

UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE



**FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM QUÍMICA E PROCESSAMENTO DE
RECURSOS LOCAIS

**DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE E
ANTIBACTERIANA DOS EXTRACTOS DE *BRIDELIA
CATHARTICA* BERTOL**

AUTOR: PAULO JOSÉ CUMBANE

MAPUTO, NOVEMBRO DE 2016

UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE



**FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM QUÍMICA E PROCESSAMENTO DE
RECURSOS LOCAIS

**DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE E
ANTIBACTERIANA DOS EXTRACTOS DE *BRIDELIA
CATHARTICA* BERTOL**

AUTOR: PAULO JOSÉ CUMBANE

SUPERVISOR: PROF. DR. FRANÇOIS MUNYEMANA

MAPUTO, NOVEMBRO DE 2016

DECLARAÇÃO DE HONRA

Declaro que esta dissertação nunca foi apresentada para a obtenção de qualquer grau ou num outro âmbito e que ele constitui o resultado do meu labor individual. Esta dissertação é apresentada em cumprimento parcial dos requisitos para a obtenção do grau de Mestrado em Química e Processamento de Recursos Locais da Faculdade de Ciências da Universidade Eduardo Mondlane

Maputo, Outubro de 2016

Paulo José Cumbane

AGRADECIMENTOS

A

Direcção Científica da Universidade Eduardo Mondlane, pela bolsa e confiança depositada
Instituto Superior de Ciências e Tecnologias de Moçambique, pela disponibilização de laboratórios
para a execução do trabalho experimental

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
ABSTRACT	x
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS, SIGLAS E ACRÓNIMOS.....	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. ASPECTOS ETNOFARMACOLOGICOS E FITOQUÍMICOS DO GÉNERO <i>BRIDELIA</i>	4
2.2. OS COMPOSTOS FENÓLICOS	11
2.2.1. PROPRIEDADES FUNCIONAIS DOS FENÓIS SIMPLES.....	13
2.2.2. PROPRIEDADES FUNCIONAIS DOS FLAVONÓIDES.....	14
2.2.3. PROPRIEDADES FUNCIONAIS DOS TANINOS.....	22
2.3. ESPÉCIES REACTIVAS DE OXIGÉNIO	25
2.3.1. FORMAÇÃO E MECANISMO DE ACÇÃO DE RADICAIS LIVRES	25
2.5.2. ALVOS BIOLÓGICOS DAS ESPÉCIES REACTIVAS DE OXIGÉNIO	28
2.5.3. PROTECÇÃO ANTIOXIDANTE.....	29
3. OBJECTIVOS.....	35
3.1. OBJECTIVO GERAL.....	35
3.2. OBJECTIVOS ESPECÍFICOS	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1. COLECTA E PREPARAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO	36
4.2. SOLVENTES E REAGENTES QUÍMICOS.....	36
4.3. PREPARAÇÃO DOS EXTRACTOS	37
4.3.1. EXTRACÇÃO HIDROETANÓLICA	37
4.3.2. EXTRACÇÃO SOLVENTE-SOLVENTE.....	37
4.4. FITOQUÍMICA QUANTITATIVA	39

4.4.1.	DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS	39
4.4.2.	DETERMINAÇÃO DE FLAVONÓIDES TOTAIS.....	40
4.4.3.	DETERMINAÇÃO DE TANINOS TOTAIS	41
4.4.3.1.	DETERMINAÇÃO DE TANINOS CONDENSADOS	41
4.4.3.2.	DETERMINAÇÃO DE TANINOS HIDROLISÁVEIS.....	41
4.5.	DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	42
4.5.1.	REDUÇÃO DO IÃO FÉRRICO (método de cianeto férrico)	42
4.5.2.	REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNICO.....	43
4.5.3.	REDUÇÃO DO RADICAL LIVRE DPPH	44
4.6.	AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA	45
5.	RESULTADOS.....	46
5.2.	ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE	49
5.3.	ACTIVIDADE ANTIBACTERIANA	50
6.	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	51
6.1.	CONTEÚDO FENÓLICO	53
6.2.	ACTIVIDADE FARMACOLÓGICA <i>IN VITRO</i>	56
6.2.1.	ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE	57
6.2.2.	ACTIVIDADE ANTIBACTERIANA	62
7.	CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	65
7.1.	CONCLUSÕES.....	65
7.2.	RECOMENDAÇÕES.....	66
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
9.	ANEXOS	94

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Usos tradicionais e indicações de algumas plantas do género <i>Bridelia</i>	7
Tabela II. Actividade antibacteriana de extractos de raiz de <i>B. Cathartica</i>	10
Tabela III. Fitoquímica de extractos da raiz de <i>Bridelia cathartica</i> Bertol.	10
Tabela IV. Actividade Antitumoral de Flavonóides em Várias Linhagens Celulares	20
Tabela V. Mecanismo de Acção Antiviral de Alguns Taninos	24
Tabela VI. Mecanismo de Acção Antimicrobiano de Alguns Taninos.....	24
Tabela VII. Fitoquímica dos extractos de folhas e caules <i>B. Cathartica</i> Bertol.	47
Tabela VIII. Actividade Antioxidante de <i>Bridelia cathartica</i> Bertol.	49
Tabela IX. CIM dos Extractos de Caules e Folhas de <i>B. Cathartica</i>	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspectos botânicos de <i>Bridelia cathartica</i> Bertol	6
Figura 2. Flavonóides isolados das espécies <i>Bridelia crenulata</i> e <i>Bridelia ferruginea</i>	6
Figura 3. Ligninas e neoligninas isoladas de <i>B. ferruginea</i> , <i>B. balansae</i> e <i>B. glauca</i>	8
Figura 4. Alguns intermediários envolvidos na biossíntese de compostos fenólicos.	12
Figura 5. Redução de radicais livres por flavonóides	17
Figura 6. Complexação de flavonóides com iões metálicos.....	17
Figura 7. Descrição das reacções conducentes à formação de EROs.....	28
Figura 8. Principais defesas antioxidantes endógenas da célula	30
Figura 9. Antioxidantes naturais separados em classes.....	32
Figura 10. Fluxograma de processos extractivos	38
Figura 11. Curva de calibração do ácido gálico (a) e de rutina (b)	48
Figura 12. Curva de calibração do ácido tânico	48
Figura 13. Curvas dose-resposta do ensaio com DPPH	50
Figura 14. Química envolvida na determinação de poder redutor dos antioxidantes	57
Figura 15. Equação da reacção do DPPH• com substância antioxidante HR	60

RESUMO

A espécie *Bridelia cathartica* Bertol (Euphorbiaceae) é utilizada na medicina popular moçambicana para o tratamento de diversas doenças, incluindo doenças infecciosas e inflamatórias, mas as investigações científicas visando determinar seu potencial terapêutico são escassas.

No presente estudo, os fenólicos totais, actividade antioxidante e antimicrobiana dos extractos brutos hidroetanólicos e das respectivas fracções acetato de etilo das folhas e caules de *Bridelia cathartica* foram determinados usando métodos padrão.

Os fenólicos encontrados não apresentaram variações significativas nas diferentes amostras analisadas ($p < 0,05$) e apresentaram valores máximos de $435,090 \pm 15,507$ e $436,970 \pm 15,310$ miligramas equivalente de ácido gálico (mgGAE) por grama do extrato seco para as amostras de caule e folhas, respectivamente. A maior actividade antioxidante foi exibida pela amostra de folhas no método de sequestro do radical livre DPPH ($EC_{50} = 3,63 \pm 0,12 \mu\text{g} / \text{mL}$) e de redução do complexo de fosfomolibdênico ($57,88 \pm 0,57\%$). A maior parte das amostras exibiram uma notável actividade antibacteriana com predominância de valores de concentração inibitória mínima (CIM) entre 250 - 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

Os resultados encontrados neste estudo revelam níveis elevados de compostos fenólicos, bem como um potente efeito antioxidante e considerável actividade antibacteriana, o que pode justificar o uso desta planta na medicina tradicional para o tratamento de várias doenças infecciosas e inflamatórias.

Palavras-chave: Fenóis totais; antibacteriana; DPPH; *Bridelia cathartica*; extractos; antioxidante.

ABSTRACT

The *Bridelia cathartica* Bertol (Euphorbiaceae) species is used in Mozambican folk medicine for the treatment of various ailments including infectious and inflammatory diseases, but scientific investigations aiming to determine its therapeutic potential are scarce.

In the present study, the total phenolics, antioxidant and antibacterial activities of the crude hydroethanolic extracts and ethyl acetate fractions of the leaves and stem of *B. cathartica* were determined using standard procedures.

The phenolics found did not show significant variations in the different analyzed samples ($p < 0,05$) and showed maximum values of 435.090 ± 15.507 and 436.970 ± 15.310 milligrams of gallic acid equivalents (mgGAE) per gram of the dry extract for the samples of stem and leaves respectively. The highest antioxidant activity was exhibited by the leaves sample in the DPPH method ($EC_{50} = 3.63 \pm 0.12 \mu\text{g/mL}$) and phosphomolybdenum complex method ($57.88 \pm 0.57\%$). Most of the extracts and fractions from leaves and stem exhibited remarkable antibacterial activity with predominance of minimum inhibitory concentration (MIC) values between 250 - 500 $\mu\text{g/mL}$.

The results found in this study reveal high levels of phenolic compounds as well as a potent antioxidant effect and considerable antibacterial activity, which may justify the use of this plant in traditional medicine for the treatment of various infectious and inflammatory diseases.

Key words: Total phenolics, antibacterial, DPPH, *Bridelia cathartica*, extracts; antioxidant.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS, SIGLAS E ACRÓNIMOS

AAT	Actividade Antioxidante Total
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina de trifosfato
ButOH	1-Butanol
CAT	Catalase
CCF	Cromatografia em camada fina
CIM	Concentração inibitória mínima
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	<i>2,2-difenil-1-picrilhidrazil</i>
EBC	Extracto hidroetanólico de caule de <i>Bridelia cathartica</i>
EBF	Extracto hidroetanólico de folhas de <i>B. cathartica</i>
EC ₅₀	Concentração efectiva
ECG	(-) -Galato de epicatequina
EGC	(-) -Epigalocatequina
EGCG	(-) -Galato de epigalocatequina
ERNs	Espécies reactivas de azoto
EROs	Espécies reactivas de oxigénio
EtOH	Etanol

FAEC	Fracção acetato de etilo de extracto de caules de <i>Bridelia cathartica</i>
FAEF	Fracção acetato de etilo de extracto de folhas de <i>Bridelia cathartica</i>
LDL	Low Density Lipoproteins
MetOH	Metanol
OMS	Organização Mundial de Saúde
SOD	Superóxido dismutase
UV/vis	Ultravioleta visível

1. INTRODUÇÃO

A história do desenvolvimento das sociedades humanas esteve sempre intimamente ligada ao uso que os povos faziam dos recursos naturais ao seu dispor. Foi a partir desses recursos que diferentes povos, através da observação de animais e experimentação, através do método de tentativa e erro, seleccionaram plantas úteis para suas diversas necessidades (Cunha, 2005). Portanto, a busca por alívio e cura de doenças por ingestão de ervas e folhas pode ter sido um dos primeiros propósitos de uso de produtos naturais (Viegas *et al.*, 2006). Acredita-se no entanto que as plantas medicinais sejam uma importante fonte de novas substâncias químicas com potenciais efeitos terapêuticos (Vashvaei *et al.*, 2015). O que pode justificar as propriedades antimicrobianas e antioxidantes muitas vezes atribuídos às plantas.

Os extractos e óleos essenciais de muitas ervas demonstraram exercer actividade biológica *in vitro* e *in vivo*, o que incentiva o desenvolvimento de pesquisas sobre medicina tradicional focada na caracterização das suas propriedades antimicrobianas (Burt, 2004; Jafari *et al.*, 2014; Keykavousi *et al.*, 2016) e antioxidantes.

As plantas são ricas em uma grande variedade de metabólitos secundários tais como taninos, alcalóides e flavonóides, que foram encontrados *in vitro* como tendo propriedades antimicrobianas e antioxidantes (Bajpai *et al.*, 2005; Vashvaei *et al.*, 2015). Muitas dessas plantas são medicinais e contêm grandes quantidades de compostos fenólicos, que podem desempenhar um papel importante no sequestro e neutralização de radicais livres e espécies reactivas de oxigénio (EROs).

Muitos desses fitoconstituintes presentes nas plantas medicinais estão associados a baixas taxas de morbidade e redução de ocorrência de doenças causadas por produtos de metabolismo de oxigénio em seres humanos (radicais livres e EROs) (Anderson *et al.*, 2001; Djeridane *et al.*, 2006).

Os compostos fenólicos de origem natural são abundantemente distribuídos no reino vegetal e são sintetizados em resposta a condição stressante que a planta está sujeita ao longo do seu ciclo de vida e destinam-se a proteger a mesma contra a agressão por radiações ultravioletas e de ataque por microorganismos (Nitiema *et al.*, 2012). Os polifenóis exibem uma ampla gama

de propriedades fisiológicas tais como anti-inflamatórias, antimicrobianas e antioxidantes (Balasundram *et al.*, 2006; Abah, 2010; Nitiema *et al.*, 2012).

Preparações vegetais são usadas na medicina tradicional africana para tratar uma lista interminável de doenças, o que atraiu a atenção dos pesquisadores na busca contínua de informações detalhadas sobre a actividade de diferentes plantas usadas nestas preparações. Pode se citar alguns exemplos, espécies como a *Cleistocholamys kirkii* (Benth) Oliv. (Annonaceae), uma planta medicinal usada na medicina tradicional moçambicana para o tratamento de doenças infecciosas como a tuberculose e algumas afecções músculo-esqueléticas como reumatismo, na qual Pereira *et al.* (2016) determinaram as propriedades antibióticas dos extractos metanólico e *n*-hexano e da fracção acetato de etilo contra *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* e isolaram diferentes compostos de interesse farmacêutico.

A espécie *Bridelia ferruginea*, bastante usada na África Subsahariana. As cascas da raiz são usadas na medicina tradicional togolesa no tratamento de diabetes *mellitus* (Bakoma *et al.*, 2012). Estes autores determinaram a quantidade de fenólicos totais e as suas propriedades antioxidantes (modelo animal) e antiglicemiantes (modelo enzimático) dos extractos hidroetanólico e acetónico e da fracção acetato de etilo.

Os relatos de uso de romã (frutas de *Punica granatum*) são citados nos textos mais antigos incluindo os textos de Ayurveda, Papiro de Ebers e registos da medicina unani e egípcia. Ela é usada como vermífugo, adstringente, bactericida, refrigerante (suco), estimulante e alivia os efeitos adversos de asma, bronquite, tosse, disenteria, diarreia, dispepsia funcional, febre, inflamações, hematomas, feridas, problemas cardíacos, entre outros (Reddy *et al.*, 2007).

Reddy *et al.* (2007) isolaram taninos (punicalinas e punicalaginas) e ácidos fenólicos (ácido galágico e ácido elágico) da espécie *Punica granatum* L. e determinaram as propriedades antioxidantes, antimaláricas e antimicrobianas destes compostos e da fracção rica em taninos.

Algumas espécies medicinais utilizadas na medicina tradicional moçambicana demonstraram ser dotadas de diversas actividades biológicas, incluindo antioxidantes, antimicrobianas, antitumorais e anti-inflamatórias porém, a maioria delas não têm estudos aprofundados sobre tais propriedades. Por exemplo, as plantas do género *Bridelia* são utilizadas na medicina

tradicional africana e asiática, no tratamento de várias doenças como anemias, doenças infecciosas, diabetes, diarreia, parasitoses, inflamações, malária, hipoglicemia, dor abdominal, doenças cardiovasculares, sexuais, entre outras (Ngueyem *et al.*, 2009).

A *Bridelia cathartica* Bertol (Euphorbiaceae), uma espécie tradicionalmente conhecida como "*Munuangati* ou *Thlanthangati*" é utilizada na medicina popular moçambicana para o tratamento de várias doenças, mas as investigações científicas com o objectivo de determinar as suas potencialidades medicinais ainda são raras.

Estudos anteriores sobre a bioactividade de *B. cathartica* relataram sua actividade antimalárica (Jurg *et al.*, 1991; Ramalhetete *et al.*, 2008) e actividade antianémica demonstrada através de quantificação de níveis de ferro em diferentes partes da planta (Omolo *et al.*, 1997).

Estudos sobre as raízes de *B. Cathartica*, desenvolvidos recentemente por Madureira *et al.* (2012) levaram à presença de alguns metabólitos secundários de maior interesse farmacológico e da actividade antibacteriana dos extractos das raízes contra estirpes bacterianas gram-positivas e gram-negativas.

Nesta perspectiva, o presente estudo intitulado *Determinação da Actividade Antioxidante e Antibacteriana dos Extractos de Bridelia cathartica Bertol* irá se cingir na quantificação dos polifenólicos presentes nos extractos de caules e das folhas de *Bridelia cathartica*, seguido de testes da actividade antioxidante e antibacteriana *in vitro*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ASPECTOS ETNOFARMACOLOGICOS E FITOQUÍMICOS DO GÊNERO *BRIDELIA*

Estudos etnobotânicos, fitoquímicos, etnofarmacológicos e toxicológicos para apoiar o conhecimento indígena têm sido relatados por diversos autores em diversas regiões do globo terrestre. Esse conhecimento tem sido alvo de validação e em alguns países como Moçambique, já é parte integrante dos sistemas de saúde para cuidados de saúde primário, onde diversas espécies medicinais podem ser vistas em ervanárias e mercados informais.

O género *Bridelia* é um conjunto de espécies vegetais pertencentes à família Phyllanthaceae e inclui aproximadamente cerca de 60 a 70 membros provenientes de África e Ásia. Cerca de 50 espécies estão distribuídas na África Tropical, Madagáscar, Iémen e na Ásia, desde Índia a sul da China, em toda Indochina, Malásia a norte de Austrália e nas Ilhas Salomão e Vanuatu (Ngueyema *et al.*, 2009). Aspectos botânicos de *Bridelia cathartica* Bertol podem ser observados na figura 1, enquanto, as indicações tradicionais de algumas plantas do género *Bridelia* estão resumidas na tabela I. Alguns metabólitos mais importantes encontrados e isolados de diferentes espécies medicinais de género constam das figuras 2 e 3.

As cascas, raízes e folhas de pelo menos dez espécies de *Bridelia* são utilizadas na medicina tradicional africana e asiática para tratamento de várias doenças, incluindo infecções genitais e urinárias (*Bridelia atroviridis*), bronquite (*Bridelia balansae*), anemia (*Bridelia cathartica*), distúrbios intestinais e dores nas articulações (*Bridelia micrantha*), cárie dentária (*Bridelia grandis*), febre, diabetes e diarreia (*Bridelia ndellensis*), reumatismo (*Bridelia retusa*), reumatismo, dor abdominal e artrite (*Bridelia esclerodermia*), febre (*Bridelia tomentosa*), disenteria e reumatismo (*Bridelia ferruginea*) (Ngueyema *et al.*, 2009) e alguns estudos químicos e biológicos foram alvos de estudo e descritos na literatura (Pegel e Rogers, 1968; Bessong *et al.*, 2006; Green *et al.*, 2011).

Muitos estudos fitoquímicos evidenciaram uma abundante presença de terpenos, esteróis e compostos fenólicos (Ngueyema *et al.*, 2009), onde se pode destacar alguns metabólitos

isolados das folhas e caules de *Bridelia monoica* e de *Bridelia ovata* (Bates *et al.*, 1990; Boonyaratavej *et al.*, 1992), nomeadamente, friedelina e friedelana-3 β -ol, flutina-5-en-3 β -ol, estigmasterol, β -sitosterol, 4-metillanosta-9, 24-metillanosta-9 (11), 25-dien-3-ona, 24,24-mimetillanosta-9 (11), 25-dien-3-ona.

Okeleye *et al.* (2011) relataram a presença de flavonóides, esteróides, taninos, alcalóides e saponinas na casca de tronco de *Bridelia micrantha* e correlacionaram esses compostos fitoquímicos à sua actividade antimicrobiana. Mburu *et al.* (2016) confirmaram a presença dos mesmos compostos fitoquímicos através da determinação de grupos funcionais utilizando espectroscopia FT-IR e através de análise quantitativa, usando espectroscopia UV-Vis determinaram o total de fenóis e flavonóides, saponinas e conteúdo de alcalóides. O total de fenólicos e flavonóides foi encontrado mais alto em cascas, enquanto o teor de saponinas foi encontrado mais alto nas folhas. O teor de alcalóides, por outro lado foi encontrado o mais alto nas raízes e correlacionaram a presença desses fitoquímicos à actividade antimalárica exibida pela planta.

Ngueyem *et al.* (2009) revelaram que a casca e as folhas de espécies de *Bridelia* são particularmente ricas em compostos fenólicos. Adefuye *et al.* (2011), Adefuye e Ndip (2013) mostraram que os extractos da casca do caule de *B. micrantha* revelaram actividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium* e *Helicobacter pylor*.

Na espécie *Bridelia crenulata* (Pegel e Rogers, 1968; Bessong *et al.*, 2006) foram isoladas e reportadas as substâncias como friedelina, epi-friedelinol, n-octacosano, α -amirina, β -sitosterol, β -sitosterol-3- β -D-glucopiranosídeo e luteoferol (**1**). Os seus extractos foram testados contra 10 bactérias patogénicas e quatro estirpes fúngicas onde verificou-se uma forte inibição contra *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* (Ramesha *et al.*, 2001). A actividade antibacteriana de luteoferol também foi avaliada e mostrou-se bastante efectivo contra todas as bactérias testadas na faixa de concentração que varia de 250-2000 $\mu\text{g/mL}$ (Ramesh *et al.*, 2002).



Foto: Kbraunsd e Taylo (2014, 2016)

Figura 1. Aspectos botânicos de *Bridelia cathartica* Bertol

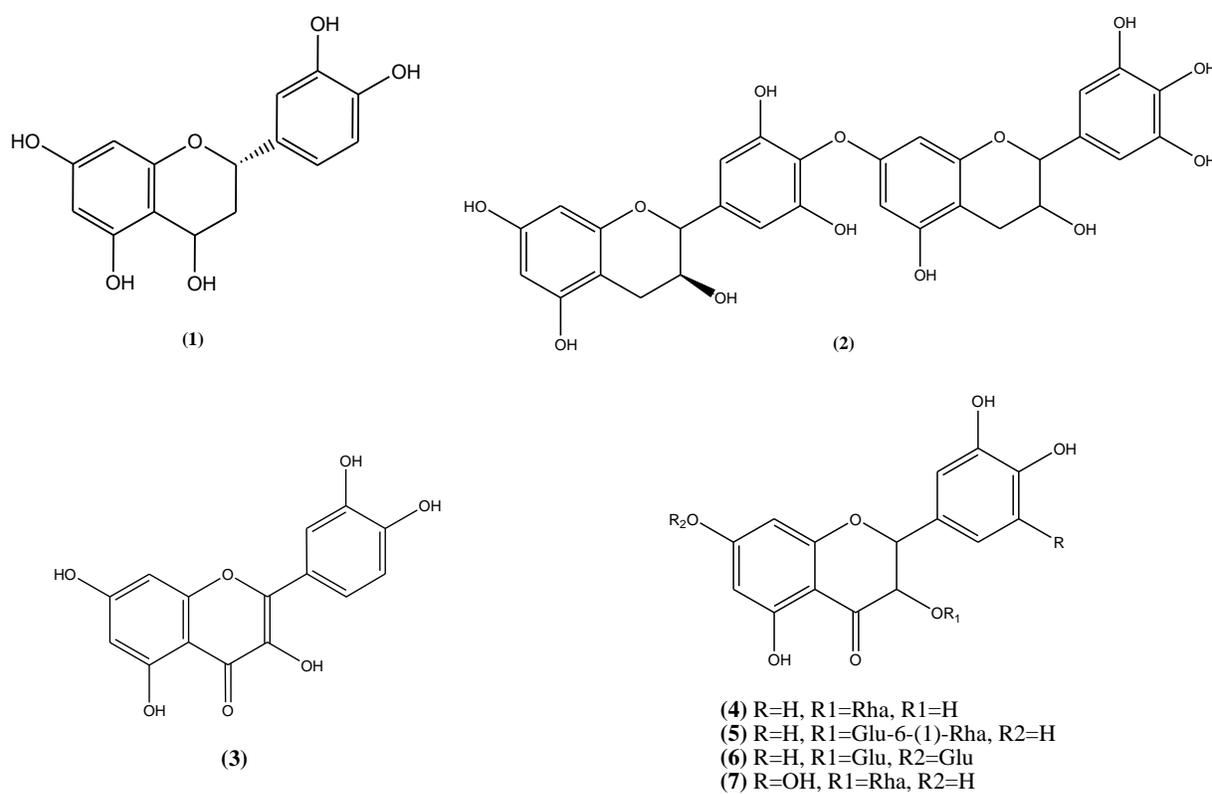


Figura 2. Flavonóides isolados das espécies *Bridelia crenulata* e *Bridelia ferruginea*

Tabela I. Usos tradicionais e indicações de algumas plantas do género *Bridelia*

Espécie	Uso tradicional/ Propriedades	Fonte
<i>B. atroviridis</i>	Laxante, diurético e afrodisíaco; gonorreia e outras doenças sexualmente transmissíveis; propriedades antibacterianas.	Ngueyema <i>et al.</i> (2009).
<i>B. balansae</i>	Bronquite Anemia; asma; obstipação; anorexia; febre; dores cardíacas; disenteria;	Ngueyema <i>et al.</i> (2009). Wet <i>et al.</i> (2012). Ngueyema <i>et al.</i> (2009).
<i>B. cathartica</i>	hemorróides; infertilidade feminina e masculina; tosse; dor epigastro; malária; cefaleias; epilepsia; doenças sexualmente transmissíveis e sintomas relacionados com infecções por VIH	Ramalhete <i>et al.</i> (2008)
<i>B. crenulata</i>	Antimicrobiana	Ramesha <i>et al.</i> (2001).
<i>B. esclerodermia</i>	Reumatismo, dor abdominal e artrite	Ngueyema <i>et al.</i> (2009).
<i>B. ferruginea</i>	Disenteria; reumatismo; aftas; antiinflamatória; antidiabética; infertilidade feminina; antipirética; antihelmintica.	Ngueyema, <i>et al.</i> (2009). Rashid <i>et al.</i> (2000).
<i>B. grandis</i>	Cárie dental e propriedades antimicrobianas. Distúrbios intestinais e dores nas articulações; antidiabética;	Ngueyema <i>et al.</i> (2009). Pegel e Rogers (1968). Green <i>et al.</i> (2011).
<i>B. micrantha</i>	antimicrobiana, antioxidante e anti-VIH.	Bessong <i>et al.</i> (2006). Omeh <i>et al.</i> (2014). Chinaka e Nkeiruka (2011).
<i>B. ndellensis</i>	Febre, diabetes e diarreia	Ngueyema <i>et al.</i> (2009).
<i>B. retusa</i>	Reumatismo	Ngueyema <i>et al.</i> (2009).
<i>B. tomentosa</i>	Febre	Ngueyema <i>et al.</i> (2009).

