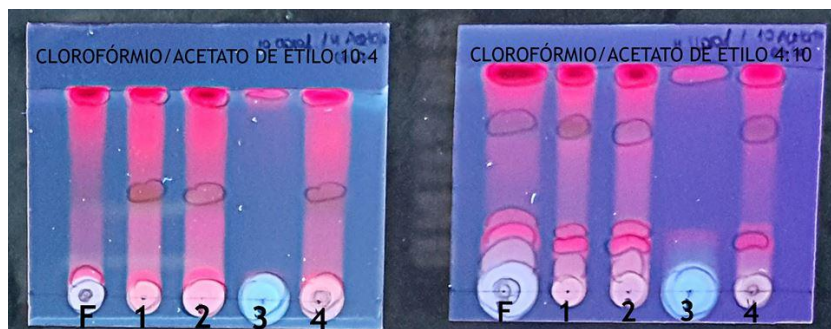


Figura 21 - Cromatograma resultante da TLC do extrato bruto metanólico do fetocomm e frações, eluído com clorofórmio/acetato de etilo 10:4 (esquerda) e clorofórmio/acetato de etilo 4:10 (direita). F: extrato bruto metanólico de fetocomm; 1: fração 1; 2: fração 2; 3: fração 3; 4: fração 4.

Pela análise das figuras anteriores (figuras 19, 20 e 21) verifica-se que com a proporção 4:10 se obtém uma melhor separação de compostos ou de mistura de compostos. Pela análise do cromatograma do extrato bruto metanólico da urze e respectivas frações (figura 19 imagem à direita), visualiza-se uma maior mistura de compostos no extrato bruto e frações comparativamente ao cromatograma do extrato bruto e frações das flores da urze (figura 20 imagem à direita). A comparação entre os dois cromatogramas (urze e flores) indica compostos com a mesma distância de migração, sugerindo que nos extratos da urze esses compostos estejam relacionados com a presença de flores na amostra, e os restantes que não coincidem com o cromatograma dos extratos das flores sejam provenientes das folhas e dos caules. A figura 19 também revela a presença de compostos com a mesma distância de migração nas frações 1, 2 e 4. No cromatograma das flores da urze (figura 20 imagem à direita) também se encontram semelhanças nas frações 2 e 4, nas quais se visualizam compostos com distância de migração e fluorescência semelhante. Relativamente ao cromatograma do extrato bruto e respectivas frações do feto comum, verifica-se que a fração aquosa (fração 3) corresponde à fração com menos mistura de compostos, demonstrando também semelhanças entre as frações 1 e 2 e ainda um pouco entre estas e a fração 4.

De forma a averiguar a existência e distribuição de compostos fenólicos pelas frações, os cromatogramas obtidos nos quais se observou uma melhor separação de compostos (fase móvel clorofórmio/acetato de etilo 4:10), foram revelados com reagente de *Folin-Ciocalteu*. Na figura 22 encontram-se os cromatogramas revelados com o reagente de *Folin-Ciocalteu*, em que na presença de compostos fenólicos ocorre alteração da cor para azul, resultante da oxidação dos fenóis pelo ácido fosfomolibdotúngstico (Cicco *et al.*, 2009). De uma forma geral, pela análise dos cromatogramas revelados (figura 22 (a), (b) e (c)), observa-se a presença de compostos fenólicos não só no extrato bruto, mas também a sua permanência pelas frações, principalmente na fração aquosa (fração 3), que apresenta uma cor mais intensa. A ocorrência de uma cor azul mais intensa na fração aquosa pode ser explicada pelo facto de ser uma das frações mais polares e, uma vez que os compostos fenólicos são compostos polares, têm maior afinidade com a água e com o metanol, do que com os restantes solventes usados (n-hexano e éter dietílico).

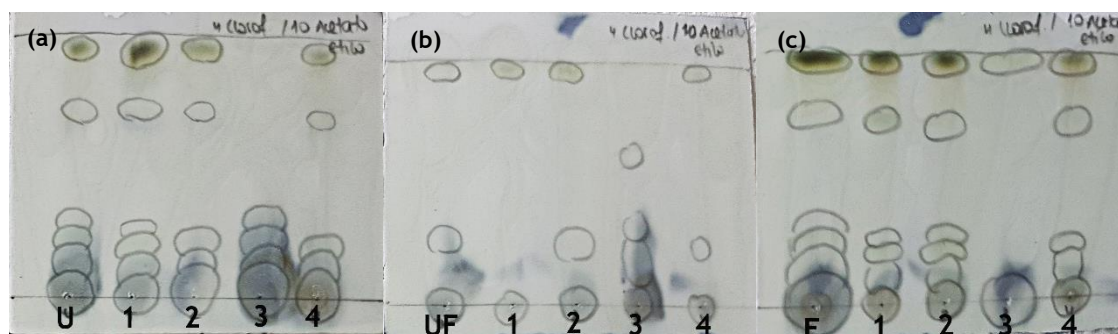


Figura 22 - Cromatogramas dos extratos brutos metanólicos e frações de (a) urze, (b) flores da urze e (c) feto comum, eluídos com clorofórmio/acetato de etilo 4:10 e revelados com reagente de *Folin-Ciocalteu*. U: extrato bruto metanólico da urze; UF: extrato bruto metanólico das flores da urze; F: extrato bruto metanólico do feto comum; 1: fração 1; 2: fração 2; 3: fração 3; 4: fração 4.

Adicionalmente, os cromatogramas também eluídos com clorofórmio/acetato de etilo 4:10 foram revelados com reagente de DPPH, o que possibilitou inferir acerca da existência de compostos com atividade antioxidante nas frações. A existência de compostos com atividade antioxidante é verificada pela diminuição da intensidade da cor, resultante da alteração de cor de roxo para amarelo (Turgay and Esen, 2015).

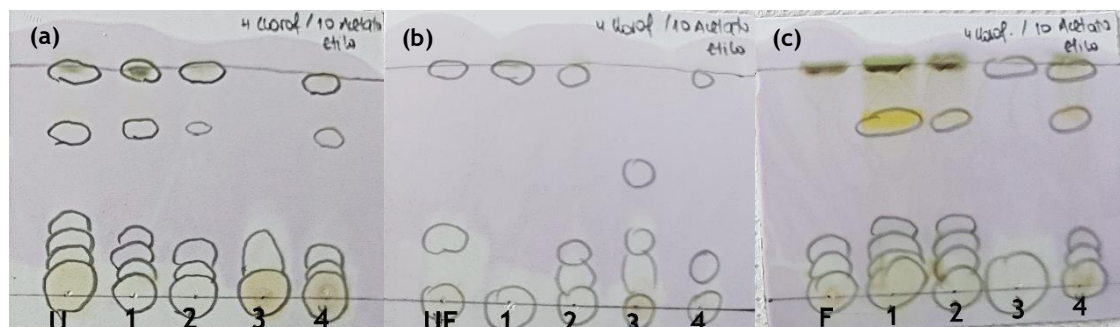


Figura 23 - Cromatogramas dos extratos brutos metanólicos e frações de (a) urze, (b) flores da urze e (c) fetocommune, eluídos com clorofórmio/acetato de etilo 4:10 e revelados com reagente de DPPH. U: extrato bruto metanólico da urze; UF: extrato bruto metanólico das flores de urze; F: extrato bruto metanólico do fetocommune; 1: fração 1; 2: fração 2; 3: fração 3; 4: fração 4.

Na figura 23 observa-se a existência de compostos com atividade antioxidante nos cromatogramas dos extratos brutos e nas frações de todas as plantas. Tal como no caso da revelação dos cromatogramas com reagente de *Folin-Ciocalteu* (figura 23), as manchas (neste caso amarelas) são maiores no extrato bruto e na fração aquosa. Adicionalmente, verifica-se também uma sobreposição da localização dos compostos fenólicos com os compostos indicadores de atividade antioxidante, uma vez que os compostos fenólicos têm capacidade antioxidante (Shahidi and Ambigaipalan, 2015).

## 5. Determinação da atividade antimicrobiana

Numa época em que a resistência microbiana está a aumentar e a tornar-se uma questão relevante de saúde pública, a descoberta de novas estratégias para desenvolver agentes antimicrobianos torna-se cada vez mais importante. As plantas contêm centenas a milhares de compostos químicos com várias atividades biológicas, tendo vindo a assumir uma posição cada vez maior na sociedade moderna e apresentando-se como possíveis agentes antimicrobianos ou fontes de compostos com estas propriedades. Assim, todos os extratos brutos metanólicos foram monitorizados quanto à sua atividade antimicrobiana, por ensaio de difusão em disco contra nove bactérias (quatro gram positivas e cinco gram negativas) e duas leveduras. A avaliação da concentração mínima inibitória (CMI) foi efetuada para os extratos brutos e respetivas frações, nos mesmos microrganismos usados no ensaio da difusão em disco. Perante os resultados obtidos, foram realizados ensaios de modo a compreender melhor a atividade exibida pelos extratos mais ativos. A bioautografia foi efetuada para o extrato bruto e respetivas frações com maior atividade antimicrobiana no microrganismo que se mostrou mais suscetível (*Bacillus cereus* para os extratos das flores da urze, *Listeria monocytogenes* para os extratos da urze e das suas flores e *Candida tropicalis* para todos os extratos). Selecionaram-se os extratos com maior atividade antimicrobiana, a fração 4 da urze e extrato bruto e frações 2 e 4 das flores da urze e testou-se em *Listeria monocytogenes*, por ensaio de curvas de morte, inibição da formação de biofilmes e avaliação da tolerância a condições adversas.

### 5.1. Teste de suscetibilidade a antimicrobianos por difusão em disco

Neste ensaio foram testados os extratos brutos metanólicos em quatro bactérias gram positivas, cinco gram negativas e duas leveduras, por forma a realizar uma monitorização inicial do potencial da atividade antimicrobiana. Como controlo foram usados discos carregados com DMSO, para o qual não se verificou formação de halo de inibição para nenhuma das estirpes de bactérias e leveduras estudadas.

### 5.1.1. Para bactérias

Na tabela 8 encontram-se os resultados obtidos pelo ensaio de difusão em disco dos extratos brutos metanólicos em bactérias gram negativas e gram positivas.

Tabela 8 - Halo de inibição formado em milímetros (mm) pelo ensaio de difusão em disco para os extratos brutos metanólicos da urze, flores da urze e feto comum em bactérias (média  $\pm$  desvio padrão). Cada disco foi carregado com 2 mg de extrato.

Estirpes	Halo de inibição (mm) <sup>a</sup>		
	Urze	Flores da Urze	Feto comum
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	7,3 $\pm$ 0,3	8,7 $\pm$ 0,4	6,7 $\pm$ 0,3
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	8,0 $\pm$ 0,7	7,7 $\pm$ 0,5	6,0 $\pm$ 0,0
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	6,0 $\pm$ 0,0	6,0 $\pm$ 0,0	6,0 $\pm$ 0,0
<i>L. monocytogenes</i> LMG 16779	8,4 $\pm$ 2,9	7,8 $\pm$ 1,6	6,0 $\pm$ 0,0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	6,0 $\pm$ 0,0	6,0 $\pm$ 0,0	6,0 $\pm$ 0,0
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	11,2 $\pm$ 2,4	10,4 $\pm$ 3,4	6,0 $\pm$ 0,0
<i>A. baumannii</i> LMG 1025	7,6 $\pm$ 0,5	7,4 $\pm$ 0,1	6,0 $\pm$ 0,0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	6,0 $\pm$ 0,0	7,5 $\pm$ 1,1	6,0 $\pm$ 0,0
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	6,0 $\pm$ 0,0	6,0 $\pm$ 0,0	6,0 $\pm$ 0,0

<sup>a</sup> Segundo a norma seguida (norma M2-A8 recomendada pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS)), são considerados como halos de inibição os diâmetros superiores a 6,0 mm, uma vez que os discos de celulose usados têm um diâmetro de 6,0 mm (NCCLS, 2003).

Pela análise da tabela 8 verifica-se uma maior atividade antimicrobiana global para os extratos da urze e das suas flores, sendo que o extrato do feto comum, de um modo geral, não apresentou atividade antibacteriana, levando à formação de apenas um pequeno halo de inibição em *B. cereus*. Os resultados para o extrato do feto comum são suportados pelo estudo de Kardong e colaboradores (2013), no qual a aplicação do extrato metanólico de *Pteridium aquilinum* não levou à formação de halo de inibição em várias bactérias gram positivas e negativas (Kardong *et al.*, 2013). No entanto, o mesmo estudo testou também extratos etanólicos e de éter de petróleo com os quais se verificou atividade antibacteriana contra bactérias gram positivas e gram negativas. Isto mostra como o solvente usado na extração pode influenciar os resultados da atividade biológica testada.

O extrato da urze e o extrato das suas flores foram responsáveis pelos maiores halos de inibição verificados neste ensaio (11,2 mm e 10,4 mm respetivamente), para *K. pneumoniae*. Este resultado é importante, uma vez que *K. pneumoniae* é uma bactéria oportunista associada a

infecções urinárias, bacteremia, pneumonia e abscesso hepático piogénico, afetando principalmente indivíduos imunocomprometidos e na ausência de tratamento, as infecções por *K. pneumoniae* apresentam alta taxa de mortalidade (Cahill *et al.*, 2015; Evrard *et al.*, 2010). Sassi e colaboradores (2007) testaram extratos de *Erica multiflora* resultantes da utilização de diferentes solventes sobre várias bactérias gram positivas e negativas, e não verificaram atividade antibacteriana para *K. pneumoniae* (Sassi *et al.*, 2007). A diferença observada pode ser devida ao facto de no estudo se ter usado uma estirpe clínica, que pode oferecer mais resistência à ação de agentes antimicrobianos, e também há diferente composição das plantas. A única bactéria gram positiva que não mostrou suscetibilidade para os extratos da urze e das suas flores foi *E. faecalis*, tal como no estudo de Nunes e colaboradores, no qual *E. faecalis* e *E. coli* não foram suscetíveis ao extrato metanólico de folhas e ao de flores de *Erica australis* (Nunes *et al.*, 2014).

### 5.1.2. Para leveduras

O ensaio da difusão em disco também permitiu avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos brutos metanólicos em leveduras, sendo que os resultados se encontram na tabela seguinte (tabela 9).

Tabela 9 - Halo de inibição formado em milímetros (mm) pelo ensaio de difusão em disco para os extratos brutos metanólicos da urze, flores da urze e feto comum em leveduras (média ± desvio padrão). Cada disco foi carregado com 2 mg de extrato.

Estirpes	Halo de inibição (mm) <sup>a</sup>		
	Urze	Flores da Urze	Feto comum
<b><i>C. albicans</i> ATCC 90028</b>	6,0 ± 0,0	6,0 ± 0,0	6,0 ± 0,0
<b><i>C. tropicalis</i> ATCC 750</b>	6,0 ± 0,0	6,0 ± 0,0	6,0 ± 0,0

<sup>a</sup> Segundo a norma seguida (norma M2-A8 recomendada pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS)), são considerados como halos de inibição os diâmetros superiores a 6,0 mm, uma vez que os discos de celulose usados têm um diâmetro de 6,0 mm (NCCLS, 2003).

Pela análise da tabela 9 verifica-se que os extratos em estudo não levaram à formação de halo de inibição por parte dos extratos brutos em *C. albicans* e *C. tropicalis*, semelhante ao verificado por Turgay e Esen com extratos de urze em *C. albicans* (Turgay and Esen, 2015) indicando que os extratos não apresentam atividade antifúngica para as espécies de *Candida* testadas.

## 5.2. Avaliação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

A determinação da concentração mínima inibitória dos extratos brutos e respectivas frações, foi efetuada pela utilização do método de microdiluição em caldo para as quatro bactérias gram positivas, as cinco gram negativas e as duas leveduras.

### 5.2.1. Para bactérias

Nas tabelas seguintes encontram-se os resultados obtidos para a concentração mínima inibitória de cada extrato bruto metanólico e respectivas frações para a urze (tabela 10), para as flores da urze (tabela 11) e para o feto comum (tabela 12), testados em bactérias.

