



**Faculdade de Ciências**  
**Departamento de Química**  
**Mestrado em Química e Processamento de Recursos Locais**

**Análise das classes de substâncias químicas responsáveis pela actividade antibacteriana da planta *Sesamum alatum* através do rastreio fitoquímico**

**Autora:**

Benedita Paula Custódio Bila

Maputo

2026



**Faculdade de Ciências**

**Departamento de Química**

Mestrado em Química e Processamento de Recursos Locais

Trabalho de culminação dos estudos

(Edição por investigação)

**Análise das classes de substâncias químicas responsáveis pela actividade antibacteriana da planta *Sesamum alatum* através do rastreio fitoquímico.**

**Autora:**

Benedita Paula Custódio Bila

**Supervisor:**

Prof. Doutor Julião Monjane

**Co-Supervisores:**

Prof. Doutor José Sumbana

Prof. Doutora Valera Dias

Maputo

2026

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus que nunca me deixou andar sozinha e deu-me forças para viver esta experiência sem igual.

Agradeço a todos os que directa ou indirectamente contribuíram para o culminar desta etapa.

Ao Departamento do curso por aceitar me na edição do mestrado por investigação.

Ao meu supervisor Prof. Doutor Julião Monjane, pelo apoio, dedicação e incentivo em momentos de incertezas e tornou possível a conclusão da dissertação.

Ao Departamento de Biologia e aos meus co-supervisores Prof. Doutor Sumbana e Prof. Doutora Valera Dias, dra. Esménia e Vânia pela disponibilidade e aprendizado.

Aos meus colegas do curso pelo tempo e experiências partilhados e ajuda prestada nas análises em outras faculdades.

À minha colega e amiga Bina pela companhia e força.

Aos meus pais Custódio Bila e Paciência Maússe, pelo carinho e incentivo a seguir a academia em todo o momento.

Aos meus irmãos: Judite, Agnaldo, Heliodoro, Nilsa e Mitold pela força e encorajamento.

Às minhas filhas Malica e Tamara, por terem suportado a minha ausência durante a formação.

Ao Instituto de Bolsas de Moçambique, pelo financiamento para o pagamento de propinas referentes ao curso.

Muito Obrigada!

## **Declaração de Honra**

Eu, Benedita Paula Custódio Bila, declaro, por minha honra que o presente trabalho académico foi desenvolvido por mim própria, enquanto mestranda no curso de Química e Processamento de Recursos Locais, edição por investigação, recorrendo a fontes e normas indicadas pela instituição e as fontes e literatura usadas para a sua elaboração estão devidamente citadas ao longo do texto e na bibliografia final.

Declaro ainda que o trabalho nunca foi apresentado em outra instituição para a obtenção de qualquer grau académico.

Maputo \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / 2026

Benedita Paula Custódio Bila

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho à minha avó, mentora da frase que se pode traduzir em “Ide à escola aprender o feitiço dos brancos de falar com o papel.” Fez de tudo para que os seus descendentes falassem com o papel, mesmo sem saber ler nem escrever, sabia que a planta que hoje eu pesquiso tem alguma actividade.

*Inkomu Magambu!*

## Resumo

Um levantamento teórico sobre o uso da planta *Sesamum alatum*, composição química e a aplicação desta na fitoterapia. Revelou ainda que existe pouca informação acerca da mesma, no entanto, esta é utilizada pelas comunidades como planta medicinal para o tratamento de feridas.

O presente estudo teve como objectivo avaliar a actividade antibacteriana de *S. alatum* em bactérias (chamados de isolados) por detrás da cicatrização de feridas, nomeadamente: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* sensível e *E. coli* multirresistente.

Os extractos brutos das folhas e sementes obtidos a partir da maceração usando os solventes etanol e água, seguida de separação líquido-líquido com solventes orgânicos de polaridade crescente Hexano, diclorometano e acetato de etilo. Os extractos e as fracções foram submetidos a ensaios antibacterianos em isolados padronizados, usando o método de difusão em disco, assim como se realizaram os testes fitoquímicos das fracções.

O resultado da pesquisa qualitativa da planta revela uma actividade antibacteriana considerável nos extractos brutos, nas folhas e sementes para isolados sensíveis e resistentes. Os testes fitoquímicos demonstram a existência de flavonóides, alcalóides, glicosídeos e terpenos na fracção de DCM do extracto aquoso das folhas, que podem ser considerados como sendo responsáveis pela inibição de *S. aureus* e *E. coli* sensível.

A pesquisa comprovou experimentalmente o motivo do uso da *S. alatum* como planta medicinal pela comunidade, no tratamento de feridas e que pode ser uma linha de pesquisa para a busca de novos medicamentos para o combate às bactérias multirresistentes.

**Palavras-chave:** *S. alatum*, actividade antibacteriana, rastreio fitoquímico.

## Abstract

A Literature survey on the use of the *Sesamum alatum* plant, chemical composition and its application in phytotherapy, showed that there is very little information about it, however, it is used by communities as a medicinal plant for the treatment of wounds.

The present study aimed to evaluate the antibacterial activity of *S. alatum* in bacteria (called isolates) that promote wound healing, namely: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, sensitive *Escherichia coli* and multi-resistant *E. coli*.

The crude extracts of leaves and seeds obtained from maceration using the solvents ethanol and water, followed by liquid-liquid separation with organic solvents of increasing polarity Hexane, dichloromethane and ethyl acetate. The extracts and fractions were subjected to antibacterial assays on standardized isolates, using the disk diffusion method, as well as phytochemical tests of the fractions.

The result of the qualitative research of the plant shows considerable antibacterial activity in the crude extracts in the leaves and seeds for sensitive and resistant isolates.

Phytochemical tests show the existence of flavonoids, alkaloids, glycosides and terpenes in the DCM fraction of the aqueous extract of the leaves, which can be considered to be responsible for the inhibition of *S. aureus* and sensitive *E. coli*.

This research experimentally proved the reason for the use of *S. alatum* as a medicinal plant by the community, in the treatment of wounds and that it can be a line of research for the search for new medicines to combat multi-resistant bacteria.

Keywords: *S. alatum*, antibacterial activity, phytochemical screening.

# Índice

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Problematização .....	2
1.2 Justificativa .....	2
1.3 Objectivos .....	4
1.3.1 Objectivo Geral .....	4
1.3.2 Objectivos Específicos .....	4
1.4 Perguntas de Pesquisa .....	4
1.5 Hipóteses .....	5
1.6 Âmbito/Parâmetros da Pesquisa .....	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	5
2.1. Plantas medicinais .....	5
2.2 Descrição do objecto de estudo .....	6
2.2.1 Ocorrência .....	7
2.2.2 Taxonomia .....	7
2.2.3 Composição química de <i>S. alatum</i> .....	7
2.3. Propriedades Medicinais .....	9
2.4. Uso de plantas no tratamento de feridas .....	9
2.5. Métodos de avaliação antibacteriana .....	10
2.5.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	12
2.5.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	13
2.5.3 <i>Escherichia coli</i> .....	14
2.6 Extração de produtos naturais .....	14
2.7 Metabolitos secundários com acção antibacteriana .....	15
2.7.1 Flavonóides .....	15
2.7.2 Alcalóides .....	17
2.7.3 Saponinas .....	18
2.7.4 Antraquinonas .....	19
2.7.5. Taninos .....	21
3. PARTE EXPERIMENTAL .....	22
3.1 Materiais e Métodos .....	22
3.2 Colheita de amostras .....	23
3.3 Preparação dos extractos brutos .....	24

3.4. Preparação dos ensaios para a avaliação da actividade antibacteriana dos extractos brutos de <i>S. alatum</i> (Ensaio I).....	24
3.4.1 Amostra-Bactérias .....	25
3.4.2 Procedimentos para a cultura de microorganismos .....	25
3.5. Fracionamento separação líquido-líquido .....	26
4. APRESENTAÇÃO DE RESULTADOS .....	26
4.1 Preparação dos extractos brutos .....	26
4.2 Avaliação da actividade antibacteriana dos extractos brutos das folha e sementes (Ensaio I) ...	27
4.3 Avaliação da actividade antibacteriana das fracções de <i>S. alatum</i> – (Ensaio II).....	28
4.4 Cromatografia de camada fina .....	29
4.5 Avaliação fitoquímica preliminar .....	30
5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS .....	32
5.1 Preparação dos extractos brutos .....	32
5.2 Avaliação da actividade antibacteriana dos extractos brutos das folha e sementes (Ensaio I) ...	33
5.3 Separação líquido-líquido .....	35
5.4 Avaliação da actividade antibacteriana das fracções de <i>S. alatum</i> – (Ensaio II) .....	35
5.5 Cromatografia em Camada Fina (TLC) .....	36
5.6 Avaliação fitoquímica preliminar .....	37
5.7 Avaliação da actividade antibacteriana da fracção mais activa (Ensaio III) .....	37
6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES .....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	40
ANEXOS .....	i

## Lista de Tabelas

Tabela 1 Classificação da sensibilidade dos microrganismos segundo CMI.....	12
Tabela 2. Resultados da extração por maceração.....	27
Tabela 3. Resultados da valaicao da activade antibacteriana dos extractos brutos.....	27
Tabela 4. Resultado da actividade antibacteriana das fracções preparadas a partir dos extractos alcoólicos.....	28
Tabela 5. Resultados da actividade antibacteriana das fracções preparadas a partir do extracto aquoso.....	28
Tabela 6. Cromatografia de camada fina para a seleccao do melhor sistema de solventes.....	29
Tabela 7. Resultados do analise fitoquimica preliminar.....	31

## Lista de Figuras

Figura 1. S. alatum.....	7
Figura 2. Fórmula estrutural de 2 -episesalatina.....	8
Figura 3. Fórmula estrutural de Sesamina e Sesamolina.....	8
Figura 4. Estrutura básica de um flavonóide.....	15
Figura 5. Exemplos de Alcalóides importantes obtidos a partir de extractos de plantas.....	17
Figura 6. Estrutura da antraquinona.....	20
Figura 7. Estrutura dos Ácidos gálico e elagico.....	21
Figura 8. TLC da fração de DCM obtida a patrir dos dos extractos brutos FA e FH.....	30
Figura 9. Placa de TLC preparativa da fracção aquosa de DCM de folhas.....	30

## **Lista de siglas, abreviaturas e acrónimos**

**CMI** - Concentração Mínima Inibidora

**OMS** - Organização Mundial de Saúde

**A.C.** - Antes de Cristo

**DCM** - Diclorometano

**SA** - Sementes em álcool

**FA** - Folhas em álcool

**SH** - Sementes em água

**FH** - Folhas em água

**E. Coli** - *Escherichia coli*

**Spp** - Espécie

**TLC** - Thin Layer Chromatography (Cromatografia em Camada Fina)

**P-TLC** - Cromatografia em Camada Fina Preparativa

# 1. INTRODUÇÃO

Desde os tempos remotos, o Homem tem usado plantas no tratamento de várias enfermidades, através de um conhecimento adquirido com base na observação e é transmitido de geração para geração, sendo uma das mais antigas formas de tratamento na prática médica.

A maioria da população africana não apenas depende das plantas, como também confia no uso de remédios tradicionais, bem como nos serviços prestados pelos praticantes (Bandeira *et al.*, 2001; Rocha *et al.*, 2021).

Desde os finais do século XVI, plantas de uso comum, os “remédios da terra” como o óleo de coco (*Cocos nucifera*) e o de rícino (*Ricinus communis*) e as raízes de abútua (*Cissampelos parreiras*) e de calumba (*Jateorhiza palmata*) tem sua eficácia comprovada no tratamento de feridas, diarreia e problemas gastrointestinais (Saraiva *et al.*, 2014).

Estudos realizados em extractos de plantas para o efeito de cicatrização destacam a *Calendula officinales*, *Aloe vera* e *Anacardium occidentale* como as mais estudadas mundialmente, com eficácia comprovada mesmo em pacientes com doenças crônicas, particularmente as diabetes (Piriz *et al.*, 2018).

Além das diabetes, o outro factor que influencia na cicatrização das feridas são as bactérias. A limpeza no local da lesão com água corrente é um passo fundamental para evitar a infecção por bactérias. Conforme recomendava Hipócrates, pai da medicina, as feridas deveriam ser limpas com vinho, vinagre ou água morna (Tazima *et al.*, 2008).

Em Moçambique, as plantas medicinais constituem um valioso instrumento na medicina tradicional, sendo largamente utilizadas nas zonas rurais como principal fonte de medicamentos para os cuidados de saúde primários. O seu valor sociocultural é inesgotável e o potencial comercial é vastamente desconhecido. Num universo estimado em 5500 espécies de plantas, apenas 15% dos recursos genéticos vegetais são usados pelas comunidades rurais para fins medicinais (Bandeira *et al.*, 2001; Bruschi *et al.*, 2014; Bruschi *et al.*, 2011).

Pelo facto de existirem, no mercado moçambicano, plantas medicinais, muito delas têm sido usadas sem conhecimento científico das suas propriedades terapêuticas, o que pode levar a efeitos secundários, daí a necessidade de se desenvolverem estudos sobre a planta *Sesamum alatum*.

O presente trabalho teve como objectivos avaliar a actividade antibacteriana de extractos brutos e de fracções preparadas a partir das folhas e sementes bem como o rastreio fitoquímico preliminar da fracção mais activa da planta *Sesamum alatum*.