Adaptado de Ngueyema *et al.* (2009).

Outros compostos foram isolados da espécie *Bridelia ferruginea*, os mais importantes incluem os flavonóides galocatequina- (4-O-7) -epigalocatequina (2), quercetina (3), quercetina-3-neoesperidósido (4), rutina (5), miricetina-3-glucósido (6), miricetina-3-ramnósido (7)

(Ngueyema *et al.*, 2009). O fraccionamento bioguiado do extracto das raízes conduziu ao isolamento de glicósido, 5'-desmetoxi- β -peltatina-5-O- β -D-glucopiranosídeo (**8**), e três compostos que já haviam sido isolados anteriormente, β -peltatina, β -peltatina-5-O- β -D-glucopiranosídeo (**9**), e deoxipodofilotoxina (Rashid *et al.*, 2000; Ngueyema *et al.*, 2009).

Outras espécies que merecem destaque são a *Bridelia balansae* e *Bridelia glauca* (Tsai *et al.*, 2003; Sueyoshi *et al.*, 2007), de onde foram isolados nove compostos, incluindo dois ésteres de cadeia longa, balansenato I e balansenato II, triterpenóide bridelona, deimino-xantina, bridelonina, adenina e seus análogos, 9- (3-metilbut-2-enil) adenina e 1- (3-metilbut-2-enil) adenina, N⁶- (3-metilbut-2-enil) adenina, 3- (3-metilbut-2-enil) adenina e, ligninas e neoligninas nomeadamente, brideliósido (**10**), neoligninas glicosídicas (**11**, **12**) e megastigmanas glicosídicas designadas bridelionósidos A, B, C, D, E e F, isolados da espécie *Bridelia glauca*.

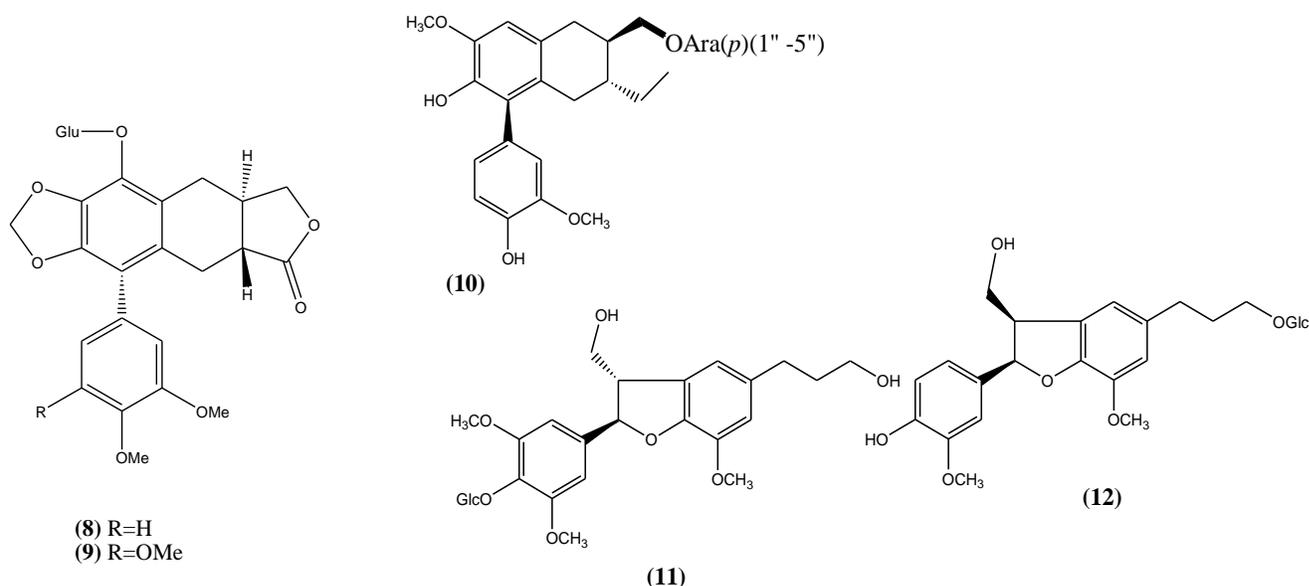


Figura 3. Ligninas e neoligninas isoladas de *B. ferruginea*, *B. balansae* e *B. glauca*

Bessong *et al.* (2006) estudaram actividade anti-VIH tipo 1 das fracções acetato de etilo e *n* – butanol com IC₅₀ de 10,4 e 7,3 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, da espécie *Bridelia glauca*, usando como alvo a enzima viral *transcriptase reversa* (TR). A análise espectroscópica das substâncias isoladas conduziu a identificação de presença de fitosteróis friedelina e sitosterol,

respectivamente. Estudos mais profundos mostraram não haver relação entre a actividade demonstrada com a ocorrência destes compostos nestas fracções. A análise fitoquímica qualitativa tornou possível a identificação de flavonóides e taninos (Bessong *et al.*, 2006) que parecem estar relacionados com a inibição da enzima viral transcriptase reversa.

Green *et al.* (2011) comprovaram a actividade anti-micobacteriana da fracção *n*-hexano e identificaram 24 fitoconstituintes que representam 60,5 % da fracção. Alguns dos compostos identificados incluem o 1,3-bis (3-fenoxifenoxi) (13,51%), 2-pinen-4-ona (10,03%), N (b) - benzil-14- (carboximetil) (6,35%) e linalol (0,2%). Os compostos taraxerona, epifriedelinol, taraxerol, ácido gálico e ácido elágico foram também isolados da mesma espécie, e alguns estudos dão indicação da presença de leucodelfinidina e ácido caféico (Pegel e Rogers, 1968).

Madureira *et al.* (2011), determinaram a actividade antibacteriana dos extractos das raízes de *Bridelia cathartica* Bertol contra diferentes estirpes bacterianas (gram positivas e gram negativas) e os valores das concentrações inibitória mínima (CIM) estão resumidos na tabela II. As bactérias que mostraram-se mais sensíveis são nomeadamente, *S. Aureus* (CIM, 7,50 µg/mL) para o extracto metanólico, e *M. smegmatis* com CIM de 31,0 µg/mL para o extracto *n* – hexano e 62,50 µg/mL para o extracto acetato de etilo respectivamente. Na tabela III encontram-se resumidos os resultados dos testes fitoquímicos realizados sobre os mesmos extractos. Com estes resultados, pode-se inferir que os extractos mais activos são os que possuem maior concentração de compostos fenólicos e terpénicos nomeadamente, o extracto acetato de etilo, metanólico e *n* – hexano onde neste último, só foi detectada a presença de terpenos.

Tabela II. Actividade antibacteriana de extractos de raiz de *Bridelia cathartica*

Extracto	CIM ($\mu\text{g/mL}$)				
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>M. smegmatis</i>
<i>n</i> -hexane	125,0	250,0	>250,0	>250,0	31,0
DCM	125,0	250,0	>250,0	125,0	>250,0
AcOEt	125,0	250,0	>250,0	125,0	62,50
MeOH	7,500	250,0	>250,0	125,0	125,0

Legenda: DCM- fracção diclorometano; AcOEt-fracção acetato de etilo; MeOH-extracto metanólico; Hex-fracção *n*-hexano; CIM ($\mu\text{g/mL}$) – concentração inibitória mínima em microgramas/mL.

Tabela III. Fitoquímica de extractos da raiz de *Bridelia cathartica* Bertol

Extracto	Flavonóides.	Fenóis	Terpenos	Alcalóides
<i>n</i> -hexane	+	-	-	-
DCM	+	-	++	+
AcOEt	++	+	++	+
MeOH	-	+	++	-

Legenda: DCM- fracção diclorometano; AcOEt-fracção acetato de etilo; MeOH-extracto metanólico; Hex-fracção *n*-hexano; CIM ($\mu\text{g/mL}$) – concentração inibitória mínima em microgramas/mL.

Adaptado de Madureira *et al.* (2011).

2.2. OS COMPOSTOS FENÓLICOS

Existem pelo menos cerca de 300.000 espécies de plantas superiores documentadas, produtoras de uma diversidade de substâncias químicas com estruturas diversificadas onde, mais de 200.000 dessas substâncias já foram isoladas e identificadas (Lattanzio, 2013).

Uns dos grupos mais importantes destes metabólitos são os compostos fenólicos (Michalak, 2006). Eles pertencem a uma classe de compostos que inclui uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas que possuem pelo menos um anel aromático no qual, ao menos, um hidrogénio é substituído por um grupo hidroxilo (Simões *et al.*, 2004).

São principalmente derivados do ácido chiquímico (**13**) e/ ou de um poliacetato e destacam-se pelas suas actividades farmacológicas (ácidos fenólicos, compostos cumarínicos, flavonóides, taninos e os compostos quinónicos) (Cunha, 2005).

O ácido chiquímico, a sua biogénese resulta da condensação aldólica de dois metabólitos da glicose: o fosfoenolpiruvato (**14**) e a eritrose-4-fosfato (**15**). Uma vez formado, o ácido chiquímico pode ser metabolizado em ácido corísmico (**16**) ou ácido gálico (**17**) que é uma das unidades formadoras dos taninos hidrolisáveis (polímeros polifenólicos de elevado peso molecular) constituídos de unidade de açúcar e ácido gálico e/ou seus derivados funcionais. Como o pH prevalente na planta torna os ácidos ionizados, poder-se-ia designar esses metabólitos como chiquimato, corismato e galato respectivamente (Simões *et al.*, 2004).

O ácido corísmico, resultante de uma molécula de ácido chiquímico e uma de fosfoenolpiruvato, por sua vez, origina os aminoácidos aromáticos, precursores de vários tipos de alcalóides. Essas vias biossintéticas que formam os aminoácidos aromáticos estão presentes em plantas, fungos e bactérias, mas não são encontradas em animais, por isso, os aminoácidos aromáticos, fenilalanina e triptofano são considerados nutrientes essenciais na dieta dos animais, enquanto a tirosina só não é considerada essencial porque pode ser formada a partir da fenilalanina.

A fenilalanina, por acção da enzima fenilalanina amoniólise (PAL) perde uma molécula de amoníaco originando o ácido cinâmico (**18**). Os ácidos cinâmicos são os precursores da

maioria dos compostos classificados como fenilpropanóides (ArC_3), compostos aromáticos com uma cadeia lateral de três átomos de carbono ligado ao anel aromático. Grande parte desses metabólitos são ácidos ou derivados destes. Os fenilpropanóides também servem como unidades formadoras dos compostos fenólicos mais complexos, os lignóides e cumarinas.

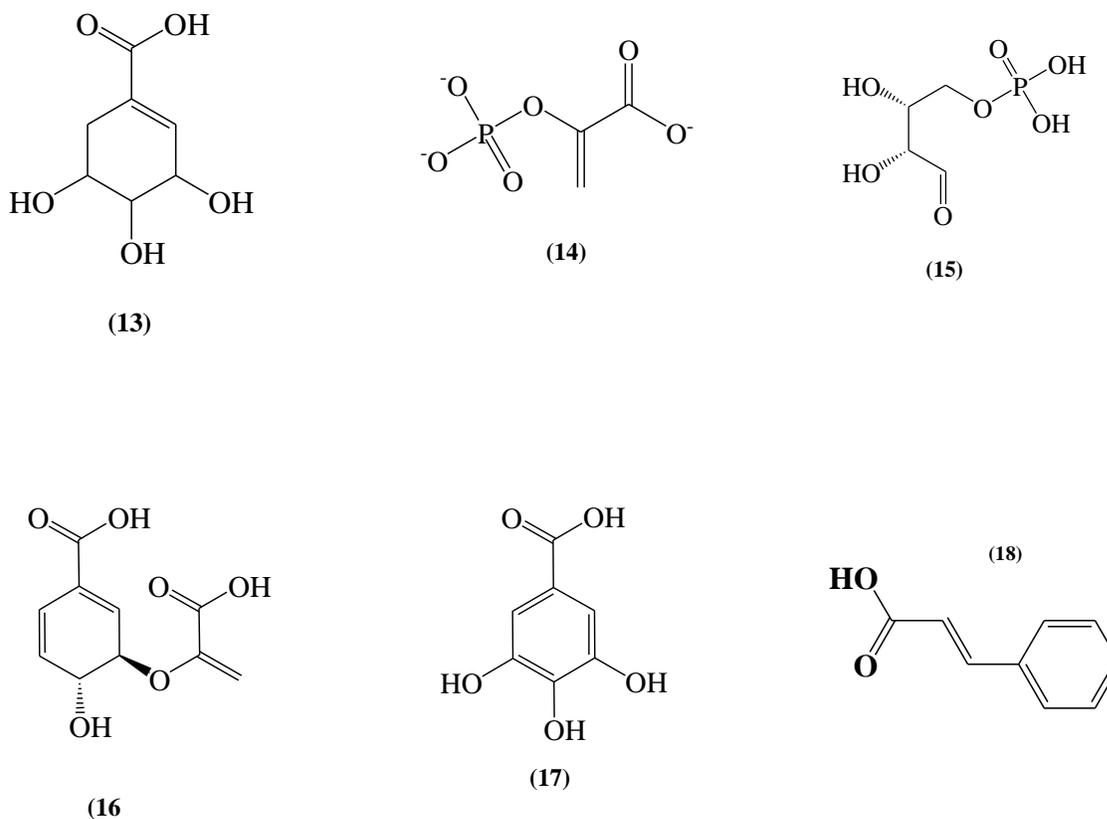


Figura 4. Alguns intermediários envolvidos na biossíntese de compostos fenólicos.

As antraquinonas, flavonóides e taninos condensados podem ser formadas via ácido chiquímico e acetato. No caso das antraquinonas, o ácido chiquímico reage com ácido α -cetoglutárico, produzindo o ácido *O*-succinilbenzóico. Este produto mais ácido mevalônico (proveniente do acetato) origina uma antraquinona.

Já os flavonóides, o seu esqueleto básico é formado por dois anéis aromáticos conectados por uma ponte de três átomos de carbono ($C_6-C_3-C_6$). Resulta de rotas biossintéticas separadas, a do ácido chiquímico e a do acetato via ácido mevalônico. A primeira origina fenilalanina, o

precursor do ácido cinâmico que, por sua vez origina o ácido cumárico, responsável por um dos anéis aromáticos (anel B) e a ponte de três carbonos. A segunda resulta no outro anel aromático (anel A) do esqueleto básico dos flavonóides.

Enquanto os taninos condensados, são formados pela ligação de unidades de flavonóides, geralmente flavon-3-óis e/ou flavan-3,4-dióis, provenientes do metabolismo dos flavonóides. Eles são formados pela hidroxilação no C-3 de uma flavanona, seguida por redução.

2.2.1. PROPRIEDADES FUNCIONAIS DOS FENÓIS SIMPLES

Os fenóis simples que possuem um único núcleo aromático são bastante comuns quer em plantas inferiores quer em plantas superiores. Para além de contribuírem para o sabor, odor, e coloração de diversos vegetais, sendo muitos desses economicamente importantes pela utilização como flavorizantes e corantes de alimentos e bebidas. Para alguns derivados de ácidos fenólicos tem sido relatada actividade antioxidante, como para o ácido clorogénico, para o ácido caféico e seus ésteres com esteróis e triterpenos, bem como para o ácido ferúlico e seus ésteres com esteróis e triterpenos (Natella *et al.*, 1999; Olthof *et al.*, 2001; Gülçin, 2006). Essas evidências sugerem que doenças causadas por reacções oxidativas em sistemas biológicos podem ser retardadas pela ingestão de antioxidantes naturais encontrados na dieta, principalmente de compostos fenólicos.

Existem relatos de efeito antioxidante (eliminação do radical peróxido e oxidação da lipoproteína de baixa densidade) dos derivados do ácido benzóico e do ácido cinâmico. A cinética encontrada para a actividade antioxidante em função do tipo de substituição aromática revelou uma variação da velocidade da reacção na sequência p-hidroxi <p-hidroximetoxi<dihidroxi <p-hidroxidimetoxi (Natella *et al.*, 1999). As mesmas actividades foram relatadas pelo Dinis *et al.* (1994) para acetaminofeno (paracetamol), ácido salicílico e ácido 5-aminosalicílico.

A actividade antibacteriana e antiviral de ésteres de ácido caféico também é relatada, destacando-se o equinocósido, de ocorrência descrita em diversas espécies de Echinaceae e o

plantamajósido de *Plantago major* L. Alguns glicósidos do ácido caféico apresentaram selectiva inibição da enzima 5-lipooxigenase, que está relacionada com a biogénese dos leucotrienos e estes, por sua vez, estão envolvidos na imuno-regulação (Simões *et al.*, 2004).

2.2.2. PROPRIEDADES FUNCIONAIS DOS FLAVONÓIDES

Os flavonóides fazem parte dos compostos polifenólicos de maior interesse devido a suas diversas propriedades biológicas (Jash e Brahmachari, 2013). A grande abundância e diversidade destes compostos parecem mostrar a extrema importância que eles possuem para plantas superiores. Contudo, não está claro que também o sejam para o homem. De facto, pode se inferir que os seres humanos ingerem muitas gramas de flavonóides diariamente, encontrados com frequência nas frutas e em muitas outras espécies vegetais, no vinho, em cereais e ocasionalmente em corantes alimentares. Estas substâncias possuem diversas actividades biológicas, destacando: à nutracêutica, antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral e antimicrobiana. As funcionalidades dos flavonóides no organismo humano são suportadas pelo facto destes terem habilidades para induzirem sistemas enzimáticos, e por estudos epidemiológicos que reportam um efeito protector contra doenças relacionadas com a idade (Yao *et al.*, 2004).

A sua presença em alimentos joga um papel importante na protecção da saúde humana, pois estudos realizados têm demonstrado diversas acções farmacológicas com destaque para a acção antioxidante, anti-inflamatório e antimutagénica (Yao *et al.*, 2004).

As isoflavonas desempenham uma importante acção hormonal (fitoestrógenos) em animais ou *in vitro* o que leva a acreditar em potentes benefícios para a saúde humana associados a ingestão da dieta rica destes compostos. Eles contribuem para as propriedades antioxidantes dos vegetais verdes, frutas, azeite e óleos de soja, vinho tinto, chocolate e chás.

Há relatos de que alguns flavonóides possuem uma variedade de actividades biológicas, incluindo antialérgica, anti-inflamatória, antiviral, antiproliferativa e anticancerígena (Yao *et al.*, 2004). O papel fisiológico destes compostos está ligado a prevenção de danos de

componentes celulares que acredita-se ser consequência de reacções químicas que envolvem radicais livres (Procházková *et al.*, 2011).

As células e tecidos corporais estão continuamente ameaçados por danos causados por radicais livres e espécies reactivas de oxigénio (EROs), que são produzidos durante o metabolismo celular normal ou induzidas por danos exógenos (Nijveldt *et al.*, 2001). Os mecanismos e a sequência de eventos pelo qual os radicais livres interferem com funções celulares não são completamente compreendidos, mas um dos eventos mais importantes parece ser a peroxidação de lípidos, o que resulta em danos da membrana celular. Este dano celular provoca uma mudança na carga líquida da célula, alterando a pressão osmótica, levando a inchaço e, eventualmente, morte celular, e adicionalmente, a indução de vários mediadores inflamatórios, que contribuem para uma resposta inflamatória geral (Nijveldt *et al.*, 2001; Halliwell, 1995).

Para se proteger de espécies reactivas de oxigénio, os organismos vivos desenvolveram vários mecanismos eficazes de defesa antioxidante (Halliwell, 1995). Estes mecanismos de defesa incluem mecanismos catalíticos: enzimas como a superóxido dismutase, a catalase, e glutatona peroxidase. E os não catalíticos: tais como homólogos a glutatona, o ácido ascórbico e α -tocoferol (vitamina E).

Como o aumento da produção de espécies reactivas de oxigénio durante a lesão de tecidos resulta em consumo e depleção dos compostos de limpeza do organismo (endógenos), assim os flavonóides podem ter um efeito aditivo para a eliminação endógena desses produtos de metabolismo de oxigénio endógeno (Nijveldt *et al.*, 2001).

Segundo Procházková *et al.* (2011), os possíveis mecanismos de eliminação de radicais livres incluem: (i) eliminação directa de espécies reactivas de oxigénio (EROs); (ii) activação de enzimas antioxidantes; (iii) actividade quelante de metais; (iv) redução de radicais α -tocoferol; (v) inibição de oxidases; (vi) mitigação do stress oxidativo causado pelo óxido nítrico; (vii) aumento dos níveis de ácido úrico; e (viii) aumento das propriedades antioxidantes das defesas antioxidantes de baixo peso molecular.

Segundo Barreiros *et al.* (2006), a actividade antioxidante dos flavonóides depende da sua estrutura e pode ser determinada por cinco factores: (i) reactividade como agente doador de

átomo de hidrogénio e do electrão; (ii) estabilidade do radical flavanoilo formado; (iii) maior reactividade frente a outros antioxidantes; (v) capacidade de quelar metais de transição; e (vi) solubilidade e interacção com as membranas biológicas.

A configuração, a substituição, o número de grupos hidroxilos também influenciam substancialmente nos vários mecanismos de actividade antioxidante (Kumar e Pandey, 2013). A configuração do grupo hidroxilo no anel B é o um dos factores mais determinante na eliminação de EROs e espécies reactivas de azoto (ERNs) porque doam hidrogénio e um electrão nos radicais hidroxilos, peroxilos e peroxinitritos, estabilizando-os, dando espaço à produção de radicais flavonóides relativamente estáveis (Cao *et al.*, 1997; Nijveldt *et al.*, 2001).

Devido aos seus potenciais de redução muito inferiores, os flavonóides (FI-OH) são termodinamicamente capazes de reduzir os radicais livres altamente oxidantes (potencial de redução na faixa de 1,00 – 1,13 V) tais como os radicais superóxido, peroxilo, alcoxilo e hidroxilo, por doação de átomo de hidrogénio como é ilustrado na figura 5.

Devido a suas capacidades quelantes de iões metálicos (ferro, cobre, etc.), os flavonóides podem inibir a geração de radicais livres. Pois, os mecanismos de geração destas espécies reactivas podem, especialmente, serem favorecidos pelos iões ferro e cobre (Barbosa *et al.*, 2010). Os traços metálicos podem ligar-se em posições específicas de diferentes anéis da estrutura de flavonóide. Os locais de ligação são apresentados na figura 6 (Kumar e Pandey, 2013).