Tabela 10 - Concentração mínima inibitória (CMI) do extrato bruto metanólico da urze e respectivas frações para as bactérias em estudo.

Estirpes	Urze - CMI ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )				
	Extrato bruto	Fração 1	Fração 2	Fração 3	Fração 4
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	>2000	2000	>2000	>2000	250
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	2000	>2000	>2000	1000	2000
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	2000	>2000	>2000	>2000	125
<i>L. monocytogenes</i> LMG 16779	2000	>2000	>2000	>2000	125
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	1000	>2000	>2000	500	>2000
<i>A. baumannii</i> LMG 1025	>2000	>2000	>2000	2000	>2000
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000

Considerando os resultados obtidos para a avaliação da CMI para os extratos da urze (tabela 10) verifica-se que a fração mais polar (fração 4) é a fração com maior atividade antibacteriana, nomeadamente contra bactérias gram positivas: *E. faecalis* e *L. monocytogenes* ( $125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), e *B. cereus* ( $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). A demonstração de atividade antibacteriana somente contra bactérias gram positivas é semelhante ao obtido por Sassi e colaboradores, em que o extrato metanólico de *Arbutus unedo*, um arbusto da família da urze (*Ericaceae*), apresentou atividade apenas contra bactérias positivas (Sassi *et al.*, 2007). Parekh e colaboradores testaram extratos

metanólicos de algumas plantas medicinais contra cinco estirpes bacterianas e verificaram a existência de uma maior suscetibilidade por parte de bactérias gram positivas em relação a gram negativas (Parekh *et al.*, 2005). Mais estudos revelam uma maior atividade antibacteriana de extratos e mesmo de compostos isolados de plantas em bactérias gram positivas (Biva *et al.*, 2016; Kramer *et al.*, 2015; Mostafa *et al.*, 2017), o que pode estar relacionado com a diferença na estrutura da parede celular de bactérias gram positivas e gram negativas. As bactérias gram-negativas possuem uma membrana externa hidrofóbica o que dificulta o possível mecanismo de ação de compostos bioativos presentes nos extratos de plantas, que atuam, entre outros mecanismos, por alterações na permeabilidade das membranas (da Cruz Cabral *et al.*, 2013; Stavri *et al.*, 2007).

Uma vez que apenas a fração mais polar (fração 4) apresenta atividade antibacteriana, a qual não é manifestada pelo extrato bruto, pode significar que os compostos presentes nela, quando em conjunto com os restantes compostos presentes no extrato bruto, apresentem um efeito antagônico e assim não atuem na inibição de crescimento bacteriano. Nguefack e colaboradores estudaram a ação sinérgica entre várias frações de óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* e *Thymus vulgaris* contra *Penicillium expansum* e verificaram que as misturas de algumas das frações mais ativas das três plantas revelaram efeito antagônico (Nguefack *et al.*, 2012), indicando a possibilidade da ocorrência deste acontecimento no caso dos extratos.

Ao contrário do obtido pelo ensaio de difusão em disco, o extrato bruto da urze (tabela 10) e o das suas flores (tabela 11) não apresentaram atividade antibacteriana para *K. pneumoniae*. Um estudo refere que o passo da extração de plantas pode muitas vezes levar à precipitação ou co precipitação do extrato, o que dificulta o desempenho e a interpretação de ensaios biológicos posteriores (Cos *et al.*, 2006). Assim, esta discordância encontrada pode ser devida ao facto de alguns extratos precipitarem aquando da adição de meio de cultura, principalmente as frações 1, 2 e 4. A precipitação do extrato pode levar a que compostos com eventual atividade antibacteriana sobre *K. pneumoniae* fiquem retidos no precipitado, diminuindo o seu contacto com a suspensão celular e levando a que seja necessária uma concentração maior para inibir o crescimento deste microrganismo.

Tabela 11 - Concentração mínima inibitória (CMI) do extrato bruto metanólico das flores de urze e respectivas frações para as bactérias em estudo.

Estirpes	Flores da Urze - CMI ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )				
	Extrato bruto	Fração 1	Fração 2	Fração 3	Fração 4
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	1000	500	62,5	>2000	250
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	2000	2000	>2000	2000	>2000
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	2000	500	125	>2000	31,3
<i>L. monocytogenes</i> LMG 16779	125	2000	62,5	>2000	62,5
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	2000	>2000	>2000	2000	>2000
<i>A. baumannii</i> LMG 1025	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000

Os resultados para os extratos das flores da urze (tabela 11) revelam que as frações 2 e 4 são as que apresentam uma maior atividade antimicrobiana, para além do extrato bruto que também apresentou uma concentração mínima inibitória de  $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$  contra *L. monocytogenes*. Contra a mesma bactéria, as frações 2 e 4 precisam de uma concentração menor que o extrato bruto para causar inibição bacteriana ( $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), à semelhança do obtido pela fração 4 da urze. Para as mesmas frações (fração 2 e 4) também se destacam os valores de CMI obtidos contra *B. cereus* ( $62,5$  e  $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e contra *E. faecalis* ( $125$  e  $31,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), mais uma vez semelhante ao ocorrido para a fração 4 da urze. Estes resultados podem ser clinicamente importantes, uma vez que *L. monocytogenes* e *B. cereus* se encontram normalmente associadas a doenças de origem alimentar, no caso de *L. monocytogenes*, a listeriose (Early, 2009; Ferreira and Domingues, 2016). *E. faecalis* é dos um dos principais microrganismos envolvidos em infeções adquiridas em ambiente hospitalar, como infeções do trato urinário associadas ao cateter, endocardite e infeções cirúrgicas e de queimaduras (Michaux *et al.*, 2014). A semelhança entre a atividade antibacteriana exibida pelas frações 2 e 4 pode ser explicada pelo facto de no cromatograma da análise de TLC estas terem apresentado semelhanças, com compostos ou misturas de compostos apresentando distâncias de migração semelhantes nas duas frações.

A ausência de atividade antibacteriana contra bactérias gram negativas é suportada pelos resultados de Guendouze e colaboradores, em que extratos metanólicos de flores de *E. arborea*

e de *E. multiflora* não apresentaram atividade antibacteriana para as bactérias gram negativas testadas (Guendouze-Bouchefa *et al.*, 2015). Estes resultados são semelhantes ao obtido para os extratos da urze, e demonstram mais uma vez uma maior atividade antibacteriana contra gram positivas do que contra gram negativas.

Tabela 12 - Concentração mínima inibitória (CMI) do extrato bruto metanólico do feto comum e respectivas frações para as bactérias em estudo.

Estirpes	Feto comum - CMI ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )				
	Extrato bruto	Fração 1	Fração 2	Fração 3	Fração 4
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
<i>L. monocytogenes</i> LMG 16779	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
<i>A. baumannii</i> LMG 1025	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000

Considerando os resultados obtidos pelo extrato bruto metanólico do feto comum e pelas suas frações (tabela 14), não se verificou atividade antibacteriana dentro da gama de concentrações testada (15,6 a 2000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para as nove estirpes avaliadas. Estes resultados estão concordantes com o ensaio de difusão em disco em que o extrato bruto não levou à formação de halo de inibição. Um estudo sobre a atividade antimicrobiana de plantas do filo *Pteridophyta* mostra uma atividade pronunciada sobre bactérias gram positivas (Sen, 1980), contudo é de notar que no estudo foram usadas várias espécies distintas.

### 5.2.2. Para leveduras

Seguem-se os resultados de CMI obtidos para o extrato bruto metanólico da urze e respectivas frações (tabela 13), extrato metanólico das flores da urze e respectivas frações (tabela 14) e extrato metanólico do feto comum e respectivas frações (tabela 15).

Tabela 13 - Concentração mínima inibitória (CMI) do extrato bruto metanólico da urze e respectivas frações para as leveduras em estudo. Valores em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Urze - CMI ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )					
Estirpes	Extrato bruto	Fração 1	Fração 2	Fração 3	Fração 4
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	500	250	500	1000	2000

Tabela 14 - Concentração mínima inibitória (CMI) do extrato bruto metanólico das flores de urze e respectivas frações para as leveduras em estudo. Valores em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Flores da Urze - CMI ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )					
Estirpes	Extrato bruto	Fração 1	Fração 2	Fração 3	Fração 4
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	500	125	2000	500	1000

Tabela 15 - Concentração mínima inibitória (CMI) do extrato bruto metanólico do feto comum e respectivas frações para as leveduras em estudo. Valores em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Feto comum - CMI ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )					
Estirpes	Extrato bruto	Fração 1	Fração 2	Fração 3	Fração 4
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	1000	250	500	2000	1000

Pela observação das tabelas, verifica-se que de uma forma geral os extratos da urze, das suas flores e do feto comum não apresentam atividade antifúngica para *C. albicans*, enquanto que para *C. tropicalis* todos eles apresentam, em especial a fração menos polar de cada um deles (fração 1). A ausência de atividade antifúngica para *C. albicans* e a presença para *C. tropicalis* é semelhante ao verificado por Hamza e colaboradores (2006), que testaram a atividade

antifúngica de extratos metanólicos de diversas plantas, entre elas *Pteridium aquilinum* e *Agauria salicifolia* Oliv. (*Ericaceae*) em várias espécies de *Candida* (Hamza *et al.*, 2006). No entanto este estudo não verificou atividade antifúngica para a gama de concentrações testadas ( $\geq 4000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), que são superiores às testadas na presente dissertação, para além de que no caso da urze se tratam de espécies diferentes da mesma família, podendo haver diferenças.

### 5.3. Bioautografia direta

A bioautografia combina a separação cromatográfica com a determinação de atividade *in situ*, permitindo a separação de uma mistura de compostos como os extratos e, em simultâneo, a localização dos constituintes ativos na placa de TLC (Marston, 2011; Sasidharan *et al.*, 2011).

Esta técnica foi efetuada para os extratos das flores da urze em *Bacillus cereus* ATCC 11778 (figura 24 (a)), os extratos da urze e das flores da urze em *Listeria monocytogenes* LMG 16779 (figura 25 (a) e (b) respetivamente) e os extratos da urze, flores da urze e feto comum em *Candida tropicalis* ATCC 750 (figura 26 (a), (b) e (c)), uma vez que correspondem aos extratos com maior atividade antimicrobiana. Estes extratos foram assim sujeitos a cromatografia em camada fina usando como fase móvel clorofórmio/acetato de etilo 4:10, seguidos da bioautografia por aplicação direta da suspensão celular. Para cada estirpe realizou-se o mesmo procedimento com antibióticos: tetraciclina para *B. cereus* (figura 24 (b)) e *L. monocytogenes* (figura 25 (c)) e anfotericina B para *C. tropicalis* (figura 26 (d)), funcionando como controlo. As zonas em que se observa coloração amarelada correspondem à presença de compostos com atividade antimicrobiana.

Uma vez que os extratos da urze e os extratos das flores também apresentaram atividade antibacteriana contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, também foi realizada a bioautografia. No entanto os resultados não são apresentados na dissertação pois não se conseguiu obter o crescimento adequado na placa.

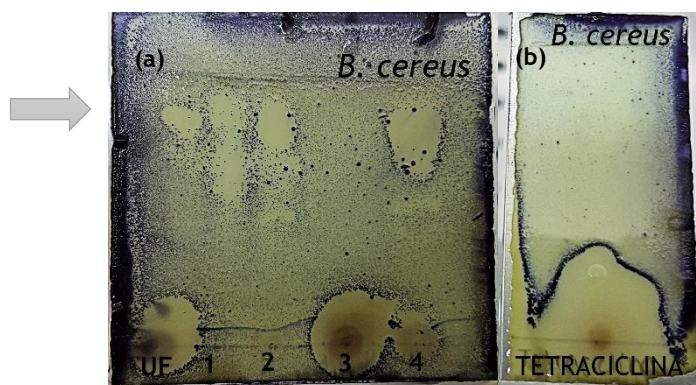


Figura 24 - Cromatogramas do extrato bruto metanólico das flores da urze e frações (a) e do antibiótico tetraciclina (b) revelados com suspensão celular de *Bacillus cereus*.

Perante os resultados os resultados obtidos para a bioautografia dos extratos das flores da urze para *B. cereus* (figura 24 (a)) verifica-se a existência de compostos com atividade antibacteriana, por parte do extrato bruto e de todas as frações. Comparando estes resultados com os obtidos no ponto 5.2.1. na avaliação da CMI encontra-se concordância entre eles. Pela avaliação da CMI, as frações 2 e 4 manifestaram-se como as mais ativas contra *B. cereus* e, na figura acima, observa-se a presença de uma mancha com a mesma distância de migração nas duas frações. Relativamente à fração 3 observa-se a presença de uma zona com inibição de crescimento, contudo a sua atividade antibacteriana não foi demonstrada pela avaliação da CMI. A mancha com inibição de crescimento na fração 3 é semelhante à encontrada no extrato bruto, no entanto, enquanto que na fração 3 se encontra apenas essa mancha, no extrato bruto está presente uma outra semelhante à encontrada nas frações 1, 2 e 4. Isto pode sugerir que o composto ou a mistura de compostos presente no extrato bruto e nas frações 1, 2 e 4, que apresentam aproximadamente a mesma distância de migração (assinalado na figura com uma seta) pode ter um papel preponderante na atividade antibacteriana sobre *B. cereus*. Como esperado, o antibiótico levou à inibição de *B. cereus*, indicada pela grande zona amarela na bioautografia realizada com tetraciclina (figura 24 (b)).

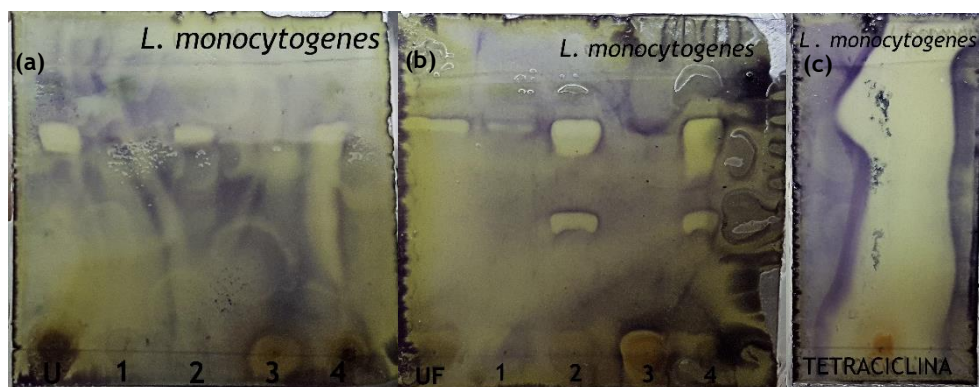


Figura 25 - Cromatogramas do extrato bruto metanólico da urze e frações (a), flores da urze e frações (b) e do antibiótico tetraciclina (b) revelados com suspensão celular de *Listeria monocytogenes*.

A análise da biotografia para *L. monocytogenes* dos extratos da urze (figura 25 (a)) e dos extratos das flores da urze (figura 25 (b)) revela semelhanças entre a atividade dos dois extratos. Ainda assim, a maior atividade antibacteriana é evidenciada pelas flores da urze, especialmente pelas frações 2 e 4, tal como verificado pela avaliação da CMI na qual estas frações apresentaram um valor de CMI menor ( $62,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). No que toca à bioautografia dos extratos da urze observa-se uma maior zona de inibição de crescimento para a fração 4, que pode ser devida à migração do composto ou compostos responsáveis pela atividade ou mesmo por ser a fração mais ativa segundo a avaliação da CMI. A bioautografia do antibiótico para *L. monocytogenes* demonstra a existência de uma grande zona inibitória (figura 25 (c)), tal como esperado.