## **1.1 Problematização**

A aquisição do conhecimento sobre o uso das plantas é transmitida de forma oral de pais para filhos, pessoas mais velhas e por convívio do quotidiano. As plantas são biodegradáveis, de fácil acesso, o que constituem vantagens para os usuários.

Segundo o conhecimento tradicional, a planta *S. alatum* tem sido usada no tratamento de feridas por várias comunidades moçambicanas. Entretanto, o conhecimento da sua acção é cientificamente desconhecido em Moçambique. Assim sendo, há a necessidade de se pesquisar sobre esta planta com vista a avaliar a sua actividade antibacteriana e identificar os metabolitos secundários presentes nos seus extractos de modo a confirmar os seus usos na medicina tradicional.

## **1.2 Justificativa**

O conhecimento sobre as propriedades das plantas e seu uso é a base de muitos sistemas de saúde tradicional e tem contribuído para a descoberta de princípios activos e no desenvolvimento de fármacos. No entanto, a utilização do conhecimento situacional das plantas deve ser acompanhado de estudos científicos para massificar a sua aplicação assim como prevenir o impacto dos efeitos colaterais dos mesmos, pois a maioria destas não é usada obedecendo

dosagens padronizadas e, por vezes, não se conhecem os efeitos do uso a longo prazo, ou seja, nem todas as plantas que o Homem usa têm poder curativo.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) cerca de 80% da população africana usa a medicina tradicional para suprir suas necessidades de saúde (Cragg & Newman, 2005; Newman & Cragg, 2016; Newman, & Cragg, 2007).

Moçambique é um importante repositório de diversidade vegetal, albergando cerca de 5.500 espécies de plantas. Estima-se que cerca de 800 destas são utilizadas para fins medicinais. No que diz respeito ao uso de plantas, Moçambique possui uma flora muito rica em termos de espécies de plantas, contudo, pouco exploradas medicinalmente (Bandeira *et al.*, 2001).

A investigação sobre o uso das plantas medicinais em Moçambique tem estado a aumentar, em muitos casos em colaboração com Universidades estrangeiras (Monjane *et al.*, 2018; Monjane *et al.*, 2020; Pagula & Baeckström, 2006; Pagula *et al.*, 2000; Ramalhete *et al.*, 2008; Ramalhete *et al.*, 2009; Ramalhete *et al.*, 2016), só para citar alguns exemplos. Assim sendo, este estudo visa acompanhar as resoluções da OMS, no sentido de otimizar o uso da medicina tradicional e promover a investigação sobre plantas medicinais.

A escolha da planta *S. alatum* visa resolver um problema de saúde pública, partindo de uma experiência pessoal de aplicação do extracto da mesma num ferimento aquando de uma visita à província de Gaza, distrito de Manjacaze, localidade de Machulane, na aldeia de Mahuntsane, que dista há cerca de 17 quilómetros do centro de saúde mais próximo e para chamar a atenção a profissionais de saúde e a comunidade em geral acerca do uso desta planta.

## 1.3 Objectivos

### 1.3.1 Objectivo Geral

Avaliar a actividade antibacteriana dos extractos preparados a partir das folhas e sementes da planta *S. alatum*, usando o método de difusão em Agar.

### 1.3.2 Objectivos Específicos

- Avaliar a actividade antibacteriana dos extractos brutos das folhas e sementes da planta *S. alatum*;
- Fraccionar o extracto que teve resultado positivo na actividade antibacteriana com base na extracção líquido-líquido;
- Avaliar a actividade antibacteriana das fracções obtidas;
- Determinar os metabólitos secundários presentes nas fracções que tiveram resultado positivo na actividade antibacteriana.

## 1.4 Perguntas de Pesquisa

1. Quais são as propriedades medicinais da planta *S. alatum*?
2. Será o extracto das folhas da planta *S. alatum* mais activo na eliminação de bactérias do que o extracto das sementes da mesma?
3. O extracto das folhas possui acção inibidora no desenvolvimento das bactérias Gram negativas que as positivas?

## 1.5 Hipóteses

H1=0: A *S. alatum* não tem propriedades medicinais.

H1≠0: A *S. alatum* tem propriedades de cicatrização, anti-inflamatória e desinfectantes.

H2=0: Os extractos das folhas e sementes de *S. alatum* não têm acção na eliminação de bactérias.

H2≠0: O extracto das sementes da *S. alatum* é mais activo na eliminação de bactérias do que o das folhas.

H3≠0: O extracto de folhas inibe o desenvolvimento da *Pseudomonas aeruginosa* mas, não inibe a *E. coli*.

H3=0: O extracto de folhas inibe o desenvolvimento de todas as bactérias em estudo.

## 1.6 Âmbito/Parâmetros da Pesquisa

A investigação enquadra - se na linha de pesquisa de Produtos naturais da Faculdade de Ciências, Departamento de Química. A mesma limitar-se-á nos seguintes pontos:

- ✓ Extração e testagem dos extractos brutos obtidos da água e solução Hidroalcoólica a 70%;
- ✓ Fraccionamento do extracto com acção antibacteriana;
- ✓ Ensaio antibacteriano em *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* ATCC 25922 sensível e *E. coli* multirresistente;
- ✓ Determinação dos metabolitos secundários.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Plantas medicinais

A utilização de produtos naturais na promoção e manutenção da saúde acompanha a história da humanidade. Vários registos de utilização de plantas pelas civilizações antigas como chinesa, grega, egípcia entre outras são datados de 460-377 A. C. (Tomazzoni *et al.*, 2006).

A planta é classificada como medicinal quando nela são encontradas substâncias que permitem a cura ou tratamento de doenças no Homem. Essas substâncias variam de uma espécie para outra normalmente, tem a função de defesa e atração de polinizadores.

A OMS considera planta medicinal como sendo todo e qualquer vegetal que possui, num ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursoras de fármacos semissintéticos (Newman & Cragg, 2016).

As plantas medicinais, normalmente, são obtidas nas matas, vendidas em mercados e feiras. A utilização é feita por indicação de amigos e familiares que convivem com a natureza ou que tenham experiência de uso com sucesso. Nestas, podem ser usadas a raiz, o caule, a folha, a flor e o fruto, em forma de produtos frescos ou secos, dependendo da espécie. O modo de preparação também varia de uma espécie para outra e de pessoa para pessoa (Piriz *et al.*, 2018).

Para os colectores e vendedores, as plantas medicinais constituem fonte de renda e servem para prestar os primeiros cuidados de saúde, no entanto, na maioria dos casos, sem conhecimento científico sobre as suas propriedades terapêuticas.

Nos países em desenvolvimento como Moçambique, de clima tropical e uma flora rica, apenas uma pequena parte é conhecida e usada como planta medicinal. A partir destas, foram feitos estudos isolados e sintetizados princípios activos que fazem parte dos fármacos dos países industrializados (Conde *et al.*, 2014).

Actualmente, estão a ser desenvolvidos vários estudos que procuram comprovar a eficácia de certas espécies de plantas medicinais, caracterizar os princípios activos, avaliar a acção destes no organismo humano e a dosagem segura.


## **2.2 Descrição do objecto de estudo**

### 2.2.1 Ocorrência

A família *Pedaliaceae* compreende 16 gêneros, com aproximadamente 85 espécies tropicais espontâneas e algumas de clima árido, sendo a maioria ervas ou arbustos e a *S. indicum* é a espécie cultivada. *S. indicum* (Figura 1) pertence à mesma família de *S. alatum*, fazem parte desta família 36 espécies, na maioria silvestre sendo *S. indicum* a espécie mais conhecida, a fonte principal de gergelim comercial.

*S. alatum* é largamente distribuído pela África tropical, ocorre em regiões húmidas e por vezes desenvolve em valas com solos arenosos, próximo dos rios e nos campos de cultivo de *S. indicum*. A *S. alatum*, nome vernacular "ximangangana" em Xironga, é uma planta anual com 30 - 100 cm de altura, apresenta flores pardas, cor-de-rosa, folhas inferiores com 3 - 5 lobos, fruto do tipo capsular, com sementes muito pequenas, desenvolve-se em solos perturbados, por vezes perto de águas sendo, de origem tropical ou na África (Alege *et al.*, 2011).

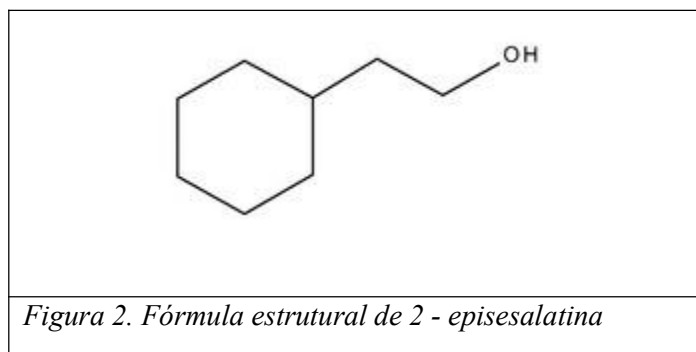
### 2.2.2 Taxonomia

Reino	<i>Plantae</i>	
Filo	Magnoliophyta	
Classe	Magnoliopsida	
Ordem	Lamiales	
Família	Pedaliaceae	
Gênero	<i>Sesamum</i>	
Espécie	<i>Alatum</i>	

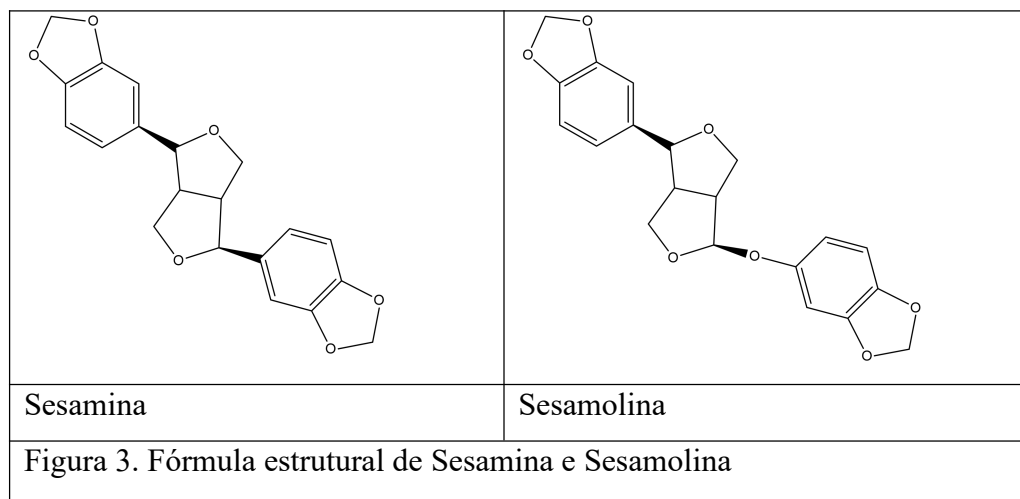
### 2.2.3 Composição química de *S. alatum*

As sementes das plantas de género Sesame são ricas em ácidos gordos insaturados (oleico e linoleico), contendo ainda lignanas (Sesamina e Sesamolina, Figura 3) com propriedades

antioxidantes, flavonoides, 2-episesalatina, cuja estrutura está apresentada na Figura 2 (Nzikou *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013).



De *S. alatum* foram isoladas 3 novas saponinas na parte aérea alatosídeo A-C, verbacosídeo, 2 derivados de ciclohexiletanol (rengiol e isorengiol). O óleo de gergelim apresenta altos teores de ácidos gordos polinsaturados, no entanto, a estabilidade oxidativa do óleo é elevada, em virtude da presença de lignanas, Sesamina e Sesamolina e de seus produtos de degradação, que são potentes antioxidantes, ajudam a combater os danos causados pelos radicais livres, substâncias químicas instáveis que podem contribuir para o envelhecimento e diversas doenças (Antoniassi *et al.*, 2013).



Sesamina é considerada responsável por inúmeros benefícios na saúde humana. Estes agem como anti-cancerígeno, anti-hipertensivo, anti-oxidante, anti-inflamatório e reduz o colesterol (Hata *et al.*, 2010).

A sesamolina deriva da sesamina, mas possui uma ligação dupla em um dos anéis fenólicos, formando um anel de éster dentro da molécula o que contribui nas atividades biológicas das substâncias diferentemente da sesamina.

O Sesamol (3,4 metilenodioxifenol) é um composto natural orgânico que se encontra no óleo de Sésame, caracteriza-se como sendo um sólido cristalino, branco, derivado de fenol, é pouco solúvel em água, mas miscível na maioria dos óleos. Apresenta também propriedades antifúngicas.

### **2.3. Propriedades Medicinais**

A planta *S. alatum* possui as seguintes propriedades medicinais: as folhas e as sementes fornecem proteção renal e possuem atividade antidiabética, os extractos etanólicos das folhas possuem atividade antibacteriana, o extracto metanólico tem propriedades atenuantes contra diabetes, o óleo das sementes é considerado afrodisíaco e antidiarreico (Cambaza, 2023).