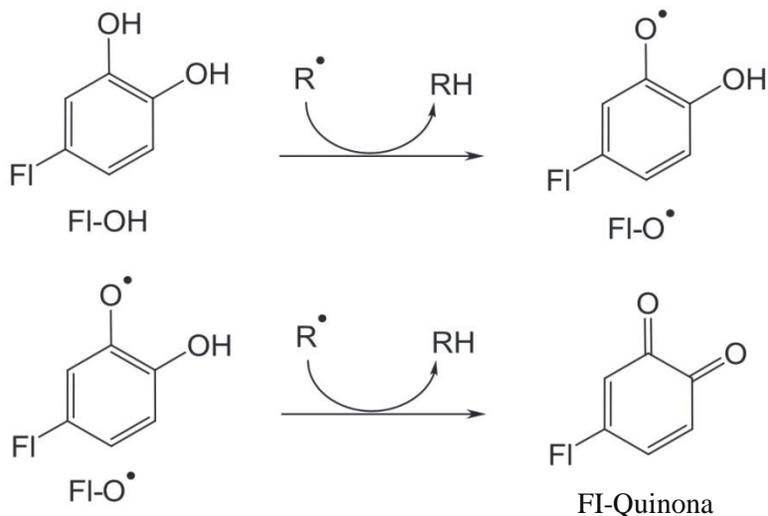


Figura 5. Redução de radicais livres por flavonóides

Legenda: Onde temos uma reacção de eliminação de espécies reactivas de oxigénio (R^\bullet) por flavonóides. O radical livre $FI-O^\bullet$ pode reagir com um segundo radical com a formação de uma quinona estável (**FI-quinona**) (Procházková *et al.*, 2011; Kumar e Pandey, 2013)

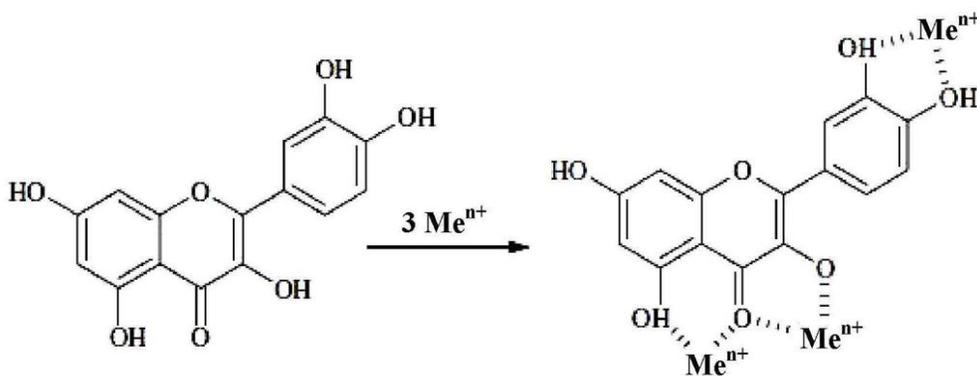


Figura 6. Complexação de flavonóides com iões metálicos.

Legenda: Temos os locais de ligação de traços metálicos na estrutura de flavonóide, onde Me^{n+} indica iões metálicos.

A epicatequina e rutina são potentes sequestradores de radicais livres. A capacidade da rutina em eliminar os radicais livres pode ser devido a sua actividade inibitória contra a enzima

xantina oxidase (Nijveldt *et al.*, 2001). Estudos recentes relatam que a xantina oxidase, uma enzima geradora de EROs, é capaz de catalisar a oxidação do retinol a ácido retinóico *in vitro*. Os flavonóides podem impedir a oxidação de LDL *in vitro* por este mecanismo. Esta acção protege as partículas de LDL. Assim, teoricamente, os flavonóides podem ter uma acção preventiva contra a aterosclerose.

Os flavonóides são também dotados de uma potente acção anti-inflamatória. Inflamação é definida como uma reacção dos tecidos vascularizados a um agente agressor caracterizada morfológicamente pela saída de líquidos e de células do sangue para o interstício. A inflamação é iniciada pela migração das células do sistema imune dos vasos sanguíneos e libertação de mediadores inflamatórios no local do dano. Este processo é seguido por recrutamento das células inflamatórias, libertação de EROs, ERNs e citoquinas pró-inflamatórias para eliminar o agente invasor e reparar o tecido injuriado (Kumar e Pandey, 2013). Como, nem sempre a resposta inflamatória inicial é suficiente e o processo pode evoluir para um estado de inflamação crónica (Coutinho *et al.*, 2009).

Apesar de não ser totalmente entendido, vários mecanismos de acção são propostos para explicar à acção anti-inflamatória *in vivo* dos flavonóides (Rathee *et al.*, 2009). No entanto, o mecanismo de acção e os componentes envolvidos neste efeito ainda não foram claramente definidos. Por via disso, a comunidade científica têm dedicado atenção considerável ao estudo de classe de flavonóides presentes em uma extensa gama de alimentos de origem vegetal, pois, estes possuem diferentes papéis biológicos (Serafini *et al.*, 2010).

A actividade anti-inflamatória desta classe de compostos tem sido bastante investigada. Foi também demonstrada a actividade dos extractos aquoso e hidroetanólico das inflorescências de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., Asteraceae no modelo de pata induzido por carragenina, onde foi também verificada para os flavonóides quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina, isolados desta espécie vegetal (Simões *et al.*, 2004). Segundo Serafini *et al.* (2010), os mecanismos moleculares para actividade anti-inflamatória dos flavonóides sugeridos incluem a inibição e/ou activação das enzimas pro-inflamatórias tais como: (i) ciclooxigenase-2; (ii) lipooxigenase; (iii) óxido nítrico sintase; (iv) factor de transcrição NF-kB; (v) activação do factor AP-1 (proteína-1); (vi) activação da enzima desintoxicante antioxidante da fase II; e

(vii) activação da *proteína quinase* activada por mitógeno, *proteína quinase c* e factor nuclear eritróide 2-relacionado com factor.

Estudos realizados recentemente mostram que os flavonóides podem minimizar a libertação de histamina durante a fase final do processo alérgico. A libertação de histamina durante esta fase da reacção alérgica é rigidamente mediada por leucotrienos produzidos pela reacção catalizada pela lipooxigenase. Este processo pode ser inibido com maior extensão por inúmeras flavonas hidroxiladas e agliconas, e com menor extensão com flavonas metoxiladas (Rathee *et al.*, 2009).

A relativa inibição dos basófilos na produção de histamina por flavonóides está correlacionada com os requisitos de estrutura-actividade demonstrada para lipooxigenase (Rathee *et al.*, 2009). Outra propriedade anti-inflamatória dos flavonóides é a sua capacidade de inibir a desgranulação de neutrófilos. Esta é uma forma directa de reduzir a libertação do ácido araquidónico por neutrófilos e outras células do sistema imune (Rathee *et al.*, 2009).

Vários investigadores têm conduzido estudos *in vitro* sobre o potencial de actividade antitumoral de flavonóides em sistemas celulares diferenciados (Ren *et al.*, 2003). Alguns flavonóides têm demonstrado capacidade de interagir com células sobre a génese do cancro, bloqueando o estágio de promoção, através da inibição da ornitina-descarboxilase. As classes que têm apresentado actividade antitumoral *in vitro* em modelos animais são: chalconas, flavanonas, flavanóis, flavonas, flavonóis e isoflavonas (Simões *et al.*, 2004). Estes flavonóides são apontados como inibidores (*in vitro*) de enzimas e receptores de ligandos envolvidos na transdução do sinal através de diferentes tipos de interacções. Assim sendo, estas interacções proteína-flavonóides, juntamente com suas propriedades antioxidantes são as principais características para os seus potenciais benefícios para a saúde. Além disso, alguns efeitos podem ser um resultado de uma combinação de eliminação de radicais livres e interacção com funções enzimáticas (Batra e Sharma, 2013).

Os relatos recolhidos sobre as propriedades inibidoras de flavonóides contra carcinogénese são resumidos na Tabela IV. Embora ainda sejam necessários estudos clínicos para uma melhor elucidação dos efeitos benéficos deste grupo de substâncias no tratamento do cancro, os dados

epidemiológicos e de testes *in vitro* aponta para o potencial uso clínico destes metabólitos (Simões *et al.*, 2004).

Outro efeito biológico dos flavonóides que merece destaque, é a capacidade antimicrobiana. Durante séculos, preparações contendo flavonóides como principais ingredientes activos foram usados por médicos e leigos curandeiros para o tratamento de doenças infecciosas em humanos (Cushnie e Lamb, 2005). Por exemplo, as propriedades curativas de própolis são referidos em todo o Antigo Testamento, e este bálsamo foi prescrito por Hipócrates (460-377 aC) na Grécia antiga para o tratamento de feridas e úlceras (Cushnie e Lamb, 2005). As propriedades antimicrobianas de própolis têm sido atribuídas ao seu elevado teor de flavonóides e em particular a presença de flavonóides galangina e pinocembrina (Cushnie e Lamb, 2005). Estudos realizados mostram que mais de trezentas substâncias foram identificadas em amostras de própolis, com predominância de flavonóides (flavonas, flavonóis, flavanonas), das quais destacam-se: galangina, crisina, tectocrisina, pinocembrina, kampferol e quercetina (Sousa *et al.*, 2007).

Tabela IV. Actividade Antitumoral de Flavonóides em Várias Linhagens Celulares

Cancro	Flavonóide
Cancro oral	Flavanonas, isoflavanas, epigallocatequina, chalconas, epigallocatequina-3-galato, curcumina, genisteina, epicatequina galato, quercetina
Cancro da mama	Flavanonas, daidzeina, genisteina, quercetina, luteolina
Cancro da tiróide	Genisteina, apigenina, kaempferol, crisina, luteolina, biochanina A
Cancro do pulmão	Flavona, quercetina
Cancro da prostata	Catequina, epicatequina, quercetina, kaempferol, luteolina, genisteina, apigenina, miricetina, silimarina
Cancro do colo uterino	Flavona, quercetina, genisteina, antocianina
Leucemia	Apigenina, quercetina, miricetina, chalconas
Melanoma de rato B16	Chalconas

Adaptado de Ren *et al.* (2003).

Basile *et al.* (1999) reportaram a actividade antimicrobiana contra *Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes* e *Pseudomonas aeruginosa* (MIC variando entre 4-2048 mg/mL) para 7 flavonóides isolados da espécie de musgos nomeadamente, a flavona apigenina, apigenina-7-*O*-triglicósido, lucenina-2, luteolina-7-*O*-neohesperidósido, saponarina, vitexina; e o biflavonóide bartramiaflavona.

Orhan *et al.* (2010) avaliaram a actividade antibacteriana e antifúngica de flavonóides 5,7-dimetoxiflavanona-4'-*O*- β -D-glucopiranosido e 5,7-dimetoxiflavanona-4'-*O*-[2''-*O*-(5'''-*O*-trans-cinamoil)- β -D-apiofuranosil]- β -D glucopiranosido isolados das folhas e caules de *V. album* ssp. *Album* (Loranthaceae) proveniente de *Armeniaca vulgaris* Lam. e de glicósido, 5,7,3'-trihidroxi-flavanona-4'-*O*- β -d-glucopiranosido isolado de extracto etanólico de *G. Fissurensis*, e de naringenina-7-*O*- β -d-glucopiranosido proveniente das partes aéreas do *C. hypoleucum* (Asteraceae) contra cepas padrão de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* e bactérias resistentes aos fármacos, assim como fungos (*Cândida albicans*, *C. krusei*). Todos os compostos testados (32-128 mg/mL) mostraram forte actividade antimicrobiana contra cepas isoladas de *P. a. eruginosa*, *A. baumannii*, *S. aureus* e *C. krusei*. Taiwo e Igbeneghu (2014) relataram a actividade antimicrobiana contra bactérias gram positivas de apigenina C-8 glucósido, isoquercitrina-6-*O*-4-hidroxibenzoato e quercetina-3-*O*- β -ramnósido isolados das folhas de *Ficus exasperata* Vahl-Holl (Moraceae).

Vários relatos sugerem que os flavonóides geralmente têm múltiplos mecanismos de acção, no entanto, os mecanismos antibacterianos permanecem largamente desconhecidos para a maioria dos flavonóides, mas sabe-se que eles podem exercer actividade antibacteriana através de mecanismos como: (i) ruptura da membrana citoplasmática; (ii) inibição da síntese de ácido nucléico; (iii) inibição do metabolismo energético; (iv) inibição da síntese da parede celular; e (v) a inibição da síntese da membrana celular (Xiao *et al.*, 2014).

Xiao *et al.* (2014) identificaram os alvos moleculares de acção de 19 flavonóides e cinco enzimas foram descritas como importantes alvos de acção, a saber: (i) fumarato flavoproteína redutase; (ii) di-hidroptoroato desidrogenase; (iii) di-hidrofolato redutase; e (iv) enoil-redutase-ACP dependente de NADH e a subunidade de DNA-girase.

Os resultados mostraram também que, a 3-*O*-galoil ou cadeia lateral de 3-*O*-glicósidos em anel pirano dos flavonóides são importantes para a inibição destas enzimas. Este estudo fornece pistas importantes para a compreensão dos mecanismos antibacterianos dos flavonóides.

2.2.3. PROPRIEDADES FUNCIONAIS DOS TANINOS

Os taninos são compostos fenólicos de peso molecular suficientemente elevado, com grupos hidroxilos e outros grupos susceptíveis (por exemplo, carboxílo) a formar complexos estáveis com proteínas e outras macromoléculas sob condições particulares de estudo (Ashok e Upadhyaya, 2012). É um grupo de polifenóis solúveis em água e são habitualmente subdivididos em taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os taninos hidrolisáveis, são ésteres de ácido gálico, enquanto os condensados (também conhecidos como protocianidinas) são polímeros de monómero polihidroxi-flavan-3-ol. Na parte central da molécula dos taninos hidrolisáveis, existe uma molécula de carbohidrato (normalmente D-glicose), e os grupos hidroxilos do carbohidrato são parcialmente ou totalmente esterificados com grupos fenólicos de ácidos fenólicos, como os de ácido gálico (em galotaninos) ou ácido elágico (em elagitaninos).

Os taninos hidrolisáveis, podem sofrer hidrólise por acção de ácidos e bases libertando o carbohidrato correspondente e o respectivo ácido fenólico. Exemplos de galotaninos são os ésteres do ácido gálico com D-glicose unido ao ácido gálico de ocorrência em folhas e cascas de muitas espécies de plantas (Ashok e Upadhyaya, 2012).

Os taninos condensados, os quais quimicamente compreendem um grupo de oligómeros de polihidroxi-flavan-3-ol ou de polímeros ligados por ligações carbono-carbono apresentam uma estrutura semelhante aos flavonóides (Zhang *et al.*, 2010). Possuem importância marcante em alimentos, pois sua presença em baixas concentrações proporciona características sensoriais desejáveis. No entanto, elevadas concentrações conferem aos frutos e outros alimentos, características adstringentes. A sensação de adstringência é gerada devido à propriedade que os taninos apresentam em precipitar proteínas, ou seja, quando em contacto com as proteínas

presentes na saliva formam um complexo insolúvel que popularmente se caracteriza pela sensação adstringente (Bernardes *et al.*, 2011).

Muitos relatos indicam que os taninos, são responsáveis pela diminuição da absorção de alimentos, da taxa de crescimento, eficiência alimentar, energia líquida metabolizável e de digestão de proteínas em animais experimentais (Ozcan *et al.*, 2014). No entanto, muitos estudos indicam que o principal efeito de taninos não é devido a sua acção inibitória sobre a ingestão e digestão de alimentos mas, antes, da diminuição de eficiência de conversão de nutrientes absorvidos em novas substâncias (KT *et al.*, 1998).

Plantas ricas em taninos são usadas na medicina tradicional no tratamento de diversas doenças tais como diarreia, hipertensão arterial, hemorragias, problemas estomacais (azia, náusea, gastrite e úlceras gástricas), queimaduras, problemas renais e do sistema urinário, processos inflamatórios em geral e tumores (Simões *et al.*, 2004; Ashok & Upadhyaya, 2012). Há muitos relatos sobre a actividade antibacteriana, antiviral, atihelmintica e antioxidante dos taninos (Cunha, 2005 ; Zhang *et al.*, 2010; Ashok *et al.*, 2012).

Por terem propriedade de precipitar alcalóides (excepto a morfina) e metais pesados, os taninos podem ser empregues como antídoto nos envenenamentos por alcalóides (Cunha *et al.*, 2005). Reddy *et al.* (2007) realizaram testes de actividade antioxidante, antimalárica e antimicrobiana *in vitro* de mistura de fracções ricas em taninos, e de taninos puros nomeadamente, ácido elágico, ácido galágico, punicalina e punicalagina, isolados do suco de frutas da espécie *Punica granatum* L. A mistura das fracções ricas em taninos exibiu uma forte inibição de produção de **EROs** com EC₅₀ entre 0.8-19 µg/mL. O ácido galágico e punicalagina exibiram actividade antimalárica contra os clones D6 e W2 de *Plasmodium falciparum* com valores de IC₅₀ de 10,9; 10,6; 7,5 e 8,8 µg/mL respectivamente.

Muitos taninos hidrolisáveis têm demonstrado um potente efeito inibitório viral em vários estágios de infecção e replicação. Este efeito tem sido notado contra vírus de herpes simples tipo 1 (HSV-1), vírus de imunodeficiência humana (HIV) e vírus de leucemia (Buzzini *et al.*, 2008). As hipóteses de mecanismo antiviral dos taninos hidrolisáveis constam na tabela V.

A actividade antibacteriana também tem sido extensivamente estudada. Quatro taninos hidrolisáveis (punicalina α e β-punicalina, α-punicalagina e β-punicalagina) foram reportados

como tendo actividade inibitória contra o crescimento de estirpes bacterianas resistentes a meticilina. As hipóteses de possíveis mecanismos de acção antibacteriana e antimicótico de alguns taninos hidrolisáveis constam da tabela VI.

Tabela V. Mecanismo de Acção Antiviral de Alguns Taninos

Composto	Alvo	Mecanismos de acção
Ácido tânico	HSV	Inibição da adsorção do vírus às células
Taninos hidrolisáveis	VIH	Inibição da adsorção do vírus às células
Taninos hidrolisavam	HSV	Inibição de adsorção/penetração do vírus às células, inibição de penetração do vírus no núcleo
Elagitanino-C-Glicósido	VIH	Inibição da transcriptase reversa viral

Fonte: Buzzini *et al.* (2008)

As fracções aquosas, acetato de etilo e *n*-butanol e de antocianinas semi-puras, e outros compostos provenientes da espécie *Punica granatum*, mostraram-se activas contra microrganismos *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Cryptococcus neoformans*, *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente, *Aspergillus fumigatus* e *Mycobacterium intracelular* (Reddy *et al.*, 2007).

Tabela VI. Mecanismo de Acção Antimicrobiano de Alguns Taninos

Composto	Alvo	Mecanismos de acção
Galotaninos	<i>Streptococcus spp.</i>	Interacção com as proteínas ricas em prolina ou ácido lipoteicóico da superfície celular
Galotaninos	<i>Streptococcus spp.</i>	Inibição da <i>glucosiltransferase</i>
Elagitaninos	<i>Staphylococcus aureus</i>	Interacção com citoplasma e enzima da parede (exemplo, oxirredutases)
Taninos hidrolisáveis	<i>Helicobacter pylori</i>	Danificação dos lípidos da membrana
Taninos hidrolisáveis	<i>Candida albicans</i>	Danificação da parede e da membrana celular

Fonte: Buzzini *et al.* (2008)

Nos estudos realizados por Yang *et al.* (2013), foi demonstrada a actividade antiviral de ácido chebulágico (tanino hidrolisável) contra enterovírus 71. O tratamento de células infectadas com ácido chebulágico reduziu o efeito citopático viral com IC₅₀ de 12,5 µg / mL. Lin *et al.* (2011) relataram a actividade antiviral do ácido chebulágico e de punicalagina isolados dos frutos secos de *Terminalia chebula* Retz contra vírus de herpes simples tipo-1 (HSV-1) por inibição de formação da ligação entre as glicoproteínas da partícula viral com receptores da membrana da célula hospedeira, penetração e disseminação. Acredita-se que a actividade farmacológica dos taninos é devida, pelo menos em parte, a três características gerais que são comuns aos dois grupos de taninos (hidrolisáveis e condensados): actividade antioxidante e a capacidade de complexar macromoléculas de natureza proteica (enzimas digestivas, proteínas fúngicas ou virais) ou polissacáridos e iões metálicos (Simões *et al.*, 2004; Cunha, 2005).

Estudos epidemiológicos sugerem existir uma correlação entre o consumo de flavanóis e seus derivados e o decréscimo do risco de ocorrência de certas doenças (Cunha, 2005). Foi sugerido que os possíveis modos de acção dos taninos no tratamento de doenças estão intimamente ligados a essas três propriedades (Simões *et al.*, 2004).

2.3. ESPÉCIES REACTIVAS DE OXIGÉNIO

2.3.1. FORMAÇÃO E MECANISMO DE ACÇÃO DE RADICAIS LIVRES

A existência de espécies químicas em forma de radicais livres foi primeiramente descrita em 1900, quando foi demonstrada a decomposição de hexafeniletano em 2 radicais trifenilmetil. Entretanto, reacções envolvendo radicais livres em sistema biológico foram consideradas de importância após 1940, com a introdução de técnicas que permitiram a detecção de radicais livres e os estudos da cinética das reacções envolvendo espécies químicas de meia vida curta (Ribeiro *et al.*, 2005).

Nos últimos anos, uma quantidade substancial de evidências apontam ao papel chave dos radicais livres e outros oxidantes, como grandes responsáveis pelo envelhecimento e pelo desenvolvimento de doenças degenerativas, como certos cancros, doenças cardiovasculares,

catarata, declínio do sistema imunológico, disfunções cerebrais (doença de Alzheimer, doença de Parkinson e distrofia muscular), doenças inflamatórias (artrites, vasculite, glomerulonefrite, lúpus eritematoso, síndrome do desconforto respiratório agudo), doenças isquémicas (doenças cardíacas, acidente vascular cerebral, isquemia intestinal), hemocromatose, SIDA, enfisema, úlceras gástricas, hipertensão e pré-eclâmpsia (Sousa *et al.*, 2007; Lobo *et al.*, 2010). No entanto, a geração de radicais livres em sistemas biológicos constitui, por excelência, um processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções biológicas relevantes.

Durante os processos metabólicos, os radicais livres actuam como mediadores para a transferência de electrões nas várias reacções bioquímicas. Sua produção, em proporções adequadas, possibilita a geração de ATP (energia), por meio da cadeia transportadora de electrões; fertilização do óvulo; activação de genes e participação em mecanismos de defesa durante o processo infeccioso. Porém, a produção excessiva pode conduzir a danos oxidativos (Barbosa *et al.*, 2010).

Os radicais livres são derivados de três elementos: oxigénio, azoto e enxofre, criando assim, EROs (espécies reactivas de oxigénio), ERNs (espécies reactivas de azoto) e ERSs (espécies reactivas de enxofre). As EROs incluem as espécies como o anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidropéroxilo (HO_2^{\cdot}), radical hidroxilo (OH^{\cdot}), óxido nítrico (NO), e outras espécies, como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), oxigénio atómico (1O_2), ácido hipocloroso (HOCl) e peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$). As ERNs são formadas durante a reacção de NO com anião superóxido com a formação de radical peroxinitrito ($^{\cdot}ONOO$). As ERSs são facilmente formadas por reacção de tióis com EROs (Carocho e Ferreira, 2013).

A geração de radicais livres ocorre normalmente, nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma por diferentes mecanismos. Tais mecanismos podem, especialmente ser favorecidos pelos iões ferro e cobre. As mitocôndrias, por meio da cadeia transportadora de electrões, são as principais fontes geradoras de radicais livres (Barbosa *et al.*, 2010).

Outras fontes endógenas de produção de radicais livres incluem, xantina oxidase, peroxisomas, inflamações, fagocitoses, via do ácido araquidónico, exercícios físicos intensos, isquemia/ injúria. Algumas fontes externas incluem, o tabagismo, poluentes ambientais, radiações, certas drogas, pesticidas, solventes industriais e ozono (Lobo *et al.*, 2010).

A figura 7 mostra o processo de formação de algumas EROs segundo Carochó e Ferreira (2013) e a figura 8 mostra as diferentes fontes celulares de produção de radicais livres segundo Freeman & Crapo (1982).

O radical hidropéroxilo formado anteriormente dissocia-se para dar lugar a formação de radical superóxido a pH fisiológico de 7,4. O anião superóxido pode ainda interagir directamente ou predominantemente por intermédio de enzimas ou processos catalisados por metais, gerando outras EROs (Flora, 2009).

O ião superóxido é rapidamente eliminado, inicialmente a peróxido de hidrogénio, e por causa da sua reacção de desmutação (catalisada pela enzima catalase desmutase, SOD) para formar peróxido de hidrogénio e oxigénio e, finalmente, água (catalisada pela enzima catalase, CAT) e EROs (Flora, 2009; Carochó e Ferreira, 2013).

Se o peróxido de hidrogénio reagir com um catalisador como ião Fe^{2+} , pode ter lugar a reacção de Feton (equação 6) formando assim o radical hidroxilo HO^\bullet (Carochó e Ferreira, 2013).

No que diz respeito o ERNs, o mecanismo de formação de peroxinitrito é descrito pela equação 7 (Squadrito e Pryor, 1998). Finalmente, as ERSs derivam, em condições oxidantes, de tióis dando lugar à formação de um dissulfureto que, com a continuação da oxidação pode resultar em qualquer dissulfureto-S-monóxido ou dissulfureto-S-dióxido como moléculas intermediárias. Finalmente, uma reacção com um tiol reduzido resulta na formação de ácido sulfénico ou ácido sulfínico (Carochó e Ferreira, 2013).