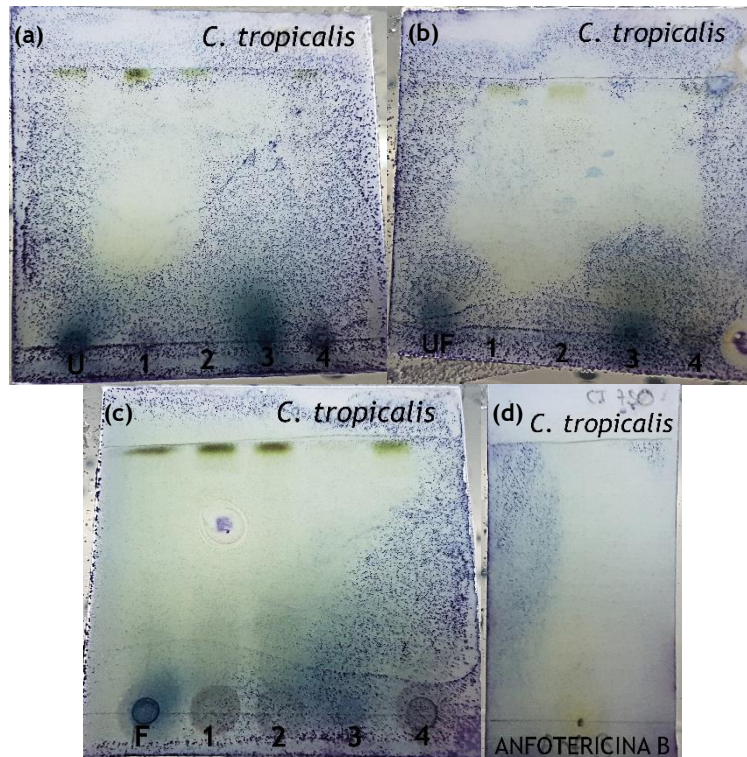


Figura 26 - Cromatogramas do extrato bruto metanólico da urze e frações (a), das flores da urze e frações (b), do feto comum (c) e antibiótico anfotericina B (d) revelados com suspensão celular de *Candida tropicalis*.

Na bioautografia em leveduras, o crescimento não foi tão homogêneo comparativamente ao crescimento na bioautografia em bactérias. Ainda assim, é possível encontrar alguma similaridade entre este ensaio e o ensaio da avaliação da CMI, no qual a fração menos polar (fração 1) correspondeu à fração mais ativa de cada planta, e nas figuras 26 (a), (b) e (c) se observa uma maior zona de inibição na proximidade da fração 1. Quanto ao antibiótico, a bioautografia revela a inibição do crescimento de *C. tropicalis* como esperado (figura 26 (d)).

Assim, é possível verificar a existência de compostos bioativos detentores de atividade antimicrobiana em todas as plantas, evidenciando o potencial antimicrobiano da urze e das suas flores, assim como do feto comum.

#### 5.4. Estudo de curvas de morte

O ensaio por curvas de morte é o método mais apropriado para determinar o efeito bactericida ou fungicida de um dado agente antimicrobiano e permite o estudo da interação dinâmica entre o agente antimicrobiano e o microrganismo, ao longo do tempo (Balouiri *et al.*, 2016).

Considerando os resultados obtidos relativos à atividade antibacteriana verificada sobre *Listeria monocytogenes* tal como a relevância deste microrganismo, prosseguiu-se com estudos direcionados à atividade dos extratos sobre esta bactéria gram positiva. *L. monocytogenes*

trata-se de uma bactéria patógena responsável pela listeriose, que é uma doença grave de origem alimentar com elevada taxa de mortalidade em mulheres grávidas, idosos, indivíduos imunocomprometidos e recém-nascidos. Em indivíduos saudáveis, *L. monocytogenes* geralmente pode originar gastroenterite febril auto-limitada (Ferreira and Domingues, 2016; Poimenidou *et al.*, 2016). Assim, selecionaram-se para posteriores estudos as frações que apresentaram maior atividade, nomeadamente as frações 2 e 4 das flores da urze, assim como o extrato bruto, e também a fração 4 da urze, procedendo à avaliação do modo de ação no crescimento de *Listeria monocytogenes* LMG 16779. No caso da urze, apenas foi selecionada a fração 4, uma vez que o valor de CMI para o extrato bruto era superior e em tais concentrações o extrato precipitava no meio de cultura, dificultando o ensaio. Foram testadas concentrações de 0,5x, 1x, 2x e 4x CMI de extrato (fração 4 da urze e extrato bruto das flores da urze CMI = 125 µg.mL<sup>-1</sup>; fração 2 e fração 4 das flores da urze CMI = 62,5 µg.mL<sup>-1</sup>). Realizaram-se medições às 0, 2, 4, 6, 8 e 24 horas de crescimento e os resultados são apresentados em gráfico com o log(UFC.mL<sup>-1</sup>) em função do tempo (horas), permitindo a comparação do crescimento de *L. monocytogenes* tratada com extrato com os controlos de crescimento e de solvente (DMSO).

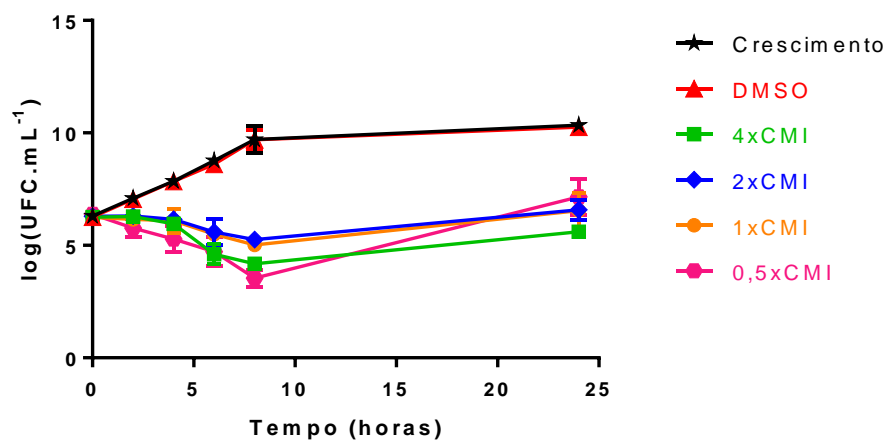


Figura 27 - Curva de morte de *Listeria monocytogenes* incubada com a fração 4 do extrato bruto da urze. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão.

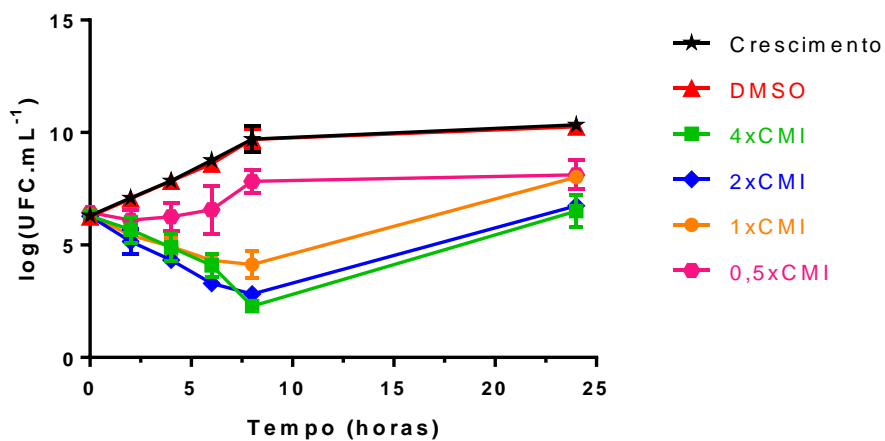


Figura 28 - Curva de morte de *Listeria monocytogenes* incubada com o extrato bruto das flores da urze. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão.

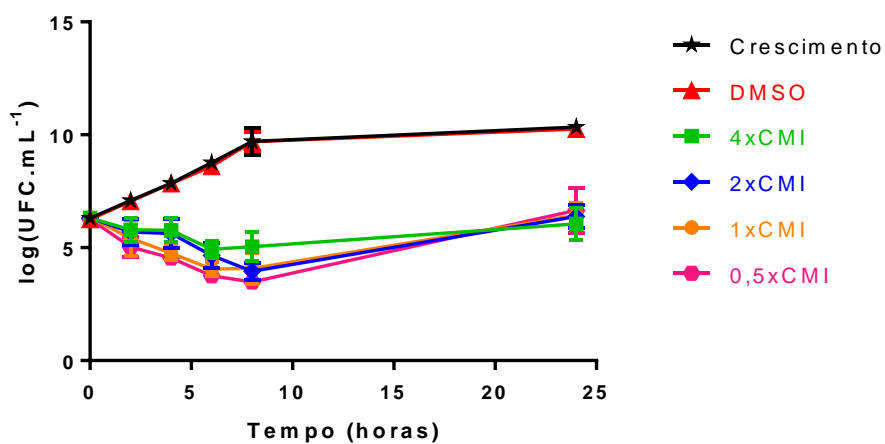


Figura 29 - Curva de morte de *Listeria monocytogenes* incubada com a fração 2 do extrato bruto das flores da urze. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão.

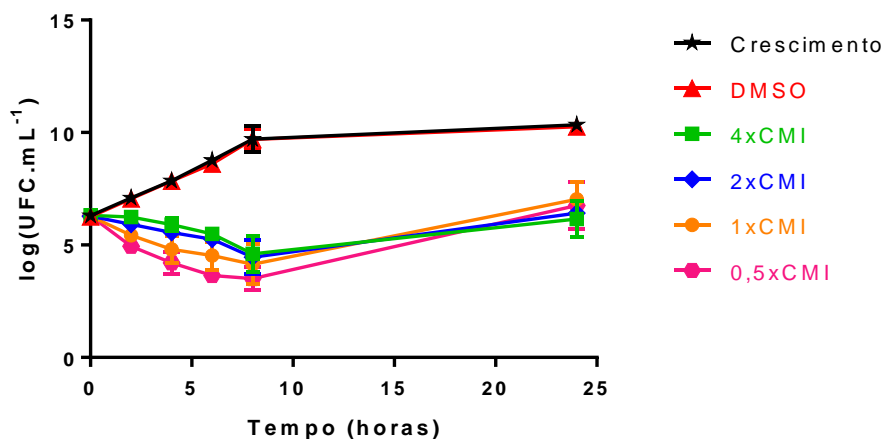


Figura 30 - Curva de morte de *Listeria monocytogenes* incubada com a fração 4 do extrato bruto das flores da urze. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão.

Pela observação das figuras 27, 28, 29 e 30 verifica-se que todos os extratos reduzem o crescimento de *L. monocytogenes* e apresentam um comportamento bacteriostático ao longo do tempo, quando comparado com o controle de crescimento e de solvente (DMSO). Para o extrato bruto das flores da urze verifica-se uma dependência da concentração, sendo que para uma maior concentração se verifica uma maior inibição do crescimento. Para as frações 2 e 4 esta diferença não é tão acentuada, demonstrando uma diminuição generalizada do crescimento até às 8 horas, seguindo-se um ligeiro aumento até às 24 horas, não ultrapassando, no entanto, a concentração inicial de inóculo usado.

A capacidade de extratos de plantas reduzirem o crescimento microbiano tem vindo a ser estudada, e um estudo de Silva e colaboradores (Silva *et al.*, 2013) demonstra que o extrato aquoso de folhas e frutos de *Vaccinium corymbosum*, um arbusto da mesma família da urze (*Ericaceae*), apresenta comportamento bacteriostático para *Listeria innocua*. Assim, este estudo revela resultados semelhantes aos obtidos na presente dissertação, em que todos os extratos avaliados apresentaram um modo de ação bacteriostático ao longo do tempo para *L. monocytogenes*.

Vários estudos reportam a presença de ácido cafeico em urze, nomeadamente na espécie *Erica arborea* (Demirkiran *et al.*, 2010; Guendouze-Bouchefa *et al.*, 2015; Luís *et al.*, 2011) e ainda a presença de quercetina (Guendouze-Bouchefa *et al.*, 2015), de ácido p-cumárico e ácido ferúlico (Luís *et al.*, 2011). Um estudo de Payne e colaboradores verificou a atividade antibacteriana do ácido cafeico, de quercetina, ácido p-cumárico e ácido ferúlico contra várias estirpes de *L. monocytogenes* (Payne *et al.*, 1989). Estes estudos sugerem que a atividade exibida pelos extratos da urze e das suas flores contra *L. monocytogenes* seja proveniente da presença destes compostos. Luís e colaboradores determinaram o conteúdo de vários compostos fenólicos em extratos metanólicos das diferentes partes aéreas de várias plantas, sendo que no caso das flores da urze o composto encontrado em maior quantidade foi o ácido elágico (Luís

*et al.*, 2011). Vatted e colaboradores demonstraram a atividade antibacteriana de extratos aquosos de bagaço de avelã contra *L. monocytogenes*, nos quais analisaram a presença de ácido elágico e encontraram uma forte correlação entre a presença deste ácido fenólico e a atividade exibida (Vatted *et al.*, 2004). Estes estudos demonstram a diferença entre a composição fitoquímica entre flores e as restantes partes aéreas de urze, sugerindo também que a atividade antimicrobiana por parte das flores contra *L. monocytogenes* possa estar relacionada com a presença de ácido elágico.

## 5.5. Estudo da inibição da formação de biofilmes

Os biofilmes formados em ambientes de processamento de alimentos são de especial importância, pois têm potencial para atuar como fonte de contaminação microbiana, podendo levar à deterioração dos alimentos ou transmissão de doenças (Stepanović *et al.*, 2004). Além disso, o modo de vida das células em biofilmes oferece vantagens para os microrganismos, como a resistência reforçada aos stresses ambientais e aos antibióticos (Penesyán *et al.*, 2015). *Listeria monocytogenes* apresenta capacidade de fixação a superfícies, ou seja, capacidade de formação de biofilmes em superfícies como metais, vidro e superfícies de borracha ou plásticas, podendo levar à contaminação de produtos alimentares (Jadhav *et al.*, 2013; Stepanović *et al.*, 2004). Desta forma, os mesmos extratos selecionados no ponto anterior (6.4.) foram avaliados ao nível da inibição da formação de biofilmes, permitindo assim testar se a sua ação inibitória é verificada só em células planctónicas, ou se atua também na inibição da formação de biofilmes.

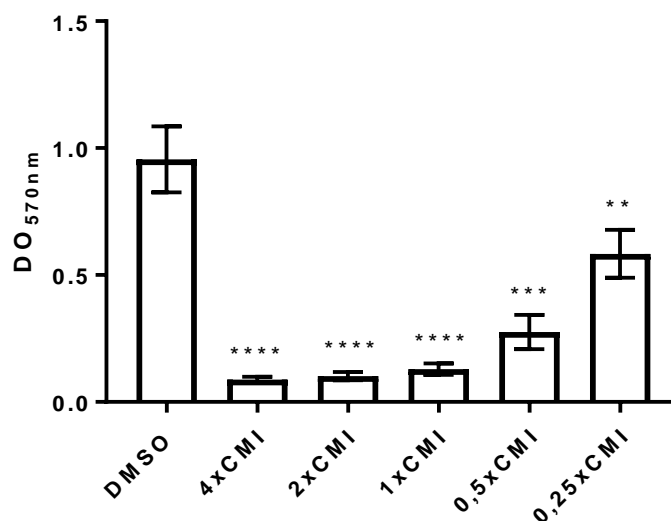


Figura 31 - Avaliação do efeito da fração 4 do extrato bruto metanólico da urze sobre a formação de biofilmes de *Listeria monocytogenes*. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  quando comparado com DMSO (controlo de solvente).

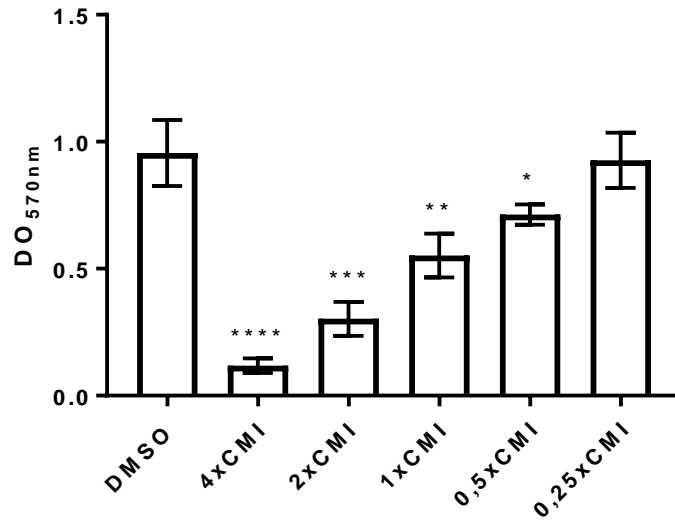


Figura 32 - Avaliação do efeito do extrato bruto metanólico das flores da urze sobre a formação de biofilmes de *Listeria monocytogenes*. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  quando comparado com DMSO (controle de solvente).