### **2.4. Uso de plantas no tratamento de feridas**

A pele como maior órgão do corpo humano protege e previne o corpo contra choques térmicos e invasão por microrganismos. Porém, uma pequena abertura (lesão) deste tecido é suficiente para a entrada de microrganismos que normalmente, habitam no corpo humano como a *Escherichia coli*, *Staphylococcus* e causar infecções. No grupo das bactérias a *Staphylococcus aureus* lidera a lista seguida de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella ssp* e por fim a *Enterobacter sp.*. De salientar que a *Staphylococcus* é comum em todos os tipos de feridas.

O tratamento de infecções por bactérias com antibióticos da segunda linha tem-se registrado ineficiente nos últimos anos, devido ao fraco controlo do uso de antibióticos. Como consequência, está-se a observar o aumento da resistência dos isolados. A resistência a antibióticos pode ocorrer tão rápido quanto a sua eficácia, visto que em antibióticos comuns esta

é perdida num período de 5 anos, devido a mudanças genéticas das bactérias tornando a situação crítica.

O *Staphylococcus*, apesar de fazer parte do microbiota humana, constitui um desafio para o sector da saúde pois é o principal agente de infecção nos hospitais e na comunidade e desde a década 60 tornou-se resistente à penicilina.

A resistência dos microrganismos exige com urgência formas alternativas para superar o problema que dia pós dia tem estado a aumentar. As plantas medicinais são vistas como a alternativa devido a grande variedade de compostos químicos com actividade antibacteriana e outras.(Oliveira *et al.*, 2016; Umamaheswara *et al.*, 2014).

A *Moringa oleífera L.* possui estudos comprovados da sua eficiência no tratamento de diversas enfermidades. Foram reportadas propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas e antifúngicas, o que justifica a sua utilização. As plantas como *Anacardium occidentale L.*, *Aloe vera L.* *Calendula officinalis L.* apresentam eficácia comprovada no tratamento de feridas, a informação sobre o poder e a composição está oficialmente divulgada, incluindo o modo de preparação e contra-indicações (Bandeira *et al.*, 2001; Bruschi *et al.*, 2014).

## **2.5. Métodos de avaliação antibacteriana**

Os microrganismos são seres vivos microscópicos, unicelulares ou pluricelulares e eucariontes. No ambiente natural os microrganismos encontram-se espalhados em diversos locais. Esta característica deve-se ao facto de poderem estabelecer relações entre si, parasitismo, quando se fixam no hospedeiro e vivem à custa deste, simbióticas que estabelecem sinergias de diferentes graus. Em alguns casos, estas são oportunistas podendo causar doenças dependendo do estado do sistema imunológico do hospedeiro.

No entanto, para o hospedeiro desenvolver a doença é necessário que haja uma quantidade considerável de microrganismos capaz de invadir o sistema imunológico, sendo as bactérias, fungos, vírus e algas, responsáveis pelas infecções. Apesar de os microrganismos estarem em

todos os locais, a higienização do local de crescimento de microrganismo em meios de cultura, o uso de água destilada e a autoclavagem (121°C) são procedimentos indispensáveis para evitar cultura de seres indesejáveis, comprometendo a saúde e/ ou estudos seguintes como o caso do estudo da actividade antibacteriana.

A actividade antibacteriana de extractos vegetais é avaliada através da determinação de uma pequena quantidade de substância necessária para inibir o crescimento do microrganismo - teste, a Concentração Mínima Inibidora (CMI). Os métodos de avaliação da actividade antibacteriana mais comuns são micro-diluição em caldo que incluem método de difusão em disco e difusão em gradiente ou métodos de instrumentos automatizados.

O método de difusão de ágar é o mais recomendado para laboratórios e para microrganismos de crescimento rápido. Os discos são feitos em papel de filtro empregando com o antibacteriano em concentração baixa (Ostrosky *et al.*, 2008).

A difusão do antibacteriano forma um halo de inibição do crescimento bacteriano cujo diâmetro é medido e interpretado. Este método revela-se vantajoso, por fornecer resultados fáceis de interpretar, assim como é de fácil execução (Reller, 2009).

Os métodos automatizados são rápidos e dispendiosos e os manuais são flexíveis e económicos, mas ambos fornecem resultados qualitativos quanto às sensibilidades, no entanto, para a obtenção de resultados com precisão, requerem outros testes. Estudos com microrganismos permitem afirmar que estes respondem de maneira diferente em relação às drogas antibióticas, por isso realizam-se testes de sensibilidade. O teste é indicado para qualquer microrganismo capaz de produzir infecção que necessite de tratamento antibacteriano, se a sensibilidade não pode ser predita a partir do crescimento e identificação do microrganismo (Jorgensen & Ferraro, 2009).

A sensibilidade classifica-se do seguinte modo, quando uma infecção de uma determinada espécie é tratada adequadamente com uma dose do agente microbiano significa que esta é sensível. Se a eficácia clínica da droga implica uma dose maior do que a normal significa que o microrganismo tem uma sensibilidade intermediária. No entanto, existem microrganismos que

não são inibidos, denominados resistentes. Para classificar em sensível, intermédio ou resistente, faz-se a medição do halo formado e compara-se com o padrão.

**Tabela 1** - Classificação da sensibilidade dos microrganismos segundo CMI

Critério	CMI (ug/ml)	Halos de inibição (mm)
Sensível	$\leq 4$	$\geq 20$
Intermédio	8-16	15-19
Resistente	$\geq 32$	$\leq 14$

A CMI pode ser obtida usando testes de diluições, isto é, não é um valor absoluto, é um ponto entre a maior concentração do teste que inibe o crescimento do microrganismo e a próxima maior concentração do teste (Jorgensen & Ferraro, 2009).

De entre vários meios o Mueller Hilton é considerado o melhor para testes rotineiros de sensibilidade contra bactérias, por fazer a multiplicação satisfatória da maioria dos patógenos, existir muita informação e experiências relativos ao teste de sensibilidade, conter uma composição baixa de inibidores como as sulfonaminas também conhecidas por sulfonamidas e tetraciclina e possui uma reprodutividade aceitável entre lotes nos testes de sensibilidade.

### 2.5.1 *Staphylococcus aureus*

O género *Staphylococcus* pertence à família *Micrococcaceae*, juntamente como os géneros *Planococcus*, *Micrococcus* e *Stomatococcus*. Actualmente, o género *Staphylococcus* possui 33 espécies, sendo que 17 delas podem ser isoladas de amostras biológicas humanas. A principal espécie deste género é o *S. aureus*, que tem a forma esférica (são cocos), cerca de 1  $\mu\text{M}$  de diâmetro e formam grupos com aspecto de cachos de uvas.

Constitui um importante patógeno envolvido na etiologia das infecções humanas, sendo encontrado, como microbiota normal, nas fossas nasais, virilha e axilas. É responsável por 45% de infecções em todo o mundo, encontra-se em muitos lugares e é transportado de um local para

outro por meio do contacto entre pessoas ou de superfícies contaminadas. *S. aureus* são semeados em meios selectivos ágar manitol, incubados a 37<sup>o</sup> C por 24 horas, apresentando-se com uma coloração amarela (Dos Santos *et al.*, 2007).

### **2.5.2 *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria gram-negativa, pertence à família *Pseudomonadaceae* aeróbica, não esporulada, recta ou ligeiramente curva, pode ser encontrada isolada ou aos pares ou ainda em pequenas cadeias de cerca de 0,5-1µm de diâmetro e 1,5-5µm de comprimento, desloca-se a partir de um flagelo que facilita a adesão deste no hospedeiro.

No que concerne ao seu metabolismo, é versátil, não é fermentadora de glicose, isto é, não utiliza carboidratos como fonte de energia, utilizam fontes de carbono e azoto, sobrevive em diferentes meios físicos, pode crescer em temperaturas que variam de 20 a 43<sup>o</sup>C, no entanto, pode ser encontrada em diversos sítios na natureza, habita na água, no solo, em vegetais e coloniza regiões húmidas da pele, incluindo as axilas, e por ser pouco exigente em termos nutricionais, aumenta o sucesso ecológico como agente oportunista. Nos pacientes com sistema imunológico debilitado, causa infecções graves devido à produção do lipopolissacarideo, pela membrana externa, que é responsável pela toxicidade e inibe a síntese proteica nas células eucarióticas resultando em necrose de tecido.

A *P. aeruginosa* afecta pacientes dos cuidados intensivos de queimaduras e fibrose cística, é conhecida por causar infecções agudas caracterizadas pela produção de toxinas e infecções crônicas por meio da produção de espessa camada de biofilme. A *P. aeruginosa* por serem pouco exigentes podem ser cultivadas em agar sangue e MacConkey e facilmente é identificado pelo odor de uva, coloração esverdeada que pode ser visualizado na placa de agar de Mueller-Hilton em teste de sensibilidade antibacteriana (TSA). O tratamento de infecções por *P. aeruginosa* é complexo, pois estas são resistentes a muitos antimicrobianos, devidos a frequentes mutações cromossómicas (Barbieri & Sun, 2004).

### **2.5.3 *Escherichia coli***

A *E. Coli* é uma bactéria Gram- negativa, anaeróbica facultativa fermentadora de açúcares, pertence à família Enterobacteriaceae, encontra-se normalmente no intestino dos animais de sangue quente (de Oliveira Souza *et al.*, 2016).

## **2.6 Extração de produtos naturais**

Na fitoquímica, o sucesso do isolamento dos produtos naturais depende fundamentalmente da extração, que inclui a selecção do método e solvente adequando, pois, cada método tem seus benefícios e limitações. Para a extração usam-se solventes tais como: o éter etílico, o éter di-isopropílico, o benzeno, o clorofórmio, o tolueno, o diclorometano, o acetato de etilo, a acetona, o tetracloreto de carbono, o metanol e o hexano.

O metanol é o solvente mais indicado pelas suas propriedades para a extração de compostos polares, extrai maior número de compostos, porém não é recomendado para o ambiente devido à toxicidade elevada e é altamente inflamável com uma chama limpa, o contacto frequente pode trazer problemas na saúde como irritação nos olhos e vômitos.

A maceração pode ser estática ou dinâmica, a matéria-prima (folhas ou sementes) é introduzida num recipiente contendo solvente devidamente seleccionado, durante algumas horas ou dias, a temperatura-ambiente que posteriormente esta é separada. Para a obtenção de extractos não voláteis de material vegetal, são utilizadas diferentes técnicas sendo que a maceração da planta com solvente orgânico é o método tradicionalmente empregue, pela facilidade e ampla aplicabilidade.

Na extração por Soxhlet faz-se um refluxo contínuo do solvente, por algum tempo, até à descoloração do extracto contido no cartucho, o processo ocorre num recipiente fechado. O material a ser isolado acumula-se no balão e recuperado com a evaporação do solvente. A extração é exaustiva no Soxhlet, mas carece de muito solvente e pode alterar as propriedades das substâncias activas, o que não ocorre na maceração, além de ser um processo simples e de baixo custo (Zhang *et al.*, 2018).

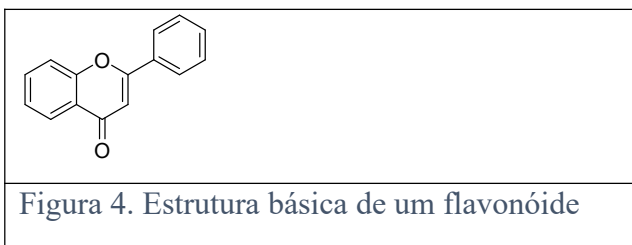
Uma alternativa ao processo tradicional é a extracção supercrítica, com a vantagem de usar o dióxido de carbono, considerada uma técnica limpa, não é inflamável, não é tóxica nem corrosiva e facilmente atinge as condições de temperatura e pressão supercrítica. A extracção de óleos vegetais com solventes, desde o século passado, observou-se um desenvolvimento na optimização de técnicas substituindo as prensas, dando acesso a produtos com maior qualidade e valor agregados. No entanto, continua sendo o maior desafio da fitoquímica seleccionar dados existentes em cada classe particular de compostos (Ibáñez *et al.*, 2015).

## 2.7 Metabolitos secundários com acção antibacteriana

Os metabolitos secundários são, geralmente, de estrutura complexa, baixo peso molecular, possuem actividade biológica marcante, encontram-se em baixas concentrações em determinados grupos de plantas, sendo a principal função de protecção do organismo (Mera *et al.*, 2019). De entre os metabolitos secundários com acção antibacteriana nas plantas, destacam-se os seguintes:

### 2.7.1 Flavonóides

Os flavonóides compreendem uma classe de compostos mais distribuídos entre as plantas, estão presentes em todos órgãos. São responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento da planta, protegendo os tecidos contra os danos oxidativos e contra agentes patogénicos, como o caso de fungos, bactérias, vírus e raios ultravioletas. São também responsáveis pela coloração e sabor dos vegetais. Quimicamente, os flavonóides são substâncias constituídas por 15 átomos de carbono no seu núcleo básico arranjado na configuração C6-C3-C6, isto é, são dois anéis ligados por três carbonos. A Figura 4 ilustra a estrutura básica de flavonoides.



Devido a sua grande variedade química, os flavonóides podem ser distribuídos em: flavonas, flavanonas, flavanóis e isoflavona com propriedades químicas e físicas distintas. Esta classe de compostos apresenta-se no estado sólido, cristalino, de coloração branca a amarelo claro. Os heterósidos são solúveis em água, álcoois e outros solventes orgânicos polares, insolúveis em solventes orgânicos apolares, as geminas são fracamente solúveis em água e solúveis em éter (Panche *et al.*, 2016).