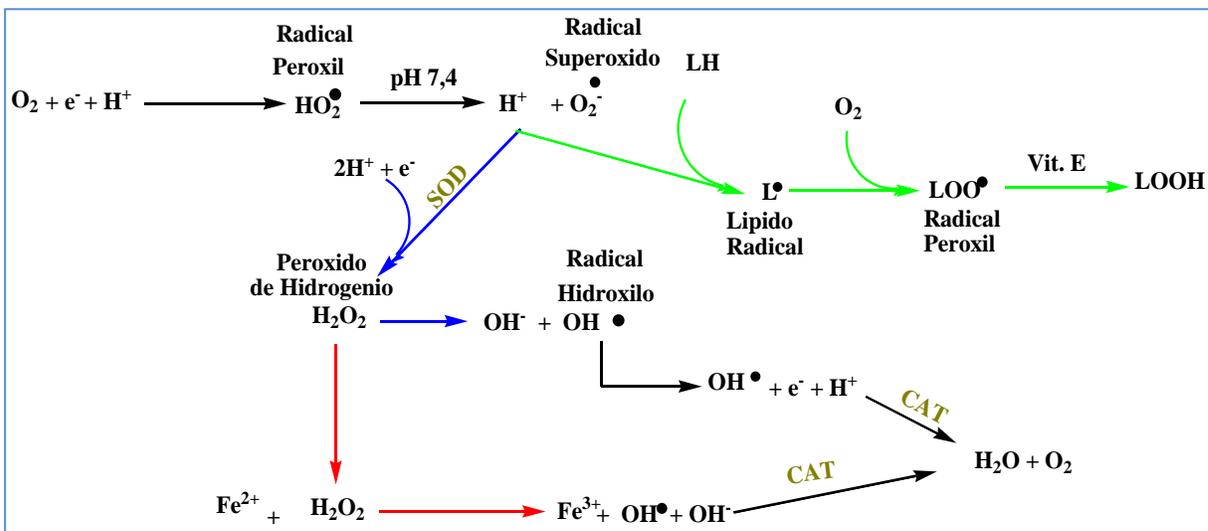


Figura 7. Descrição das reacções conducentes à formação de EROs

Setas verdes representam a peroxidação lipídica. Setas azuis representam as reacções de Haber-Weiss e setas vermelhas representam as reacções de Fenton. As letras em negrito representam radicais ou moléculas com o mesmo comportamento (H_2O_2). SOD refere-se a enzima Superóxido-Dismutase e CAT refere-se à enzima catalase.

Adaptado de Carcho e Ferreira (2013).

2.5.2. ALVOS BIOLÓGICOS DAS ESPÉCIES REACTIVAS DE OXIGÉNIO

A condição fisiológica da célula exige equilíbrio entre as condições pro-oxidante e antioxidante. O rompimento do estado estacionário a favor da condição pró-oxidante favorece injúrias celulares, sendo a condição denominada de *stress oxidativo*, tendo como consequências danos das biomoléculas como o ADN, lípidos, proteínas e os carboidratos (Ribeiro *et al.*, 2005).

As proteínas podem ser oxidadas através do mecanismo catalisado por metais pesados. O ferro é considerado de importância em tais reacções, porque pode participar de ciclo redox através de reacções com oxigénio molecular ou peróxido de hidrogénio, gerando EROs, as quais oxidam aminoácidos alterando a função das proteínas (Levine *et al.*, 1990). As proteínas contendo aminoácidos como argenina, histidina, metionina e cisteína parecem ser as mais vulneráveis (Lobo *et al.*, 2010). Os ataques aos aminoácidos que compõem as proteínas podem

gerar danos como clivagens de ligações com ou sem geração de fragmentos e ligações cruzadas, o que pode ter como consequência a perda de actividade enzimática, dificuldades no transporte activo através das membranas celulares, citólise e morte celular (Barreiros *et al.*, 2006).

Outros alvos susceptíveis de oxidação por EROs são o colesterol e os ácidos gordos polinsaturados presentes nas membranas celulares e organelares (Freeman e Crapo, 1982; Barreiros *et al.*, 2006). Os lípidos polinsaturados são altamente reactivos com radicais livres, e podem formar peróxidos. Este processo pode tornar-se auto-catalítico após o início e irá produzir lípidos-peróxidos, lípidos-álcoois e produtos aldeídicos (Freeman e Crapo, 1982).

Os danos no ADN causados por EROs envolvem clivagem da ligação fosfodiéster, alteração de ribose e oxidação das bases nitrogenadas. O acúmulo de lesões no ADN tem consequências para a célula relacionadas com a mutagênese e carcinogênese (Barreiros *et al.*, 2006). A indução de mutagênese, o mais conhecido dos efeitos biológicos da radiação, ocorre principalmente devido a danos do ADN pelo radical HO[•].

Os radicais livres afectam virtualmente todos os aspectos de existência biológica através de reacções que em última análise causam modificações estruturais, metabólicas e do material genético (Lobo *et al.*, 2010). O *stress* oxidativo é considerado o evento celular importante em muitos processos patológicos, sendo a hipótese oxidativa, uma das mais atraentes na área biomédica para explicar mecanismos moleculares de algumas doenças (Sorg, 2004).

2.5.3. PROTECÇÃO ANTIOXIDANTE

A exposição do organismo a radicais livres, provenientes de diversas fontes, levou o organismo a desenvolver uma série de mecanismos de defesas para eliminar estes radicais livres. Estas defesas foram a resposta da evolução à inevitabilidade da existência de radicais de oxigénio em condições de vida aeróbia (Ferreira e Abreu, 2007). As defesas antioxidantes humanas podem ser divididas em dois grandes grupos (figura 8 e 9), enzimáticas e não enzimáticas (Carocho e Ferreira, 2013)

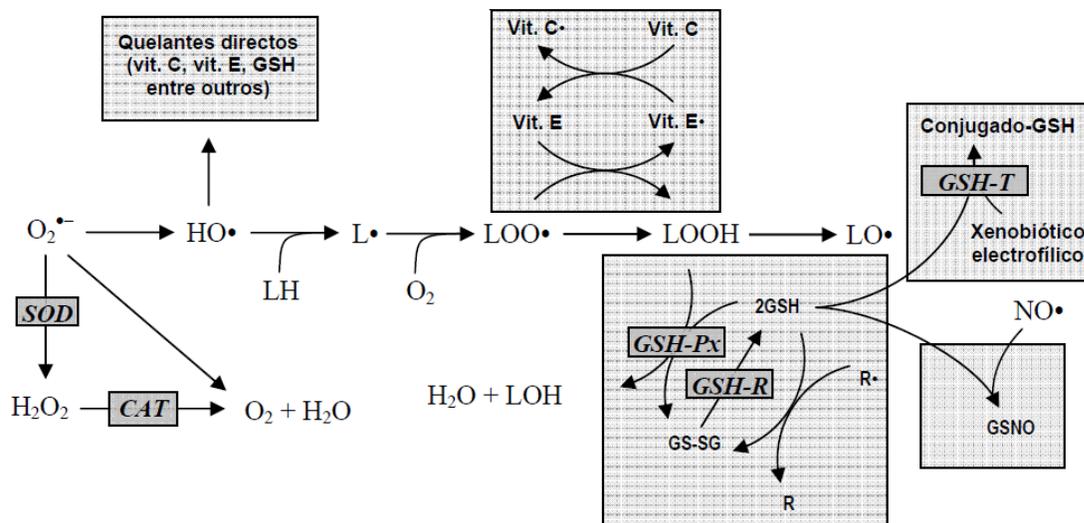


Figura 8. Principais defesas antioxidantes endógenas da célula

Legenda: As defesas antioxidantes estão representadas em rectângulos escuros e as enzimas representadas em *itálico*. EROs: anião superóxido ($O_2^{\bullet -}$), peróxido de hidrogénio (H_2O_2), radical hidróxido (HO^\bullet), lípidos membranares (LH), radical lipídico (L^\bullet), radical peróxido (LOO^\bullet) e lípido hidroperóxido (LOOH), óxido nítrico (NO^\bullet), alcoóis (LOH). Defesas antioxidantes: *superóxido dismutase (SOD)*, *catalase (CAT)*, *glutationa peroxidase (GPH-Px)*, *glutationa redutase (GPH-R)*, *glutationa (GSH)*, *glutationa dissulfeto (GS-SG)*, *α -tocoferol ou vitamina E (vit. E)*, *radical de vitamina E (vit. E \bullet)*, *vitamina C (vit. C)*, *radical de vitamina C (vit. C \bullet)*, *não radical (R)*, *radical (R \bullet)*, *S-nitrosoglutatona (GSNO)*.

Fonte: Ferreira e Abreu (2007)

As defesas antioxidantes enzimáticas são em grande número e encontram-se espalhadas por todo o organismo, tanto no meio intracelular como no meio extracelular (Ferreira e Abreu, 2007). As defesas antioxidantes enzimáticas são divididas em, defesas primárias e secundárias. As defesas primárias são compostas de três enzimas importantes que neutralizam ou impedem a formação de radicais livres: glutatona peroxidase (GPH-Px), que doa dois electrões para reduzir peróxidos e formando selenóis e também elimina peróxidos, que são potenciais substratos da reacção de Feton. A catalase (CAT), que converte o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio molecular. Esta enzima possui uma das maiores taxas de conversão até então conhecidas pelo homem, chegando a processar por cada molécula de catalase, seis bilhões de moléculas de peróxido de hidrogénio. E finalmente, a superóxido dismutase (SOG) que

converte o anião superóxido em peróxido de hidrogénio, substrato para a catalase (Carocho e Ferreira, 2013).

A defesa enzimática secundária inclui glutathione redutase (GPHR) e glucose-6-fosfato desidrogenase (G-6-P). A GPHR reduz glutathione (um antioxidante), da sua forma oxidada para a forma reduzida, reciclando assim para continuar a neutralizar mais radicais livres. A glucose-6-fosfato regenera NADPH (nicotinamida adenina fosfato de dinucleótido - coenzima utilizada em reacções anabólicas), criando assim um ambiente de redução. Essas duas enzimas não neutralizam radicais directamente, mas têm papéis de apoio para os outros antioxidantes endógenos (Carocho e Ferreira, 2013).

Os antioxidantes endógenos não enzimáticos incluem por exemplo compostos como a vitamina A, cofactor enzimático Q10, compostos de azoto (ácido úrico) e péptido glutathione (GSH). A vitamina A ou retinol é produzida no fígado como resultado da quebra de β -caroteno. Há uma dúzia de formas de vitamina A que podem ser isoladas. Sabe-se que tem benefícios importante para a pele, olhos e órgãos internos. O que lhe confere actividade antioxidante é a capacidade de se combinar com radicais peroxilados antes da propagação de peroxidação de lípidos (Palace *et al.*, 1999).

A coenzima Q10 está presente em todas as células e membranas. Ela desempenha um papel importante na cadeia respiratória e em outros processos de metabolismo celular. A coenzima Q10 actua impedindo a formação de radicais peroxilo lipídio, embora tenha sido relatado que esta coenzima pode neutralizar esses radicais mesmo após sua formação. Outra função importante é a capacidade de regenerar a vitamina E. Alguns autores descrevem esse processo como sendo mais provável do que a regeneração de vitamina E através do ascorbato (vitamina C) (Turunen *et al.*, 2004).

O ácido úrico é o produto final do metabolismo de nucleótidos de purina em humanos e, durante a evolução, as suas concentrações aumentaram. Após a filtração renal, 90% de ácido úrico é reabsorvido pelo corpo, mostrando que tem funções importantes dentro do corpo. Na verdade, o ácido úrico é conhecido por evitar a superprodução de oxidantes oxo-heme que resultam da reacção da hemoglobina com peróxidos. Por outro lado, também previne a lise de eritrócitos pela peroxidação e é um potente eliminador de oxigénio atómico e Radicais hidroxilo (Kand'ár, *et al.*, 2006).

A glutatona é um tripéptido endógeno que protege as células contra radicais livres, quer doando um átomo de hidrogénio ou um electrão. Também é muito importante na regeneração

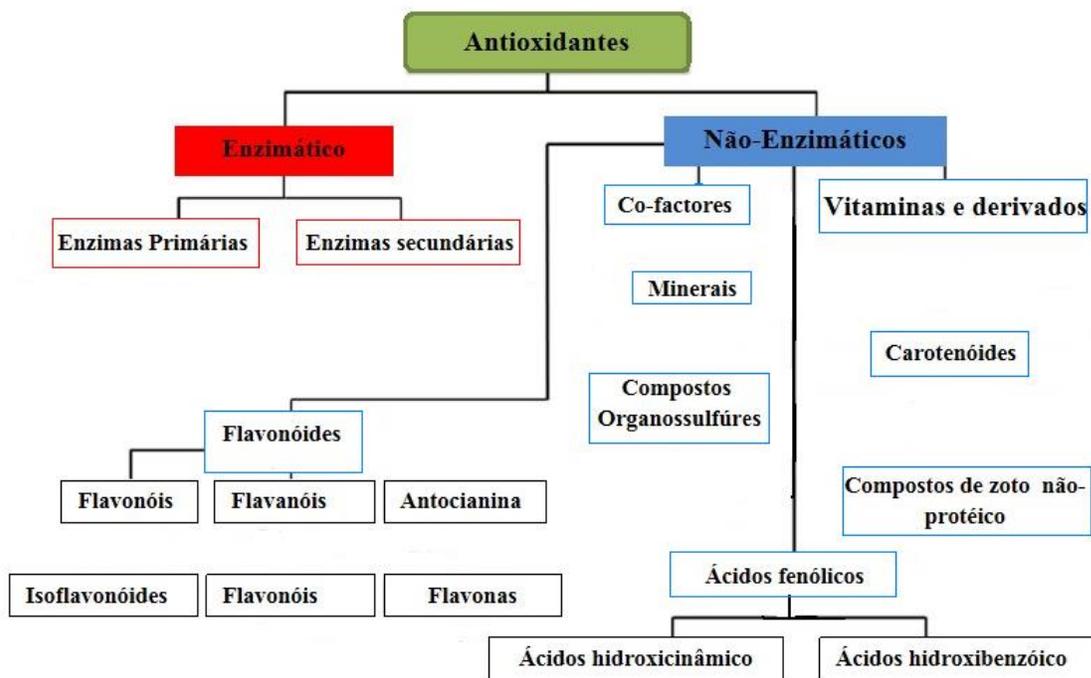


Figura 9. Antioxidantes naturais separados em classes

Adaptado de Caroch e Ferreira (2013).

Apesar da sua notável eficiência, o sistema antioxidante endógeno não é suficientemente eficiente para equilibrar os níveis de radicais livres produzidos no sistema biológico, daí que, o organismo humano usa os antioxidantes naturais que estão presentes na dieta humana para manter a concentração de EROs nos níveis mínimos possíveis (Pietta, 2000).

O ácido ascórbico (vitamina C) pode ser encontrado sob duas isoformas com potente actividade antioxidante: ácido L-ascórbico e ácido L-dihidroascórbico. O ácido ascórbico é eficaz na eliminação de anião radical superóxido, peróxido de hidrogénio, radical hidroxilo, oxigénio atómico e óxido de azoto (Caroch e Ferreira, 2013).

A vitamina E é composta por oito isoformas, com quatro tocoferóis (α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol e δ -tocoferol) E quatro tocotrienóis (α -tocotrienol, β -tocotrienol, γ -tocotrienol e δ -tocotrienol), sendo o α -tocoferol a mais potente e abundante isoforma em sistemas biológicos. A vitamina E interrompe a peroxidação lipídica ao doar seu hidrogénio fenólico aos radicais peróxido formando radical tocoperóxido que, apesar de serem radicais, não são reactivos e não podem continuar a cadeia da reacção oxidativa. A vitamina E é o único principal antioxidante lipossolúvel encontrado no plasma, células vermelhas e tecidos, permitindo a protecção da integridade das estruturas lipídicas, principalmente a biomembrana. A vitamina K é outro composto lipossolúvel com propriedades antioxidantes, sendo encontrado sob forma de duas isoformas, K1 e K2. A estrutura 1,4-protéico. naftaquinona encontrada nesta vitamina é que lhe confere a actividade antioxidante, protegendo vários alvos (Carocho e Ferreira, 2013).

Os flavonóides, são um grupo de compostos antioxidantes constituídos por, flavonóis, flavanóis, antocioninas, isoflavonóides, flavanonas e flavonas. Todos esses subgrupos de compostos compartilham o mesmo esqueleto de difenilpropano ($C_6C_3C_6$). As propriedades antioxidantes dos flavonóides são conferidas pelos grupos hidroxilos fenólicos ligados às estruturas do anel e podem actuar como agentes redutores, doadores de hidrogénio, extintores de oxigénio atómico, eliminadores de radicais superóxido e até mesmo quelantes de metais. Eles também activam enzimas antioxidantes, reduzem radicais de α -tocoferol (tocoferóxidos), inibem as oxidases, atenuam o stress nitrativo e aumento dos níveis de ácido úrico e de moléculas de baixo molecular. Alguns dos mais importantes flavonóides são catequina, catequina-galato, quercetina e kaempferol (Prochazkova *et al.*, 2011).

Os ácidos fenólicos são compostos dos ácidos hidroxicinâmico e hidroxibenzóico. Eles têm actividade antioxidante como quelantes de metais e eliminadores de radicais livres com impacto especial sobre radicais hidroxilo e peróxido, aniões superóxido e peroxinitritos. Um dos compostos mais estudados e promissores no grupo dos ácidos hidroxibenzóicos é ácido gálico que também é o precursor de muitos taninos gálicos, enquanto o ácido cinâmico é o precursor de todos os ácidos hidroxicinâmicos (Krimmel *et al.*, 2010).

Os carotenóides são um grupo de pigmentos naturais que são sintetizados por plantas e microorganismos, mas não por animais. Eles podem ser divididos em dois grandes grupos: os

hidrocarbonetos carotenóides conhecidos como carotenos que contêm grupos finais específicos, como licopeno e β -caroteno, e os carotenóides oxigenados conhecidos como xantófilos, como zeaxantina e luteína. O principal efeito antioxidante dos carotenóides é devido à extinção de oxigênio atômico. Os carotenóides têm ligações duplas conjugadas dentro da sua estrutura e o único radical livre que é eliminado completamente por esses pigmentos é o radical peróxido (Paiva e Russell, 1999).

3. OBJECTIVOS

3.1. OBJECTIVO GERAL

- Avaliar a composição fitoquímica e actividade farmacológica dos extractos das folhas e caule de *Bridelia cathartica* (Euphorbiaceae).

3.2. OBJECTIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar os fenólicos totais, flavonóides totais e taninos totais nos extractos das folhas e caule de *Bridelia cathartica*;
- Comparar o perfil de compostos fenólicos nos diferentes extractos de *B. cathartica*;
- Determinar a actividade antioxidante dos extractos de *Bridelia cathartica*;
- Determinar a actividade antibacteriana dos extractos de *Bridelia cathartica*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. COLECTA E PREPARAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

As partes aéreas (folhas e caules) de *B. cathartica* foram colhidas nas dunas da Praia de Macaneta, Distrito de Marracuene, Província de Maputo em Março de 2014 e a identificação da espécie foi feita por botânicos do Herbário do Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências da Universidade Eduardo Mondlane por comparação com espécime existente com voucher número 1772. Uma exsicata foi depositada na herboteca do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica do ISCTEM (sem número de registo), onde permaneceu como material de referência de estudo.

O material para o estudo, foi submetido a secagem à temperatura ambiente por 90 dias ao abrigo da luz excessiva, com controlo regular de perda de massa (ciclo de 15 dias), seguido de redução do tamanho das partículas com um triturador de cereais (Kenwood 600) e a calibração do pó, por tamis de 180 µm de diâmetro da malha. A conservação foi feita em um recipiente de vidro âmbar hermeticamente fechado até a data de início de processos extractivos.

4.2. SOLVENTES E REAGENTES QUÍMICOS

Todos os solventes e reagentes químicos usados para extracção ou ensaios analíticos foram adquiridos na sua forma pura em Laboratórios de referência a partir de fornecedores locais. O etanol foi adquirido da Merck (RSA), *n*-hexano da Alpha Chemika (Índia), o acetato de etilo, da L & T Diagnostics CC (RSA), reagente de Folin-Ciocalteu, da LNS Lab (RSA), o Nitrato de amónio, da Sigma-Aldrich (Alemanha), carbonato de sódio, da Fluka Chemika (Suécia), o ácido ortofosfórico, da Merck (RSA), o 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) da Sigma-Aldrich (EUA), o cloreto de alumínio, da Merck (RSA) e placas cromatográficas (sílica gel F₂₅₄), da Merck (RSA).

4.3. PREPARAÇÃO DOS EXTRACTOS

4.3.1. EXTRACÇÃO HIDROETANÓLICA

O etanol a 70° GL foi preparado pela diluição de etanol a 96° GL (Sigma, RSA) e o seu título confirmado com recurso ao alcoómetro de Gay-Lussac. Em seguida, 50 Gramas do pó de caules ou das folhas de *Bridelia cathartica* foram extraídos sucessivamente por digestão até esgotamento com 500 mL de etanol 70° GL (EtOH) durante 5 dias com renovação diária de solvente (24 horas). Os extractos foram combinados e os marcos submetidos a duas lavagens com 500 mL do mesmo solvente e posteriormente descartados. Os extractos resultantes foram combinados (cerca de 3400 mL) e o extracto resultante filtrado por sucção com membrana *milipore* e dividido em duas porções (**A** e **B**). A porção ‘**A**’ foi submetida a concentração no rotavapor (BUCHI, Alemanha) à pressão reduzida a 50 °C até a obtenção dos extractos brutos secos, doravante designados de extracto bruto hidroetanólico de folhas (**EBF**) e extracto hidroetanólico de caules (**EBC**) respectivamente.

4.3.2. EXTRACÇÃO SOLVENTE-SOLVENTE

A porção ‘**B**’ do extracto hidroetanólico foi concentrada até ¼ do seu volume, e o extracto resultante foi submetido a uma lavagem com *n*-hexano numa ampola de separação de 500 mL (5x200 mL) para remoção de substâncias de natureza gordurosa. A fracção aquosa foi acidificada com solução de ácido metafosfórico 2% (m/v) em presença de sulfato de amónio 20 % até pH 5, depois transferido para uma ampola de separação de 500 mL e particionada com acetato de etilo (AcOEt) até esgotamento (10x200 mL).

A fase orgânica resultante (AcOEt) foi tratada (para eliminação de traços de água) com uma alíquota de sulfato de sódio anidro, filtrada com papel de filtro WhatmanTM e transferida para um balão de fundo redondo de 500 mL, concentrada à pressão reduzida num rotavapor à 50 °C até a obtenção das fracções secas doravante designadas de fracção acetato de etilo de folhas (FAEF) e fracção acetato de etilo de caules (FAEC) respectivamente.

A porção apolar foi analisada quanto a presença de compostos fenólicos por CCF analítica em placa de sílica gel Merck, 60 F₂₅₄, revelada usando uma lâmpada UV 254/365 nm ou pulverizada com reagente de Folin-Ciocalteu 10% v/v e solução de carbonato de sódio 7,5 %. Os métodos de extracção usados encontram-se descritos na figura 10 do esquema abaixo.

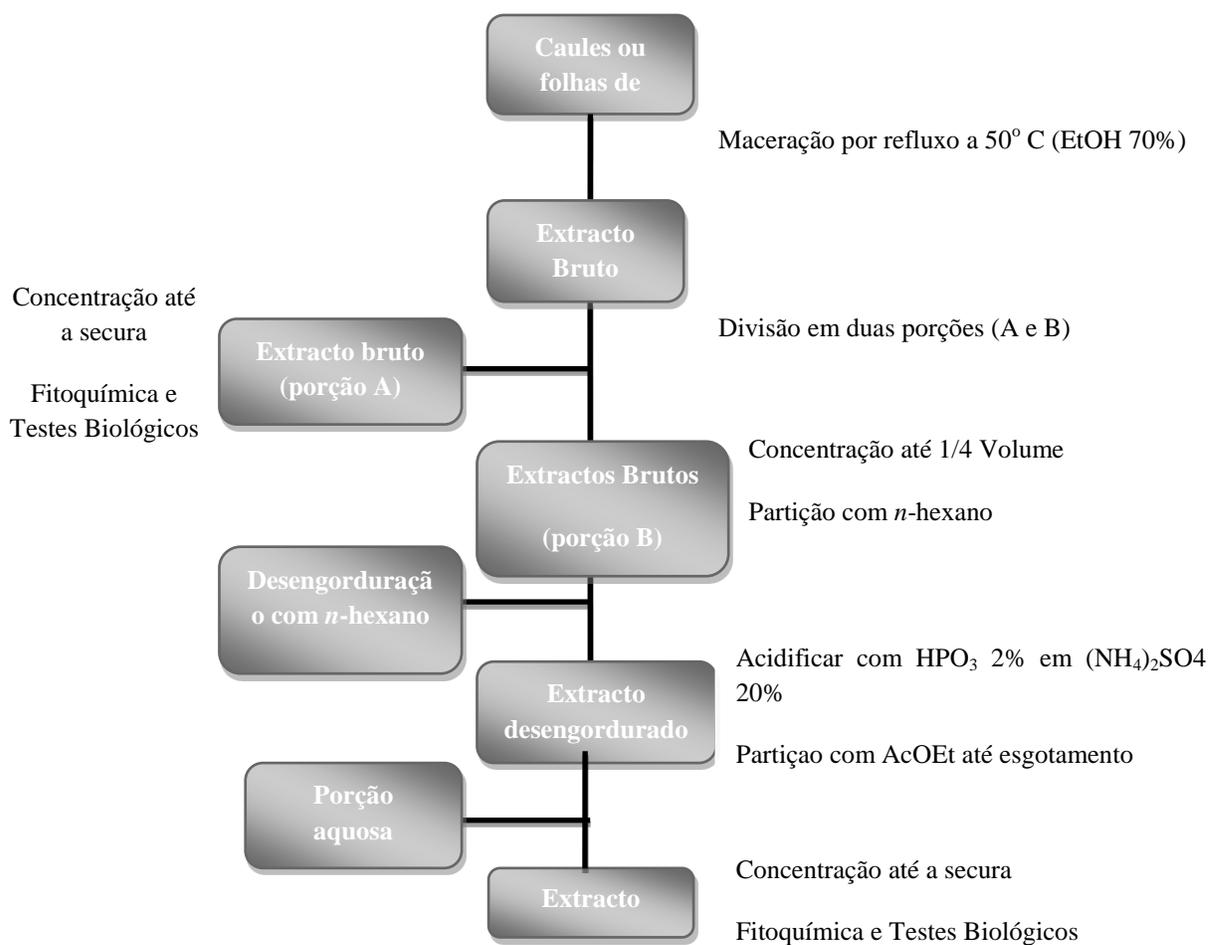


Figura 10. Fluxograma de processos extractivos

4.4. FITOQUÍMICA QUANTITATIVA

4.4.1. DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS

Para a análise dos extractos, 500 μL de cada extracto na concentração de 1 mg/mL preparados em metanol, foram transferidos separadamente para tubos de ensaio. Seguidamente adicionados 500 μL de reagente de Folin-Ciocalteu 10 % (v/v), agitados vigorosamente e deixados em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de adição de 1 mL da solução de carbonato de sódio 7,5 % (m/v) e 8 mL de água destilada, agitado por um minuto, e uma posterior incubação (2 horas), seguido das leituras das medidas de absorção das soluções azuis formadas, usando um espectrofotómetro UV/vis Shimazu 1601.