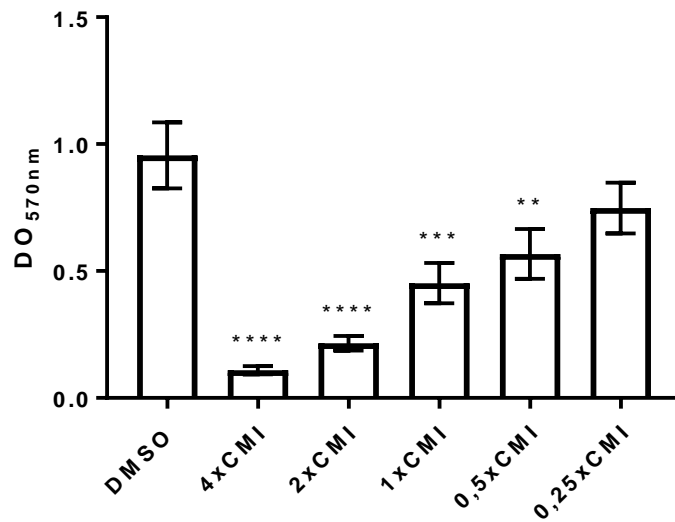


Figura 33 - Avaliação do efeito da fração 2 do extrato bruto metanólico das flores da urze sobre a formação de biofilmes de *Listeria monocytogenes*. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  quando comparado com DMSO (controle de solvente).

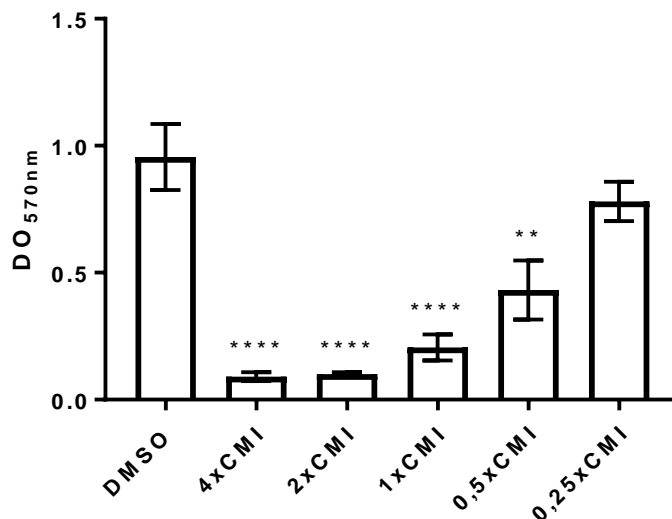


Figura 34 - Avaliação do efeito da fração 4 do extrato bruto metanólico das flores da urze sobre a formação de biofilmes de *Listeria monocytogenes*. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  quando comparado com DMSO (controle de solvente).

As figuras 31 a 34 correspondem aos resultados do efeito da fração 4 da urze, do extrato bruto, da fração 2 e 4 das flores da urze, respetivamente, quando se avaliou a formação de biofilmes na presença de concentrações de 0,5x, 1x, 2x e 4x CMI, em *L. monocytogenes*. Pela observação das figuras, para concentrações iguais ou superiores a 0,5x CMI todos os extratos levam a uma diminuição significativamente estatística da formação de biofilmes, sendo de destacar a atividade inibitória evidenciada pela fração 4 da urze, que mesmo na concentração mais baixa (0,25x CMI), apresenta uma redução significativa da formação de biofilmes por esta bactéria ( $p < 0,01$ ). Esta fração e a fração 4 das flores da urze inibem a formação de biofilmes significativamente com  $p < 0,001$  para concentrações de 4x, 2x e 1x CMI.

Vários estudos relatam a atividade de extratos de plantas na inibição da formação de biofilmes em *L. monocytogenes*, como o estudo de Nostro e colaboradores (2016) que verificou a atividade *in vitro* de extratos metanólicos de algumas plantas na inibição da formação de biofilmes de bactérias associadas a surtos alimentares (Nostro *et al.*, 2016). Neste estudo, os extratos de *Punica granatum* L. e de *Rhus coriaria* L. (CMI = 625 e 78  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  respetivamente), numa gama de concentrações que varia entre  $\frac{1}{2}$  a  $\frac{1}{16}$  xCMI produzem uma inibição significativa de biofilmes de 80-60 % para *L. monocytogenes*. Comparando estes resultados com os obtidos na presente dissertação verifica-se que no estudo as concentrações, quando relacionadas com a CMI, necessárias para alcançar o mesmo grau de significância do presentemente obtido são menores. Um outro estudo, de Sandasi e colaboradores (2010) revela o efeito de extratos de algumas ervas usadas na culinária e de algumas plantas na formação de biofilmes por *L. monocytogenes*, em que a percentagem de inibição obtida pelos extratos ronda os 74-78 % e é muito próxima da obtida para o antibiótico ciprofloxacina (75%) (Sandasi *et al.*,

2010). Estes resultados são semelhantes aos obtidos na presente dissertação. Estas evidências sugerem o potencial destes extratos contra a formação de biofilme de *L. monocytogenes*.

## 5.6. Avaliação da tolerância a condições adversas

*Listeria monocytogenes* é uma bactéria ubíqua na natureza e além da capacidade de formar biofilmes, sobrevive em condições de stress (baixo pH, baixa temperatura e elevada concentração de sal), o que facilita a sua transmissão através do consumo de alimentos contaminados, como a carne, vegetais, alimentos prontos a comer ou leite não pasteurizado (Ferreira and Domingues, 2016; Poimenidou *et al.*, 2016). De forma a avaliar se os extratos contribuem para a suscetibilidade de *L. monocytogenes* a condições adversas ou, se pelo contrário, induzem a sua proteção celular, realizou-se uma pré-incubação das células com concentração subinibitória (0,5x CMI) do extrato bruto metanólico das flores da urze, e respetivas frações 2 e 4, assim como a fração 4 da urze, e avaliou-se o seu efeito na sobrevivência de *L. monocytogenes* a condições adversas. Este estudo permite averiguar o potencial dos extratos em aplicações alimentares de forma a prevenir o aparecimento desta bactéria mesmo em processos de preservação alimentar.

As figuras 35 e 36 mostram o efeito da fração 4 da urze, do extrato bruto metanólico das flores da urze e respetivas frações 2 e 4, na tolerância de *L. monocytogenes* a pH ácido (2,4) e a temperaturas elevadas (55 °C), respetivamente.

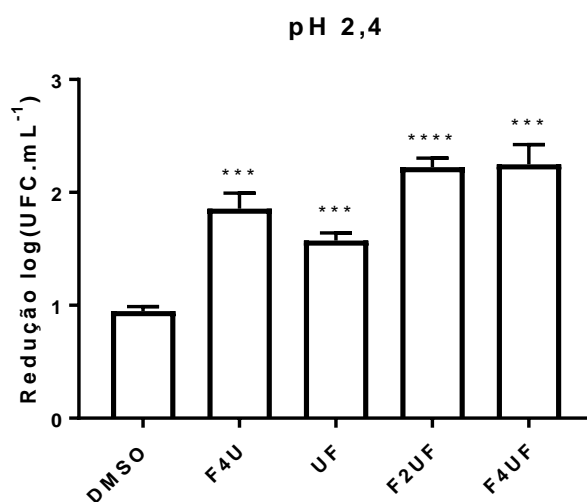


Figura 35 - Avaliação do efeito da fração 4 do extrato bruto metanólico da urze, extrato bruto e frações 2 e 4 das flores da urze em *Listeria monocytogenes* submetida a pH ácido 2,4 durante 60 minutos. \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  quando comparado com DMSO (controlo de solvente). F4U: fração 4 do extrato bruto metanólico da urze; UF: extrato bruto metanólico das flores da urze; F2UF: fração 2 do extrato bruto metanólico das flores da urze; F4UF: fração 4 do extrato bruto metanólico das flores da urze.

Analisando os resultados obtidos, verifica-se que todos os extratos levam a um aumento estatisticamente significativo da redução logarítmica das unidades formadoras de colónias por mililitro, tornando a bactéria mais suscetível à acidez do meio envolvente ( $p < 0,001$ ).

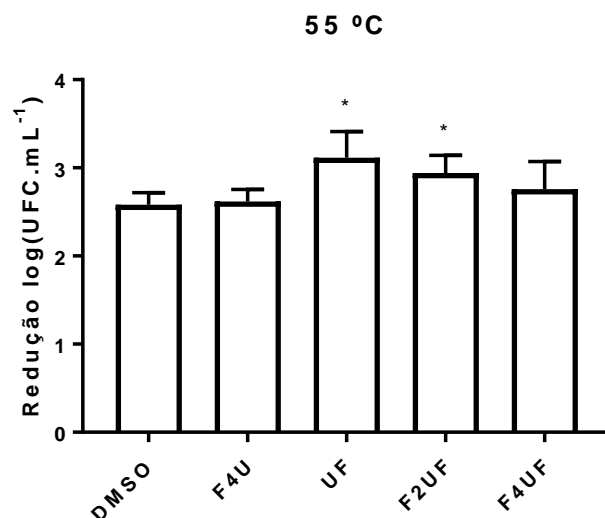


Figura 36 - Avaliação do efeito da fração 4 do extrato bruto metanólico da urze, extrato bruto e frações 2 e 4 das flores da urze em *Listeria monocytogenes* submetida a temperaturas elevadas (55 °C) durante 120 minutos. \*  $p < 0,5$  quando comparado com DMSO (controlo de solvente). F4U: fração 4 do extrato bruto metanólico da urze; UF: extrato bruto metanólico das flores da urze; F2UF: fração 2 do extrato bruto metanólico das flores da urze; F4UF: fração 4 do extrato bruto metanólico das flores da urze.

Por outro lado, no que toca à tolerância a temperaturas elevadas apenas o extrato bruto das flores da urze e a fração 2 reduzem significativamente a tolerância de *L. monocytogenes* ( $p < 0,5$ ), não demonstrando, no entanto, indução de proteção celular.

Existem poucos estudos que avaliem o efeito de extratos de plantas na tolerância de microrganismos a condições adversas. Este género de estudo é mais direccionado na análise da adaptação de *L. monocytogenes* a alimentos, como o estudo de Poimenidou e colaboradores (Poimenidou *et al.*, 2016) que demonstra que células de *L. monocytogenes* adaptadas a tomate cereja e a folhas de alface podem adquirir resistência a agentes antibacterianos. Um outro estudo de Oliveira e colaboradores revela que o uso de um composto natural, o resveratrol, induz um aumento na tolerância de *L. monocytogenes* ao stress após adaptação ao resveratrol (Oliveira *et al.*, 2017), contrariamente ao obtido na presente dissertação, em que se verificou um aumento da suscetibilidade de *L. monocytogenes* tratada com os extratos, em condições de pH baixo e temperaturas elevadas. Esta diferença pode ser devida a uma ação conjunta de vários compostos presentes em cada extrato ou a uma diminuição da expressão de proteínas relacionadas com a tolerância a estes fatores (Gandhi and Chikindas, 2007). Estas evidências salientam a relevância dos resultados obtidos, já que alguns compostos podem induzir proteção celular ao stress e, na presente dissertação tal não se verificou. Estes resultados incentivam assim o potencial uso destes extratos, por exemplo, como conservante alimentar alternativo para controlar *L. monocytogenes*. Contudo mais estudos são necessários, nomeadamente no despiste de toxicidade por parte dos extratos.

As doenças transmitidas por alimentos constituem uma questão global com elevado impacto na saúde humana, por isso o desenvolvimento de novas estratégias antimicrobianas para o controlo e a eliminação de microrganismos em alimentos frescos é de extrema importância, permitindo também aumentar a vida útil dos produtos alimentares (Hintz *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2017). Desta forma, estes estudos demonstram o potencial dos extratos da urze e das suas flores no controlo de células planctónicas, em que apresentaram um comportamento bacteriostático ao longo do tempo, e em biofilmes de *L. monocytogenes* nos quais se verificou uma inibição significativa da sua formação. Em adição, este último estudo mostra que os extratos provocam um aumento da suscetibilidade de *L. monocytogenes* a condições adversas. Assim, os extratos da urze e das suas flores podem ser uma potencial fonte de compostos naturais que podem ser usados como conservantes e no tratamento de infeções causadas por *L. monocytogenes*. No entanto, mais estudos devem ser realizados, no âmbito de compreender melhor que compostos estão envolvidos na atividade apresentada pelos extratos.



## Capítulo V

### Conclusão

A presente dissertação teve como objetivo global a caracterização fitoquímica dos extratos da urze e do feto comum, e a avaliação da atividade antioxidante bem como do potencial antimicrobiano.

Os resultados para a caracterização fitoquímica indicam que o extrato que apresenta maior teor em fenóis totais é o extrato das flores, e em flavonóides totais o extrato da urze e o extrato das suas flores, com aproximadamente o mesmo teor.

Todos os extratos revelaram potencial antioxidante pelo método do DPPH, sendo que a urze e as suas flores apresentaram atividade antioxidante forte e o feto comum atividade moderada. Pelo método que usa o sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, o extrato que apresentou atividade antioxidante superior foi o extrato do feto comum. Pela avaliação da atividade antioxidante pelos dois métodos diferentes conclui-se que os extratos apresentam um potencial antioxidante interessante ao nível da sequestração de radicais livres, evidenciada pelo método do DPPH, e uma menor atividade ao nível da oxidação lipídica, demonstrada pelo método do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, sendo que neste aspeto o feto comum é o que apresenta um maior potencial.

Relativamente à atividade antimicrobiana, apesar do feto comum não demonstrar atividade antibacteriana, apresentou atividade antifúngica. Os extratos da urze e das suas flores também apresentaram atividade antifúngica e, à semelhança do observado com o feto comum, a fração mais ativa de todas as plantas foi a fração menos polar (fração 1). Adicionalmente, os extratos da urze e das suas flores revelaram um bom potencial antibacteriano, nomeadamente contra bactérias gram positivas, sendo de salientar a atividade exibida pela fração mais polar (fração 4) da urze, e pelo extrato bruto e frações 2 e 4 das flores da urze. Perante a atividade antimicrobiana verificada, procedeu-se à avaliação do modo de ação do extrato bruto e das frações com maior atividade, verificando-se que todos os extratos reduzem o crescimento de *L. monocytogenes*, apresentando um comportamento bacteriostático ao longo do tempo. Na formação de biofilmes, houve uma inibição significativa desta capacidade para todos os extratos e frações analisadas, sendo de destacar a fração 4 da urze em que todas as concentrações testadas, inibitórias e subinibitórias, levaram a uma redução significativa. Na tolerância a condições adversas, os resultados revelaram que os extratos tornam *L. monocytogenes* significativamente mais suscetível a pH ácido, e no que toca a temperaturas elevadas apenas o extrato bruto da urze e a fração 2 das flores da urze apresentaram uma redução significativa da sobrevivência de *L. monocytogenes*.

Assim, conclui-se que a urze e o feto comum podem ser uma fonte de novos compostos com potencial uso terapêutico.

Em estudos futuros seria relevante proceder a uma caracterização mais aprofundada de cada extrato e frações ativas, de forma a compreender e identificar os compostos responsáveis pelas atividades biológicas aqui descritas. Seria também importante avaliar a toxicidade dos extratos e compostos envolventes de forma a assegurar o seu uso seguro, bem como experimentar outros solventes na extração e testar compostos purificados. Uma vez que se observaram algumas diferenças entre a atividade demonstrada pelos extratos da urze e pelos extratos das suas flores, seria igualmente pertinente perceber as diferenças encontradas, em particular ao nível dos compostos envolventes.