## **Identificação dos flavonóides**

### Reação de Shinoda

Colocar cerca de 2 ml do extracto alcoólico em um tubo de ensaio e adicionar mais ou menos seis fragmentos de Mg metálico e adicionar 1 ml de HCl conc., observando se desenvolve coloração rosa a vermelha.

### Reação com cloreto de alumínio

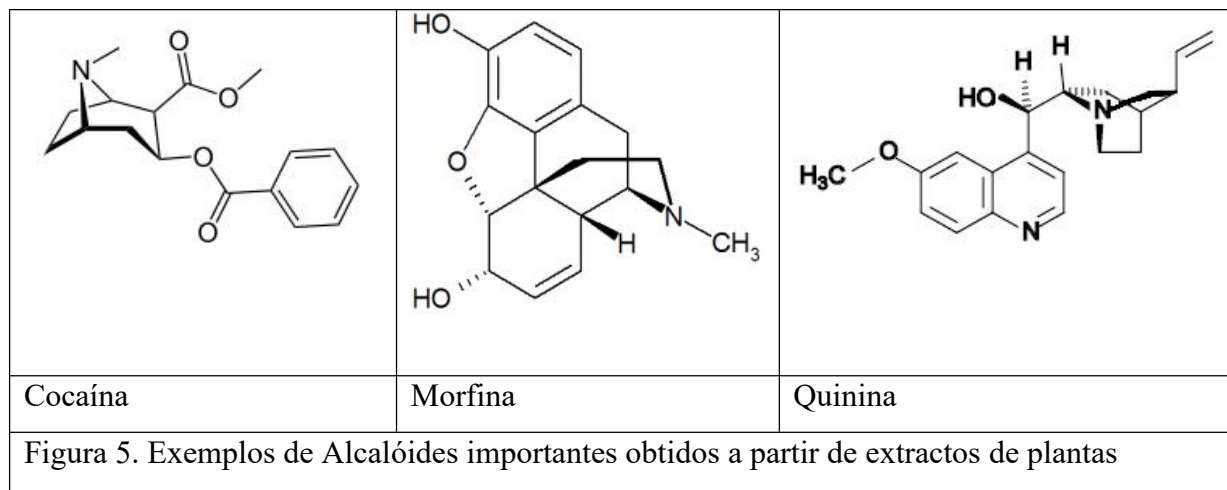
- Humedecer áreas diferentes com uma tira de papel de filtro com o extracto alcoólico obtido;
- Colocar sobre uma das regiões uma gota de solução de  $AlCl_3$  a 5% e comparar a fluorescência sob luz ultravioleta (ondas longas).

*Pesquisa positiva → intensificação de fluorescência com mudança de cor para verde amarelado.*

Os flavonóides são considerados potenciais antioxidantes naturais, devido aos grupos hidroxilos ligados à estrutura do anel aromático, diminuem a permeabilidade capilar e aumentam a resistência dos vasos, são anti-inflamatórios, anti-diuréticos, anti-microbianos, anti-alérgicos, anti-tumoral e tem acção anti-envelhecimento.

### 2.7.2 Alcalóides

Alcalóides são compostos orgânicos de azoto, sintetizados por algumas espécies de plantas, isto é, aminas (exclui as aminas simples) e muitas vezes reagem com ácidos para formar sais. Na sua forma pura são sólidos cristalinos, incolores, não voláteis, sabor amargo, alguns são tóxicos e venenosos, por isso, tem a função protectora para a planta. Apresentam, geralmente, uma estrutura complexa, com sistemas cíclicos, na maioria dos casos heterocíclicos. Esta variedade explica a diversidade da actividade terapêutica que apresentam. Na Figura 5 estão representadas as estruturas de alguns alcaloides mundialmente conhecidos, extraídos a partir de extractos de plantas medicinais.



Esta classe de substâncias pode ser classificada quanto à origem botânica, biossíntese e actividade farmacológica. Quanto à origem botânica ou família, podem ser alcalóides da quina (quinina) e alcalóides do ópio (morfina). Quanto à biossíntese estes podem ser alcalóides verdadeiros, que derivam de aminoácidos, contendo um átomo de Nitrogénio em anel heterocíclico (morfina e emetina). Protoalcalóides são aminas simples precursoras da síntese de alcalóides, contém um átomo de Nitrogénio que não pertence ao anel heterocíclico (mescolina) e pseudoalcalóides são substâncias que possuem todas as características dos alcalóides verdadeiros mas, provem do metabolismo de terpenos ou de acetato (Aconitina).

Este grupo de substâncias influenciou muito a história médica, económica, política e social da humanidade, apresenta tanto actividade terapêutica quanto tóxica. Um exemplo notável é a execução do Sócrates que como pena, ingeriu chá de uma planta tóxica a Cicuta.

O uso do ópio e da morfina, são de exclusiva prescrição médica, pois actuam no sistema nervoso central e originam, facilmente, a dependência. A codeína faz parte de muitos fármacos para a tosse. A Grã-Bretanha e a China envolveram-se em conflitos armados devido ao desentendimento na comercialização do ópio que foram conhecidos como a guerra do ópio.

A casa sagrada era usada para o tratamento da malária no século XVI, foi isolada no século XVIII e ensaiada a sua eficácia, deste então, a quinina é usada como droga de primeira linha no tratamento da malária e apresenta ainda propriedades analgésicas (Lu *et al.*, 2012).

### **Identificação dos alcalóides**

Geralmente, os alcalóides têm um átomo de Nitrogénio com o par de electrões não compartilhados, o que os confere o carácter básico, sendo assim, reagem com ácidos, formando precipitados de coloração variada (variando de branco a castanho alaranjado) e amorfos ou cristalinos.

- Aqueça a fervura, cerca de 5 g da droga vegetal (moída) em teste, e 30 ml de ácido clorídrico diluído. Filtre.
- Divida o filtrado em 4 tubos de ensaio.
- Em 3 tubos, acrescente três gotas dos reagentes de Dragendorff, Mayer e Bertrand, respectivamente. Um tubo será o branco.
- Observe a formação de turvação e/ou precipitado.

### **2.7.3 Saponinas**

As saponinas são substâncias que se encontram em tecidos vegetais vulneráveis ao ataque de fungos, bactérias, isto é, estão relacionados com o sistema de defesa. O nome saponina deriva do latim *Sapinis*, que significa sabão e são glicosídeos de esteroides ou de terpenos policíclicos. Possuem uma parte com características lipofílica (triterpeno ou esteroide) e outra parte

hidrofílica (açúcares), o que determina propriedades tensioactivas, formando espuma persistente após agitação.

As saponinas são classificadas de acordo com o número fundamental de aglicona, podendo ser: saponinas esteroidais e saponinas triterpênicas e também pelo seu carácter ácido, básico ou neutro. A distribuição das saponinas é diferenciada no reino vegetal sendo que, nas monocotiledóneas, podem ser encontradas exclusivamente saponinas esteroidais neutras e nas dicotiledóneas predominam as saponinas triterpênicas (Bouzier *et al.*, 2023).

### **Identificação das saponinas**

A caracterização das saponinas pode ser feita com base na agitação do extracto ocorrendo a formação de espuma persistente de espessura de cerca de 1cm.

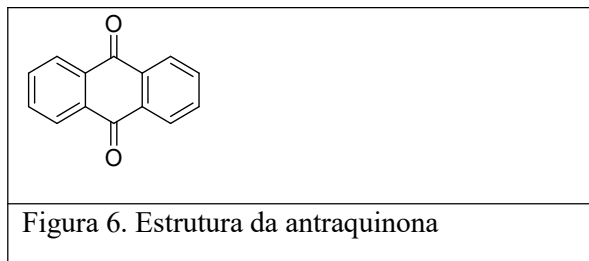
#### **A) Pesquisa de Saponinas - teste qualitativo de espuma**

- Ferver (decoção) 2g da droga em pó com 10 mL de água destilada por 3 minutos. Agitar energeticamente, no sentido vertical por 15 segundos.
- Deixar a solução em repouso, por 15 minutos, marcar com caneta a altura da espuma.
- Observar a presença de espuma persistente (por 15 minutos).
- Reação positiva = permanência da espuma.
- Reação negativa = desaparecimentos da espuma.

As propriedades anfílicas das saponinas permitem que actuem sobre as membranas celulares, alterando a permeabilidade ou causando a sua destruição. Sendo assim, algumas destas agem como antibacterianas, antifúngicas e anti-inflamatórias.

#### **2.7.4 Antraquinonas**

Antraquinonas são compostos orgânicos provenientes da oxidação dos fenóis, isto é, são derivados de dicetona do antraceno. A sua principal característica é a presença de dois grupos carbonílicos formando um sistema conjugado, tal como é apresentado na Figura 6.



Apresentam a forma de cristais de coloração amarela avermelhada, sublimam-se a temperatura ambiente, são solúveis em solventes apolares, mas as formas ligadas aos glicosídeos são solúveis nesses solventes, são amarelas e não sublimam a temperatura ambiente (Dos Santos *et al.*, 2008).

### Identificação de antraquinonas

A detecção de antraquinonas pode ser feita com o reagente de Bornträger em meio básico (Hidróxido de amónio) seguida de agitação.

- **Reacção de Bornträger directa:**

Para antraquinonas livres: cascara-sagrada

- Colocar pequeno fragmento da droga (cerca de 0,2 g) ou pequena quantidade de pó em um tubo de ensaio e adicionar 5 ml de solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$  dil.

*Reacção Positiva* → coloração rósea ou avermelhada

- **Reacção de Bornträger com prévia hidrólise ácida:**

Para glicosídeos antraquinônicos e dímeros:

- Colocar 1,0 g da droga em tubo de ensaio;
- Adicionar 8,0 ml de solução de EtOH a 25%;
- Ferver na chama por 1 min;
- Filtrar por algodão para um tubo de ensaio contendo 4 ml de solução  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 5% e aquecer levemente;
- Resfriar na torneira e adicionar 5 ml de  $\text{CHCl}_3$  (clorofórmio) ou  $\text{Et}_2\text{O}$  (éter etílico);
- Extrair cuidadosamente por cerca de 3 minutos;

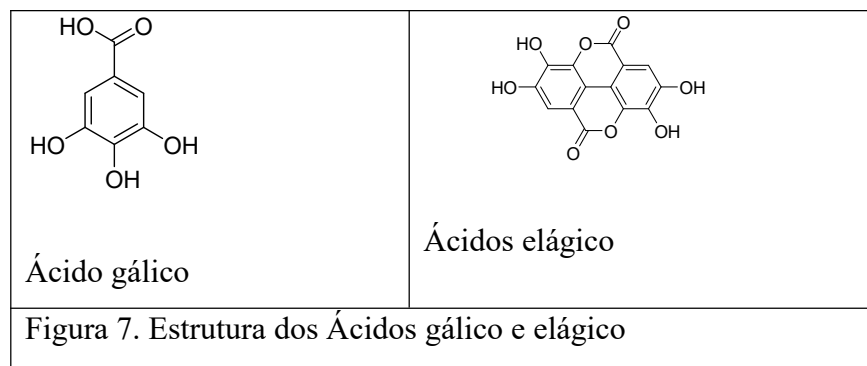
- Decantar a camada orgânica para um tubo de ensaio;
- Adicionar 5 ml de solução de NH<sub>4</sub>OH dil.;
- Agitar fortemente e deixar em repouso.

Estes compostos possuem uma acção laxativa moderada após ingestão oral, por isso são usados para evacuação intestinal antes de processos cirúrgicos e em catárticos agindo sobre o intestino grosso, diminuindo a reabsorção de água. Estes também possuem actividade antibacteriana, antiviral e antifúngica.

### 2.7.5. Taninos

Taninos são compostos polifenólicos, de alto peso molecular, de natureza heterogénica, altamente solúveis em água, responsáveis pela defesa da planta contra herbívoros, dificultando a digestão dos animais.

Classicamente, segundo a estrutura química, os taninos são classificados em dois grupos: hidrolisáveis e condensados. Os taninos hidrolisáveis consistem de ésteres de ácidos gálicos e condensados em ésteres de ácidos elágicos glicosilados, formados a partir do chiquimato, em que os grupos hidroxila do açúcar são esterificados com ácidos fenólicos. Os dois membros mais representativos desta classe de metabolitos secundários estão representados na Figura 7 (Monteiro *et al.*, 2005).



### Identificação de taninos

## A) Extracção

- Preparar um decocto (15 minutos) com 5 g da droga vegetal pulverizada com 100 ml de água destilada.
- Filtrar e deixar esfriar (solução extrativa A).
- Realizar testes gerais de identificação, juntamente com uma amostra-padrão positivo.
- Distribuir o filtrado em 4 tubos de ensaio identificados, sendo que o tubo nº 4 será o branco.

Executar as reacções de identificação. Duas técnicas dando reacção positiva confirmam a presença de taninos.

## B) Testes de identificação

Tubo 1 – Gelatina (2 ml da extração A + 2 gotas de HCl diluído + solução de gelatina a 2,5% gota-a-gota. Se ocorrer formação de precipitado: reacção positiva para taninos).

Tubo 2 – Cloreto férrico (2 ml da extração A + 10 ml de água destilada + 2-4 gotas da solução de FeCl<sub>3</sub> a 1% em metanol. Cor Azul: taninos hidrolisáveis ou gálico e Cor Verde: taninos condensados ou catéquico).