Todos os ensaios foram feitos em 3 réplicas e o teor de fenóis calculado como média \pm desvio padrão da média e expressos em miligramas equivalente de ácido gálico (mgEAG) por grama de extracto seco, calculados através da equação da curva de calibração (equação 1) do padrão deste ácido, traçada usando a metodologia proposta por Waterhouse (2012) e Amorim *et al.* (2012), com pequenas modificações.

$$A = 0,00483C + 0,0693; \quad R^2 = 0,998 \quad (1)$$

Onde, A – absorbância, C – concentração (mg/L) e R^2 – quadrado de coeficiente de correlação de Pearson.

Para preparação da curva de calibração, diluiu-se 100, 200, 300, 500 e 1000 μL de uma solução stock de ácido gálico 50 mg/mL em 100 mL, adiciona-se água destilada quantidade que baste. Estas soluções apresentam as concentrações de 50, 100, 150, 250 e 500 mg/L.

As soluções da curva de calibração foram preparadas, pipetando-se uma alíquota de 20 μL para cuvetas separadas, adicionada 1,58 mL de água destilada e 100 μL de reagente de Folin-Ciocalteu e agitou-se vigorosamente com vórtex, e deixadas em repouso por 10 minutos,

seguido de adição de 300 μL de solução de carbonato de sódio 7.5 % (m/v). Estas soluções contêm o fenol (ácido gálico) nas concentrações finais de 0,50 - 5,0 mg/L .

Após 2 horas, as absorvâncias das soluções foram determinadas a 760 nm contra o branco e plotadas contra concentrações das soluções. Todos os ensaios foram feitos em 3 réplicas, e as médias usadas para a construção da curva de calibração por regressão linear, usando o programa estatístico *GraphPad Prisma 7.0*

4.4.2. DETERMINAÇÃO DE FLAVONÓIDES TOTAIS

500 μL de cada amostra, na concentração de 1 mg/mL preparados em MetOH, foram transferidos separadamente para tubos de ensaio. Seguidamente adicionados 500 μL da solução metanólica do ácido acético 60 % (v/v), 2 mL da solução metanólica de piridina 20 % (v/v), 1 mL da solução metanólica de reagente cloreto de alumínio 5 % (m/v) e 6 mL de solução hidrometanólica 80 % (v/v). As amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 30 minutos e as medidas de absorvâncias lidas a 420 nm no espectrofotómetro *UV/vis* Shimazu 1601. Todos os ensaios foram feitos em 3 réplicas e os teores de flavonóides calculados como média \pm desvio padrão da média e expressos em miligramas equivalente de rutina (mER) por grama de extracto seco, calculados através da equação da curva de calibração do padrão de rutina (equação 2), traçada usando a metodologia descrita por Amorim *et al.* (2012).

$$A = 0,02188C + 0,03712; \quad R^2 = 0,9928 \quad (2)$$

Onde, A – absorvância, C – concentração (mg/L) e R^2 – quadrado de coeficiente de correlação de Pearson.

A curva de calibração foi preparada usando alíquotas de 100-1000 μL da solução de rutina 100 $\mu\text{g/mL}$ (solução metanólica), 500 μL de solução metanólica de ácido acético 60 % (v/v), 2 mL de solução metanólica de piridina 20 % (v/v) e 1 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio 5 % (m/v) num balão volumétrico de 10 mL . O volume final foi ajustado com metanol 80 %. As concentrações finais de rutina variavam de 1-10 $\mu\text{g/mL}$. Todos os ensaios

foram feitos em 3 réplicas e as médias usadas para a construção da curva de calibração com recurso a regressão linear obtida no programa estatístico *GraphPad Prisma 7.0*.

4.4.3. DETERMINAÇÃO DE TANINOS TOTAIS

4.4.3.1. DETERMINAÇÃO DE TANINOS CONDENSADOS

Para a análise de extractos, 2 mL de amostra foi misturada em um tubo de ensaio, com 5 mL de solução ácida-butanol com traços de sulfato ferroso (77 mg de FeSO₄.7H₂O em 500 mL de butanol-HCl (5/2)). Os tubos foram postos em banho de água a 95° C por 15 minutos. A absorbância foi lida a 530 nm num espectrofotómetro *UV/vis* Shimazu 1601 e o resultado expresso em miligrama equivalente de cianidin-3-glucósido (*mgECya*) por grama de extracto seco. Todos os ensaios foram feitos em 3 réplicas e os taninos condensados calculados com recurso a equação 3.

$$mgECya = \frac{A * V * M * V2}{l * \epsilon * v * m} \quad (3)$$

Onde *A* é absorbância da amostra a 530 nm; *V* é o volume total da reacção (7 mL); *M* é a massa molar (*g/mol*) de cianidina-3-glucósido; *V2* é o volume total do extracto (25 mL); *l* é a largura da cubeta (*cm*); ϵ é a absorvidade molar (34.700 L/mol.cm); *v* é o volume do extracto usado no ensaio (2 mL) e *m* é a massa do extracto (25 mg).

4.4.3.2. DETERMINAÇÃO DE TANINOS HIDROLISÁVEIS

Para análise de extractos, 5 mL de solução de iodato de potássio 2,5 % (*m/v*) previamente aquecidos em banho de água a 30°C por 7 minutos, foram misturados com 1 mL do extracto ou fracção a 500 µg/mL (solução metanólica) e agitados. Os tubos foram incubados a 30° C num banho de água por 2 minutos e as suas absorbâncias lidas a 550 nm num espectrofotómetro *UV/vis* Shimazu 1601. Todos os ensaios foram feitos em 3 réplicas e o teor de taninos calculado e expresso em miligramas equivalente de ácido tânico (*mgEAT*) por

grama de extracto seco, calculados a partir da equação da curva de calibração (equação 4) do padrão de ácido tânico, traçada usando a metodologia descrita por Amorim *et al.* (2012).

A curva de calibração foi preparada usando alíquotas de 100-500 μL da solução do ácido tânico 100 $\mu\text{g/mL}$ (solução metanólica), 500 μL de solução de Folin-Ciocalteu 10% (v/v) e 1 mL de solução metanólica de carbonato de sódio 7,5% (m/v), em balões volumétricos de 10 mL, os volumes finais foram ajustados para 10 mL com água destilada. A concentração final do ácido tânico varia de 1-5 $\mu\text{g/mL}$ e as medidas de absorção lidas a 760 nm. Todos os ensaios foram feitos em 3 réplicas, as médias usadas para a construção da curva de calibração por regressão linear, usando o programa estatístico *GraphPad Prisma 7.0*.

$$A = 0,07069C + 0,006466; \quad R^2 = 0,9922 \quad (4)$$

Onde, A – absorbância, C – concentração (mg/L) e R^2 – quadrado de coeficiente de correlação de Pearson.

4.5. DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.5.1. REDUÇÃO DO IÃO FÉRRICO (método de cianeto férrico)

O poder redutor dos extractos foi determinado pelo método descrito por Khaled-Khodja *et al.* (2014) e Canabady-Rochelle *et al.* (2015) com mínimas modificações. 1 mL de amostra ou de padrão quercetina a 500 $\mu\text{g/mL}$ foi misturado com 2,5 mL de 200 mM de tampão fosfato (pH 6,6) e 2,5 mL de ferricianeto de potássio 1 %. A mistura da reacção foi incubada a 50° C por 20 minutos seguida de adição de 2,5 mL de ácido tricloroacético 10 % e centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos. 2,5 mL do sobrenadante foi misturado com 2,5 mL de água destilada e 500 μL de cloreto férrico 0,1 %. A absorbância das amostras foi medida a 700 nm contra o branco apropriado e estas comparadas com a absorbância do padrão quercetina (equação 5). Todos os ensaios foram feitos em três réplicas e os valores foram apresentados como média \pm desvio padrão da média.

$$\text{Poder redutora (\%)} = 100 - \frac{A_o - A_a}{A_o} \times 100 \quad (5)$$

Onde, A_o – corresponde a solução azul da Prússia (59 μM) formado pelo padrão quercetina na concentração de 500 μM medida nas mesmas condições que as das amostras. A_a – absorvância de amostra.

4.5.2. REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNICO

Para a análise das amostras, 500 μL de soluções das amostras e do padrão quercetina na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ foram submetidas a reação com reagente fosfomolibdênico (0,6 mM de ácido sulfúrico, 20 mM de fosfato de sódio e 4 mM de molibdato de amônio). Os tubos são incubados por 90 minutos a 90 $^{\circ}\text{C}$) e lidas a 695 nm em um espectrofotômetro *UV/vis* 1601 Shimadzu. As absorvâncias das amostras foram comparadas com as absorvâncias do padrão quercetina nas mesmas concentrações e condições de análise (Prieto *et al.*, 1999). Os resultados foram expressos na forma de atividade antioxidante relativo (%*AARquercetina*), e os cálculos foram realizados através da equação 6. Todos os ensaios foram feitos em três réplicas e os valores foram apresentados como média \pm desvio padrão da média.

$$\%AAR_{\text{quercetina}} = \frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)}}{\text{Abs (quercetina)} - \text{Abs (branco)}} \times 100 \quad (6)$$

Onde %AAR corresponde a redução do complexo fosfomolibdênico em percentagem de quercetina.

4.5.3. REDUÇÃO DO RADICAL LIVRE DPPH

A actividade antioxidante das amostras (extracto ou controlo) foi determinada seguindo a metodologia descrita por Do *et al.* (2014), com pequenas modificações.

5 mL duma solução de DPPH recentemente preparada a partir de dissolução de 6 mg de DPPH em 50 mL de metanol (cerca de 300 μM) foram tratados com volumes variados (40-600 μL) de amostras (**EBC**, **FAEC**, **EBF**, **FAEF** e quercetina) na concentração de 1 mg/mL, em balões volumétricos de 10 mL. Os volumes foram ajustados para 10 mL com metanol e as concentrações finais variaram de 2-30 $\mu\text{g/mL}$, incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente. O decréscimo de absorção foi medido a 517 nm e os dados usados para determinar a percentagem de inibição com recurso a equação 7.

A solução controlo de DPPH foi preparada a partir de 5 mL de solução inicial (300 μM) e 5 mL de metanol, a sua absorção foi também medida a 517 nm usando-se metanol como branco. As percentagens de inibição obtidas das diferentes diluições dos extractos, calculadas pela equação 7 foram usadas para determinar os valores de EC_{50} nas amostras analisadas, plotando-se a percentagem de inibição no eixo Y e diluição do extracto ($\mu\text{g/mL}$) no eixo X a partir da curva exponencial da 1ª ordem (Sousa *et al.*, 2007) obtida com recurso ao programa estatístico *GraphPad Prisma 7.0*, com um grau de significância de 95%. O baixo valor de EC_{50} é indicativo de alta capacidade antioxidante de amostra (Zemmouri *et al.*, 2014).

$$\% \text{Inibição} = \frac{\text{Abs}(\text{controlo}) - \text{Abs}(\text{amostra})}{\text{Abs}(\text{controlo})} \times 100 \quad (6)$$

Onde Inibição (%) – percentagem de inibição; Absorbância (controlo) – absorbância de DPPH na ausência de amostra; Absorbância (amostra) – absorbância de DPPH na presença de amostra.

4.6. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA

A actividade antimicrobiana dos extractos foi avaliada pelo método de difusão em disco, seguindo a metodologia descrita por Klančnik *et al.* (2010) e Farjana *et al.* (2014) com menores modificações. Foram usadas cinco estirpes de bactérias (gram negativas e gram positivas) nomeadamente, *Escherichia coli* ATCC 25922 (gram negativa), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (gram negativa), *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (gram positiva), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (gram positiva) e *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 (gram positiva).

As cepas microbianas foram obtidas no Laboratório de Microbiologia do Hospital Central de Maputo (cortesia da Dra. Calvina Langa), e repicadas no caldo nutritivo contido em tubos de ensaio e incubadas numa estufa bacteriológica a 37° C por 24 horas, padronizadas para a turbidez de 0,5 na escala de Mcfarland em solução salina 0,9 %, por comparação visual com tubo padrão contendo uma suspensão padrão de sulfato de bário equivalente a uma suspensão de *Escherichia coli* contendo $1,5 \times 10^8$ células/mL.

Para o teste, 500 µL da suspensão de cada microrganismo foi uniformemente espalhado numa placa de Petri contendo agar de *Muller Hinton* usando uma zaragatoa estéril. Quatro discos de papel estéreis de 6 mm de diâmetro foram colocados (usando uma pinça estéril) e impregnados com 10 µL de cada amostra nas concentrações que variavam de 50 µg a 2 mg (50, 100, 250, 500, 700, 1000 e 2000 µg/mL). O dimetilsulfóxido (DMSO) foi usado como solvente e controlo negativo. A ciprofloxacina 5 µg ou gentamicina 10 µg foram usados como controlos positivos. As placas foram incubadas numa estufa bacteriológica a 37° C por 24 horas. Todos os ensaios foram feitos em 4 réplicas e a concentração inibitória mínima determinada como sendo a mínima concentração capaz de causar um halo (mm) não superior a 8 mm e nem inferior a 7 mm. O critério adoptado para a classificação de actividade é proposto por Holetz *et al.* (2002).

5. RESULTADOS

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos na determinação dos compostos fenólicos totais, dos flavonóides totais, dos taninos hidrolisáveis e condensados dos extractos das folhas e caules de *Bridelia cathartica* Bertol. Além disso, são ainda apresentados os resultados referentes à capacidade antioxidante e à determinação da actividade antibacteriana de algumas estirpes patogénicas gram positivas e gram negativas respectivamente. O tratamento estatístico foi feito com recurso a *Software GraphPad Prism 7.0*. Todos os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média de três repetições. As diferenças entre os grupos foram detectadas pelo teste de *t-student* e pela análise de variância (one way-ANOVA), seguido do teste de Brown-Forsythe. As diferenças foram consideradas significativas para o valor de $p < 0,05$.

O teor em fenóis totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu e os resultados expressos em termos de miligrama-equivalente do ácido gálico (*mgEAG*) por cada grama de extracto seco, os flavonóides totais foram determinados pelo método de complexação com cloreto de alumínio e os seus resultados expressos em termos de miligrama-equivalente de rutina (*mgER*) por cada grama de extracto seco. Os taninos foram determinados pelo método de iodato de potássio (taninos hidrolisáveis) e método de ácido-butanol (taninos condensados) e os seus resultados expressos como miligrama-equivalente de ácido tânico (*mgEAT*) por grama de extracto seco e miligrama-equivalente de cianidina-3-glucósido (*mgECya*) por grama de extracto seco para taninos hidrolisáveis e condensados respectivamente e os resultados encontram-se resumidos na tabela VII.

A capacidade antioxidante foi determinada com recurso aos métodos de redução de ião férrico e redução do complexo fosfomolibdénico, expressa em termos de percentagem relativa calculada em função do padrão quercetina (flavonóide), a qual foi atribuído a actividade máxima de 100 %. Enquanto no método de sequestro do radical livre DPPH, foi expressa em termos de concentração eficiente (EC_{50}), que expressa a concentração mínima do extracto capaz de reduzir a concentração inicial de DPPH até 50 %, determinada a partir da curva dose-resposta (concentração do extracto versus percentagem de redução de DPPH, como mostrado na figura 13.

5.1. FITOQUÍMICA QUANTITATIVA DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Os resultados fitoquímicos quantitativos de fenólicos de folhas e caule de *Bridelia cathartica* Bertol estão sumarizados na tabela VII. Nas figuras 11e 12 estão representadas as curvas de calibração de ácido gálico, rutina e ácido tânico respectivamente.

Tabela VII. Fitoquímica dos extractos de folhas e caules de *B. Cathartica* Bertol

Amostra	Fenóis Totais (<i>mgEAG/g</i>)	Flavonóides (<i>mgER/g</i>)	Taninos Hidrolisáveis (<i>mgEAT/g</i>)	Taninos Condensados (<i>mgECya/g</i>)
EBC	429,114 ± 05,975 ^a	0,495 ± 0,077 ^a	1,431 ± 0,085 ^a	35,814 ± 0,351 ^a
EBF	427,527 ± 10,406 ^a	5,187 ± 0,096 ^b	1,507 ± 0,085 ^a	48,020 ± 0,062 ^b
FAEC	435,090 ± 15,507 ^a	4,433 ± 0,057 ^c	1,943 ± 0,069 ^b	34,903 ± 0,432 ^a
FAEF	436,970 ± 15,310 ^a	25,531 ± 0,106 ^d	2,688 ± 0,100 ^c	65,293 ± 0,577 ^c

Legenda: EBC - extracto bruto hidroetanólico de caules; EBF - extracto bruto hidroetanólico das folhas; FAEC - fracção acetato de etilo do extracto bruto hidroetanólico de caules; FAEF - fracção acetato de etilo do extracto bruto hidroetanólico das folhas; *mgEAG/g* - miligrama equivalente de ácido gálico por grama de extracto seco; *mgER/g* - miligrama equivalente de rutina por grama de extracto seco; *mgEAT/g* - miligrama equivalente do ácido tânico por grama de extracto seco; *mgECya/g* - miligrama equivalente de cianidina-3-glucósido por grama de extracto seca. As médias com a mesma letra não apresentam diferenças significativas para o valor de $p < 0,05$.

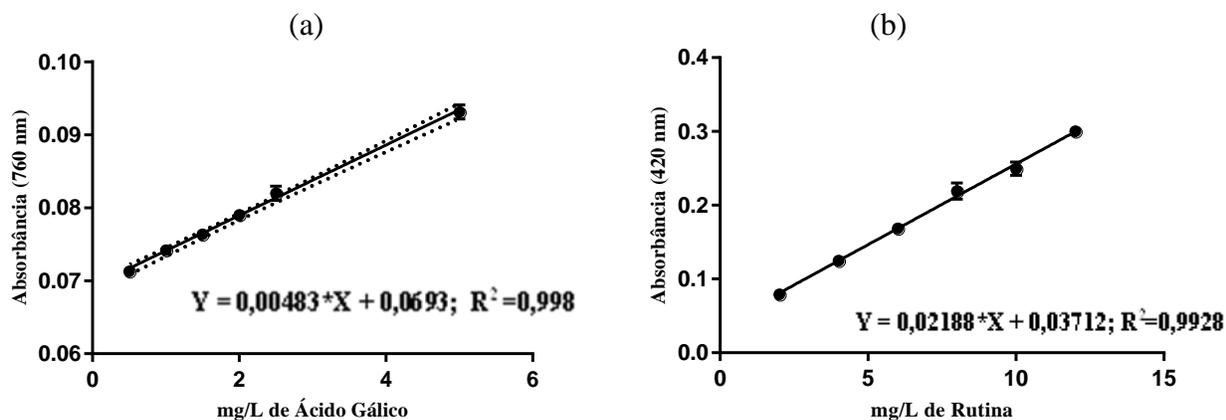


Figura 11. Curva de calibração do ácido gálico (a) e de rutina (b)

Legenda: Onde, X – concentração (mg/L) e R^2 – quadrado de coeficiente de correlação de Pearson.

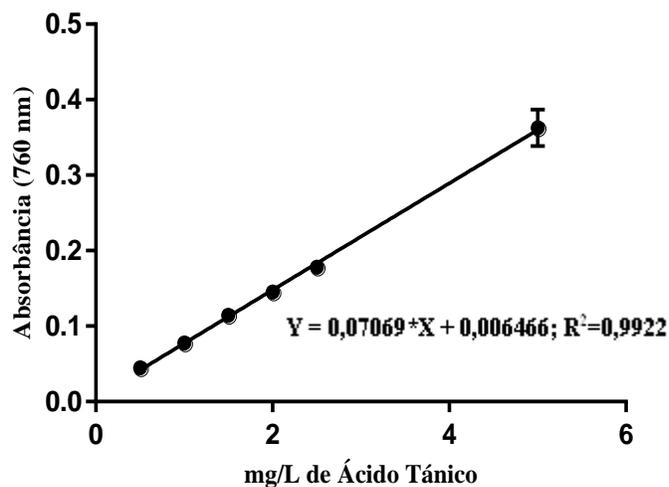


Figura 12. Curva de calibração do ácido tânico

Legenda: Onde, X – concentração (mg/L) e R^2 – quadrado de coeficiente de correlação de Pearson.

5.2. ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE

No presente estudo, os extractos de *Bridelia cathartica* foram usados como fonte de substâncias bioactivas e os seus potenciais antioxidantes e os respectivos teores foram quantificados e estão sumarizados na tabela VIII. Os dados apresentados neste estudo demonstram que os extractos de *Bridelia cathartica* possuem propriedades antioxidantes, facto que sugere um possível efeito protector *in vivo* de preparados de *B. cathartica* contra lesões oxidativas causadas por radicais livres ou EROs que ocorrem em diferentes condições patológicas.

Tabela VIII. Actividade Antioxidante de *Bridelia cathartica* Bertol

Amostra	Método DPPH (EC50, $\mu\text{g}/\text{mL}$)	Método Fosfomolibdénico (%)	Poder redutor (%)
EBC	$10,45 \pm 0,41^a$	$42,36 \pm 0,07^a$	$89,56 \pm 0,76^a$
EBF	$3,63 \pm 0,12^b$	$57,88 \pm 0,57^b$	$40,00 \pm 0,98^b$
FAEC	$14,60 \pm 0,06^c$	$45,98 \pm 0,19^c$	$110,40 \pm 1,02^c$
FAEF	$4,93 \pm 0,44^d$	$50,51 \pm 0,08^d$	$47,51 \pm 0,12^d$
Quercetina	$1,50 \pm 0,03$	$100,00 \pm 0,00$	$100,00 \pm 0,0000$

Legenda: DPPH – radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil; EC50 – concentração eficiente em $\mu\text{g}/\text{mL}$; %AAT – actividade antioxidante total em percentagens de quercetina; %PRPFe³⁺ poder redutor dos extractos face ao ião férrico em percentagens de quercetina. As médias com a mesma letra não apresentam diferenças significativas para o valor de $p < 0,05$.

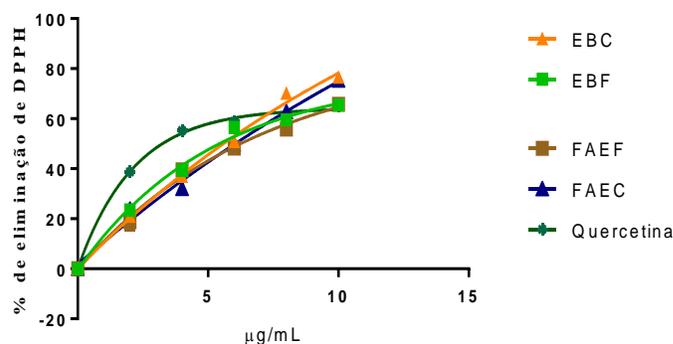


Figura 13. Curvas dose-resposta do ensaio com DPPH

Legenda: EBC - extracto bruto hidroetanólico de caules; EBF - extracto bruto hidroetanólico das folhas; FAEC - fracção acetato de etilo do extracto bruto hidroetanólico de caules; FAEF - fracção acetato de etilo do extracto bruto hidroetanólico das folhas de *B. cathartica*. A quercetina é uma substância de referência que foi usada como padrão positivo.

5.3. ACTIVIDADE ANTIBACTERIANA

Os resultados da actividade antimicrobiana realizada no presente trabalho estão sumarizados na tabela IX, onde estão apresentadas as concentrações inibitórias mínimas dos extractos de caule e folhas de *B. Cathartica*.

Tabela IX. CIM dos Extractos de Caules e Folhas de *B. Cathartica*

Actividade Antimicrobiana (MIC, µg/mL)					
Amostra	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. pneumoniae</i>
EBF	>300	300	>1000*	>1000*	>1000*
EBC	>300	>250	500	>1000*	>1000*
FAEF	>300	>1000	250	>1000*	>1000*
FAEC	>250	>250	>250	>1000*	>1000*

Legenda: EBC - extracto bruto hidroetanólico de caules; EBF - extracto bruto hidroetanólico das folhas; FAEC - fracção acetato de etilo do extracto bruto hidroetanólico de caules; FAEF - fracção acetato de etilo do extracto bruto hidroetanólico das folhas de *B. cathartica*. MIC – concentração inibitória mínima em µg/mL. *Extractos considerados inactivos para as estirpes testes.