## Capítulo VI

### Referências bibliográficas

Ã, M. S. (2006) 'Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review', *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, pp. 531-537. DOI:10.1016/j.jfca.2004.11.005.

Akkol, E. K., Yeşilada, E. and Güvenç, A. (2008) 'Valuation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of Erica species native to Turkey', *Journal of Ethnopharmacology*, 116 (2), pp. 251-257. DOI:10.1016/j.jep.2007.11.023.

Ansar, M., Ghatak, A., Ghatak, L., Srinivasaraghavan, A., Balodi, R. and Raj, C. (2016) 'Chapter 6: Secondary Metabolites in Pathogen-Induced Plant Defense', in: *Plant Secondary Metabolites: Volume 3*. pp. 169-184.

Artini, M., Papa, R., Barbato, G., Scoarughi, G. L., Cellini, A., Morazzoni, P., Bombardelli, E. and Selan, L. (2012) 'Bacterial biofilm formation inhibitory activity revealed for plant derived natural compounds', *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20 (2), pp. 920-926. DOI:10.1016/j.bmc.2011.11.052.

Ay, M., Bahadori, F., Öztürk, M., Kolak, U. and Topçu, G. (2007) 'Antioxidant activity of Erica arborea', *Fitoterapia*, 78 (7-8), pp. 571-573. DOI:10.1016/j.fitote.2007.03.024.

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., *et al.* (2013) 'Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review', *Journal of Food Engineering*, 117 (4), pp. 426-436. DOI:10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014.

Balouiri, M., Sadiki, M. and Ibsouda, S. K. (2016) 'Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review', *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6 (2), pp. 71-79. DOI:10.1016/j.jpha.2015.11.005.

Biva, I. J., Ndi, C. P., Griesser, H. J. and Semple, S. J. (2016) 'Antibacterial constituents of Eremophila alternifolia: An Australian aboriginal traditional medicinal plant', *Journal of Ethnopharmacology*, 182, pp. 1-9. DOI:10.1016/j.jep.2016.02.011.

Cahill, B. K., Seeley, K. W., Gutel, D. and Ellis, T. N. (2015) 'Klebsiella pneumoniae O antigen loss alters the outer membrane protein composition and the selective packaging of proteins into secreted outer membrane vesicles', *Microbiological Research*, 180, pp. 1-10. DOI:10.1016/j.micres.2015.06.012.

Chikezie, P. C., Ibegbulem, C. O. and Mbagwu, F. N. (2015) 'Bioactive Principles from Medicinal Plants', *Research Journal of Phytochemistry*, 9 (3), pp. 88-115. DOI:10.3923/rjphyto.2015.88.115.

Chuah, E. L., Zakaria, Z. A., Suhaili, Z., Abu Bakar, S. and Desa, M. N. M. (2014) 'Antimicrobial Activities of Plant Extracts against Methicillin-Susceptible and Methicillin-Resistant

*Staphylococcus aureus*', *Journal of Microbiology Research*, 4 (1), pp. 6-13. DOI:10.5923/j.microbiology.20140401.02.

Cicco, N., Lanorte, M. T., Paraggio, M., Viggiano, M. and Lattanzio, V. (2009) 'A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts', *Microchemical Journal*, 91 (1), pp. 107-110. DOI:10.1016/j.microc.2008.08.011.

Cobrado, L., Azevedo, M. M., Silva-Dias, A., Ramos, J. P., Pina-Vaz, C. and Rodrigues, A. G. (2012) 'Cerium, chitosan and hamamelitannin as novel biofilm inhibitors?', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67 (5), pp. 1159-1162. DOI:10.1093/jac/dks007.

Cos, P., Vlietinck, A. J., Berghe, D. Vanden and Maes, L. (2006) 'Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro "proof-of-concept"', *Journal of Ethnopharmacology*, 106 (3), pp. 290-302. DOI:10.1016/j.jep.2006.04.003.

Croteau, R., Kutchan, T. M. and Lewis, N. G. (2000) 'Natural Products (Secondary Metabolites)', in: *Biochemistry Molecular Biology of Plants*.7, pp. 1250-1318.

da Cruz Cabral, L., Fernández Pinto, V. and Patriarca, A. (2013) 'Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods', *International Journal of Food Microbiology*, 166 (1), pp. 1-14. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.026.

Delaquis, J. P., Stanich, K., Girard, B. and Mazza, G. (2002) 'Antimicrobial activity of individual and mixed fraction of dill, celandra, coriander and eucalyptus essential oil', *International Journal of Food Microbiology*, 74, pp. 101-109.

Demirkiran, O., Topçu, G., Bahadori, F., Ay, M., Nazemiyeh, H. and Choudhary, I. (2010) 'Two new phenylpropanoid glycosides from the leaves and flowers of *Erica arborea*', *Helvetica Chimica Acta*, 93 (1), pp. 77-83. DOI:10.1002/hlca.200800379.

Djeussi, D. E., Noumedem, J. A., Seukep, J. A., Fankam, A. G., Voukeng, I. K., Tankeo, S. B., Nkuete, A. H. and Kuete, V. (2013) 'Antibacterial activities of selected edible plants extracts against multidrug-resistant Gram-negative bacteria', *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13 (1), pp. 164. DOI:10.1186/1472-6882-13-164.

Duarte, A. F., Ferreira, S., Oliveira, R., Domingues, F. C., Silva, F., Domingues, F. C., Queiroz, J. A., Oleastro, M. and Domingues, F. C. (2013) 'Effect of Coriander Oil (*Coriandrum sativum*) on Planktonic and Biofilm Cells of *Acinetobacter baumannii*', *International Journal of Food Microbiology*, 8 (3-4), pp. 62-68. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.004.

Early, R. (2009) *Foodborne Pathogens*. DOI:10.1533/9781845696337.1.205.

Evrard, B., Balestrino, D., Dosgilbert, A., Bouya-Gachancard, J. L. J., Charbonnel, N., Forestier, C. and Tridon, A. (2010) 'Roles of capsule and lipopolysaccharide O antigen in interactions of human monocyte-derived dendritic cells and *Klebsiella pneumoniae*', *Infection and Immunity*, 78 (1), pp. 210-219. DOI:10.1128/IAI.00864-09.

Fair, R. J. and Tor, Y. (2014) 'Perspectives in Medicinal Chemistry Antibiotics and Bacterial

Resistance in the 21st Century', *Perspectives in Medicinal Chemistry*, pp. 25-64. DOI:10.4137/PMC.S14459.Received.

Fernandes, A. J. D., Ferreira, M. R. A., Randau, K. P., de Souza, T. P. and Soares, L. A. L. (2012) 'Total Flavonoids Content in the Raw Material and Aqueous Extractives from *Bauhinia monandra* Kurz (Caesalpinaceae)', *The Scientific World Journal*, 2012, pp. 1-7. DOI:10.1100/2012/923462.

Ferreira, S. and Domingues, F. (2016) 'The antimicrobial action of resveratrol against *Listeria monocytogenes* in food-based models and its antibiofilm properties', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, pp. 4531-4535. DOI:10.1002/jsfa.7669.

Gandhi, M. and Chikindas, M. L. (2007) 'Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive', *International Journal of Food Microbiology*, 113 (1), pp. 1-15. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.008.

Gray, A. I. (2012) *Natural Products Isolation*. Vol. 864. DOI:10.1007/978-1-61779-624-1.

Guendouze-Bouchefa, N., Madani, K., Chibane, M., Boulekbache-Makhlouf, L., Hauchard, D., Kiendrebeogo, M., Stévigny, C., Okusa, P. N. and Duez, P. (2015) 'Phenolic compounds, antioxidant and antibacterial activities of three Ericaceae from Algeria', *Industrial Crops and Products*, 70, pp. 459-466. DOI:10.1016/j.indcrop.2015.03.053.

Gupta, C. and Prakash, D. (2014) 'Phytonutrients as therapeutic agents', *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 11 (3), pp. 151-169. DOI:10.1515/jcim-2013-0021.

Gyawali, R. and Ibrahim, S. A. (2014) 'Natural products as antimicrobial agents', *Food Control*, 46, pp. 412-429. DOI:10.1016/j.foodcont.2014.05.047.

Hamza, O. J. M., van den Bout-van den Beukel, C. J. P., Matee, M. I. N., Moshi, M. J., Mikx, F. H. M., Selemani, H. O., Mbwambo, Z. H., Van der Ven, A. J. A. M. and Verweij, P. E. (2006) 'Antifungal activity of some Tanzanian plants used traditionally for the treatment of fungal infections', *Journal of Ethnopharmacology*, 108 (1), pp. 124-132. DOI:10.1016/j.jep.2006.04.026.

Harnafi, H., Bouanani, N. el H., Aziz, M., Serghini Caid, H., Ghalim, N. and Amrani, S. (2007) 'The hypolipidaemic activity of aqueous *Erica multiflora* flowers extract in Triton WR-1339 induced hyperlipidaemic rats: A comparison with fenofibrate', *Journal of Ethnopharmacology*, 109 (1), pp. 156-160. DOI:10.1016/j.jep.2006.09.017.

Hill, C. (2012) 'Virulence or niche factors: What's in a name?', *Journal of Bacteriology*, 194 (21), pp. 5725-5727. DOI:10.1128/JB.00980-12.

Hintz, T., K. Matthews, K. and Di, R. (2015) 'Review: The use of plant antimicrobial compounds for food preservation', *Hindawi (BioMed Research International)*, 2015, pp. 1-12.

Holmes, A. H., Moore, L. S. P., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., Guerin, P. J. and Piddock, L. J. V (2016) 'Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial

- resistance', *The Lancet*, 387 (10014), pp. 176-187. DOI:10.1016/S0140-6736(15)00473-0.
- Jadhav, S., Shah, R., Bhawe, M. and Palombo, E. A. (2013) 'Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* planktonic cells and biofilms', *Food Control*, 29 (1), pp. 125-130. DOI:10.1016/j.foodcont.2012.05.071.
- Kardong, D., Upadhyaya, S. and Saikia, L. R. (2013) 'Screening of phytochemicals, antioxidant and antibacterial activity of crude extract of *Pteridium aquilinum* Kuhn', *Journal of Pharmacy Research*, 6 (1), pp. 179-182. DOI:10.1016/j.jopr.2012.11.037.
- Kouidhi, B., Al Qurashi, Y. M. A. and Chaieb, K. (2015) 'Drug resistance of bacterial dental biofilm and the potential use of natural compounds as alternative for prevention and treatment', *Microbial Pathogenesis*, 80, pp. 39-49. DOI:10.1016/j.micpath.2015.02.007.
- Kramer, B., Thielmann, J., Hickisch, A., Muranyi, P., Wunderlich, J. and Hauser, C. (2015) 'Antimicrobial activity of hop extracts against foodborne pathogens for meat applications', *Journal of Applied Microbiology*, 118 (3), pp. 648-657. DOI:10.1111/jam.12717.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R. and Nithyanandam, R. (2011) 'A review of the antioxidant potential of medicinal plant species', *Food and Bioprocess Processing*, 89 (3), pp. 217-233. DOI:10.1016/j.fbp.2010.04.008.
- Lattanzio, V. (2013) 'Phenolic Compounds: Introduction', in: Ramawat, K. G. and Mérillon, J.-M. (eds.) *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 1543-1580.
- Levy, S. B. and Marshall, B. (2004) 'Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses', *Nature Medicine*, 10 (1078-8956 (Print)), pp. S122-S129. DOI:10.1038/nm1145.
- Ludwiczuk, A., Skalicka-Woźniak, K. and Georgiev, M. I. (2017) *Terpenoids, Pharmacognosy*. DOI:10.1016/B978-0-12-802104-0.00011-1.
- Luís, A., Domingues, F. and Duarte, A. P. (2011) 'Bioactive compounds, RP-HPLC analysis of phenolics, and antioxidant activity of some Portuguese shrub species extracts.', *Natural Product Communications*, 6 (12), pp. 1863-72.
- Luís, Â., Domingues, F., Gil, C. and Duarte, A. P. (2009) 'Antioxidant activity of extracts of Portuguese shrubs: *Pterospartum tridentatum*, *Cytisus scoparius* and *Erica* spp.', *Journal of Medicinal Plants Research*, 3 (11), pp. 886-893.
- Luís, Â., Neiva, D. M., Pereira, H., Gominho, J., Domingues, F. and Duarte, A. P. (2016) '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', *Industrial Crops and Products*, 91 (July), pp. 97-103. DOI:10.1016/j.indcrop.2016.06.022.
- Luís, A., Neiva, D., Pereira, H., Gominho, J., Domingues, F. and Duarte, A. P. (2014) 'Stumps of *eucalyptus globulus* as a source of antioxidant and antimicrobial polyphenols', *Molecules*, 19

(10), pp. 16428-16446. DOI:10.3390/molecules191016428.

Mabhiza, D., Chitemerere, T. and Mukanganyama, S. (2016) 'Antibacterial Properties of Alkaloid Extracts from *Callistemon citrinus* and *Vernonia adoensis* against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*', *International Journal of Medicinal Chemistry*, 2016, pp. 1-7. DOI:10.1155/2016/6304163.

Mann, J., Davidson, R. S., Hobbs, J. B., Banthorpe, D. V. and Harborne, J. B. (1994) *Natural products: their chemistry and biological significance*.

Márquez-García, B. and Cordoba, F. (2010) 'Antioxidative system in wild populations of *Erica andevalensis*', *Environmental and Experimental Botany*, 68 (1), pp. 58-65. DOI:10.1016/j.envexpbot.2009.10.008.

Marrs, R. H. and Watt, A. S. (2006) 'Biological flora of the British Isles: *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn', *Journal of Ecology*, 94 (6), pp. 1272-1321. DOI:10.1111/j.1365-2745.2006.01177.x.

Marston, A. (2011) 'Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry', *Journal of Chromatography A*, 1218 (19), pp. 2676-2683. DOI:10.1016/j.chroma.2010.12.068.

Martins, N., Barros, L. and Ferreira, I. C. F. R. (2016) 'Trends in Food Science & Technology In vivo antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps', 48. DOI:10.1016/j.tifs.2015.11.008.

Matsuura, H. N. and Fett-Neto, A. G. (2017) 'Plant Alkaloids: Main Features, Toxicity, and Mechanisms of Action', in: Carlini, C. R. and Ligabue-Braun, R. (eds.) *Plant Toxins*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 243-261.

McGuire, A. F. and Kron, K. A. (2005) 'Phylogenetic Relationships of European and African *Ericas*', *International Journal of Plant Sciences*, 166 (2), pp. 311-318. DOI:10.1086/427478.

Mehndiratta, P. L. and Bhalla, P. (2014) 'Use of antibiotics in animal agriculture and emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones: need to assess the impact on public health', *Indian J Med Res*, 140, pp. 339-344.

Michaux, C., Hartke, A., Martini, C., Reiss, S., Albrecht, D., Budin-Verneuil, A., *et al.* (2014) 'Involvement of *Enterococcus faecalis* small RNAs in stress response and virulence', *Infection and Immunity*, 82 (9), pp. 3599-3611. DOI:10.1128/IAI.01900-14.

Mostafa, A. A., Al-Askar, A. A., Almaary, K. S., Dawoud, T. M., Sholkamy, E. N. and Bakri, M. M. (2017) 'Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases', *Saudi Journal of Biological Sciences*, pp. 0-5. DOI:10.1016/j.sjbs.2017.02.004.

Mugrabi De Kuppler, A. L., Fagúndez, J., Bellstedt, D. U., Oliver, E. G. H., León, J. and Pirie, M. D. (2015) 'Testing reticulate versus coalescent origins of *Erica lusitanica* using a species phylogeny of the northern heathers (Ericaceae, Ericaceae)', *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 88, pp. 121-131. DOI:10.1016/j.ympev.2015.04.005.

NCCLS (2002) *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts ; Approved Standard – Second Edition Serving the World ' s Medical Science Community Through Voluntary Consensus*. Vol. 22.

NCCLS (2003) *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard– Eighth Edition*. Vol. 23.

NCCLS (2005) *Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico, Norma Aprovada*. Vol. 23.

Negi, P. S. (2012) 'Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application', *International Journal of Food Microbiology*, 156 (1), pp. 7-17. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.006.