Tubo 3 – Acetato de chumbo (5ml da extração A + 10 ml da solução de ácido acético a 10 % + 5 ml da solução de acetato de chumbo a 10%. Formação de um precipitado esbranquiçado: presença de taninos hidrolisáveis)

## 3. PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1 Materiais e Métodos

Para a realização das experiências usaram-se os seguintes equipamentos, materiais e reagentes.

➤ Reagentes/ solventes	➤ Equipamentos
Etanol 70%, <i>n</i> -Hexano, Metanol, ácido sulfúrico concentrado, Éter de Etila, Água destilada, Hidróxido de	Triturador de sementes, rotavapor, fonte de aquecimento, geleira, estufa, calibrador de escala

<p>sódio 5%, Ácido clorídrico 2M, Cloreto de ferro (III) 5%, Acetato de chumbo, Reagente de Mayer, Reagente de Wagner, Reagente de Shinoda, Reactivo de Liebermann, Reactivo de Rossol, Vanilina, Soro fisiológico.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <b>Meios de cultura</b> - Ágar sangue, Ágar MacConkey e Mueller Hilton,</li> <li>➤ <b>Discos experimentais</b> - Ciprofloxacina 5µg</li> </ul> <p><b>Material biológico</b> - <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> não padronizado, <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 e <i>Escherichia coli</i> multirresistente;</p>	<p>Macfarland, autoclave, bico de Bunsen, forador de discos balões de erlenmeyer de 500ml e 1000ml, Balões de erlenmeyer, copos de Becker, papel de filtro, placas de alumínio (sílica gel) 20x20, conta-gotas, rótulos, rolhas, tina cromatográfica, tubos de ensaio, vidro de relógio, suporte metálico, espátulas, frascos plásticos, pipetas ansas, zaragatoas de inoculação, luvas, placas de Petri, seringas,</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <b>Equipamento de campo</b> - Sacos de ráfia, tesoura, jornais</li> </ul>
---	--

### 3.2 Colheita de amostras

As amostras das sementes e folhas da planta *S. alatum* foram colhidas no mês de Novembro de 2018, no distrito da Moamba. Para a colheita foi usada uma faca e tesoura de cozinha para cortar as partes aéreas da planta. O material vegetal foi armazenado em sacos de ráfia de modo a não perderem as suas propriedades ou que não decorram reacções indesejadas durante o seu transporte. Em seguida, procedeu-se a separação manual das vagens e folhas, e deixou-se a secar à sombra no laboratório de Química, à temperatura ambiente, por 21 dias.

As vagens, quando secas, abrem-se e facilmente colheram-se as sementes, foram peneiradas seguidas de triagem para a separação de restos de partes da planta. As folhas secas foram moídas num liquidificador caseiro até obter uma aparência homogénea.

De salientar que a identificação botânica das folhas da planta foi feita pelo herbário da UEM com base em métodos científicos e o uso popular da espécie no Instituto de Medicina Tradicional. Tendo se constatado que havia défice de informação sobre as plantas usadas e estudadas. O Instituto não dispõe de uma base de dados adequada sobre as pesquisas científicas das plantas

usadas na medicina tradicional. O mesmo acontece com a existência de legislação para o uso de plantas na saúde que espera aprovação pela Assembleia da República.

### **3.3 Preparação dos extractos brutos**

A extração teve lugar no laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Eduardo Mondlane. Utilizando. Numa balança analítica (Gibertini Europe 500), foram pesados 80g de amostras das sementes e folhas. Em seguida foram colocados, separadamente, em balões de Erlenmeyer (um para sementes e o outro para as folhas).

240 ml de solventes foram adicionados em cada Erlenmeyer, para a preparação de 2 extractos brutos diferentes: SA (extracto bruto preparado a partir das sementes e usando como solvente de extracção uma mistura hidroalcoólica a 70%) e FA (extracto bruto preparado a partir das folhas e usando como solvente de extracção uma mistura hidroalcoólica a 70%).

Para a preparação dos extractos aquosos SH (extracto bruto preparado a partir das sementes e usando como solvente de extracção a água); FH (extracto bruto preparado a partir das folhas e usando como solvente de extracção a água). 30g de cada amostra, foram introduzidos no balão de Erlenmeyer e colocaram-se 90ml de água destilada em cada balão.

Todas as misturas foram submetidas à maceração com agitação durante 6 horas, e, em seguida, procedeu-se a filtração usando um papel de filtro Whatman 1 e, concentração no Rotavapor. A maceração com água apenas foi realizada no dia anterior ao ensaio antibacteriano pois, o macerado obtido usando água como solvente apresenta a desvantagem de ser difícil de conservar sem alterar a sua composição.

### **3.4. Preparação dos ensaios para a avaliação da actividade antibacteriana dos extractos brutos de *S. alatum* (Ensaio I)**

### 3.4.1 Amostra-Bactérias

Os isolados foram fornecidos pelo Departamento de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade Eduardo Mondlane, nomeadamente: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* não padronizado, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Escherichia coli* multirresistente.

Os meios de cultura foram preparados conforme as instruções do fabricante, sendo que em cada litro de água destilada, dissolvem-se 37g de ágar Mueller Hilton e coloca-se uma quantidade que cobre a base da placa de Petri e guarda-se numa geleira. Este procedimento realizou-se num local protegido de microrganismos e com material esterilizado.

No dia do ensaio, as placas foram introduzidas na estufa por 10 minutos, a 37°C, para a sua activação, ou seja, aquecer até à temperatura ambiente para crescimento dos micro-organismo. Os isolados foram sub-cultivados no dia anterior ao ensaio.

### 3.4.2 Procedimentos para a cultura de micro-organismos

Para a efectivação desta etapa foram seguidos os seguintes passos: Cultura de micro-organismos *Staphylococcus aureus* em Ágar sangue e *Pseudomonas aeruginosa* e *E. Coli* em Ágar Mac Conkey. Os discos foram feitos de papel de filtro “Whatman 1”, enumerados conforme o número de extractos que se pretendia analisar e esterilizados para descartar a contaminação.

A banca de trabalho foi higienizada e todo o trabalho foi realizado próximo da chama do bico de Bunsen. Esterilizou-se a seringa e extraíram-se 5ml de soro fisiológico, que foram colocados em cada um dos 4 tubos e tapados. Foi identificada uma colônia na placa, inoculou-se e calibrou-se para 0.5UFC. Repetiu-se o procedimento para as outras culturas.

Procedeu-se a identificação das placas (data e nome da bactéria), em seguida, introduziu-se a zaragatoa no tubo e fizeram-se movimentos nas bordas, no meio de cultura, introduziu-se novamente no tubo e iniciaram-se movimentos suaves em ziguezague muito próximos em toda a placa. Repetiu-se o esfreganço com a placa virada no ângulo de 90<sup>0</sup>, 180<sup>0</sup> e 270<sup>0</sup> respectivamente,

e fez-se o mesmo procedimento com as outras placas, um tubo para uma placa de Petri com Muller Hilton.

Colocaram-se os discos na placa, sendo a posição central o disco de controlo positivo, posição superior o número um que corresponde ao extracto alcoólico de semente, a posição inferior ao disco de controlo o número 2 que corresponde ao extracto alcoólico de folhas. O lado direito do disco de controlo posicionou-se o número 3 que corresponde ao extracto aquoso de sementes e, por fim, o lado esquerdo o número 4 com o extracto aquoso de folhas.

Usando uma pipeta de 5 $\mu$ L para cada extracto, humedeceu-se o número correspondente. Tapou-se a placa, inverteu-se e guardou-se na estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas. Procedeu-se do mesmo modo para o ensaio biológico II (com as fracções preparadas a partir dos extractos brutos) e III (compostos da fracção mais activa).

### **3.5. Fracionamento separação líquido-líquido**

A separação líquido-líquido implica uma dissolução selectiva entre solventes imiscíveis, este método depende da afinidade do soluto e o solvente assim, mediu-se 10ml de extracto aquoso de folhas e colocou-se 10 ml de solvente n-Hexano, agitou-se e deitou-se no funil de separação. Deixou-se ficar e formaram-se 2 fases, uma do solvente e outra do soluto (extracto). Com muito cuidado abriu-se uma torneira e separaram-se as fases, acrescentaram-se 10ml de solvente, agitou-se e deixou-se formar as fases e abriu-se a torneira.

Mediram-se 10 ml do diclorometano e colocou-se num funil. Procedeu-se do mesmo modo até que se extraíram todos os compostos. E repetiu-se o procedimento com o Etilo acetato. Em seguida, os copos com o solvente, contendo o extracto, foram depositados em local seguro para a evaporação deste.

## **4. APRESENTAÇÃO DE RESULTADOS**

### **4.1 Preparação dos extractos brutos**

Na extração das folhas com álcool obteve-se 85 ml de extracto e com água 42 ml e nas sementes a extração com álcool obteve-se 110 ml de extracto e em água 67 ml, conforme mostra a Tabela 2.

Tabela 2. Resultados da extração por maceração

	Álcool		Água	
	Folhas	Sementes	Folhas	Sementes
<b>Amostra (g)</b>	80g	80g	30g	30g
<b>Solvente (ml)</b>	240ml	240ml	150ml	150ml
<b>Extracto</b>	85ml	110ml	42ml	67ml

#### 4.2 Avaliação da actividade antibacteriana dos extractos brutos das folhas e sementes (Ensaio I)

A avaliação da actividade bacteriana dos extractos aquosos e alcoólicos da planta *S. alatum* foi realizada com bactérias sensíveis e resistentes a antibióticos conforme espelha a Tabela 3:

Tabela 3. Resultados da valiação da actividade antibacteriana dos extractos brutos

	S A	FA	S H	FH	Ciprofloxacina
<b>1</b>	-	-	-	-	+
<b>2</b>	-	+	-	-	+
<b>3</b>	-	-	-	-	-
<b>4</b>	+	-	-	+	-

(1) *Staphylococcus aureus*, (2) *Pseudomonas aeruginosa*, (3) *Escherichia coli*, (4) *Escherichia coli* multirresistente

(SA) Semente/ alcoólica (FA) Folhas/ alcoólica (SH) Semente /aquosa (FH) Folhas/aquosa

(+) Inibe (-) Não inibe

### 4.3 Avaliação da actividade antibacteriana das fracções de *S. alatum* – (Ensaio II)

As fracções dos extractos alcoólicos foram submetidos ao ensaio antibacteriano conforme mostra a Tabela 4.

**Tabela 4.** Resultado da actividade antibacteriana das fracções preparadas a partir dos extractos alcoólicos

Isolados	Sementes				Folhas			
	Hex	DCM	EA	Resíduo	Hex	DCM	EA	Resíduo
<b>Pa</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Sa</b>	-	-	-	-	-	+	-	-
<b>E.c</b>	-	-	-	-	-	+	-	-
<b>Ecr</b>	-	-	+	-	-	-	-	-

As fracções do extracto aquoso das folhas revelaram o resultado descrito na tabela 5.

**Tabela 5.** Resultados da actividade antibacteriana das fracções preparadas a partir do extracto aquoso

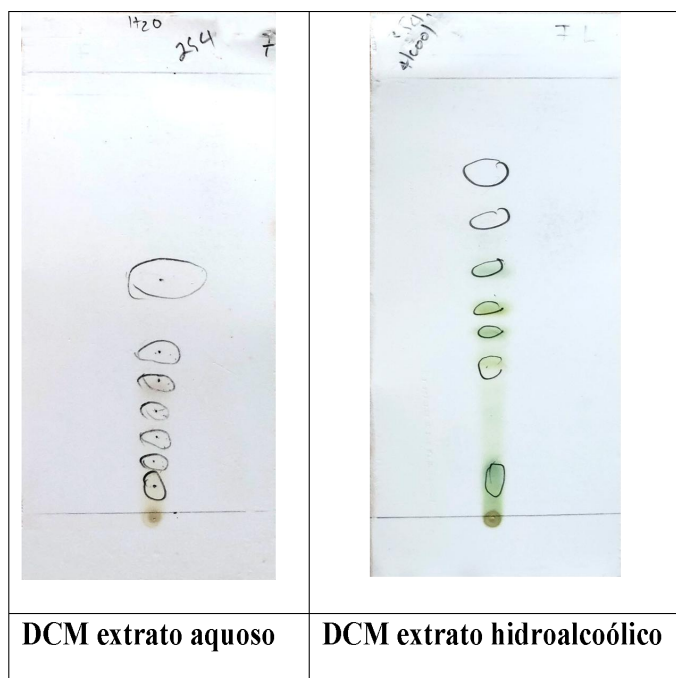
Isolados	Folhas			
	Hex	DCM	EA	Resíduo
<b>P.a</b>	-	+	-	-
<b>Sa</b>	-	+	-	-
<b>E.c</b>	-	-	-	-
<b>Ecr</b>	-	-	-	-

#### 4.4 Cromatografia de camada fina

Na cromatografia em camada fina usou-se placas de alumínio com sílica gel 20x20 que foram cortadas 8x4cm cada e mediu-se 1cm para determinar a área de aplicação da amostra com tubos capilares. O objectivo era a selecção do melhor sistema de solventes a ser usado para a separação dos componentes da fracção mais activa, de acordo com a Tabela 6.