6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

O grande progresso científico e tecnológico decorrente do avanço das ciências farmacêuticas e médicas no que refere ao tratamento das doenças infecciosas e cancerígenas ainda apresenta várias dificuldades em termos de estratégia terapêutica, uma vez que as alternativas existentes geralmente estão baseadas na combinação de dois ou mais quimioterápicos ou na utilização destes associados à radioterapia para o caso de doenças cancerígenas. Entretanto esta abordagem clínica está frequentemente associada à elevada toxicidade para o organismo, para além de causar mecanismos de resistência microbiana aos antibióticos. Desta forma tornou-se imperativo a busca constante de novas alternativas terapêuticas que possam modificar este panorama adverso. Dentro deste contexto o presente trabalho teve como principais metas à caracterização fitoquímica (perfil fenólico), antibacteriana e antioxidante de diferentes extractos de *Bridelia cathartica* Bertol.

A facilidade das reacções, eficiência dos métodos, número de citações bibliográficas e disponibilidade dos equipamentos e reagentes foram os critérios de selecção usados para a escolha dos métodos aplicados no presente trabalho de pesquisa. Os métodos de Folin-Ciocalteu e de complexação com cloreto de alumínio foram usados para estimar o conteúdo de fenóis totais e de flavonóides totais respectivamente. Os métodos de iodato de potássio e de reagente ácido-*n*-butanol foram usados para estimar os taninos hidrolisáveis e condensados respectivamente.

Os métodos de redução do ião férrico, redução do ácido fosfomolibdénico e sequestro do radical livre DPPH foram usados na determinação da actividade antioxidante. Finalmente o método de difusão em disco sobre cultura de agar, usado para a avaliação da actividade antibacteriana dos extractos hidroetanólicos e fracções acetato de etilo das folhas e caule de *B. cathartica* Bertol.

Os métodos de regressão linear e de decaimento exponencial (primeira ordem) foram imprescindíveis para a previsão e formulação de equações referentes aos mais diversos fenómenos aqui estudados, com destaque para a determinação da concentração eficiente das amostras EC₅₀ (quantidade de antioxidante necessária para reduzir até 50% a concentração inicial de DPPH) durante a redução do radical livre DPPH e das equações das curvas de calibração dos diferentes padrões ora utilizados.

As plantas têm sido uma rica fonte para obtenção de moléculas para serem exploradas terapeuticamente. Muitas substâncias isoladas de plantas continuam sendo fontes de medicamentos e o interesse da pesquisa nesta área tem aumentado nos últimos anos. A pesquisa fitoquímica busca conhecer os constituintes químicos das plantas ou conhecer o grupo de metabólitos secundários relevantes nas mesmas.

As análises fitoquímicas fornecem informações relevantes da presença de metabólitos secundários nas plantas, para que assim possa chegar ao isolamento de princípios activos importantes na produção de novos fitoterápicos. Entre as classes de princípios activos vegetais podemos citar os metabólitos secundários: alcalóides, cumarinas, terpenos e esteróides, glicósidos cardioactivos, lignanas, saponinas, compostos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonóides e taninos), estes últimos forão objecto deste estudo.

Os dados da literatura mostram que algumas espécies do género *Bridelia* foram intensamente estudadas em termos químico e biológico e apresentam uma grande diversidade de substâncias com estruturas totalmente diferenciadas e estas foram várias vezes reportadas por diferentes autores (Pegel e Rogers, 1968; Bates *et al.*, 1990; Boonyaratavej *et al.*, 1992; Rashid *et al.*, 2000; Ramesha *et al.*, 2001; Tsai *et al.*, 2003; Bessong *et al.*, 2006; Green *et al.*, 2011).

Em estudos químicos, a literatura demonstra de forma exaustiva a ocorrência de diferentes substâncias como terpenos, fenóis simples, flavonóides, taninos, ligninas, neoligninas e outras com propriedades terapêuticas interessantes que foram encontradas nas diferentes espécies do género *Bridelia* (Rashid *et al.*, 2000; Sueyoshi *et al.*, 2008; Ngueyema *et al.*, (2009). Notoriamente, das espécies estudadas, a menos citada sob ponto de vista químico e biológico é a *Bridelia cathartica*.

Vários estudos têm descrito o poder redutor dos compostos fenólicos presentes em várias espécies vegetais, correlacionando-os com a capacidade de sequestro de radicais livres produzidos em vários processos patológicos no biosistema humano ou animal (Gordon, 1996; Pooja & Sunita, 2014), dessa forma a quantificação de fenóis em vegetais é útil para atribuir-lhes essas propriedades funcionais. No presente estudo, a detecção de compostos fenólicos nas folhas e caules de *Bridelia cathartica* ficou evidenciada pela avaliação dos extractos brutos hidroetanólicos e acetato de etilo das partes aéreas (folhas e caules) com recurso a CCF sobre

placas de sílica gel Merk F₂₅₄ e os cromatogramas revelados com a soluções de Folin-Ciocalteu 10 % em meio básico, onde ficou evidenciado o desenvolvimento de algumas manchas azuis, o que dava indicação de presença de compostos fenólicos. A presença destes compostos nos extractos estudados, motivou a quantificação dos mesmos, pois, a sua ocorrência levantava expectativas da sua possível correlação com possível actividade antioxidante e antibacteriana.

6.1. CONTEÚDO FENÓLICO

Compostos fenólicos, como taninos, flavonóides e outros são considerados os principais constituintes químicos que contribuem significativamente para a capacidade antioxidante de amostras vegetais. Algumas das diferentes actividades biológicas das plantas, como a actividade antibacteriana também podem estar relacionadas com os compostos fenólicos.

Embora o método usado para a determinação de fenóis totais possa sofrer interferência com outros antioxidantes como ácido ascórbico, amins aromáticas, dióxido de enxofre, entre outros (Prior *et al.*, 2005), este é sem dúvidas o método de escolha por vários autores para a quantificação de conteúdos fenólicos de amostras vegetais medicinais ou nutricionais (Awah *et al.*, 2012; Gurnani *et al.*, 2015).

Os flavonóides são uma classe de compostos fenólicos de extrema importância biológica e diversificados. A maioria dos flavonóides tem 15 átomos de carbono e consistem em dois anéis fenólicos ligados por uma cadeia de três átomos de carbono formando um composto tricíclico (Amorim *et al.*, 2012). O catião alumínio (Al^{3+}) reage com flavonóides contidos na amostra formando um complexo estável de flavonóide - Al^{3+} de coloração amarela. A intensidade da cor é directamente proporcional a concentração de flavonóides. A reacção dos flavonóides com cloreto de alumínio conduz a uma mudança batocrómica e intensificação na absorção no espectro UV/vis que pode ser medida sem a influência de outros compostos fenólicos presentes na amostra (Amorim *et al.*, 2012). A intensidade da coloração é directamente proporcional a concentração de flavonóides contidos na amostra e pode ser quantificada espectrofotometricamente num máximo de 420 nm.

Os taninos vegetais têm sido quantificados por diversos tipos de ensaios, como precipitação de metais ou proteínas e por métodos colorimétricos, sendo esses últimos mais comuns. Os métodos mais apropriados para determinação de taninos são os de precipitação com proteínas (Monteiro *et al.*, 2005). Alguns ensaios colorimétricos são usados para quantificar grupos de taninos específicos, muito embora estes métodos sejam amplamente usados para analisar taninos de uma maneira geral, como no caso de taninos hidrolisáveis, eles detectam somente grupos galoilo e hexaidroxidifenóis (Mueller-Harvey, 2001).

Para quantificar taninos condensados os métodos mais utilizados são o butanol-HCl e a vanilina (Yu e Dahlgren, 2000). De acordo com Schofield *et al.* (2000), o método vanilina depende da reacção da vanilina com os taninos condensados para formação de complexos coloridos. O sucesso deste ensaio depende do tipo do solvente usado, da concentração e natureza do ácido, do tempo da reacção, temperatura e concentração da vanilina. O maior problema para o método vanilina parece ser a reactividade de subunidades de polímeros de taninos, o que caracteriza a falta de especificidade para taninos condensados. A raiz das dificuldades analíticas está na complexidade e variabilidade das estruturas dos taninos condensados (Schofield *et al.*, 2001).

Em ensaios colorimétricos, o método mais apropriado para a reacção com galotaninos e elagitaninos é o método KIO_3 , sendo o método específico para ésteres de ácido gálico (Wilson e Hagerman, 1990). Em espécies de *Acer*, a reacção do reagente- KIO_3 produz com galo e elagitaninos um complexo de coloração rosa.

Mueller-Harvey (Wilson e Hagerman, 1990) acrescentou que para misturas complexas de taninos este ensaio não é viável por formar uma reacção marrom antes da rosa e ser extremamente dependente da temperatura e duração da reacção. Willis e Allen (Willis e Allen, 1998) introduziram modificações no método KIO_3 . Recomendaram a investigação de um tempo óptimo de reacção (dependendo de cada espécie estudada) e que não é necessário o resfriamento das amostras para o teste, como se acreditava. Por essas moléculas apresentarem uma grande variabilidade de estruturas, tanto em taninos condensados como hidrolisáveis, alta reactividade de suas subunidades com materiais oxidativos e complexação com macromoléculas, o processo de isolamento, identificação e quantificação torna-se bastante complexo.

Os resultados do conteúdo de fenólicos totais, flavonóides totais e taninos dos extractos de *Bridelia cathartica* encontram-se apresentados na Tabela VII. Todas as amostras apresentaram quantidades relevantes de fenólicos totais (EBC: $429,114 \pm 5,975$ mgEAG/g, EBF: $427,527 \pm 10,406$ mgEAG/g, FAEC: $435,090 \pm 15,507$ mgEAG/g e FAEF: $436,970 \pm 15,310$ mgEAG/g). A análise estatística ($p < 0,05$) não mostrou diferenças significativas de conteúdo de fenólicos para todas as amostras analisadas. A partição com acetato de etilo não causa nenhuma variação significativa dos compostos fenólicos nos extractos EBC e EBF.

Foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) nos conteúdos de flavonóides para todas as amostras avaliadas. O valor mais alto foi experimentado pela fracção FAEF ($25,531 \pm 0,106$ mgER/g), enquanto o valor mais baixo foi encontrado no extracto EBC ($0,495 \pm 0,077$ mgER/g). A partição com acetato de etilo mostrou um aumento significativo ($p < 0,05$) no conteúdo de flavonóides. Para a amostra dos caules, ocorreu um aumento de $0,495 \pm 0,077$ mgRE/g (EBC) para $4,433 \pm 0,057$ mgER/g (FAEC). Para a amostra de folhas, o conteúdo de flavonóides aumentou de $5,187 \pm 0,096$ mgER/g (EBF) para $25,531 \pm 0,106$ mgER/g (FAEF).

Para os taninos hidrolisáveis, os valores encontrados para os extractos brutos foram de $1,431 \pm 0,085$ e $1,507 \pm 0,085$ mgEAT/g para as amostras EBC e EBF respectivamente. Enquanto para os taninos condensados as mesmas amostras apresentaram os conteúdos em taninos de $35,814 \pm 0,351$ mgECyag⁻¹ (EBC) e $48,020 \pm 0,062$ mgECyag⁻¹ (EBF). Não foram encontradas diferenças significativas do conteúdo de taninos hidrolisáveis ($p < 0,05$) entre os extractos brutos hidroetanólicos (EBC e EBF). Diferenças significativas foram observadas entre os extractos brutos com as suas respectivas fracções. Observou-se um ligeiro aumento de conteúdo de taninos hidrolisáveis de $1,431 \pm 0,085$ mgEAT/g (EBC) para $1,943 \pm 0,069$ mgEAT/g (FAEC) e de $1,507 \pm 0,085$ mg TAE/g (EBF) para $2,688 \pm 0,100$ mg TAE / g (FAEF). Os taninos condensados mostraram diferenças significativas nas duas amostras ($p < 0,05$). O valor mais alto foi exibido pela amostra de folhas (EBF: $48,020 \pm 0,062$ mgECya/g e FAEF: $65,296 \pm 0,577$ mgECya/g).

Os elevados teores de fenóis encontrados neste estudo podem sugerir uma possível actividade antioxidante dos extractos de *Bridelia cathartica*, uma vez que esta actividade geralmente está ligada ao conteúdo fenólico dos extractos. Por essa razão, vários estudos avaliam a relação entre a actividade antioxidante dos produtos vegetais com o seu conteúdo fenólico. Dentro de alguns estudos esta correlação foi encontrada (Zemmouri *et al.*, 2014).

6.2. ACTIVIDADE FARMACOLÓGICA *IN VITRO*

Compostos fenólicos como flavonóides, taninos e outros são considerados principais contribuintes para a capacidade antioxidante e antimicrobiana de diversas plantas medicinais, daí, o crescente interesse em busca de tais substâncias a partir de fontes naturais. Evidências epidemiológicas crescentes do papel de alimentos antioxidantes na prevenção de certas doenças têm conduzido ao desenvolvimento de grande número de métodos para determinação da capacidade antioxidante (Rufino *et al.*, 2007). No presente estudo, diferentes extractos de *Bridelia cathartica* foram usados como fonte de substâncias bioactivas e os seus potenciais antioxidantes e antibacterianos foram quantificados.

Assim sendo, vários métodos são usados para a determinação das propriedades antioxidantes de amostras vegetais (Alam *et al.*, 2013) onde se pode citar, captura do radical livre DPPH (DPPH scavenging activity), degradação de peróxido de hidrogénio (Hydrogen peroxide scavenging assay), sequestro de óxido nítrico (Nitric oxide scavenging activity), sequestro do radical peroxinitrito (Peroxynitrite radical scavenging activity), ensaio TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), ensaio TRAP (Total radical-trapping antioxidant parameter), ensaio FRAP (Ferric reducing-antioxidant power assay), actividade sequestradora de radicais superóxido (Superoxide radical scavenging activity (SOD), actividade sequestradora de radicais hidroxilo (Hydroxyl radical scavenging activity), ensaio HORAC (Hydroxyl radical averting capacity method), ensaio ORAC (Oxygen radical absorbance capacity Method), método de redução do complexo fosfomolibdénico (Phosphomolybdenum method), método de tiocianato férrico (Ferric thiocyanate (FTC) method), método do ácido tiobarbitúrico (Thiobarbituric acid (TBA) method), método DMPD (N,N-dimethyl-p-phenylene diamine dihydrochloride method), método de xantina oxidase (Xanthine oxidase method), método de estimativa de glutathione reduzida (Reduced glutathione (GSH) estimation), ensaio LDL (LDL assay) (Alam, 2013), entre outros. No presente trabalho foram eleitos três métodos, nomeadamente captura do radical livre DPPH, método de redução do complexo fosfomolibdénico e o método de cianeto férrico.

6.2.1. ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE

O poder de redução de extractos vegetais está associado à actividade antioxidante e pode servir de reflexo significativo da actividade antioxidante de amostras testadas. Os compostos com potenciais redutores indicam a sua disponibilidade em doar electrões e podem reduzirem intermediários de biomoléculas como lípidos num estado oxidado (Jayanthi & Lalitha, 2011).

O ensaio de redução do ião férrico, cujo mecanismo químico é mostrado na figura 14 é um dos métodos usados na determinação da capacidade antioxidante dos extractos vegetais ou substâncias puras. Baseia-se no aumento de absorbância da mistura reaccional entre os reagentes e os compostos antioxidantes presentes na amostra. O aumento da absorbância da mistura da reacção indica o poder de redução das amostras. Neste método, os compostos antioxidantes reduzem o ião férrico formando iões ferrosos. Estes por sua vez, reagem com cloreto férrico formando um complexo azul prussiano que absorve a 700 nm (Alam *et al.*, 2013). A capacidade antioxidante foi calculada em relação ao padrão quercetina, contrariamente ao método proposto por Canabady-Rochelle *et al.* (2015) em que usa o ácido ascórbico como substância de referência positiva. A quercetina foi atribuída uma capacidade antioxidante de 100 % e o resultado de poder redutor foi expresso em percentagem (%).

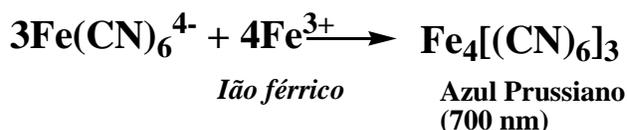
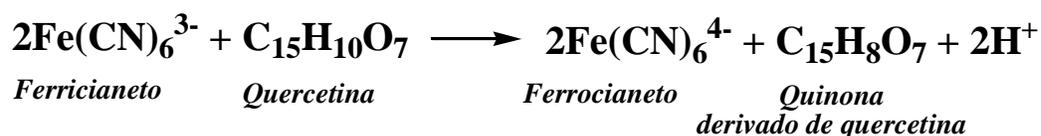


Figura 14. Química envolvida na determinação de poder redutor dos antioxidantes

O valor de absorbância da solução (Ao) azul prussiano foi determinado a uma concentração teórica de 59 μM , correspondente a uma concentração de quercetina de 88,5 μM (1 mol de azul prussiano é produzido por 3/2 mol de quercetina). Assim, a absorbância das amostras medida a 700 nm foi comparada com a absorbância da solução azul prussiano produzida

experimentalmente pela reacção de quercetina 88,5 μM com excesso de ferricianeto e iões férrico.

Todas as amostras analisadas demonstraram uma capacidade redutora e apresentaram diferenças significativas entre si ($p < 0,05$). Os valores mais altos foram experimentados pelo extracto EBC ($89,56 \pm 0,76 \%$) e pela respectiva fracção FAEC ($110,40 \pm 1,02 \%$), sendo esta, amostra que apresentou um poder de redução maior que a do padrão de referência (quercetina). A partição com acetato de etilo mostrou um aumento significativo ($p < 0,05$) do poder redutor das duas amostras analisadas (caules e folhas). Para a amostra de caules, ocorreu um aumento de poder redutor de $89,56 \pm 0,76 \%$ (EBC) para $110,40 \pm 1,02 \%$ (FAEC). Para a amostra de folhas, o poder redutor aumentou de $40,00 \pm 0,98 \%$ (EBF) para $47,51 \pm 0,12 \%$ (FAEF). Em geral, a amostra de caules experimentou maior capacidade redutora em relação a amostra de folhas.

Khaled-Khodja *et al.* (2014) determinaram o poder redutor dos extractos metanólicos de *Ajuga iva*, *Marrubium vulgare*; *Mentha pulegium* e *Teucrium polium* e expressaram o resultado em equivalente de ácido ascórbico (mg/g) e equivalente de quercetina (mg/g) e encontraram uma correlação entre o aumento da concentração com o aumento da capacidade antioxidante dos extractos. A mesma correlação foi encontrada por Jayanthi e Lalitha (2011) durante o estudo de poder redutor dos extractos de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms em diferentes solventes (éter dietílico, acetato de etilo, acetona e extracto aquoso).

A concentração inicial de trabalho para amostras em estudo foi de $500 \mu\text{g/mL}$, alcançando a concentração final no meio reaccional de cerca de $27 \mu\text{g/mL}$, o que significa que se aumentasse a concentração final dos extractos, poderia provocar um aumento de poder redutor (Bhandari e Kawabata, 2004). Os dados encontrados no presente estudo dão indicação da possibilidade de uso de preparados de *B. cathartica* para a redução dos níveis de ferro no organismo, pois, a presença de iões ferroso no organismo podem induzir a produção do radical hidroxilo, espécie altamente reactiva ($t_{1/2}$ igual a 1×10^{-9} s), formada através da reacção de Feton (equação 6), responsável pela oxidação de ADN, modificação de proteínas, peroxidação de lípidos, etc. (Carocho e Ferreira, 2013).

O método de fosfomelibdénio ou ensaio da capacidade antioxidante total, é um método usado na determinação quantitativa da capacidade antioxidante através da formação de complexo

fosfomolibdénico verde. O ensaio baseia-se na redução de molibdénio (VI) a molibdénio (V) por antioxidantes presentes na amostra e subsequente formação da cor verde do complexo fosfomolibdénico (V) a pH ácido (Prieto *et al.*, 2013). A cor verde produzida absorve a um comprimento de onda máximo de 695 nm e portanto pode ser determinada espectrofotometricamente. Todas as amostras analisadas demonstraram uma capacidade antioxidante revelada pela formação, no meio reaccional, da coloração esverdeada do complexo fosfomolibénico (V). Todas as amostras apresentaram diferenças significativas entre si ($p < 0,05$). Os valores mais altos foram encontrados no extracto EBF ($57,88 \pm 0,57$ %) e na respectiva fracção FAEF ($50,51 \pm 0,08$ %). A partição com acetato de etilo mostrou um aumento significativo ($p < 0,05$) da capacidade antioxidante para a amostra de caules, de $42,36 \pm 0,07$ % (EBC) para $45,98 \pm 0,19$ %, e uma redução da actividade antioxidante na amostra de folhas, de $57,88 \pm 0,57$ (EBF) para $50,51 \pm 0,08$ (FAEF).

O modelo para avaliação da actividade antioxidante utilizando DPPH, cujo mecanismo químico é mostrado na figura 15, é baseado na capacidade deste radical em reagir com substâncias doadoras de hidrogénio atómico (H) incluindo compostos fenólicos. A deslocalização do electrão na molécula de DPPH dá origem à cor violeta escura, que absorve na banda de cerca de 517 nm (Alam *et al.*, 2013) e que por acção de um antioxidante (RH) ou uma espécie radicalar ($R\bullet$), muda para coloração amarela, com conseqüente decaimento da absorção, podendo a mesma ser assim monitorada espectrofotometricamente (Sousa *et al.*, 2007; Alam *et al.*, 2013). Dessa forma foram determinadas as percentagens de inibição de diferentes diluições das amostras que posteriormente foram usados para a determinação da curva dose-resposta, a qual possibilitou o cálculo de concentração eficiente.

Todas as amostras analisadas demonstraram uma capacidade redutora do radical livre DPPH e apresentaram diferenças significativas entre si ($p < 0,05$). O menor valor de CE_{50} ($\mu g/mL$) e portanto, maior capacidade de sequestro de radical livre DPPH foi encontrado para extracto EBF ($3,63 \pm 0,12 \mu g/mL$) e pela respectiva fracção FAEF ($4,93 \pm 0,44 \mu g/mL$). A partição com acetato de etilo mostrou um aumento significativo ($p < 0,05$) do valor da CE_{50} das duas amostras analisadas (caules e folhas). Para a amostra do caules, ocorreu um aumento do valor de CE_{50} de $10,45 \pm 0,41 \mu g/mL$ (EBC) para $14,60 \pm 0,06 \mu g/mL$ (FAEC). Enquanto, para a amostra de folhas, o valor de EC_{50} variou de $3,63 \pm 0,12 \mu g/mL$ (EBF) para $4,93 \pm 0,44 \mu g/mL$ (FAEF).

Esta queda de poder de sequestro dos extractos pode ser um indicativo de presença de algumas substâncias nos extractos brutos com capacidade redutora que não tenham afinidade com acetato de etilo, não tendo sido assim separados durante a partição líquido-líquido com acetato de etilo.

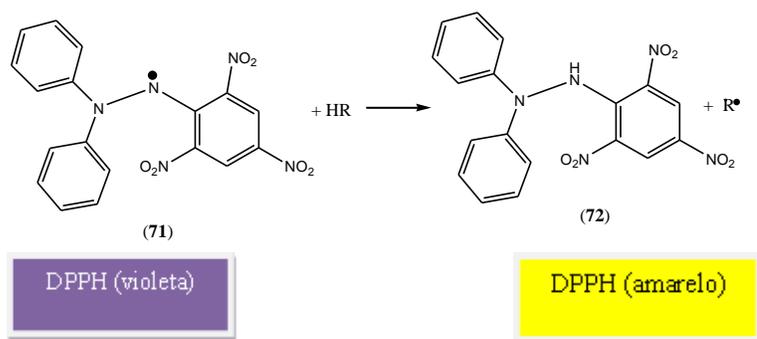


Figura 15. Equação da reacção do DPPH• com substância antioxidante HR

Em geral, os resultados dos testes da actividade antioxidante mostram haverem diferenças significativas em todos os parâmetros avaliados, entre, **EBC** versus **EBF**; **FAEC** versus **FAEF**; **EBC** versus **FAEC**; **EBF** versus **FAEF**. A análise de variância entre os grupos com pacote ANOVA ($p < 0,05$) também mostrou haver diferenças significativas entre as médias das variáveis estudadas.

A partir dos gráficos dose-resposta do teste com DPPH, é possível observar que a actividade sequestradora de radical livre DPPH é concentração-dependente. Ou seja, quanto maior for a concentração, maior é a percentagem de inibição.

A análise dos resultados mostra que as duas amostras (folhas e caules) são dotadas de propriedades antioxidantes interessantes, onde a amostra de folhas mostra-se mais activa nos testes de sequestro de radicais livres DPPH e de redução do complexo fosfomolibdénico, enquanto a amostra de caule mostrou possuir maior poder redutor do ião férrico.