Nguefack, J., Tangué, O., Dongmo, J. B. L., Dakole, C. D., Leth, V., Vismer, H. F., Amvam Zollo, P. H. and Nkengfack, A. E. (2012) 'Synergistic action between fractions of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against *Penicillium expansum*', *Food Control*, 23 (2), pp. 377-383. DOI:10.1016/j.foodcont.2011.08.002.

Nostro, A., Guerrini, A., Marino, A., Tacchini, M., Di Giulio, M., Grandini, A., *et al.* (2016) 'In vitro activity of plant extracts against biofilm-producing food-related bacteria', *International Journal of Food Microbiology*, 238, pp. 33-39. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.024.

Nunes, R., Rodrigues, S., Pasko, P., Tyszka-Czochara, M., Grenha, A. and De Carvalho, I. S. (2014) 'Effect of *Erica australis* extract on Caco-2 cells, fibroblasts and selected pathogenic bacteria responsible for wound infection', *Industrial Crops and Products*, 52, pp. 99-104. DOI:10.1016/j.indcrop.2013.10.015.

Nychas, G. J. E. (1995) 'Natural antimicrobials from plants', in: *New Methods of Food Preservation*. pp. 58-89.

Oliveira, A. R., Domingues, F. C. and Ferreira, S. (2017) 'The influence of resveratrol adaptation on resistance to antibiotics, benzalkonium chloride, heat and acid stresses of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*', *Food Control*, 73, pp. 1420-1425. DOI:10.1016/j.foodcont.2016.11.011.

Osman, K., Evangelopoulos, D., Basavannacharya, C., Gupta, A., McHugh, T. D., Bhakta, S. and Gibbons, S. (2012) 'An antibacterial from *Hypericum acmosepalum* inhibits ATP-dependent MurE ligase from *Mycobacterium tuberculosis*', *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39 (2), pp. 124-129. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2011.09.018.

Ozkan, G., Kamiloglu, S., Ozdal, T. and Boyacioglu, D. (2016) 'Potential Use of Turkish Medicinal Plants in the', pp. 1-32. DOI:10.3390/molecules21030257.

Panneerselvam, C., Murugan, K., Roni, M., Aziz, A. T., Suresh, U., Rajaganesh, R., *et al.* (2016) 'Fern-synthesized nanoparticles in the fight against malaria: LC/MS analysis of *Pteridium aquilinum* leaf extract and biosynthesis of silver nanoparticles with high mosquitocidal and

antiplasmodial activity', *Parasitology Research*, 115 (3), pp. 997-1013. DOI:10.1007/s00436-015-4828-x.

Parekh, J., Jadeja, D. and Chanda, S. (2005) 'Efficacy of Aqueous and Methanol Extracts of Some Medicinal Plants for Potential Antibacterial Activity', *Methods*, 29, pp. 203-210.

Paulsen, B. S. (2010) *Highlights through the history of plant medicine, Bioactive compounds in plants - benefits and risks for man and animals*. Vol. 50.

Payne, K. I. M. D., Rico-munoz, E. and Davidson, P. M. (1989) 'The Antimicrobial Activity of Phenolic Compounds Against *Listeria monocytogenes* and Their Effectiveness in a Model Milk System', 52 (3), pp. 151-153.

Penesyan, A., Gillings, M. and Paulsen, I. T. (2015) 'Antibiotic discovery: Combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities', *Molecules*, 20 (4), pp. 5286-5298. DOI:10.3390/molecules20045286.

Pinho, P. M., Naengchomng, W., Kijjoa, A., Nazareth, N., Silva, A. M. S., Eaton, G. and Herz, W. (2006) 'An unusual glucoside from *Cleistanthus gracilis*', *Phytochemistry*, 67 (16), pp. 1789-1792. DOI:10.1016/j.phytochem.2006.01.014.

Poimenidou, S. V., Chatzithoma, D. N., Nychas, G. J. and Skandamis, P. N. (2016) 'Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to heat, salinity and low pH, after habituation on cherry tomatoes and lettuce leaves', *PLoS ONE*, 11 (10), pp. 1-16. DOI:10.1371/journal.pone.0165746.

Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M. and Ignacimuthu, S. (2006) 'In vitro antibacterial activity of some plant essential oils', *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6 (1), pp. 39. DOI:10.1186/1472-6882-6-39.

Prakash, D. and Sharma, G. (2014) 'Phytochemicals of nutraceutical importance: Do They Defend Against Diseases?', in: *Phytochemicals of Nutraceutical Importance*. pp. 1-24.

Proestos, C. and Komaitis, M. (2013) 'Analysis of Naturally Occurring Phenolic Compounds in Aromatic Plants by RP-HPLC Coupled to Diode Array Detector (DAD) and GC-MS after Silylation', *Foods*, 2 (1), pp. 90-99. DOI:10.3390/foods2010090.

Qi, G., Yang, L., Xiao, C., Shi, J., Mi, Y. and Liu, X. (2015) 'Nutrient values and bioactivities of the extracts from three fern species in China: a comparative assessment.', *Food and Function*, 6 (9), pp. 2918-2929. DOI:10.1039/c5fo00510h.

Ramawat, K. G., Dass, S. and Mathur, M. (2009) 'The Chemical Diversity of Bioactive Molecules and Therapeutic Potential of Medicinal Plants', in: Ramawat, K. G. (ed.) *Herbal Drugs: Ethnomedicine to Modern Medicine*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 7-32.

Rex, J. H., Johnson, E. M., Ghannoum, M. A., Knapp, C. C., Alexander, B. D., Motyl, M. R., et al. (2009) *Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: approved guideline M44-A, Clinical and Laboratory Standards Institute*. Vol. 24.

Rossolini, G. M., Arena, F., Pecile, P. and Pollini, S. (2014) 'Update on the antibiotic resistance

- crisis', *Current Opinion in Pharmacology*, 18, pp. 56-60. DOI:10.1016/j.coph.2014.09.006.
- Rubió, L., Motilva, M.-J. and Romero, M.-P. (2013) 'Recent advances in biologically active compounds in herbs and spices: a review of the most effective antioxidant and anti-inflammatory active principles.', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53 (9), pp. 943-53. DOI:10.1080/10408398.2011.574802.
- Sandasi, M., Leonard, C. M. and Viljoen, A. M. (2010) 'The in vitro antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*', *Letters in Applied Microbiology*, 50 (1), pp. 30-35. DOI:10.1111/j.1472-765X.2009.02747.x.
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M. and Latha, L. Y. (2011) 'Extraction, Isolation and Characterization of Bioactive Compounds from Plants' Extracts', *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8 (1), pp. 1-10. DOI:10.1016/j.jpba.2005.01.021.
- Sassi, A. Ben, Harzallah-Skhiri, F. and Aouni, M. (2007) 'Investigation of Some Medicinal Plants from Tunisia for Antimicrobial Activities', *Pharmaceutical Biology*, 45 (5), pp. 421-428. DOI:10.1080/13880200701215406.
- Savoia, D. (2012) 'Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics', *Future Microbiol*, 7, pp. 979-990.
- Scherer, R. and Godoy, H. T. (2009) 'Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method', *Food Chemistry*, 112 (3), pp. 654-658. DOI:10.1016/j.foodchem.2008.06.026.
- Sen, R. D. B. and S. P. (1980) 'Antibiotic activity of pderophytes', *Economic Botany*, 34 (3), pp. 284-298.
- Shahidi, F. and Ambigaipalan, P. (2015) 'Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review', *Journal of Functional Foods*, 18, pp. 820-897. DOI:10.1016/j.jff.2015.06.018.
- Shai, L. J., McGaw, L. J., Aderogba, M. A., Mdee, L. K. and Eloff, J. N. (2008) 'Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentata* (Burm.f) C.A. Sm. leaves', *Journal of Ethnopharmacology*, 119 (2), pp. 238-244. DOI:10.1016/j.jep.2008.06.036.
- Shiu, W. K. P., Rahman, M. M., Curry, J., Stapleton, P., Zloh, M., Malkinson, J. P. and Gibbons, S. (2012) 'Antibacterial acylphloroglucinols from *hypericum olympicum*', *Journal of Natural Products*, 75 (3), pp. 336-343. DOI:10.1021/np2003319.
- Silva, O., Viegas, S., De Mello-Sampayo, C., Costa, M. J. P., Serrano, R., Cabrita, J. and Gomes, E. T. (2012) 'Anti-*Helicobacter pylori* activity of *Terminalia macroptera* root', *Fitoterapia*, 83 (5), pp. 872-876. DOI:10.1016/j.fitote.2012.03.019.
- Silva, S., Costa, E. M., Pereira, M. F., Costa, M. R. and Pintado, M. E. (2013) 'Evaluation of the antimicrobial activity of aqueous extracts from dry *Vaccinium corymbosum* extracts upon food

- microorganism', *Food Control*, 34 (2), pp. 645-650. DOI:10.1016/j.foodcont.2013.06.012.
- Stavri, M., Piddock, L. J. V and Gibbons, S. (2007) 'Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources', *J. Antimicrob. Chemother.*, 59 (6), pp. 1247-1260. DOI:10.1093/jac/dkl460.
- Stepanović, S., Ćirković, I., Ranin, L. and Švabić-Vlahović, M. (2004) 'Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface', *Letters in Applied Microbiology*, 38 (5), pp. 428-432. DOI:10.1111/j.1472-765X.2004.01513.x.
- Suleiman, M. M., McGaw, L. J., Naidoo, V. and Eloff, J. N. (2010) 'Detection of antimicrobial compounds by bioautography of different extracts of leaves of selected south african tree species', *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 7 (1), pp. 64-78. DOI:10.4314/ajtcam.v7i1.57269.
- Tourchi-Roudsari, M. (2014) 'Multiple effects of bracken fern under in vivo and in vitro conditions', *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15 (18), pp. 7505-7513. DOI:10.7314/APJCP.2014.15.18.7505.
- Tsumbu, C. N., Deby-Dupont, G., Tits, M., Angenot, L., Frederich, M., Kohnen, S., Mouithys-Mickalad, A., Serteyn, D. and Franck, T. (2012) 'Polyphenol content and modulatory activities of some tropical dietary plant extracts on the oxidant activities of neutrophils and myeloperoxidase', *International Journal of Molecular Sciences*, 13 (1), pp. 628-650. DOI:10.3390/ijms13010628.
- Turgay, O. and Esen, Y. (2015) 'Antioxidant, total phenolic and antimicrobial characteristics of some species', *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 21 (3), pp. 498-503.
- Vardhan, P. V. and Shukla, L. I. (2017) 'Gamma irradiation of medicinally important plants and the enhancement of secondary metabolite production.', *International Journal of Radiation Biology*, 0 (0), pp. 1-13. DOI:10.1080/09553002.2017.1344788.
- Vattem, D. A., Lin, Y., Labbe, R. G. and Shetty, K. (2004) 'Antimicrobial activity against select food-borne pathogens by phenolic antioxidants enriched in cranberry pomace by solid-state bioprocessing using the food grade fungus *Rhizopus oligosporus*', 39, pp. 1939-1946. DOI:10.1016/j.procbio.2003.09.032.
- Xu, W., Zhang, F., Luo, Y., Ma, L., Kou, X. and Huang, K. (2009) 'Antioxidant activity of a water-soluble polysaccharide purified from *Pteridium aquilinum*', *Carbohydrate Research*, 344 (2), pp. 217-222. DOI:10.1016/j.carres.2008.10.021.



# Anexo I

## Cálculo de IC<sub>50</sub> e de AAI

Como referido no Capítulo III dos Materiais e Métodos no ponto 5.2., são apresentados nesta secção os restantes cálculos de IC<sub>50</sub> e de AAI.

Nas figuras 37, 38 e 39 encontram-se os gráficos da percentagem de inibição (% I) em função da concentração de extrato bruto das flores da urze na célula espectrofotométrica, para as três concentrações de DPPH. Estes gráficos permitiram o cálculo de IC<sub>50</sub> e de AAI para as três concentrações de DPPH (tabelas 16,17 e 18), e assim calcular a média de cada parâmetro que se encontra nos resultados. O extrato bruto das flores da urze apresentaram um potencial antioxidante forte.

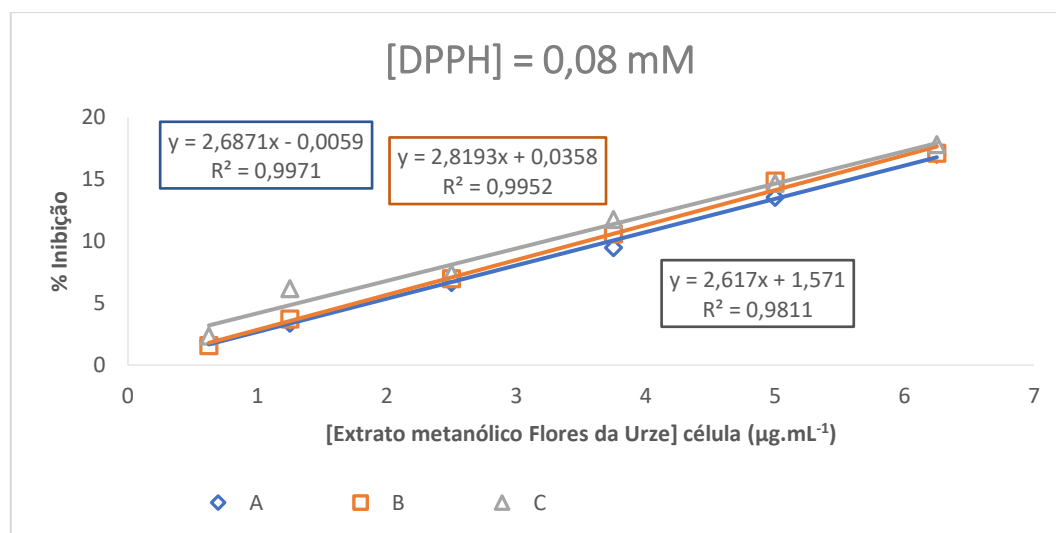


Figura 37 - Percentagem de inibição (% I) do extrato bruto metanólico das flores da urze para a solução de DPPH 0,08 mM.

Tabela 16 - IC<sub>50</sub> e AAI de extrato bruto metanólico de flores da urze para a solução de DPPH 0,08 mM.

[DPPH] = 0,08 mM				
	A	B	C	Média ± desvio padrão
IC <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	18,6	17,7	18,5	18,3 ± 0,5
AAI	1,7	1,8	1,7	1,7 ± 0,0

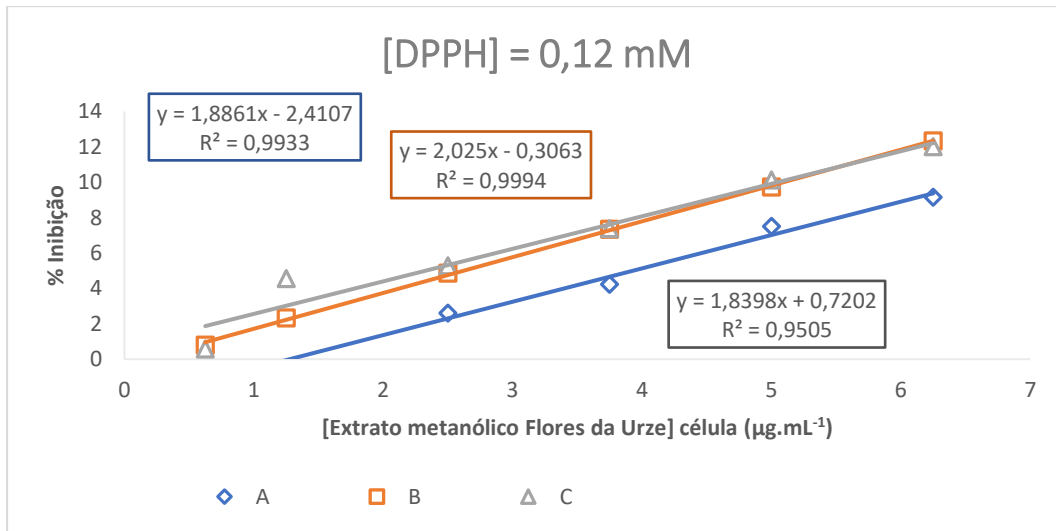


Figura 38 - Percentagem de inibição (% I) do extrato bruto metanólico das flores da urze para a solução de DPPH 0,12 mM.