**Tabela 6.** Cromatografia de camada fina para a selecção do melhor sistema de solventes

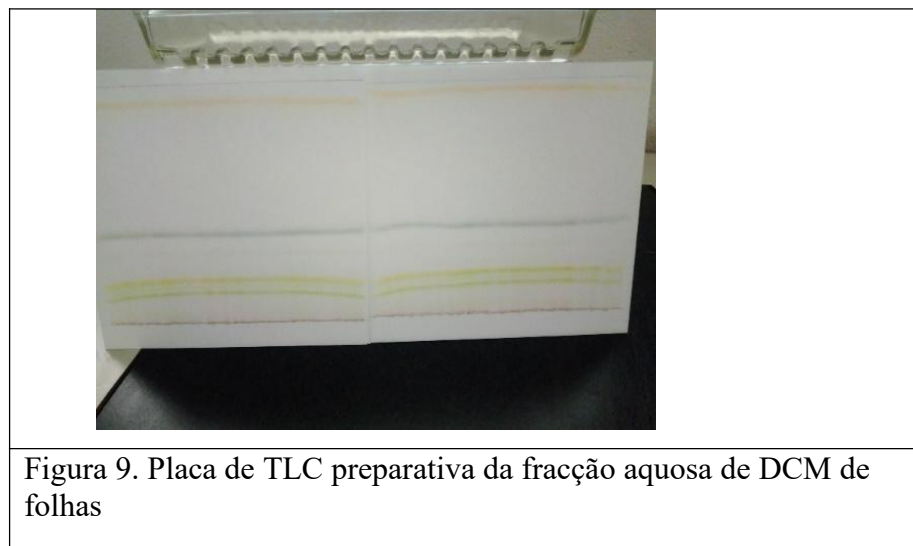
	<b>Solvente de eluição</b>	<b>Proporção (ml)</b>	<b>Número de manchas</b>	<b>Valor de Rf</b>	<b>Revelador</b>
1	Hexano/DCM	5-5	1	0.14	UV/Vanilina/Iodo
2	Hexano/DCM	2.5-7.5	2	0.12; 0.47	UV/Vanilina/Iodo
3	Hexano/DCM	1-9	3	0,042; 0.18; 0.60	UV/Vanilina/Iodo
4	Hexano/DCM	7.5-2.5	1	0.057	UV/Vanilina/Iodo
5	Hexano/DCM	9-1	1	0.042	UV/Vanilina/Iodo
6	Hexano/Acet	7-3	6	0.157;0.21;0.257; 0.3; 0.428; 0.557	UV/Vanilina
7	Hexano/Acet	7.5-2.5	7	0.042;0.1; 0.157; 0.228; 0.285; 0.34; 0.528	UV/Vanilina
8	Hexano/Acet	6.5-3.5	7	0.11; 0.34; 0.385; 0.471; 0.61; 0.657; 0.742	UV/Vanilina



**Figura 8.** TLC da fração de DCM obtida a partir dos extractos brutos FA e FH

#### 4.5 Avaliação fitoquímica preliminar

As placas cromatográficas contendo as manchas dos compostos, foram separados com ajuda de uma espátula para um copo de Becker, onde foram adicionados 10ml de DCM para cada placa (vide Figura 9). Em seguida filtrou-se a obteve-se o composto para a prospecção fitoquímica.



Os compostos foram submetidos a testes fitoquímicos e apresentaram os resultados descritos na Tabela 7:

**Tabela 7.** Resultados da análise fitoquímica preliminar

<b>Composto (Manchas)</b>	<b>Teste realizado</b>	<b>Resultado</b>	<b>Metabolitos secundários</b>
<b>1</b>	-	-	-
<b>2</b>	Reagente de Killiani	Precipitado laranja e solução azul esverdeada	Glicosídeos
<b>3</b>	-	-	-
<b>4</b>	Teste de Dragendorff	Precipitado de cor alaranja	Alcaloides
<b>5</b>	Reagente de Shinoda	Solução rosa claro	Flavonoides
<b>6</b>	Teste de Salkowski  UV 366nm	Formação de 2 fases com cor castanha avermelhado na interfase.	Terpenos
<b>7</b>	-	-	-

## 5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

### 5.1 Preparação dos extractos brutos

A extração compreende uma das etapas mais importantes dos produtos naturais, cada um dos métodos de extração, depende fundamentalmente do fim, pois cada um possui seus benefícios e limitações, a extração com água tem benefício de usar um solvente de fácil acesso e sem custos, no entanto, a sua utilização é limitada, no que concerne à conservação e retirada do solvente no extracto.

De entre vários métodos de extração o presente trabalho elegeu a maceração à temperatura ambiente usando água e solução hidroalcoólica como solventes, pois a extração a frio permite obter melhor rendimento do que a extração quente. Acrescenta-se ainda que pode haver princípios activos sensíveis à acção da temperatura, fazendo com que estas percam a sua actividade.

A pesquisa sobre a acção medicinal de extractos feita em folhas de diferentes plantas usando a maceração e infusão, demonstraram que os ensaios feitos com o extracto da maceração revelaram-se mais expressivos que os obtidos por infusão. De salientar que este método é recomendado para a extração de substâncias não voláteis (Mendes, 2019).

Estudos feitos acerca do efeito das técnicas extrativas no rendimento e actividade antioxidante revelam que a solução hidroalcoólica a 70% possui melhor rendimento com excepção do sohxlet. Isto demonstra que a solução hidroalcoólica é selectiva para a extração de metabolitos secundários e o maior rendimento deve-se às propriedades anfífilas e extrai substâncias de ambas polaridades e apresenta menos riscos para a amostra e para o ambiente (Mera *et al.*, 2019).

No que concerne ao solvente universal as comunidades usam-no para obter o extracto, mas, quimicamente não é recomendado devido à temperatura elevada utilizada para a sua evaporação. Este facto coloca o etanol em vantagem quanto à temperatura de evaporação, pois é fácil de manipular e relativamente barato se comparado a outros solventes polares.

Os extractos podem ser conservados numa geleira por muito tempo enquanto o aquoso é de uso imediato. A maceração conserva as propriedades das substâncias activas, por não envolver

temperaturas elevadas, por outro lado, em termos de execução, é um processo simples e não envolve custos.

Tendo em conta o objectivo da extracção, o etanol revela-se mais indicado para a pesquisa por ser um solvente capaz de extrair facilmente compostos aromáticos ou orgânicos saturados. Esta propriedade deve-se ao grupo OH que o aumenta a capacidade de extração em relação à água, no entanto, o solvente universal torna-se pertinente neste estudo por ser o mais usado pelas comunidades (Carvalho *et al.*, 2018).

## **5.2 Avaliação da actividade antibacteriana dos extractos brutos das folha e sementes (Ensaio I)**

Este ensaio revelou a sensibilidade das bactérias *P. aeruginosa* ao extracto hidroalcoólico de folhas e sensibilidade da *E. coli* multirresistente a extractos hidroalcoólicos de sementes e aquoso de folhas, de acordo com a Tabela 3.

Os extractos SA, FA e FH demonstraram efeito antibacteriano sobre a *P. aeruginosa* e *E. coli* multirresistente, ambas Gram-negativa apresentam uma parede celular quimicamente mais complexa que as Gram-positiva e tem um maior teor de lípidos e proteínas que impedem a acção dos antimicrobianos que resultam na resistência destes aos antibióticos.

Resultados surpreendente é referente a *E. coli* multirresistente, visto que a *E. coli* sensível não foi inibido. Contrariamente ao observado no estudo de Sundarakumar & Karmegam (2018) sobre a sensibilidade dos extractos da folha de *S. alatum*, a *E. coli* apresentou inibição maior seguida por *P. cepacia*, *S. epidermidis* usando o controlo positivo a ciprofloxacina e técnica de difusão em disco.

O estudo de sobre o *S. indicum* revelou que esta ocorre nas plantações desta leguminosa, a *S. alatum* como uma erva daninha, o que demonstra que, de certo modo, há uma similaridade nas necessidades metabólicas destas espécies.

Na região sul de Moçambique esta leguminosa não encontra condições apropriadas para o seu bom desenvolvimento, sendo assim, pode-se acreditar que a diferença de resultado está relacionada à diferença dos metabolitos.

Apesar de não estar relacionada a este estudo, importa referir que a actividade antibacteriana pode variar de acordo com a estação do ano da colecta da amostra vegetal, sendo que, realizando um estudo sob a mesma concentração e extractos de estações diferentes, os resultados e o extracto colhido no verão apresentou maior actividade que do inverno, em menor concentração (Mendes, 2019).

Por outro lado, esta diferença de resultados pode ser explicada pelas condições que a planta possui como o clima e solo, que influenciam muito nos metabolitos secundários que serão produzidos e, conseqüentemente, na actividade do composto activo.

Estudos recentes revelam que há cada vez mais espécies resistentes à demanda de antibióticos produzidos, o que leva a acreditar numa terceira linha de drogas que seriam as plantas que conservam uma grande diversidade de princípios activos resultantes do metabolismo secundário (Dias *et al.*, 2013).

Os microrganismos que oportunam as feridas são as bactérias Gram negativas incluindo as *P. aeruginosa*, *Klebsiella* e, *E. coli* Gram positivas como a *S. aureus* e *Candida albicans* por um lado, por outro, ao elevado número de microrganismos resistentes a antibióticos. O tratamento baseado na combinação de antibióticos e plantas é vista como uma das saídas e outros estudos levaram à seleção dos isolados para este estudo (Lídia *et al.*, 2010).

Os extractos brutos SA, FA e FH devido à actividade antibacteriana revelada acima, foram submetidos, separadamente, à partição líquido-líquido, usando como solventes o n-Hexano, DCM, etilacetato.

Cada extracto bruto resultou na obtenção de quatro fracções por cada. Além das fracções dos solventes acima mencionadas, todos eles tinham também a fracção aquosa, que, para este trabalho, foi designada Resíduo.

### 5.3 Separação líquido-líquido

O fraccionamento dos extractos brutos resultou em 4 fracções de cada amostras (Hex, DCM, EA e Resíduo). As fracções preparadas derivaram dos seguintes extractos brutos: SA, FA e FH, que mostraram actividade antibacteriana contra *E. coli* resistente (SA e FH) e *P. aeruginosa* (FA), de acordo com a Tabela 3.

As fracções orgânicas foram concentradas num Rotavapor, enquanto a fase aquosa não, devido a não fácil evaporação da água, pois requeria o uso de um liofilizador ou Freeze-dryer, que consiste, primeiro, em solidificar a amostra e depois submeter a sublimação, ou seja, evaporação da água sem passar do estado líquido.

A separação líquido-líquido revela-se viável quando se trata de sistemas de solventes apropriados e com nível de toxicidade baixa. Esta escolha deve permitir a recuperação do solvente sem envolver temperaturas elevadas que podem destruir os princípios activos.

Alguns estudos apontam solventes como o etanol e a água, por apresentam o inconveniente de recuperação da água e pouco tempo de conservação. A temperatura de ebulição da água e do álcool estão relativamente muito acima da temperatura-ambiente.

Esta e outras propriedades dos solventes são importantes para se escolher e extrair o compostos de um extracto. Um exemplo disto, observou-se uma particularidade na posição do solvente extractor, na utilização do acetato de etilo, este forma-se em cima pois é menos denso que a água.

### 5.4 Avaliação da actividade antibacteriana das fracções de *S. alatum* – (Ensaio II)

De acordo com a Tabela 4, a fracção de etilacetato (SA) mostrou actividade antibacteriana contra a bactéria *E. coli* resistente, enquanto as outras foram inactivas. Surpreendentemente, esta fracção não foi activa contra a bactéria *E. coli* sensível. Este facto pode-se dever às diferenças existentes nas paredes celulares das bactérias pois esta fracção pode conter metabolitos secundários capazes de inibir o crescimento das bactérias *E. coli* resistente.

De acordo com os dados apresentados nas Tabelas 3 e 4, pode-se concluir que os compostos que apresentaram actividade do extracto bruto SA contra a bactéria *E. coli* resistente estão presentes na fracção de etilacetato deste extracto.

Ainda na Tabela 4, das fracções preparadas a partir do extracto bruto alcoólico das folhas (FA), apenas a fracção DCM mostrou actividade antibacteriana contra as bactérias *S. aureus* e *E. coli* sensível. A actividade revelada por esta fracção contra estas bactérias é surpreendente. O extracto bruto foi activo apenas contra a bactéria *P. aeruginosa* (Tabela 3), entretanto nenhuma das suas fracções revelou actividade contra esta bactéria.

Por outro lado, o extracto bruto FA foi inactivo contra as bactérias *S. aureus* e *E. coli* sensível (Tabela 3). Entretanto, a fracção de DCM demonstrou actividade contra estas duas bactérias. Portanto recomenda-se um estudo mais aprofundado sobre estes resultados.

A Tabela 5, ilustra os resultados da avaliação da actividade antibacteriana das fracções preparadas a partir do extracto aquoso (FH). De acordo com a tabela, apenas a fracção de DCM revelou a actividade antibacteriana contra as bactérias *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

Os outros extractos foram inactivos. Do mesmo modo recomenda-se uma avaliação mais aprofundada destes extractos pois o extracto FH foi activo apenas contra *E. coli* resistente e nenhuma das suas fracções apresentou actividade contra esta bactéria.