A capacidade antioxidante da substância padrão (quercetina) é maior que a dos extractos ($EC_{50} = 1,495 \pm 0,029 \mu\text{g/mL}$), apesar de ter exibido um menor poder redutor do ião férrico em comparação com o extracto **EBC** ($110,40 \pm 1,02 \%$).

Estudos fitoquímicos quantitativos mostraram presença de maiores teores de substâncias de natureza fenólica em todas as amostras, não havendo diferenças significativas da sua ocorrência em termos totais, diferindo entre si na sua distribuição em termos de grupos químicos. Estas diferenças ditam provavelmente o diferenciado poder antioxidante exibido por cada amostra ora analisada. Desta forma, a actividade antioxidante das folhas e caule de *Bridelia cathartica* ficou evidenciada, o que pode suportar os relatos de usos desta planta como agente antimicrobiano e anti-inflamatório.

Os estudos fitoquímicos das espécies de algumas espécies do género *Bridelia* levaram a identificação de um grande número de polifenóis, triterpenos, glicósidos e ligninas. A tabela I relata as propriedades etnomédicas e a tabela II, componentes fitoquímicos de algumas espécies do género considerados durante o estudo. Nota-se que quase todas as espécies, incluindo a *Bridelia cathartica*, são usadas tradicionalmente como anti-inflamatórios e como antimicrobianos. E muitas vezes, os resultados obtidos durante estudos fitoquímicos e biológicos servem de ferramenta para a validação dos usos tradicionais relatados para cada espécie.

A produção excessiva de EROs leva ao dano de lípidos, proteínas, membranas e ácidos nucleicos e também servir como um importante sinalizador intracelular que amplifica respostas inflamatórias (Filippin *et al.*, 2008). As propriedades antioxidantes demonstradas para extractos de *Bridelia cathartica* podem ter uma contribuição muito importante em processos inflamatórios gerados por EROs, o que pode em parte explicar uso desta espécie como anti-inflamatório.

Diversas substâncias fenólicas são tidas como importantes agentes antioxidantes, esse poder está intimamente associado ao tipo de esqueleto carbónico que eles possuem, que é propício para a estabilização de radicais livres. A actividade antioxidante dos flavonóides por exemplo depende da sua estrutura e o seu poder antioxidante pode ser determinado por, pelo menos cinco factores nomeadamente: reactividade como agente doador de átomo de hidrogénio e do electrão, estabilidade do radical flavanoilo formado, reactividade frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição e solubilidade e interacção com as membranas biológicas (Barreiros *et al.*, 2006). A configuração, a substituição, o número de grupos hidroxilos também influenciam substancialmente nos vários mecanismos da actividade antioxidante (Kumar e Pandey, 2013). Por outro lado, diferentes metabólitos de natureza fenólica têm suas particularidades que podem ditar

uma maior ou menor capacidade antioxidante, não dependendo necessariamente da sua maior ou menor concentração nas amostras.

6.2.2. ACTIVIDADE ANTIBACTERIANA

Os resultados da actividade antibacteriana realizada no presente trabalho estão resumidos na tabela IX e os critérios escolhidos para a caracterização da actividade antibacteriana em função de concentração inibitória mínima foram descritos por Holetz *et al.* (2002). Segundo este, os extractos que exibem uma MIC inferior a 100 $\mu\text{g/mL}$, a actividade destes extractos é considerada boa; de 100 a 500 $\mu\text{g/mL}$, a actividade é moderada, de 500 a 1000 $\mu\text{g/mL}$, a actividade antimicrobiana é fraca; acima de 1000 $\mu\text{g/mL}$ o extracto é considerado inactivo. É claro que esses critérios não são consensuais com os de diferentes autores. Na verdade, alguns autores consideram o valor de 250 $\mu\text{g/mL}$ como forte actividade antimicrobiana (Madureira *et al.*, 2012).

Ensaio realizados a partir dos extractos hidroetanólicos (**EBC** e **EBF**) e fracções acetato de etilo (**FAEC** e **FAEF**) das folhas e caule de *Bridelia cathartica* dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações de 50, 100, 250, 500, 700, 1000 e 2000 $\mu\text{g/mL}$ mostraram considerável actividade contra patógenos humanos gram positivos e gram negativos nomeadamente, *Escherichia coli* ATCC 25922 (gram negativo), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (gram negativo), *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (gram positivo), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (gram positivo) e *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 (gram positivo).

Constituintes polifenólicos, flavonóides, ésteres de fenóis simples entre outros, podem desempenhar importantes actividades antimicrobianas. É o caso da quercetina, rutina, apigenina, entre outros compostos químicos, que possui forte actividade antimicrobiana frente a cepas de bactérias gram positivas e gram negativas (Basile *et al.*, 1999; Orhan *et al.*, 2010). Estudos fitoquímicos de *Bridelia cathartica* realizados por Madureira *et al.* (2011) revelaram a presença desses constituintes para além de alcalóides e terpenos. A análise quimiotaxonômica mostra que os constituintes de natureza fenólica estão presentes em várias espécies do género *Bridelia* e

portanto, diferentes partes (raízes, caules e folhas) podem desempenhar diferentes tipos de actividades biológicas.

Os extractos **EBC** e **EBF** e as respectivas fracções (**FAEC** e **FAEF**) demonstraram actividade antibacteriana moderada contra *Escherichia coli* com concentração inibitória mínima que varia de 300-500 µg/mL. Os mesmos extractos mostraram actividade moderada contra *P. aeruginosa* e *S. aureus*, com a excepção da **FAEF** que demonstrou uma fraca actividade (MIC > 1000 µg/mL) contra *P. aeruginosa* e **EBF** contra *S. aureus*. As espécies *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus pneumoniae* mostraram-se insensíveis para todas as amostras estudadas, e a fracção **FAEF** demonstrou uma melhor actividade antibacteriana contra *S. aureus*.

Preparações das raízes de *Bridelia cathartica* são usadas na medicina tradicional para o tratamento de várias doenças incluindo malária (Ramalhete *et al.*, 2008) e doenças venéreas (Madureira *et al.*, 2011). As folhas e caules são usados no tratamento de doenças intestinais de carácter infeccioso. A actividade antimicrobiana do extracto bruto (metanólico) e fracções (*n*-hexano, diclorometano e acetato de etilo) das raízes foi demonstrada nos trabalhos de Madureira *et al.* (2011) que descreveram uma forte e moderada actividade antibacteriana contra bactérias gram positivas e gram negativas com MIC de 7,5 µg/mL (*S. aureus* e *E. faecalis*), 250 µg/mL (*K. pneumoniae*), 125 µg/mL (*P. aeruginosa*) e 15 µg/mL (*M. smegmatis*) para o extracto bruto respectivamente, 125 µg/mL (*S. aureus*), maior que 250 µg/mL (*E. faecalis*), 250 µg/mL (*K. pneumoniae*), maior que 250 µg/mL (*P. aeruginosa*) e 125 µg/mL (*M. smegmatis*) para a fracção *n*-hexano respectivamente, 125 µg/mL (*S. aureus*), 7,5 µg/mL (*E. fecalis*), 250 µg/mL (*K. pneumoniae*), maior que 250 µg/mL (*P. aeruginosa* e *M. smegmatis*) para a fracção diclorometano respectivamente e, 250 µg/mL (*S. aureus*), 250 µg/mL (*E. fecais*), 250 µg/mL (*K. pneumoniae*), maior que 250 µg/mL (*P. aeruginosa*) e 125 µg/mL e (*M. smegmatis*) para a fracção acetato de etilo respectivamente.

A fracção **FAEF** exibiu uma promissora actividade contra a bactéria gram positiva *S. aureus*, visto que esta fracção exibiu o menor valor de MIC (250 µg/mL), porém, em geral as bactérias gram negativas (*E coli* e *P. aeruginosa*) mostraram-se mais sensíveis em relação as gram positivas, visto que das três bactérias gram positivas testada apenas uma mostrou-se sensível. Os resultados obtidos para as espécies gram negativas podem parcialmente ser explicados pelas

diferenças estruturais e de composição química da parede celular existentes nas células bacterianas.

Analisando os resultados fitoquímicos quantitativos obtidos para os flavonóides e taninos (hidrolisáveis e condensados) das amostras estudadas, fica evidente a ocorrência de teores mais altos no extracto **FAEF**. Este facto pode explicar a forte actividade antimicrobiana associada ao baixo valor de MIC obtido para esta amostra.

Vários relatos sugerem que os flavonóides geralmente têm múltiplos mecanismos de acção antimicrobianos. No entanto, estes mecanismos permanecem largamente desconhecidos para a maioria dos flavonóides, mas sabe-se que eles podem exercer actividade antibacteriana através de ruptura da membrana citoplasmática, inibição da síntese de ácido nucléico, inibição do metabolismo energético, inibição da síntese da parede celular e a inibição da síntese da membrana celular (Xiao *et al.*, 2014). Acredita-se também que a actividade farmacológica dos taninos pode estar associada a sua forte capacidade antioxidante e sequestradora de radicais livres e habilidade em complexar macromoléculas de natureza proteica (enzimas ou proteínas microbianas) ou polissacáridos e iões metálicos (Simões *et al.*, 2004; Cunha *et al.*, 2005).

Os resultados deste estudo podem suportar o facto de esta espécie ser usada na medicina tradicional para o tratamento de várias doenças de natureza infecciosa. Esta correlação pode ser observada na última análise, pelo poder demonstrado por extractos das folhas e caules de *Bridelia cathartica* contra *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

A *Escherichia coli* por exemplo, uma enterobactéria bacilar e anaeróbia facultativa, cujo habitat natural é o lúmen intestinal dos seres humanos e de outros animais de sangue quente, está muitas vezes associada às infecções intestinais e urinárias, o que explica o emprego de preparações desta planta em remédios tradicionais usados no tratamento de diarreia e de doenças venéreas.

Os resultados deste estudo sobre compostos fitoquímicos e actividade antibacteriana da espécie *B. cathartica* são semelhantes aos obtidos por Okeleye *et al.* (2011), Adefuye *et al.* (2011) e Adefuye e Ndip (2013) sobre espécies *B. micrantha*.

7. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

7.1. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem inferir o seguinte:

Todas as amostras estudadas apresentaram quantidades relevantes de fenólicos totais sem nenhuma variação significativa entre si (EBC: $429,114 \pm 5,975$ mgEAG/g, EBF: $427,527 \pm 10,406$ mgEAG/g, FAEC: $435,090 \pm 15,507$ mgEAG/g e FAEF: $436,970 \pm 15,310$ mgEAG/g).

Os elevados teores de fenóis encontrados neste estudo podem sugerir uma possível actividade antioxidante dos extractos de *Bridelia cathartica* ligada ao conteúdo fenólico dos extractos;

Todas as amostras analisadas demonstraram uma capacidade redutora de ião férrico e apresentaram diferenças significativas entre si. Os valores mais altos foram experimentados pelo extracto EBC ($89,56 \pm 0,76$ %) e pela respectiva fracção FAEC ($110,40 \pm 1,02$).

Todas as amostras analisadas demonstraram uma capacidade redutora do complexo fosfomolibdénico e apresentaram diferenças significativas entre si. Os valores mais altos foram encontrados no extracto EBF ($57,88 \pm 0,57$ %) e na respectiva fracção FAEF ($50,51 \pm 0,08$ %).

Todas as amostras analisadas demonstraram uma capacidade redutora do radical livre DPPH e apresentaram diferenças significativas entre si. O menor valor de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) e portanto, maior capacidade de sequestro de radical livre DPPH foi encontrado para extracto EBF ($3,63 \pm 0,12$ $\mu\text{g/mL}$) e pela respectiva fracção FAEF ($4,93 \pm 0,44$ $\mu\text{g/mL}$).

Os extractos **EBC** e **EBF** e as respectivas fracções (**FAEC** e **FAEF**) demonstraram actividade antibacteriana moderada com concentração inibitória mínima que varia de 300-500 $\mu\text{g/mL}$.

Os resultados encontrados no presente estudo permitem validar o uso etnomedicinal da espécie *B. cathartica* como agente antimicrobiano e anti-inflamatório.

7.2. RECOMENDAÇÕES

Os resultados obtidos neste trabalho experimental revelam que a espécie *B. catártica* é uma excelente fonte de compostos bioactivos com propriedades antioxidantes e antimicrobianas, no entanto estes são apenas as primeiras pistas para o início de um longo trabalho de investigação.

O facto de não se conhecer a identidade das moléculas presentes nos diferentes extractos, torna este trabalho um desafio, obrigando a aplicação das mais diversificadas técnicas analíticas que permitirão o seu isolamento e elucidação estrutural. Por outro lado, a actividade biológica de extractos de *B. cathartica* pode ser testada de diferentes modos, por exemplo, será um desafio realizar um estudo fitoquímico guiado por actividade biológica, de modo a permitir a identificação de compostos responsáveis por actividades demonstradas por estes extractos.

Relativamente à capacidade antioxidante um próximo passo poderá passar por testar a capacidade antioxidante em modelos *in vitro*, como por exemplo em células animais, para determinar se existe uma protecção efectiva contra a peroxidação de lípidos.

Poderá ser interessante o estudo da capacidade antimicrobiana com mais estirpes bacterianas e fungos, nomeadamente em patogénos humanos isolados em amostras clínicas bem como a determinação da concentração mínima inibitória dos extractos com recurso a método de diluição.

Desta forma, um passo seguinte neste estudo poderá ser a aplicação de técnicas de separação que permitam uma maior separação dos compostos, como por exemplo técnicas de separação por cromatografia (gasosa ou HPLC), ou o acoplamento destas técnicas a espectroscopia de massa (MS). Como complemento à MS, a RMN (Ressonância Magnética Nuclear) também poderá ser útil para a identificação de moléculas bioactivas.

Tal como referido anteriormente, apesar da presumível presença de polifenóis nos extractos, estamos certos que as actividades bioactivas aqui exploradas poderão estar associadas à presença de outros tipos de moléculas, à semelhança de moléculas já identificadas em outros trabalhos de investigação (Bates *et al.*, 1990; Boonyaratavejet *et al.*, 1992), desta forma, tendo em conta os resultados obtidos, é extremamente pertinente a continuidade deste trabalho de investigação, especialmente no que diz respeito à identificação das moléculas bioactivas. Para nós, este será

provavelmente, o maior desafio futuro, mas também uma janela de oportunidades para desenvolver um trabalho científico relevante e de elevada qualidade científica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alam, M. N., Bristi, N. J., e Rafiquzzaman, M. (2013). Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21, 143–152.
- Aliyu, A. B.; Ibrahim, M. A.; Ibrahim, H.; Musa, A. M.; Lawal, A. Y.; Oshanimi, J.A.; Usman, M.; Abdulkadir, I. E.; Oyewale, A. O.; Amupitan, J. O. (2012). Free radical scavenging and total antioxidant capacity of methanol extract of *Ethulia conyzoides* growing in Nigeria. *Romanian Biotechnological Letters*, 17, 1458-1465.
- Amorim, E. L., Castro, V. T., Melo, J. G., Corrêa, A. J., e Sobrinho, T. J. (2012). Standard Operating Procedures (SOP) for the Spectrophotometric Determination of Phenolic Compounds Contained in Plant Samples. *InTech*, 47-66.
- Ángelo, P. M., e Jorge, N. (2007). Phenolic compounds in foods – A brief review. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 66, 1-9.
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., e Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst Journal*, 127, 183–198.
- Ashok, P. K., e Upadhyaya, K. (2012). Tannins are Astringent. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1, 45-50.
- Awah, Francis M.; Uzoegwu, Peter N.; Ifeonu, Patrick; Oyugi, Julius O.; Yao, John Rutherford XiaoJian; Fehrmann, Frauke; Fowke, Keith R.; e Eze, M. (2012). Free radical scavenging activity, phenolic contents and cytotoxicity of selected Nigerian medicinal plants. *Food Chemistry*, 131, 1279–1286.
- Bakoma, B.; Berké, B.; Eklú-Gadegbeku, K.; Diallo, A.; Agbonon, A.; Aklikokou, K.; Gleassor, M.; e Moore, N. (2012). Total Phenolic Content, Antioxidant Activity and *in vitro* Inhibitory Potential against Key Enzymes Relevant for Hyperglycemia of *Bridelia ferruginea* Extracts. *Research Journal of Phytochemistry*, 6, 120-126 .

- Barbosa, K. B., Costa, N. M., Alfenas, R. d., Paula, S. O., Minim, V. P., e Bressan, J. (2010). Stresse Oxidativo: Conceito, Implicações e Factores Modulatórios. *Revista de Nutrição*, 23, 629-643.
- Barreiros, A. L., David, J. M., e David, J. P. (2006). Stress Oxidativo : Relação entre Geração de Espécies Reactivas de Oxigénio e Defesa do Organismo. *Química Nova*, 29, 113-123.
- Basile, A., Giordano, S., LoÂpez-SaÂez, J. A., e Cobianchi, R. C. (1999). Antibacterial Activity of Pure Flavonoids Isolated from Mosses. *Phytochemistry*, 52, 147-1482.
- Bates, R. B., Boonyaratavej, S., Caldera, S., e Suvannachut, K. (1990). A New Triterpenoid from *Bridelia tomentosa*. *Journal of Natural Products*, 53, 209-2011.
- Batra, P., e Sharma, A. K. (2013). Anti-cancer Potential of Flavonoids: Recent Trends and Future Perspectives. *3 Biotech*, 3, 439-459.
- Battistin, V., Matsuda, L. K., e Macedo, G. A. (2004). Fontes e Aplicações de Taninos e Tanases em Alimentos. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 15, 63-72.
- Bernardes, N. R., Glória, L. L., Nunes, C. R., Pessanha, F. F., Muzitano, M. F., e Oliveira, D. B. (2011). Quantificação dos Teores de Taninos e Fenóis Totais e Avaliação da Atividade Antioxidante dos Frutos de Aroeira. *VÉRTICES*, 13(3), 117-128.
- Bessong, P. O., Rojas, L. B., Obi, L. C., Tshisikawe, P. M., e Igunbor, E. O. (2006). Further Screening of Venda Medicinal Plants for Activity Against HIV Type 1 Reverse Transcriptase and Integrase. *African Journal of Biotechnology*, 5, 526-528.
- Bhandari, M. R., e Kawabata, J. (2004). Organic Acid, Phenolic Content and Antioxidant Activity of *Wild yam* (*Dioscorea* spp.) Tubers of Nepal. *Food Chemistry*, 88, 163-168.
- Bingham, M., Willemen, A., Wursten, B., Ballings, P., e Hyde, M. (26 de Abril de 2015). *Bridelia cathartica* G. Bertol. Obtido em 04 de Julho de 2016, de Flora of Zambia: http://zambiaflora.com/speciesdata/image-display.php?species_id=162760&image_id=1
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., e Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *The World Allergy Organization journal*, 5, 9-19.

- Bochkov, D. V., Sysolyatin, S. V., Kalashnikov, A. I., e Surmacheva, I. A. (2012). Shikimic Acid: Review of its Analytical, Isolation, and Purification Techniques from Plant and Microbial Sources. *Journal of Chemical Biology*, 5, 5-17.
- Bona, E. A., Pinto, F. G., Fruet, T. K., Jorge, T. C., e Moura, A. C. (2014). Comparação de Métodos para Avaliação da Actividade Antimicrobiana e Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de Extractos Vegetais Aquosos e Etanólicos. *Arquivos do Instituto Biológico*, 81, 218-225.
- Boonyaratavej, S., Tantayanontha, S., Kitchanachai, P., Chaichantipyuth, C., Chittawong, V., e Miles, D. H. (1992). Trans-Triacontyl-4-hydroxy-3-methoxycinnamate, a New Compound from the Thai Plant *Bridelia ovata*. *Journal of Natural Products*, 55, 1761–1763.
- Brown, J. E., Khodr, H., Hider, R. C., e Rice-Evans, C. A. (1998). Structural Dependence of Flavonoid Interactions With Cu^{2+} ions: Implications. *Biochemical Journal*, 330, 1173–1178.
- Buzzini, P., Arapitsas, P., Goretti, M., Branda, E., Turchetti, B., Pinelli, P., Patrizia; I., F.; e Romani, A. (2008). Antimicrobial and Antiviral Activity of Hydrolysable Tannins. *Antimicrobial and Antiviral Activity of Hydrolysable Tannins*, 8, 1179-1187.
- Canabady-Rochelle, L. L., Harscoat-Schiavo, C., Kessler, V., Aymes, A., Fournier, F., e Girardet, J.-M. (2015). Determination of Reducing Power and Metal Chelating Ability of Antioxidant Peptides: Revisited Methods. *Food Chemistry*, 183, 129–135.
- Cao, G., Sofic, E., e Prior, R. L. (1997). Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. *Free Radical Biology & Medicine*, 22, 749–760,.
- Carocho, M., e Ferreira, I. C. (2013). A Review on Antioxidants, Prooxidants and Related Controversy: Natural and Synthetic Compounds, Screening and Analysis Methodologies and Future Perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25.

- Chinaka, N., e Nkeiruka, U. (2011). Screening of Ethyl Acetate Extract of *Bridelia micrantha* for Hepatoprotective and Anti-Oxidant Activities on Wistar rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4, 796-798.
- Choi, Y., Jeong, H.-S., e Lee, J. (2007). Antioxidant Activity of Methanolic Extracts from Some Grains Consumed in Korea. *Food Chemistry*, 103, 130–138.
- Clarkson, P. M., e Thompson, H. S. (2000). Antioxidants: What Role do They Play in Physical Activity and Health? *American Journal of Clinical Nutrition*, 72, 637S–46S.
- Coutinho, M. A., Muzitano, M. F., e Costa, S. S. (2009). Flavonóides: Potenciais Agentes Terapêuticos para o Processo Inflamatório. *Revista Virtual de Química*, 1, 241-256.
- Cushnie, T. T., e Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial Activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 343–356.
- Cushnie, T. T., e Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial Activity of Flavonoids. *Int J Antimicrob Agents*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 343–356.
- Dinis, T. C., Madeira, V. M., e Almeida, L. M. (1994). Action of Phenolic Derivatives (Acetaminophen, Salicylate, and 5-Aminosalicylate) as Inhibitors of Membrane Lipid Peroxidation and as Peroxyl Radical Scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315, 161-169.
- Do, Q. D.; Angkawijaya, A. E.; Tran-Nguyen, P. L.; Huynh, L. H.; Soetaredjo, F. E., Ismadji, S.; e Ju, Y-H. (2014). Effect of Extraction Solvent on Total Phenol Content, Total Flavonoid Content, and Antioxidant Activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22, 296-302.
- Farjana, A., Zerín, N., e Kabir, S. (2014). Antimicrobial Activity of Medicinal Plant Leaf Extracts Against Pathogenic Bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4, S920-S923.
- Ferreira, I. C., e Abreu, R. M. (2007). Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. *Sociedade Portuguesa de BioAnalistas da Saúde*, 4, 32-39.

- Filippin, L. I., Vercelino, R., Marroni, N. P., e Xavier, R. M. (2008). Influência de Processos Redox na Resposta Inflamatória da Artrite Reumatóide. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 48, 17-24.
- Flora, S. J. (2009). Structural, Chemical and Biological Aspects of Antioxidants for Strategies Against Metal and Metalloid Exposure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2, 191-206.
- Freeman, B. A., e Crapo, J. D. (1982). Biology of Disease. Free Radicals and Tissue Injury. *International Academy of Pathology*, 47, 412-426.
- Gordon, M. H. (1996). Dietary antioxidants in disease prevention. *Natural Product Reports*, 13, 265-273.
- Green, E., Obi, L. C., Samie, A., Bessong, P. O., e Ndip, R. N. (2011). Characterization of n-Hexane Sub-fraction of *Bridelia micrantha* (Berth) and its Antimycobacterium Activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11, 1472-6882.
- Grotewold, E. (2006). *The Science of Flavonoids*. New York: Springer Science Business Media, Inc.
- Gülçin, İ. (2006). Antioxidant Activity of Caffeic Acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 217, 213–220.
- Gurnani, N., Gupta, M., Mehta, D., e Mehta, B. K. (2015). Chemical composition, Total Phenolic and Flavonoid Contents, and *in vitro* Antimicrobial and Antioxidant Activities of Crude Extracts from Red Chilli Seeds (*Capsicum frutescens* L.). *Journal of Taibah University for Science*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtusci.2015.06.011>.
- Halliwell, B. (1995). How to characterize an antioxidant: an update. *Biochem Soc Symp*, 61, 73–101.
- Halliwell, B., e Whiteman, M. (2004). Measuring Reactive Species and Oxidative Damage *in vivo* and in Cell Culture: How Should You Do it and What Do the Results Mean? *British Journal of Pharmacology*, 142, 231–255.