Tabela 17 - IC<sub>50</sub> e AAI de extrato bruto metanólico das flores da urze para a solução de DPPH 0,12 mM.

[DPPH] = 0,12 mM				
	A	B	C	Média ± desvio padrão
IC <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	27,8	24,8	26,8	26,5 ± 1,5
AAI	1,7	2,0	1,8	1,8 ± 0,1

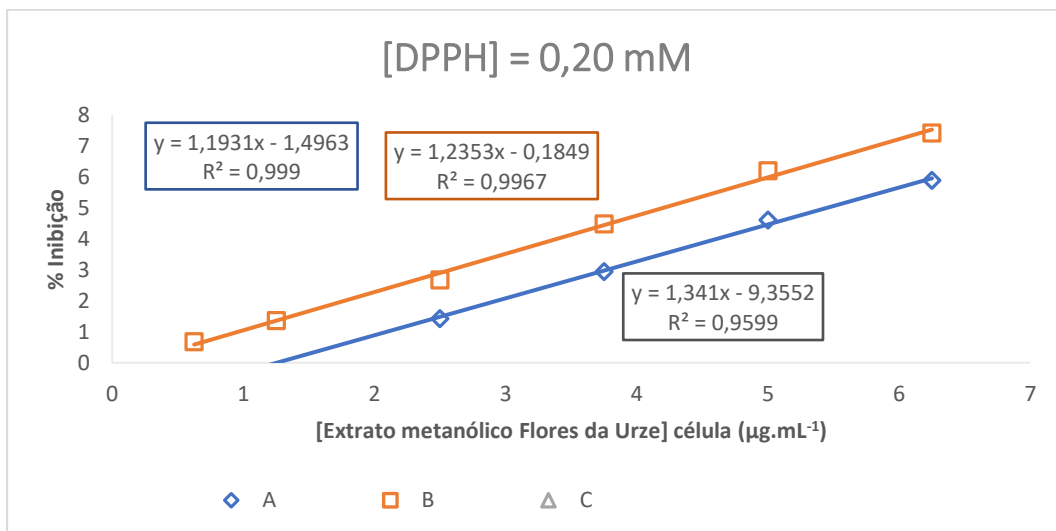


Figura 39 - Percentagem de inibição (% I) do extrato bruto metanólico das flores da urze para a solução de DPPH 0,20 mM.

Tabela 18 - IC<sub>50</sub> e AAI de extrato bruto metanólico das flores das urze para a solução de DPPH 0,08 mM.

[DPPH] = 0,20 mM				
	A	B	C	Média ± desvio padrão
IC <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	43,2	40,6	44,3	42,7 ± 1,9
AAI	1,8	1,9	1,6	1,8 ± 0,2

Seguem-se os cálculos os gráficos da percentagem de inibição (% I) em função da concentração de extrato bruto do feto comum na célula espectrofotométrica, para as três concentrações de DPPH (figuras 40, 41 e 42) e as tabelas com os parâmetros antioxidantes calculados para cada concentração de DPPH (tabelas 19, 20 e 21). O AAI do extrato do feto comum indicou um potencial antioxidante moderado.

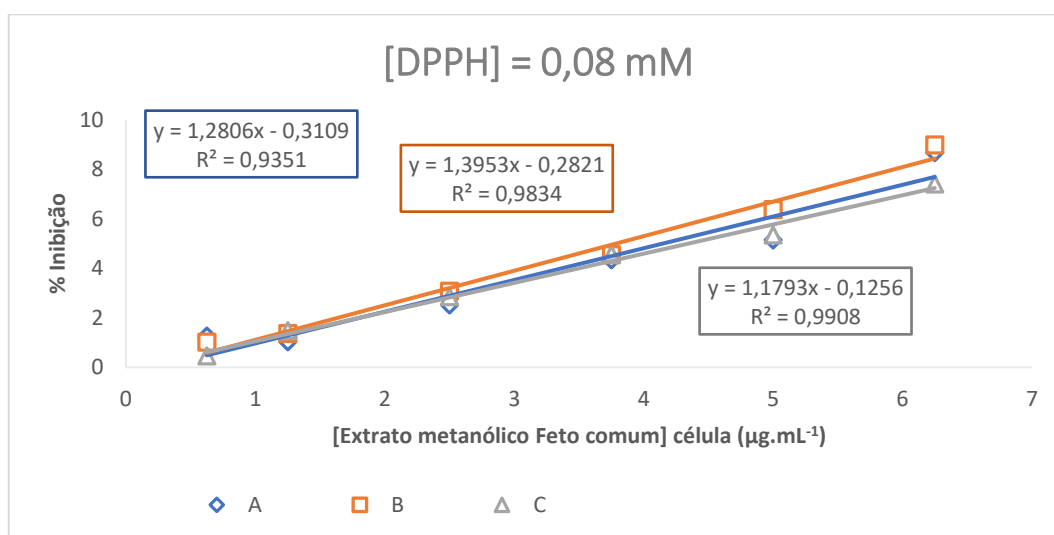


Figura 40 - Percentagem de inibição (% I) do extrato bruto metanólico do feto comum para a solução de DPPH 0,08 mM.

Tabela 19 - IC<sub>50</sub> e AAI de extrato bruto metanólico do feto comum para a solução de DPPH 0,08 mM.

[DPPH] = 0,08 mM				
	A	B	C	Média ± desvio padrão
IC <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	39,3	36,0	42,5	39,3 ± 3,2
AAI	0,8	0,9	0,7	0,8 ± 0,1

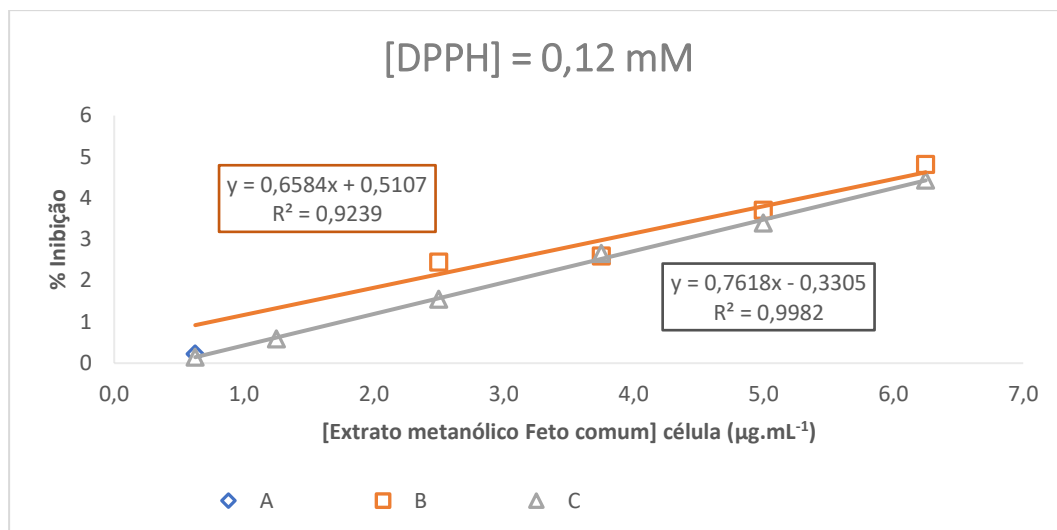


Figura 41 - Percentagem de inibição (% I) do extrato bruto metanólico do feto comum para a solução de DPPH 0,12 mM.

Tabela 20 - IC<sub>50</sub> e AAI de extrato bruto metanólico do feto comum para a solução de DPPH 0,12 mM. -: Pontos eliminados

[DPPH] = 0,12 mM				
	A	B	C	Média ± desvio padrão
IC <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	-	75,2	66,1	70,6 ± 6,4
AAI	-	0,6	0,7	0,7 ± 0,1

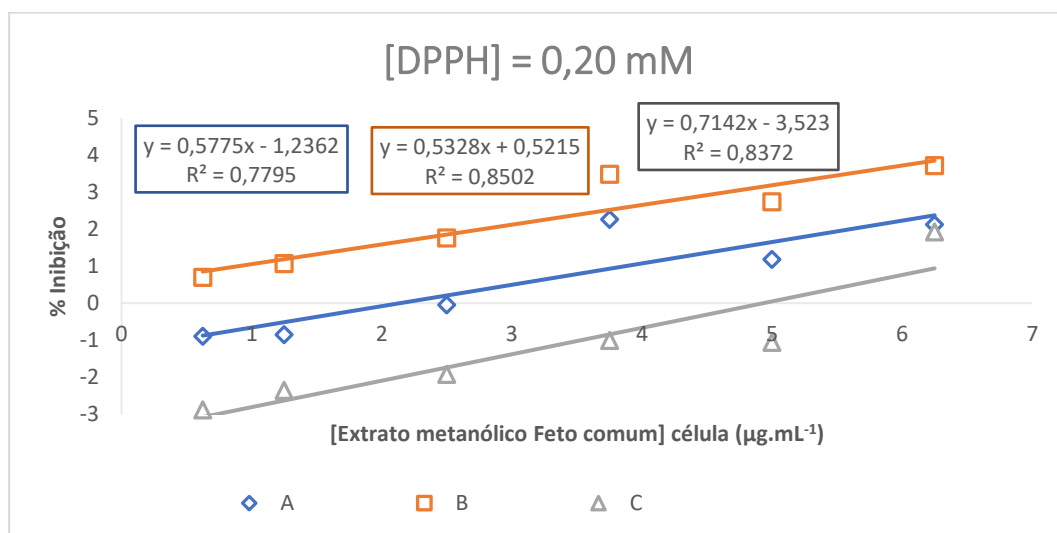


Figura 42 - Percentagem de inibição (% I) do extrato bruto metanólico do feto comum para a solução de DPPH 0,20 mM.

Tabela 21 - IC<sub>50</sub> e AAI de extrato bruto metanólico do feto comum para a solução de DPPH 0,20 mM.

[DPPH] = 0,20 mM				
	A	B	C	Média ± desvio padrão
IC <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	88,7	92,9	74,9	85,5 ± 9,4
AAI	0,8	0,8	1,0	0,9 ± 0,1

O procedimento realizado para a avaliação da atividade antioxidante nos extratos brutos foi efetuado também para três padrões antioxidantes: rutina, trolox e ácido gálico.

Assim, de seguida encontram-se os cálculos da atividade antioxidante para os padrões, com os gráficos da percentagem de inibição (% I) em função da concentração de rutina na célula espectrofotométrica da rutina (figuras 43, 44 e 45), do trolox (figuras 46, 47 e 48) e do ácido gálico (figuras 49, 50 e 51). Os parâmetros da atividade antioxidante para cada concentração de DPPH da rutina seguem-se nas tabelas 22, 23 e 24; para o trolox apresentam-se nas tabelas 25, 26 e 27; e para o ácido gálico encontram-se nas tabelas 28, 29 e 30. Todos os padrões antioxidantes exibiram um potencial antioxidante forte.

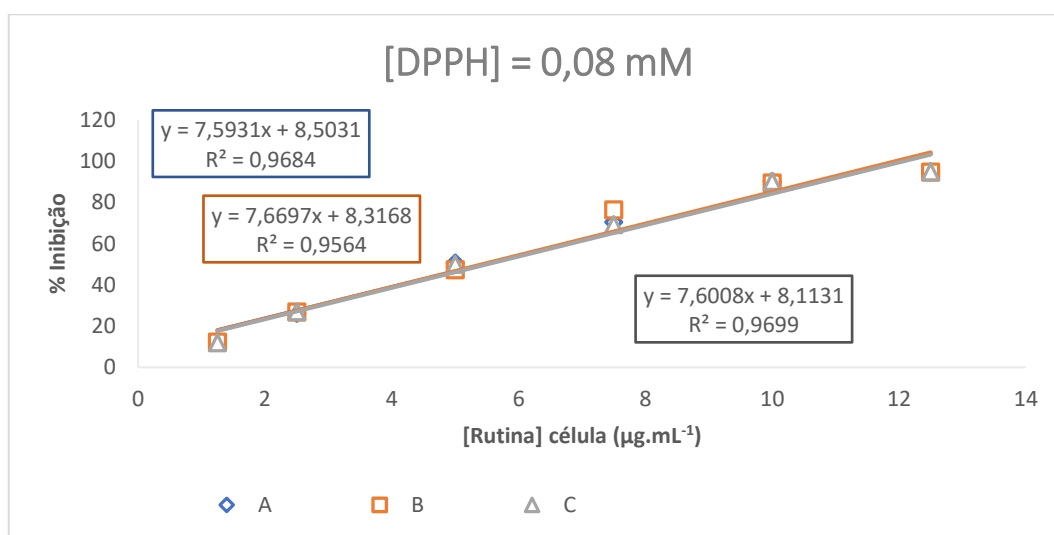


Figura 43 - Percentagem de inibição (% I) da rutina para a solução de DPPH 0,08 mM.

Tabela 22 - IC<sub>50</sub> e AAI da rutina para a solução de DPPH 0,08 mM.

[DPPH] = 0,08 mM				
	A	B	C	Média ± desvio padrão
IC <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	5,5	5,4	5,5	5,5 ± 0,0
AAI	5,5	5,5	5,4	5,5 ± 0,0

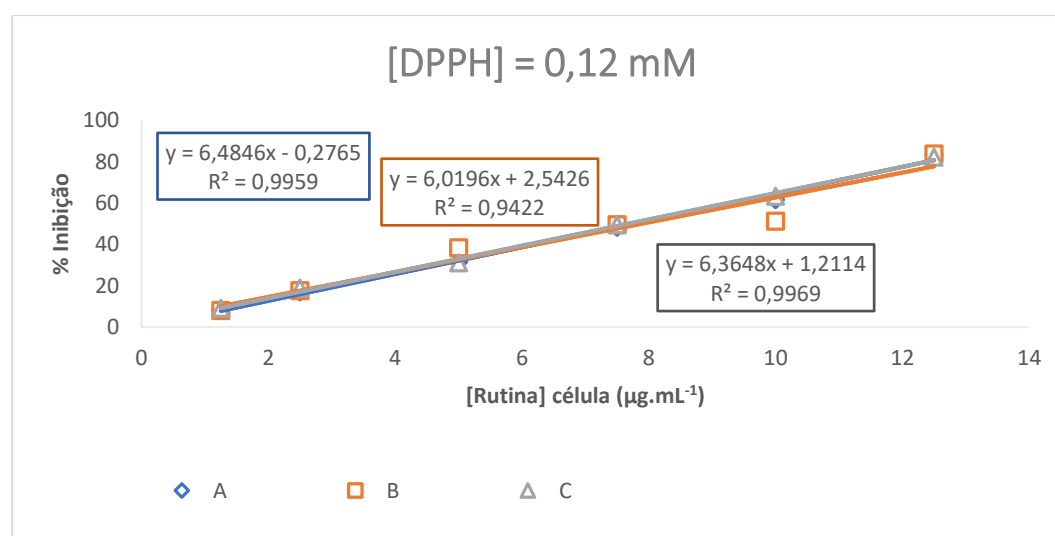


Figura 44 - Percentagem de inibição (% I) da rutina para a solução de DPPH 0,12 mM.

Tabela 23 - IC<sub>50</sub> e AAI da rutina para a solução de DPPH 0,12 mM.