Entretanto, algumas literaturas defendem que um resultado negativo com um extracto bruto não exclui a possibilidade de um resultado positivo com fracções resultantes de diferentes fraccionamento deste, uma vez que algumas fracções estarão mais enriquecidas em substâncias activas (Dias *et al.*, 2013).

## **5.5 Cromatografia em Camada Fina (TLC)**

A fase móvel foi variada em diferentes proporções de n-Hexano/ Diclorometano e n-Hexano/Acetona e visualizadas em lâmpada UV para a análise das fracções de DCM das folhas

(FA e FH). As proporções foram variadas (Tabela 6) de modo a se obter o melhor sistema de solventes para melhor separação entre os componentes presentes nestas fracções.

A Tabela 6 demonstra que o sistema Hexano: Acetona (7.5:2.5) é o melhor para separar componentes de acordo com os resultados das TLC das duas amostras na Figura 8.

Ambas as fracções de DCM analisadas foram demonstraram uma maior actividade antibacteriana. A revelação com iodo revelou a presença de 7 manchas em cada uma das placas. De acordo com a Figura 8, estas manchas não tem os mesmos valores de R.F. usando o mesmo sistema de solventes.

Portanto, significa que ambas as fracções não possuem os mesmos compostos, daí que houve a necessidade de se recorrer à Cromatografia em Camada Fina Preparativa (P-TLC) de modo a separar os compostos individuais (Figura 9) e realizar os testes fitoquímicos preliminares para identificar a classe de compostos a que pertencem (Tabela 7).

### **5.6 Avaliação fitoquímica preliminar**

A avaliação fitoquímica preliminar (Tabela 7) feita com base em ensaios padrão em ambas as fracções de DCM derivadas dos extractos das folhas, demonstrou a presença dos seguintes metabolitos secundários: fenóis, alcaloides, flavonoides e glicosídeo. Na P-TLC foram extraídos compostos que depois de identificada a classe em que pertencem foram submetidas a uma avaliação da sua actividade antibacteriana (Ensaio III).

### **5.7 Avaliação da actividade antibacteriana da fracção mais activa (Ensaio III)**

Os compostos da fracção hidro-alcoólicas de folhas foram testados nos mesmos isolados e nas mesmas condições. Os compostos não inibiram o desenvolvimento dos isolados em estudo. O extracto bruto encontra-se na terceira fase de separação de compostos, o resultados do teste da

actividade anti-bacteriana das fracções revela o contrário das fases anteriores, o que leva a acreditar, por um lado, que as fracções têm acção quando em conjunto ou sinergia entre estes.

Por outro lado, o método de difusão em Muller Hilton é usado para investigar actividade antimicrobiana de substâncias naturais e extractos de plantas, porém, apresenta um inconveniente quando os extractos forem de baixa actividade antimicrobiana, pois será necessário aumentar o volume e a concentração.

Esta posição corrobora o estudo de Mendes (2019) que acredita que a presença de compostos não é necessariamente excluída pelos resultados negativos, já que a metodologia aplicada pode ser diferente e, portanto, incapaz de detectar, com sucesso, essas substâncias, aliado à possibilidade de a quantidade desse composto no extracto tenha sido muito baixa.

Um ensaio realizado sob quase todas as condições, variando o volume, neste caso aumentando para 50µL, o composto 5 inibe o desenvolvimento da *E. coli* sensível e multirresistente o que nos leva a prever a possibilidade de os resultados diferentes dos actuais.

## 6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

A pesquisa comprovou experimentalmente o motivo do uso da *S. alatum* como planta medicinal pela comunidade no tratamento de feridas. Os extractos brutos das folhas e sementes mostraram actividade antibacteriana apreciável. Contudo, a medida que se ia fazendo o fraccionamento, esta actividade mudava de uma bactéria para outra e foi-se perdendo à medida que a complexidade das fracções subsequentes tornou-se mais simples. Estes resultados podem dever-se ao facto de não ser apenas um composto ou uma classe de compostos que podem actuar de forma sinérgica.

Daí, recomenda-se que estudos sejam realizados para:

1. Avaliar fitoquimicamente a fracção aquosa de etilacetato das sementes da planta estudada, de modo a identificar os metabolitos secundários responsáveis pela actividade antibacteriana contra a bactéria *E. coli* resistente e não *E. coli* sensível, e a razão da desta diferença;
2. Avaliar o efeito por detrás do extracto hidro-alcoólico bruto das folhas apresentar actividade antibacteriana apenas contra a bactéria *P. aeruginosa* e que as suas fracções inibiram o crescimento das bactérias *S. aureus* e *E. coli* sensível.
3. Realizar estudos fitoquímicos das fracções de DCM das folhas de modo a identificar os metabolitos presentes, pois foram as mais activas.
4. Repetir os ensaios feitos com todos os extracto usando técnicas colorimétricas para a avaliação da actividade anti-bacteriana.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alege, G. O., Akinyele, B. O., Ayodele, S. M., & Ogbode, A. V. (2011). Taxonomic importance of the vegetative and pod characteristics in three Nigerian species of sesame. *Africa Journal of Plant Science*, 5(March), 213–217.
- Antoniassi, R., Arriel, N. H. C., Gonçalves, E. B., Freitas, S. C. de, Zanotto, D. L., & Bizzo, H. R. (2013). Influência das condições de cultivo na composição da semente e do óleo de gergelim. *Revista Ceres*, 60(3), 301–310. <https://doi.org/10.1590/s0034-737x2013000300001>
- Bandeira, S. O., Gaspar, F., & Pagula, F. P. (2001). Ethnobotany and Healthcare in Mozambique. *Pharmaceutical Biology*, 39(1), 70–73.
- Barbieri, J. T., & Sun, J. (2004). Pseudomonas aeruginosa ExoS and ExoT. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 152(August), 79–92. <https://doi.org/10.1007/s10254-004-0031-7>
- Bouzier, A., Rojas, J., Ibinga, S. K. K., Lamarti, A., Martin, P., & Morillo, M. (2023). The Impact of Saponins on Health-Review. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 13(4), 5–7. <https://doi.org/10.33263/BRIAC134.362>
- Bruschi, P., Mancini, M., Mattioli, E., Morganti, M., & Signorini, M. A. (2014). Traditional uses of plants in a rural community of Mozambique and possible links with Miombo degradation and harvesting sustainability. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 10(1), 1–22. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84904524917&partnerID=40&md5=a87a0803e13e970dba9f29f8c75170e6>
- Bruschi, Piero, Morganti, M., Mancini, M., & Signorini, M. A. (2011). Traditional healers and laypeople: A qualitative and quantitative approach to local knowledge on medicinal plants in Muda (Mozambique). *Journal of Ethnopharmacology*, 138(2), 543–563. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.09.055>
- Cambaza, E. (2023). Biology, ecology, and uses of the medicinal plant Sesamum alatum. *Academia Biology*, 1, 1–7. <https://doi.org/10.20935/acadbiol6027>
- Carvalho, M. T., Bermamasco, R., & Gomes, R. G. (2018). Métodos de extração de compostos bioativos: aproveitamento de subprodutos na agroindústria. *Revista UNINGÁ Review*, 33(1), 66–84.

- Conde, P., Figueira, R., Saraiva, S., Catarino, L., Romeiras, M., & Duarte, M. C. (2014). A Missão Botânica de Moçambique (1942-1948): Contribuições para o conhecimento da flora medicinal de Moçambique. *Historia, Ciencias, Saude - Manguinhos*, 21(2), 539–585. <https://doi.org/10.1590/S0104-59702014000200007>
- Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2005). Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. *Pure and Applied Chemistry*, 77(1), 7–24. <https://doi.org/10.1351/pac200577010007>
- de Oliveira Souza, C., Roberta Barros Melo, T., do Socorro Barros Melo, C., Moreira Menezes, Ê., Correa de Carvalho, A., & Célia Reis Monteiro, L. (2016). Escherichia coli enteropatogênica: uma categoria diarreio gênica versátil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 2(7), 1–2. <https://doi.org/10.5123/s2176-62232016000200010>
- Dias, D. C., De, S., Bhattacharya, S., & Dias, M. (2013). Antibacterial activity and phytochemical analysis of Cardanthera difformis druce leaf extracts from West Bengal, India. *International Journal of Phytomedicine*, 5, 479–485.
- Dos Santos, A. L., Santos, D. O., De Freitas, C. C., Ferreira, B. L. A., Afonso, I. F., Rodrigues, C. R., & Castro, H. C. (2007). Staphylococcus aureus: Visiting a strain of clinical importance. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 43(6), 413–423. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442007000600005>
- Dos Santos, R. N., Silva, M. G. D. V., & Braz Filho, R. (2008). Constituintes químicos do caule de Senna reticulata Willd. (Leguminosae). *Quimica Nova*, 31(8), 1979–1981. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000800011>
- Hata, N., Hayashi, Y., Okazawa, A., Ono, E., Satake, H., & Kobayashi, A. (2010). Comparison of sesamin contents and CYP81Q1 gene expressions in aboveground vegetative organs between two Japanese sesame (Sesamum indicum L.) varieties differing in seed sesamin contents. *Plant Science*, 178(6), 510–516. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.02.020>
- Ibáñez, E., Mendiola, J. A., & Castro-Puyana, M. (2015). Supercritical Fluid Extraction. *Encyclopedia of Food and Health*, 8(2), 227–233. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00675-9>
- Jorgensen, J. H., & Ferraro, M. J. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: A review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*, 49(11), 1749–1755. <https://doi.org/10.1086/647952>
- Lidia, R., Maria, M., Natália, G., Caroline L, C.-S., Adriano, J., & Rosamary, A. G. (2010).

- Cuidados locais com as feridas das queimaduras. *Revista Brasileira de Queimaduras*, 9(2), 54–59.
- Lu, J. J., Bao, J. L., Chen, X. P., Huang, M., & Wang, Y. T. (2012). Alkaloids isolated from natural herbs as the anticancer agents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/485042>
- Mendes, F. L. R. (2019). *Avaliação da actividade antibacteriana de extratos de Eugenia brasiliensis*. Instituto de Tecnologia em Farmacos de Manguinhos, Rio de Janeiro.
- Mera, I. F. G., Falconí, D. E. G., & Córdova, V. M. (2019). Secondary metabolites in plants: Main classes, phytochemical analysis and pharmacological activities. *Bionatura*, 4(4), 1000–1009. <https://doi.org/10.21931/RB/2019.04.04.11>
- Monjane, J. A., Capusiri, D., Giménez, A., & Sterner, O. (n.d.). *Onopordopicrin with leishmanial activity from the leaves of Brachylaena discolor*. 2, 1–9.
- Monjane, J. A., Capusiri, D., Giménez, A., & Sterner, O. (2018). Leishmanicidal activity of onopordopicrin isolated from the leaves of *Brachylaena discolor*. *Tropical Journal of Natural Products Research*, 2(7), 328–331. <https://doi.org/10.26538/tjnpr/v2i7.5>
- Monjane, J., Dimande, P., Zimba, A., Nhachengo, E., Teles, E., Ndimba, H., & Uamusse, A. (2020). *Tropical Journal of Natural Product Research Antifungal Activity of Biopesticides and their Effects on the Growth Parameters and Yield of Maize and Pigeon Pea*. 4(September), 512–515.
- Monteiro, J. M., Albuquerque, U. P. de, Araújo, E. de L., & Amorim, E. L. C. de. (2005). Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova*, 28(5), 892–896. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422005000500029>
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016). Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 79(3), 629–661. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>
- Newman, D. J., Cragg, G. M., Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2007). *Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years* . 70(February), 461–477. <https://doi.org/10.1021/np068054v>
- Nzikou, J. M., Matos, L., Bouanga-Kalou, G., Ndangui, C. B., Pambou-Tobi, N. P. G., Kimbonguila, A., ... Desobry, S. (2009). Chemical composition on the seeds and oil of Sesame (*Sesamum indicum* L.) grown in Congo-Brazzaville. *Advance Journal of Food*

- Science and Technology*, 1(1), 6–11.
- Oliveira, V. B., Zucheto, M., Oliveira, C. F., Paula, C. S., Duarte, A. F. S., Miguel, M. D., & Miguel, O. G. (2016). Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento , atividade antioxidante , doseamentos totais e no perfil por clae-dad de dicksonia sellowiana ( presl .). Hook , dicksoniaceae. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 18(1), 230–239.
- Ostrosky, E. A., Mizumoto, M. K., Lima, M. E. L., Kaneko, T. M., Nishikawa, S. O., & Freitas, B. R. (2008). Métodos para avaliação da actividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(2), 301–307. <https://doi.org/10.1590/s0102-695x2008000200026>
- Pagula, F. P., & Baeckström, P. (2006). Studies on Essential Oil-Bearing Plants from Mozambique: Part II. Volatile Leaf Oil of Needles of *Pinus elliottii* Engelm. and *Pinus taeda* L. *Journal of Essential Oil Research*, 18(1), 32–34. <https://doi.org/10.1080/10412905.2006.9699378>
- Pagula, F. P., Baser, K. H. C., & Kürkçüoğlu, M. (2000). Essential Oil Composition of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. from Mozambique. *Journal of Essential Oil Research*, 12(3), 333–335. <https://doi.org/10.1080/10412905.2000.9699530>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5(e27), 1–15. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Piriz, M., Lima, C., Jardim, V., Mesquita, M., Souza, A., & Heck, R. (2018). Plantas Medicinais No Processo De Cicatrização De Feridas: Uma Revisão De Literatura. *Revista Expressão Católica Saúde*, 3(2), 64. <https://doi.org/10.25191/recs.v3i2.2429>
- Ramalhete, Catia, Lopes, D., Mulhovo, S., Rosario, E. V., & Jose, F. U. M. (2008). *Antimalarial Activity of Some Plants Traditionally Used in Mozambique*. (June 2016), 1–9.
- Ramalhete, Cátia, Mansoor, T. A., Mulhovo, S., Molnár, J., & Ferreira, M. J. U. (2009). Cucurbitane-type triterpenoids from the African plant *Momordica balsamina*. *Journal of Natural Products*, 72(11), 2009–2013. <https://doi.org/10.1021/np900457u>
- Ramalhete, Cátia, Mulhovo, S., Molnar, J., & Ferreira, M.-J. U. (2016). Triterpenoids from *Momordica balsamina*: Reversal of ABCB1-mediated multidrug resistance. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24(21), 5061–5067. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.08.022>
- Rocha, L. P. B. da, Alves, J. V. de O., Aguiar, I. F. da S., Silva, F. H. da, Silva, R. L. da, Arruda, L. G. de, ... Silva, M. V. da. (2021). Uso de plantas medicinais: Histórico e relevância.

*Research, Society and Development*, 10(10), e44101018282. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i10.18282>

- Saraiva, S., Romeiras, M., & Duarte, M. C. (2014). *Patrícia Conde*. 653–673.
- Sundarakumar, M., & Karmegam, N. (2018). Antibacterial Activity of Ethanol Extracts of *Sesamum alatum* Thonn. Leaves. *International Journal of Current Research in Biosciences and Plant Biology*, 5(3), 38–41.
- Tazima, M. D. F. G. S., De Andrade Vicente, Y. A. M. V., & Moriya, T. (2008). Biologia da ferida e cicatrização. *Medicina*, 41(3), 255–260. <https://doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v41i3p259-264>
- Tomazzoni, M. I., Negrelle, R. R. B., & Centa, M. de L. (2006). Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêuta. *Texto & Contexto - Enfermagem*, 15(1), 115–121. <https://doi.org/10.1590/s0104-07072006000100014>
- V. Umamaheswara Rao, N. Nanadini, P. Nagababu, N. V. (2014). Antimicrobial activity of Amazonian plants extracts. *International Journal of Phytomedicine*, 5(November), 479–485.
- Wang, L., Zhang, Y., Li, P., Zhang, W., Wang, X., Qi, X., & Zhang, X. (2013). Variation of sesamin and sesamol contents in sesame cultivars from China. *Pakistan Journal of Botany*, 45(1), 177–182.
- Zhang, Q. W., Lin, L. G., & Ye, W. C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine (United Kingdom)*, 13(1), 1–26. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>

# **ANEXOS**

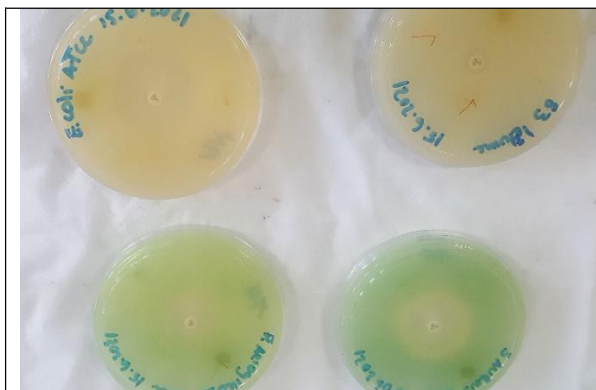


Imagem A - Ensaio biológico dos extractos brutos alcoólicos e aquosos de folhas e sementes de *S. alatum*

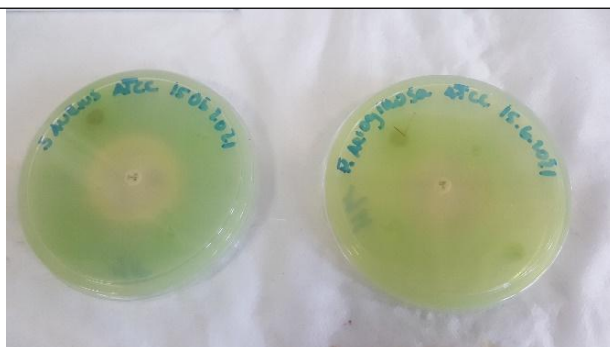


Imagem B - Ensaio biológico em *S. aureus* e *P. aeruginosa*

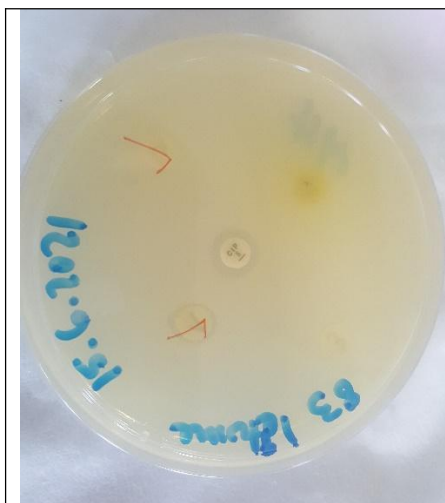


Imagem C - Ensaio biológico em *E. coli* multirresistente de extracto bruto alcoólico de sementes e aquosa de folhas.



Imagem D - Ensaio biológico de em *P. aeruginosa* de extracto bruto alcoólico de folhas



Imagem E - Separação líquido - líquido do extracto bruto alcoólico das sementes

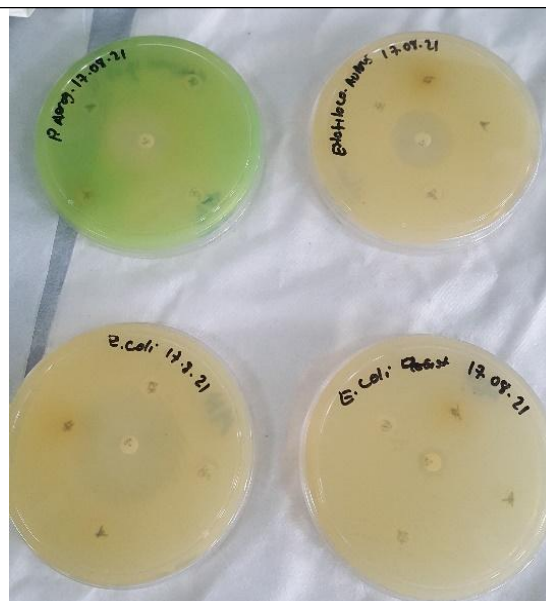


Imagem F - Ensaio biológico das fracções do extracto aquoso de folhas

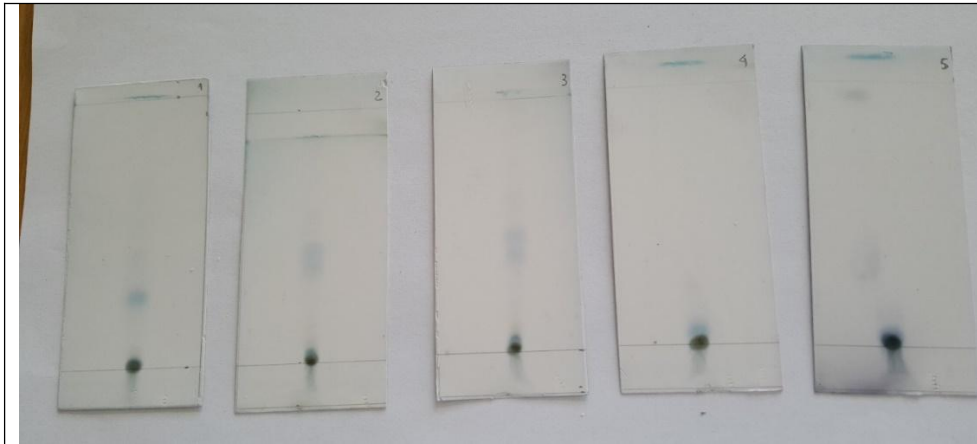


Imagem G -

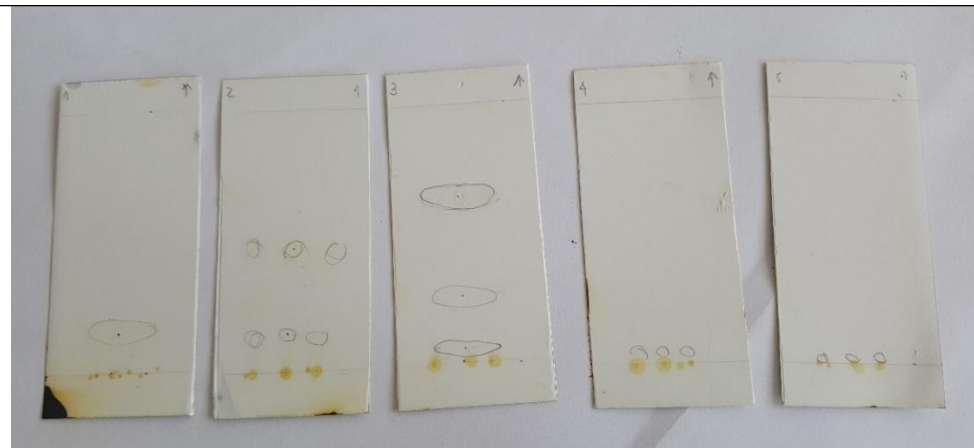


Imagem H -

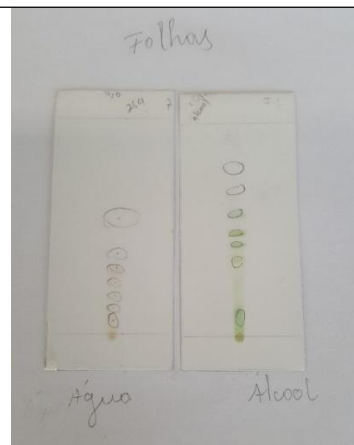


Imagem I -

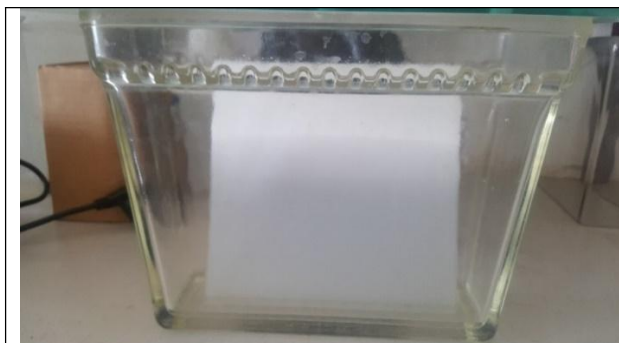


Imagem J - Cromatografia de camada fina

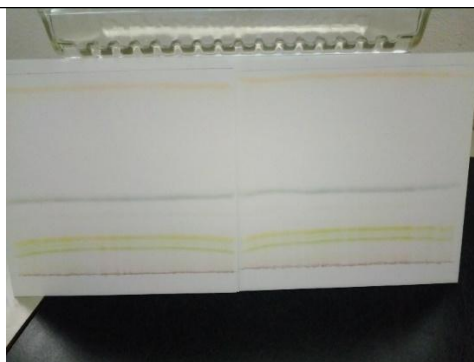


Imagem K - Placa de TLC preparativa da fracção aquosa de DCM de folhas

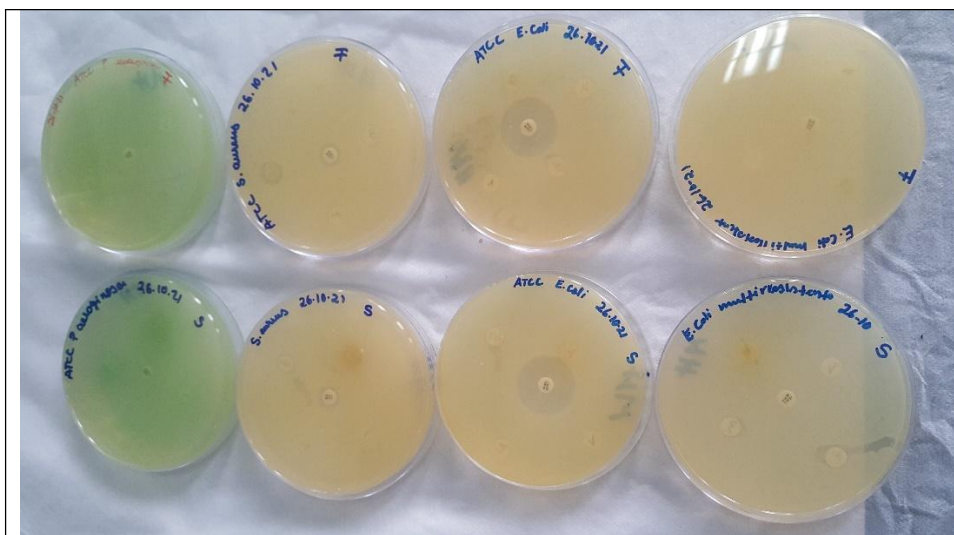


Imagem L - Ensaio biológicos dos compostos da fracção de DCM