- Halliwell, B., Gutteridge, J., e Cross, C. (1992). Free Radicals, Antioxidants, and Human Disease: Where are We Now? *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 119, 598-620.
- Holetz, F. B., Pessini, G. L., Sanches, N. R., Cortez, D. A., Nakamura, C. V., e Filho, B. P. (2002). Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97, 1027-1031.
- Iqbal, E., Salim, K. A., e Lim, L. B. (2015). Phytochemical Screening, Total Phenolics and Antioxidant Activities of Bark and Leaf Extracts of *Goniothalamus velutinus* (Airy Shaw) from Brunei Darussalam. *Journal of King Saud University-Science*, 27, 224-232.
- iSPot share nature*. (08 de Junho de 2014). Obtido em 04 de Julho de 2016, de The Open University: <http://www.ispotnature.org/node/587649?nav=related>
- Jash, S. K., e Brahmachari, G. (2013). Recent Progress in the Research of Naturally Occurring Flavonoids: A Look Through. *Journal Organic Biomolecular Chemistry*, 1, 65-168.
- Jayanthi, P., e Lalitha, P. (2011). Reducing Power of The Solvent Extracts of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3, 126-128.
- Júnior, L. R., Höehr, N. F., Vellasco, A. P., e Kubota, L. T. (2001). Sistema Antioxidante Envolvendo o Ciclo Metabólico da Glutathione Associado a Métodos Electroanalíticos na Avaliação do Stresse Oxidativo. *Química Nova*, 24, 112-119.
- Jurga, A., Tomás, T., e Pividalb, J. (1991). Antimalarial Activity of Some Plant Remedies in Use in Marracuene, Southern Mozambique. *Journal of Ethnopharmacology*, 33, 79-83.
- Kand'ár, R., Žáková, P., e Mužáková, V. (2006). Monitoring of Antioxidant Properties of Uric Acid in Humans for a Consideration Measuring of Levels of Allantoin in Plasma by Liquid Chromatography. *Clinica Chimica Acta*, 365, 249-256.
- Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., e Jukic, M. (2006). Screening of 70 Medicinal Plant Extracts for Antioxidant Capacity and Total Phenols. *Food Chemistry*, 94, 550-557.

- Kbraunsd, e Taylo, R. (25 de March de 2016). *Observations in the Species: Bridelia cathartica* subsp. *cathartica*. Obtido em 20 de January de 2016, de iSpot shere nature: <https://www.ispotnature.org/species-dictionaries/sanbi/Bridelia%20cathartica%20subsp.%20cathartica>
- Khaled-Khodjaa, L., Boulekbache-Makhlouf, L., e Madani, K. (2014). Phytochemical Screening of Antioxidant and Antibacterial Activities of Methanolic Extracts of Some Lamiaceae of Methanolic Extracts of Some Lamiaceae. *Industrial Crops and Products*, 61, 41-48.
- Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., e Možina, S. S. (2010). Evaluation of Diffusion and Dilution Methods to Determine the Antibacterial Activity of Plant Extracts. *Journal of Microbiological Methods*, 81, 121–126.
- Krimmel, B., Swoboda, F., Solar, S., e Reznicek, G. (2010). OH-radical Induced Degradation of Hydroxybenzoic and Hydroxycinnamic Acids and Formation of Aromatic Products—A Gamma Radiolysis Study. *Radiation Physics and Chemistry*, 79, 1247-1254.
- KT, C., TY, W., CI, W., YW, H., e Y., L. (1998). Tannins and Human Health: a Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 421-64.
- Kumar, S., e Pandey, A. K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 2013, 1-16. <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2013/162750/>
- Lattanzio, V. (2013). Phenolic Compounds: Introduction. Natural Products, *Springer - International Publisher Science, Technology, Medicine* 1,1 544-1573.
- Levine, R. L.; Garland, D.; Oliver, Cynthia N.; Amici, A.; Climentn, I.; Lenz, A.; Ahn, B.-W.; Shaltiel, S. e Stadtman, E. R. (1990). Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. *Methods in Enzymology*, 186, 464–478.
- Liang, L., Wua, X., Zhaob, T., Zhaob, J., Lib, F., Zoua, Y.; Maob, G. e Yanga, L. (2012). *In vitro* Bioaccessibility and Antioxidant Activity of Anthocyanins from Mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) Following Simulated Gastro-intestinal Digestion. *Food Research International*, 46, 76-86.

- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., e Chandra, N. (2010). Free Radicals, Antioxidants and Functional Foods: Impact on Human Health. *Pharmacognosy Reviews*, 4, 118-126. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3249911/#!po=2.77778>.
- Machado, H., Nagem, T. J., Peters, V. M., Fonseca, C. S., e Oliveira, T. T. (2008). Flavonóides e Seu Potencial Terapêutico. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução*, 27, 33-39.
- Madureira, A. M., Ramalhet, C., Mulhovo, S., Duarte, A., e Ferreira, M.-J. U. (2011). Antibacterial Activity of Some African Medicinal Plants Used Traditionally Against Infectious Diseases. *Pharmaceutical Biology*, 1-9.
- Marnett, L. J. (2000). Oxyradicals and DNA Damage. *Journal of Carcinogenesis*, 21, 361-370.
- Michalak, A. (2006). Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 4, 523-530.
- Monteiro, J. M., Albuquerque, U. P., e Lima, E. (2005). Taninos: uma Abordagem da Química à Ecologia. *Química Nova*, 28, 892-896.
- Mueller-Harvey, I. (2001). Analysis of Hydrolysable Tannins. *Animal Feed Science and Technology*, 91, 3-20.
- Nabyla K.-K.; Lila B.-M.; e Khodir M. (2014). Phytochemical Screening of Antioxidant and Antibacterial Activities of Methanolic Extracts of Some Lamiaceae. *Industrial Crops and Products*, 61, 41-48.
- Naczka, M., e Shahidib, F. (2004). Extraction and Analysis of Phenolics in Food. *Journal of Chromatography A*, 1054, 95-111.
- Natella, F., Nardini, M., Felice, M. D., e Scaccini, C. (1999). Benzoic and Cinnamic Acid Derivatives as Antioxidants: Structure-Activity Relation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1453-1459.
- Ngueyema, T., Brusotti, G., Caccialanza, G., e Finzi, P. V. (2009). The Genus *Bridelia*: A Phytochemical and Ethnopharmacological Review. *Journal of Ethnopharmacology*, 124, 339-349.

- Ngueyema, T., Brusotti, G., Marrubini, G., Grisoli, P., Dacarro, C., Vidari, G., Finzi, P.; e Caccialanza, G. (2008). Validation of Use of a Traditional Remedy From *Bridelia grandis* (Pierre ex Hutch) stem bark against oral Streptococci. *Journal of Ethnopharmacology*, 120, 13-16.
- Nijveldt, R. J., Nood, E. v., Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Norren, K. v., e Leeuwen, P. A. (2001). Flavonoids: a Review of Probable Mechanisms of Action and Potential Applications. *The American Journal for Clinical Nutrition*, 74, 418–425.
- Olthof, M. R., Hollman, P. C., e Katan, M. B. (2001). Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Are Absorbed in Humans. *The American Society for Nutritional Sciences*, 131, 67-71.
- Omeh, Y. N., Onoja, S. O., Ezeja, M. I., e Okwor, P. O. (2014). Subacute Antidiabetic and *in vivo* Antioxidant Effects of Methanolic Extract of *Bridelia micrantha* (Hochst Baill) Leaf on Alloxan-Induced Hyperglycaemic Rats. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 11, 95-105.
- Omolo, O. J., Chhabra, S. C., e Nyagah, G. (1997). Determination of Iron Content in Different Parts of Herbs used Traditionally for Anaemia Treatment in East Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 58, 97–102.
- Orhan, D. D., Özçelik, B., Özgen, S., e Ergun, F. (2010). Antibacterial, Antifungal, and Antiviral Activities of some Flavonoids. *Microbiological Research*, 165, 496–504.
- Ozcan, T., Akpınar-Bayizit, A., Yilmaz-Ersan, L., & Delikanli, B. (2014). Phenolics in Human Health. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 5, 393-396.
- Özçelik, B., e Orhan, D. D. (2008). Antimicrobial Activity of Flavonoids against Extended-Spectrum β -Lactamase (ES β L)-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7, 1151-1157.
- Paiva, S. A., e Russell, R. M. (1999). β -Carotene and Other Carotenoids as Antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition*, 18, 426-433.
- Palace, V. P., Khaper, N., Qin, Q., e Singal, N. a. (1999). Antioxidant Potentials of Vitamin. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 746–761.

- Pegel, K. H., & Rogers, C. B. (1968). Constituents of *Bridelia micrantha*. *Phytochemistry*, 7, 655-656.
- Pereira, F., Madureira, A. M., Sancha, S., Mulhovo, S., Duarte, X. L., e Ferreira, M.-J. U. (2016). *Cleistoclamys kirkii* Chemical Constituents: Antibacterial Activity and Synergistic Effects Against Resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Ethnopharmacology*, 178, 180–187.
- Pooja, V., e Sunita, M. (2014). Antioxidants and Disease Prevention. *International Journal of Advanced Scientific and Technical Research*, 2, 903-911.
- Prasad, A. S., Beck, F. W., Bao, B., Fitzgerald, J. T., Snell, D. C., Steinberg, J. D., Joel D; e Cardozo, L. J. (2007). Zinc Supplementation Decreases Incidence of Infections in the Elderly: Effect of Zinc on Generation of Cytokines and Oxidative Stress. *American Journal of Clinical Nutrition*, 85, 837–44.
- Prieto, P., Pineda, M., e Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific
- Prior, R. L., Wu, X., e Schaich, A. K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.
- Procházková, D., Boušová, I., & Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and Prooxidant Properties of Flavonoids. *Fitoterapia*, 513–523.
- Ramalhete, C., Lopes, D., Mulhovo, S., Rosário, V. E., e Ferreira, M. J. (2008). Antimalarial Activity Of Some Plants Traditionally Used In Mozambique. *Workshop Plantas Mediciniais e Fitoterapêuticas nos Trópicos. IICT /CCCM*, 1-9.
- Ramesh, N., Viswanathan, M., Saraswathy, A., Brindha, P., Balakrishna, K., e Lakshmanaperumalsamy, P. (2002). Antibacterial activity of luteoforol from *Bridelia crenulata*. *Fitoterapia*, 73, 409–411.

- Ramesha, N., Viswanathan, M., Saraswathy, A., Balakrishna, K., Brindha, P., e Lakshmanaperumalsamy, P. (2001). Phytochemical and Antimicrobial Studies of *Bridelia crenulata*. *Pharmaceutical Biology*, 39, 460-464.
- Rao, Y. K., Fang, S.-H., e Tzeng, Y.-M. (2005). Anti-inflammatory Activities of Flavonoids Isolated from *Caesalpinia pulcherrima*. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 249–253.
- Rashid, M. A., Gustafson, K. R., II, J. H., e Boyd, M. R. (2000). A New Podophyllotoxin Derivative from *Bridelia ferruginea*. *Natural Product Letters*, 14, 285-292.
- Rathee, P., Chaudhary, H., Rathee, S., Rathee, D., Kumar, V., e Kohli, K. (2009). Mechanism of Action of Flavonoids as Anti-inflammatory Agents: A Review. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*, 8, 229-235.
- Reddy, M. K., Gupta, S. K., Jacob, M. R., Khan, S. I., e Ferreira, D. (2007). Antioxidant, Antimalarial and Antimicrobial Activities of Tannin-Rich Fractions, Ellagitannins and Phenolic Acids from *Punica granatum* L. *Planta Med*, 73, 461-467.
- Regine, G., Ben Younes, S., Ghazghazi, H., e Ben Salem, R. (2013). Investigation into the Biological Activities and Chemical Composition of *Calendula officinalis* L. growing in Tunisia. *International Food Research Journal*, 20, 3001-3007.
- Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., e Lei Zhu, L. Z. (2003). Flavonoids: Promising Anticancer Agents. *Medicinal Research Reviews*, 23, 519-534.
- Rhazi, N., Hannache, H., Oumam, M., Sesbou, A., Charrier, B., Pizzi, A.; Bouhtoury, F. Charrier, E. (2015). Green Extraction Process of Tannins Obtained from *Moroccan Acacia mollissima* barks by microwave: Modeling and Optimization of the process Using the Response Surface Methodology RSM. *Arabian Journal of Chemistry*, 1-17.
- Ribeiro, S. M., Queiroz, J. H., Pelúzo, M. D., Costa, N. B., Matta, S. L., e Queiroz, M. E. (2005). A Formação e os Efeitos das Espécies Reactivas de Oxigênio no Meio Biológico. *Bioscience Journal*, 21, 133-149.

- Rufino, M. D., Alves, R. E., Brito, E. S., Morais, S. M., Sampaio, C. d., Pérez-Jiménez, J., e Saura-Calixto, F. (2007). Metodologia Científica: Determinação da Actividade pela Captura do Radical Livre DPPH. *Comunicado Técnico Online*, 1-4.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., e Remésy, C. (2005). Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 287–306.
- Schofield, P., Mbugua, D., e Pell, A. (2001). Analysis of Condensed Tannins: a Review. *Animal Feed Science and Technology*, 91, 21–40.
- Serafini, M., Peluso, I., e Raguzzini, A. (2010). Antioxidants and the Immune System. *3rd International Immunonutrition Workshop*. 69, pp. 273–278. Platja D’Aro, Girona, Spain: Proceedings of the Nutrition Society.
- Sihema, D., Samiaa, D., Gaetano, P., Sara, L., Giovannic, M., Hassiba, C., Laurad, G.; e Nouredine, H. (2015). *In vitro* Antioxidant Activities and Phenolic Content in Crop Residues of Tunisian Globe Artichoke. *Scientia Horticulturae*, 190, 128–136.
- Simões, C. M., Scbenkel, E. P., Gosmann, G., Mello, J. C., Mentz, L. A., e Petrovick, P. R. (2004). *Farmacognosia. Da Planta ao Medicamento* (5a ed.). Porto Alegre: UFRGS Editora.
- Sorg, O. (2004). Oxidative stress: A theoretical model or biological reality? *Comptes Rendus Biologies*, 327, 649–662.
- Sousa, C. M., Silva, H. R., Vieira-Jr., G. M., Ayres, M. C., Charllyton Luis S. da Costa, D. S., Barros, E. D., Araújo, P.; e Brandão, M. (2007). Fenóis Totais e Actividade Antioxidante de Cinco Plantas Medicinais. *Quima Nova*, 30, 351-355.
- Sousa, J. P., Furtado, N. A., Jorge, R., Soares, A., e Bastos, J. (2007). Perfís Físico-Químico e Cromatográfico de Amostras de Própolis Produzidas nas Microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 17, 85-93.
- Souza, W. (2008). Estudo Químico e das Actividades Biológicas dos Alcalóides Indólicos de *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae – (Agoniada). Curitiba: Universidade Federal de paraná. Tese de Doutorado.

- Squadrito, G. L., e Pryor, W. A. (1998). Oxidative Chemistry of Nitric Oxide: the Roles of Superoxide, Peroxynitrite, and Carbon Dioxide. *Free Radical Biology & Medicine*, 25, 392–403.
- Steenvoorden, D., e Henegouwen, G. M. (1997). The Use of Endogenous Antioxidants to Improve Photoprotection. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 41, 1-10.
- Sueyoshi, E., Liu, H., Matsunami, K., Otsuka, H., e Shinzato, T. (2007). Bridelioside, a New Lignan Glycoside from *Bridelia glauca* Bl. f. *balansae* (Tucht.) Hatusima. *Journal of Natural Medicines*, 61, 468-471.
- Surveswaran, S., Cai, Y.-Z., e Corke, H. (2007). Systematic Evaluation of Natural Phenolic Antioxidants from 133 Indian Medicinal Plants. *Food Chemistry*, 102, 938-953.
- Taiwo, B. J., e Igbeneghu, O. (2014). Antioxidant and Antibacterial Activities of Flavonoid Glycosides from *Ficus Exasperata* Vahl-Holl (Moraceae) Leaves. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines*, 11, 97-101.
- Tapas, A., Sakarkar, D., e Kakde, R. (2008). Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7, 1089-1099.
- Tereschuk, M. L., Riera, M. V., Castro, G. R., e Abdala, L. (1997). Antimicrobial Activity of Flavonoid from Leaves of *Tagetes Minuta*. *Journal of Ethnopharmacology*, 56, 227–232.
- Thakura, G. S., Bag, M., Sanodiya, B. S., Bhadauriya, P., Debnath, M., Prasad, G., e Bisen, P. (2009). *Momordica balsamina*: A Medicinal and Nutraceutical Plant for Health Care Management. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10, 667-682.
- Tsai, Y.-H., Chen, I.-S., e Tsai, L.-L. (2003). New Long-Chain Esters and Adenine Analogs from the Leaves of Formosan *Bridelia balansae*. *Helvetica Chimica Acta*, 83, 2452–2457.
- Turunen, M., Olsson, J., e Dallner, G. (2004). Metabolism and Function of Coenzyme Q. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1660, 171-199.

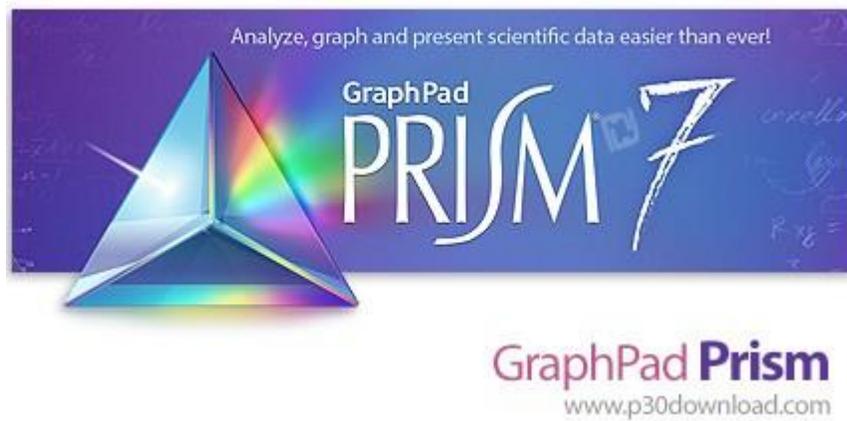
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., e Telser, J. (2006). Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. *Biochem Cell Biol*, 39, 44-84.
- Viegas, C., Bolzani, V. d., e Barreiro, E. (2006). Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. *Química Nova*, 29, 326-337.
- Waterhouse, A. (08 de Agosto de 2012). *Waterhouse Lab*. Obtido em 17 de Julho de 2015J, de University of California: <http://waterhouse.ucdavis.edu/faqs/folin-ciocalteau-micro-method-for-total-phenol-in-wine>
- Welch, K. D., Davis, T., Eden, M. E., & Aus, S. (2002). Deleterious Iron-mediated Oxidation of Biomolecules. *Free Radical Biology and Medicine*, 32, 577–583.
- Weta, H. D., Nzamaa, V., e Vuurenb, S. (2012). Medicinal Plants Used for the Treatment of Sexually Transmitted Infections by Lay People in Northern Maputaland, KwaZulu–Natal Province, South Africa. *South African Journal of Botany*, 78, 12-20.
- Wiese, L. (2008). Avaliação de Actividade Antioxidante e Antiinflamatória de Extracto e Fracções de *Alternanthera tenella* Colla. In P. d.-G. Centro de Ciências da Saúde, *Dissertação de Mestrado*. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina.
- Willis, R. B., e Allen, P. (1998). Improved method for measuring hydrolyzable tannins using potassium iodate. *Analyst*, 123, 435-439.
- Wilson, T. C., e Hagerman, A. (1990). Quantitative Determination of Ellagic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 1678–1683.
- Xiao, Z.-T., Zhu, Q., e Zhang, H.-Y. (2014). Identifying Antibacterial Targets of Flavonoids by Comparative Genomics and Molecular Modeling. *Open Journal of Genomics*, 13. <http://rossscience.org/ARTICLE/OJGEN-3-1.php>
- Yang, Y.; Xiu, J.; Liu, J.; Zhang, L.; Li, X.; Xu, Y.; Qin, C., e Zhang, L. (2013). Chebulagic Acid, a Hydrolyzable Tannin, Exhibited Antiviral Activity *in Vitro* and *in Vivo* Against Human Enterovirus 71. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 9618-9627.

- Yao, L. H.; Jiang, Y. M.; Shi, J.; Tomas-Barberán, F. A.; Datta, N.; Singanusong, R., e Chen, S. S. (2004). Flavonoids in Food and Their Health Benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59, 113–122.
- Yu, Z., e Dahlgren, R. A. (2000). Evaluation of Methods for Measuring Polyphenols in *Conifer foliage*. *Journal of Chemical Ecology*, 26, 2119-2140.
- Zemmouri, H.; Ammar, S.; B., Amel; Messarah, M.; Feki, A., e Bouaziz, M. (2014). Chemical Composition and Antioxidant Activity of *Borago officinalis* L. Leaf Extract Growing in Algeria. *Arabian Journal of Chemistry*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.11.059>
- Zhang, L.-L., Lin, Y.-M., Zhou, H.-C., Wei, S.-D., e Chen, J.-H. (2010). Condensed Tannins from Mangrove Species *Kandelia candel* and *Rhizophora mangle* and Their Antioxidant Activity. *Molecules*, 15, 420-431.

9. ANEXOS

ANEXO 1:

GRAPHPAD PRISM



GraphPad Prism - [Project Name]

File Edit View Insert Change Arrange Window Help

Prism File Sheet Undo Clipboard Analysis Change Import Draw Write Text Export Print Send LA Help

Family Search results Data Tables Unpaired t test data Info Project info 1 Results Graphs Unpaired t test data Layouts Floating Notes Data with notes

	Group A	Group B
	Male	Female
	Y	Y
1	54	43
2	23	34
3	45	65
4	54	77
5	45	46
6		65
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		

Group I Group J Group K Group L Group M

Title Title Title Title Title

Y Y Y Y Y

Parameters: t tests (and Nonparametric Tests)

Experimental Design Options

Experimental design

Unpaired

Paired

	A	B
	Control	Treated
	Y	Y
1		
2		
3		
4		
5		

Assume Gaussian distribution?

Yes. Use parametric test.

No. Use nonparametric test.

Choose test

Unpaired t test. Assume both populations have the same SD

Unpaired t test with Welch's correction. Do not assume equal SDs

Learn Cancel OK

Unpaired t test data Row --, B: Female Selected: Rows 500000, Columns 1

開始 GraphPad Prism - [Pro... GraphPad Statistics Gu... SoftHome

ANEXO 2:

PUBLICAÇÃO RESULTANTE

Sky Journal of Microbiology Research Vol. 5(2), pp. 018 - 026, March, 2017
Available online <http://www.skyjournals.org/SJMR>
ISSN 2315-876X ©2017 Sky Journals

Full Length Research Paper

Antioxidant and antibacterial activity of leaves and stem extracts of *Bridelia cathartica* Bertol

Paulo Cumbane^{1,2} and François Munyemana^{1*}

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, Eduardo Mondlane University, Av. Julius Nyerere Nr 3453, P. O. Box 257, Maputo, Mozambique.

²Higher Institute of Science and Technology of Mozambique (ISCTEM), School of Health, Pharmacy Course, Rua 1394-Zona da FACIM, 322-Maputo, Mozambique.

Accepted 8 April, 2017

The *Bridelia cathartica* Bertol (Euphorbiaceae) species is used in Mozambican folk medicine for the treatment of various ailments including infectious and inflammatory diseases, but scientific investigations aiming to determine its therapeutic potential are scarce. In the present study, the total phenolics, antioxidant and antibacterial activities of the crude hydroethanolic extracts and ethyl acetate fractions of the leaves and stem of *B. cathartica* were determined using standard procedures. The phenolics found did not show significant variations in the different analyzed samples ($p < 0.05$) and showed maximum values of 435.090 ± 15.507 and 436.970 ± 15.310 milligrams of gallic acid equivalents (mgGAE) per gram of the dry extract for the samples of stem and leaves respectively. The highest antioxidant activity was exhibited by the leaves sample in the DPPH method ($EC_{50} = 3.63 \pm 0.12 \mu\text{g/mL}$) and phosphomolybdenum complex method ($57.88 \pm 0.57\%$). Most of the extracts and fractions from leaves and stem exhibited remarkable antibacterial activity with predominance of minimum inhibitory concentration (MIC) values between 250 - 500 $\mu\text{g/mL}$. The results found in this study reveal high levels of phenolic compounds as well as a potent antioxidant effect and considerable antibacterial activity, which may justify the use of this plant in traditional medicine for the treatment of various infectious and inflammatory diseases.

Key words: Total phenolics, antibacterial, DPPH, *Bridelia cathartica*, extracts antioxidant.

INTRODUCTION

The history of the development of human societies has always been intimately linked to people's use of the natural resources at their disposal. It was from these resources that different people, through the observation of animals and experimentation, through the method of trial and error, were selecting useful plants for their diverse needs (Cunha, 2005). Therefore, the search for relief and cure of diseases by ingestion of herbs and leaves may have been one of the first purpose for using natural products (Viegas et al., 2006). Medicinal plants are believed to be an important source of new chemical substances with potential therapeutic effects (Vashvaei et al., 2015). The extracts and essential oils of many herbs

have been shown to exert biological activity *in vitro* and *in vivo*, which justifies research on traditional medicine focused on the characterization of their antimicrobial activity. The therapeutic benefit of plants is often attributed to their antimicrobial and antioxidant properties (Burt, 2004; Jafari et al., 2014; Keykavousi et al., 2016). Plants are rich in a wide variety of secondary metabolites such as tannins, alkaloids and flavonoids, which have been found *in vitro* to have antimicrobial properties (Bajpai et al., 2005; Vashvaei et al., 2015). Many medicinal plants contain large amounts of antioxidants such as polyphenols, which can play an important role in adsorbing and neutralizing free radicals, quenching singlet and triplet oxygen, or decomposing peroxides. Many of these phytochemicals possess significant antioxidant capacities that are associated with lower occurrence and lower mortality rates of several human

*Corresponding author. E-mail: munyfranc@yahoo.co.uk or francoism@uem.mz. Tel.: +258823175440.