[DPPH] = 0,12 mM				
	A	B	C	Média ± desvio padrão
IC <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	7,8	7,9	7,7	7,8 ± 0,1
AAI	6,0	5,9	6,1	6,0 ± 0,1

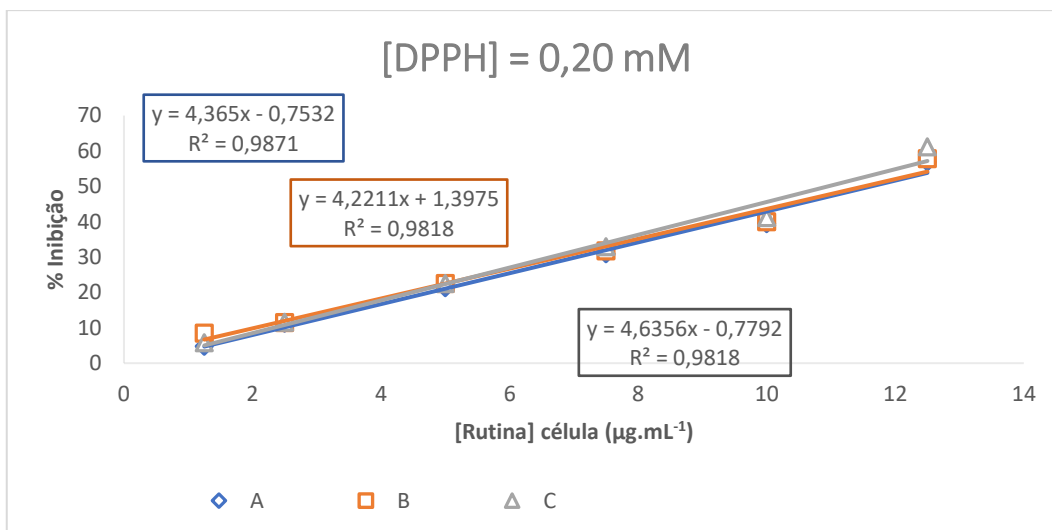


Figura 45 - Percentagem de inibição (% I) da rutina para a solução de DPPH 0,20 mM.

Tabela 24 - IC<sub>50</sub> e AAI da rutina para a solução de DPPH 0,20 mM.

[DPPH] = 0,20 mM				
	A	B	C	Média ± desvio padrão
IC <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	11,6	11,5	11,0	11,4 ± 0,4
AAI	6,4	6,5	6,8	6,6 ± 0,2

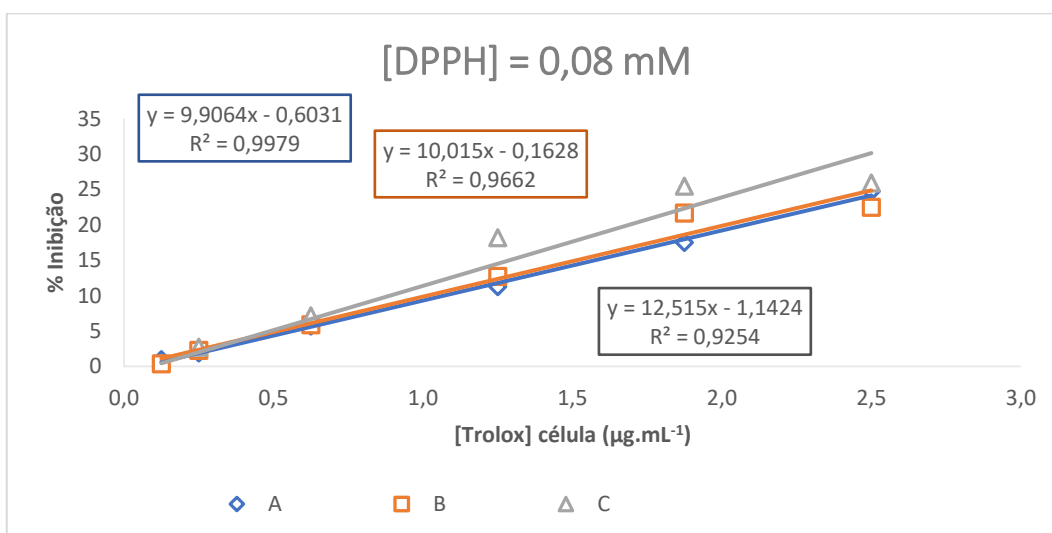


Figura 46 - Percentagem de inibição (% I) do trolox para a solução de DPPH 0,08 mM.

Tabela 25 - IC<sub>50</sub> e AAI do trolox para a solução de DPPH 0,08 mM.

[DPPH] = 0,08 mM				
	A	B	C	Média ± desvio padrão
IC <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	5,1	5,0	4,1	4,7 ± 0,6
AAI	5,9	6,0	7,4	6,4 ± 0,8

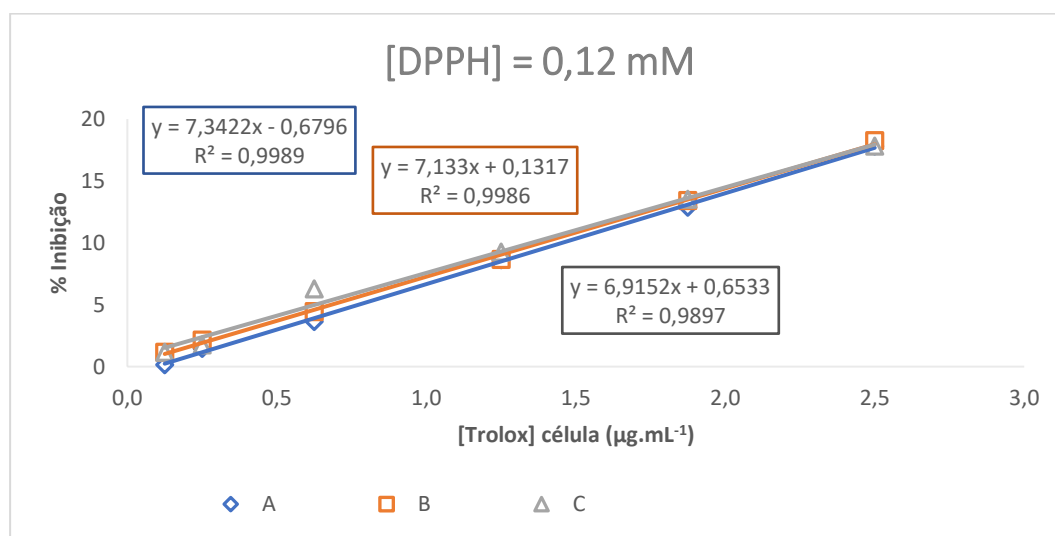


Figura 47 - Percentagem de inibição (% I) do trolox para a solução de DPPH 0,12 mM.

Tabela 26 - IC<sub>50</sub> e AAI do trolox para a solução de DPPH 0,12 mM.

[DPPH] = 0,12 mM				
	A	B	C	Média ± desvio padrão
IC <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	6,9	7,0	7,1	7,0 ± 0,1
AAI	6,7	6,6	6,5	6,6 ± 0,1

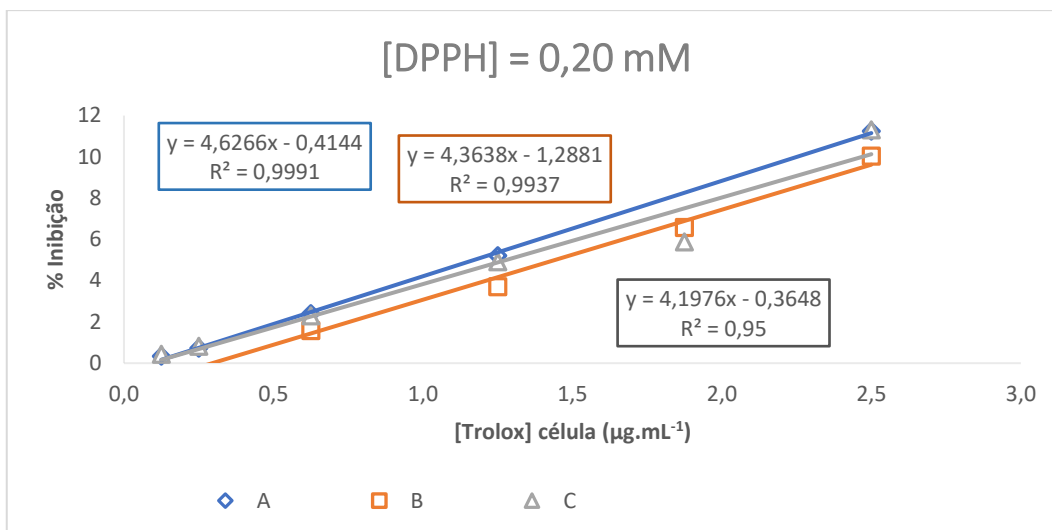


Figura 48 - Percentagem de inibição (% I) do trolox para a solução de DPPH 0,20 mM.

Tabela 27 - IC<sub>50</sub> e AAI do trolox para a solução de DPPH 0,20 mM.

<b>[DPPH] = 0,20 mM</b>				
	A	B	C	Média ± desvio padrão
<b>IC<sub>50</sub> (µg.mL<sup>-1</sup>)</b>	10,9	11,8	12,0	11,5 ± 0,6
<b>AAI</b>	6,8	6,3	6,2	6,4 ± 0,3

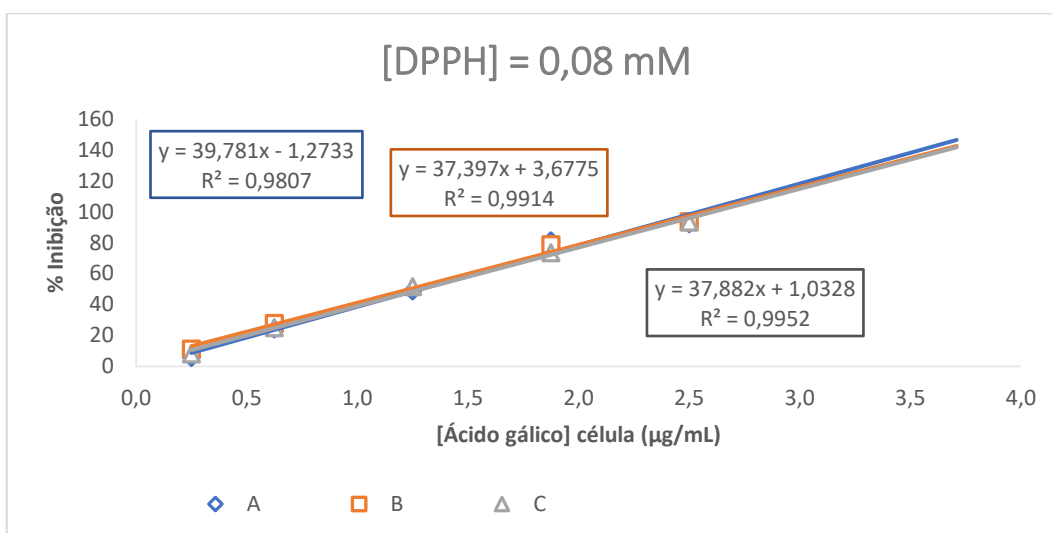


Figura 49 - Percentagem de inibição (% I) do ácido gálico para a solução de DPPH 0,08 mM.

Tabela 28 - IC<sub>50</sub> e AAI do ácido gálico para a solução de DPPH 0,08 mM.

[DPPH] = 0,08 mM				
	A	B	C	Média ± desvio padrão
IC <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	1,3	1,2	1,3	1,3 ± 0,0
AAI	21,8	23,6	20,6	22,0 ± 1,5

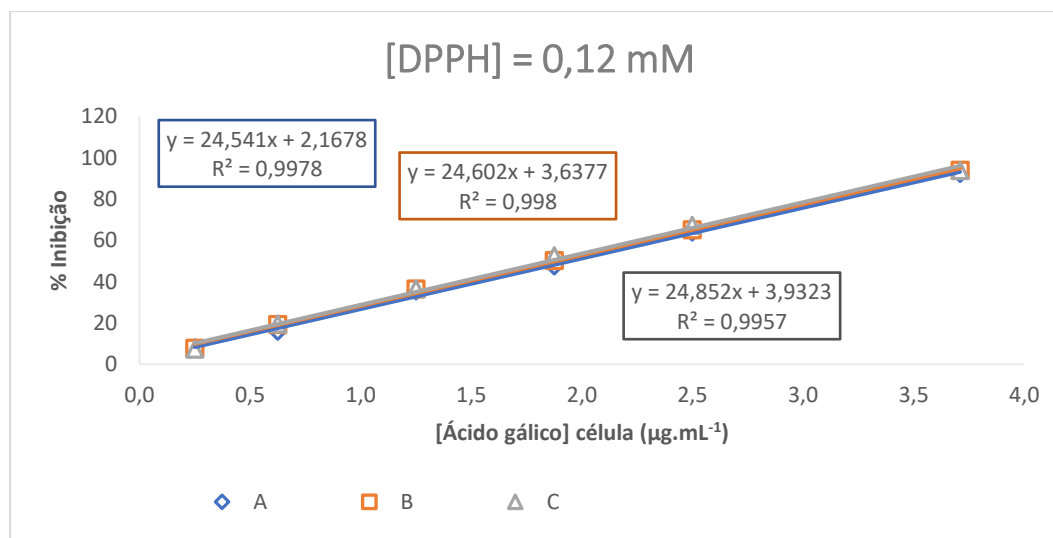


Figura 50 - Percentagem de inibição (% I) do ácido gálico para a solução de DPPH 0,12 mM.

Tabela 29 - IC<sub>50</sub> e AAI do ácido gálico para a solução de DPPH 0,12 mM.

[DPPH] = 0,12 mM				
	A	B	C	Média ± desvio padrão
IC <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	1,9	1,9	1,9	1,9 ± 0,0
AAI	23,9	24,8	25,2	24,6 ± 0,7

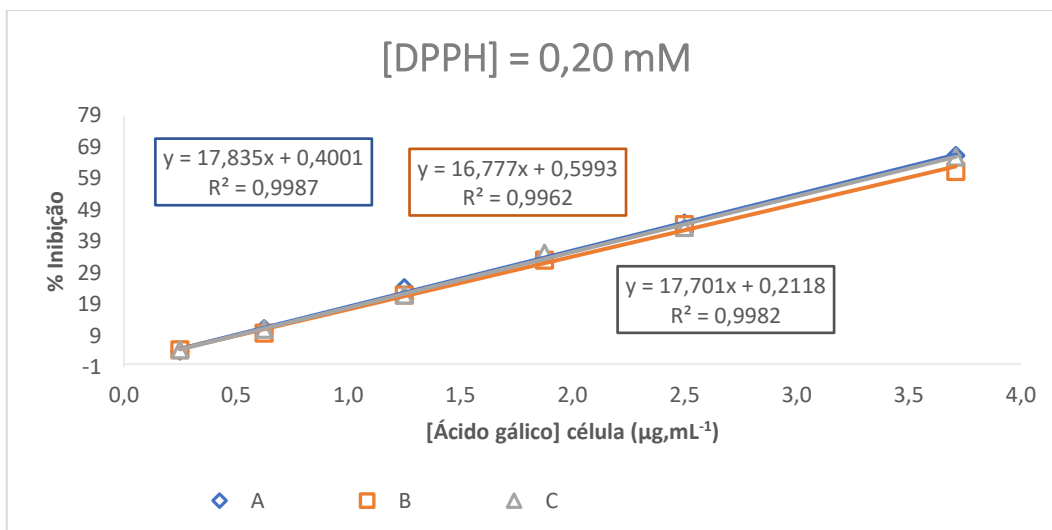


Figura 51 - Percentagem de inibição (% I) do ácido gálico para a solução de DPPH 0,20 mM.

Tabela 30 - IC<sub>50</sub> e AAI do ácido gálico para a solução de DPPH 0,20 mM.

<b>[DPPH] = 0,20 mM</b>				
	A	B	C	Média ± desvio padrão
<b>IC<sub>50</sub> (µg.mL<sup>-1</sup>)</b>	2,8	2,9	2,8	2,8 ± 0,1
<b>AAI</b>	26,4	24,4	26,2	25,7 ± 1,1



## Anexo II

### Comunicação oral

Participação no “XII Annual CICS-UBI Symposium” com a comunicação oral “Phytochemical characterization and evaluation of the antimicrobial properties of the heather and common bracken”.

XII Annual CICS-UBI Symposium  
ABSTRACTS BOOK

8 PHYTOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF  
THE ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF THE HEATHER AND  
COMMON BRACKEN

*Santos, AS., Luís, Â., Ferreira, S., Duarte, AP.  
CICS-UBI - Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal*