



ANÁLISE FITOQUÍMICA E ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE EXTRATOS DE *Millettia aurea* SOBRE *Neisseria gonorrhoeae*

IN VITRO PHYTOCHEMICAL AND ANTIBACTERIAL ANALYSIS OF *Millettia aurea* EXTRACTS ON *Neisseria gonorrhoeae*

*Eduardo Priceiro
Lázaro Gonçalves Cuinica
Universidade Rovuma – Moçambique*

RESUMO

Os alcaloides, flavonoides, taninos e saponinas pertencem aos metabólitos secundários cuja atividade principal é defender e proteger as plantas que foram produzidas. Este trabalho tem por objetivo analisar as substâncias bioativas dos extratos da *Millettia aurea* com potencial inibitória sobre bactérias causadoras de doenças de transmissão sexual com enfoque na gonorreia. Os métodos utilizados foram analíticos que consistiu na identificação dos alcaloides, flavonoides, taninos e saponinas, através da exibição da coloração e formação de precipitado assim como o método espectrofotométrico UV/VIS para a quantificação dos mesmos. A análise antibacteriana foi feita *in vitro*, onde *Neisseria gonorrhoeae* foi cultivado no meio agar MacConkey e incubado durante 1 dia. Mediu-se os hallos de inibição e percentagem de letalidade. A concentração inibitória mínima foi determinada através da menor concentração dos extratos que inibiu completamente o crescimento bacteriano. A raiz da *M. aurea* exibiu a presença de alcaloides, flavonoide e taninos, sendo os alcaloides, com maior concentração. Para o extrato aquoso das folhas da mesma planta também apresentou os metabólitos acima mencionados com vantagem máxima em termos de concentrações, os flavonoides. Os metabólitos secundários da planta já identificados têm uma relação com atividade antibacteriana *Neisseria gonorrhoeae*¹.

Palavras-chave: Extratos de *Millettia aurea*, análise fitoquímica, atividade antimicrobiana, gonorreia.

¹ Esta pesquisa não recebeu financiamento



ABSTRACT

Alkaloids, flavonoids, tannins and saponins belong to secondary metabolites whose main activity is to defend and protect the plants that have been produced. This work aims to analyze the bioactive substances from *Millettia aurea* extracts with inhibitory potential on bacteria causing sexually transmitted diseases with a focus on gonorrhea. The analytical methods used were the identification of alkaloids, flavonoids, tannins and saponins, through the display of colour and precipitate formation, as well as the UV / VIS spectrophotometric method for their quantification. Antibacterial analysis was performed *in vitro*, where *Neisseria gonorrhoeae* was grown on MacConkey agar and incubated for 1 day. The levels of inhibition and percentage of lethality were measured. The minimum inhibitory concentration was determined through the lowest concentration of the extracts that completely inhibited bacterial growth. The *Millettia aurea* root showed the presence of alkaloids, flavonoids and tannins, with alkaloids being the most concentrated. For the aqueous extract of the leaf of the same plant it also presented the metabolites mentioned above with maximum advantage in terms of concentrations, the flavonoids. The secondary metabolites of the plant already identified have a relationship with antibacterial activity *Neisseria gonorrhoeae*.

Keywords: *Millettia aurea* extracts, phytochemical analysis, antimicrobial activity, gonorrhea.

INTRODUÇÃO

Desde os tempos remotos, o homem sempre buscou a natureza como melhor amiga ao recorrer os recursos que melhorem sua condição de vida, assim como aumentar a oportunidade de sobrevivência pela melhoria da sua saúde. Em todas as épocas e culturas pela exigência da natureza, ele aprendeu a tirar proveito dos recursos naturais locais.

O estudo dos compostos químicos sintetizados pelas plantas que tem acompanhado a evolução do homem através dos tempos e os seus usos como agentes terapêuticos datam de milhares de anos (FOWLER, 2006).

Os metabólitos secundários em estudo, apresentam diversificadas propriedades farmacológicas de grande importância para a comercialização nos locais agrônômicos, alimentícios, nas perfumarias e, principalmente, no setor farmacêutico (SILVA, et. al., 2013).



A *Millettia aurea* popularmente designada por “Nathikathika”, ou “Nathika” no distrito de Montepuez Província de Cabo Delgado-Moçambique, possui, em alguns pontos do país, outras designações de acordo com a sua distribuição geográfica e da língua falada de cada zona. O termo “Nathikathika”, que significa “sujeira”, é usado em língua local (Emakhuwa). Quando trituradas e dissolvidas em água as raízes desta planta, apresentam uma coloração branca semelhante à de farinha de milho, submetido ao mesmo solvente. A comunidade desta zona tem recorrido ao uso desta planta para o tratamento de doenças sexuais sintomaticamente transmissíveis como gonorreia, causada por uma bactéria *Neisseria gonorrhoeae* ou gonococcus (BARROS, et. al., 2004).

No entanto, não existe a forma mais correcta de atribuir nomes mais particulares às plantas que têm um potencial terapêutico. As plantas medicinais são as que contêm em suas partes ou em todas os compostos que são utilizados para o tratamento de doenças e produção de fitoterapêuticos após passar pelos processos que as tornem próprias para o uso (LAUSTOSA et. al., 2017).

Assim, a planta em estudo pertence ao Reino: Plantae Divisão: Magnoliophyta Classe: Mognoliopsida Ordem: Fabales Família: Fabaceae Género: *Millettia* Espécie: *M. aurea*. Foi identificada no Herbário Nacional de Moçambique LUM - Maputo, faltando a deposição e registo de exsicata, devido a pandemia de COVID-19. A família Fabaceae ou Leguminosae compreende 727 géneros e 19,325 espécies, sendo considerada a terceira maior família de Angiospermae (ILVA, et. al., 2018). Esta família está dividida em três Subfamílias de acordo com suas características, que são: Caesalpinioideae, Fabaceae e Mimosoideae (MELLO et. al., 2001).

O género *Millettia* possui 999 espécies das quais a *M. aurea* ocorre naturalmente em Madagáscar. É distribuído no noroeste de Madagáscar, em Mahajanga e Província de Antsiranana. As grandes folhas compostas são esverdeadas acima, verde azulado abaixo, com um terminal de 7 a 9 pares de folhetos opostos. É decídua, com a folhagem emergindo antes do tempo de floração. As grandes, flores da lilácea aparecem de Novembro a Janeiro como as chuvas sazonais e são produzidas em racemes longos pendentes. As vantagens de semente lenhosa são plantas aveludadas, a liberar suas sementes quando eles se separaram devido à torção crescente (NODARI & GUERRA, 2000). Esta planta, ainda pouco se conhece a sua ocorrência para o território moçambicano.

A descrição do estudo fitoquímico da *M. aurea* torna difícil, porém há relatos sem base escrita segundo os quais em Moçambique, sobretudo na Província de Cabo Delgado em geral e no distrito



de Montepuez em particular, a população usa as raízes para o tratamento da gonorreia, dores estomacais e cólicas. Existem pesquisas feitas sobre *Millettia pinnata* que mostraram algum potencial para o biocida atividade contra *V. cholerae* e *E. coli*, bem como um anti-inflamatório, anti-nociceptiva (redução da sensibilidade a estímulos dolorosos) e antipirético (redução da febre). Ainda num outro estudo do mesmo género indica que *Millettia stuhlmannii*, a espécie muito semelhante da *Millettia aurea* foram isolados alguns compostos tais como, flavonoides, glicosídeos e a robinetina a partir do cerne e o alfa-aminoácido, a canavenina, a partir das sementes (FERREIRA, 2015).

De um modo geral, pretendeu-se caraterizar as substâncias bioativas dos extratos da *M. aurea* com potencial inibitória sobre bactérias causadoras de doenças de transmissão sexual com enfoque na gonorreia.

MÉTODOS

A verificação da adequação dos métodos escolhidos da pesquisa foi classificada de acordo com os tipos de pesquisa. Portanto, ela é aplicada porque os resultados obtidos são direcionados ao público para alavancar o tratamento das doenças de origem bacterianas especificamente as que são sexualmente transmissíveis como são o caso da gonorreia, sífilis, clamídia, entre outras. A pesquisa é quantitativa pois o material coletado foi experimentado laboratorialmente, tendo-se constatado que a determinação das concentrações inibitórias mínimas dos princípios ativos necessita do uso das variáveis quantitativas neste contexto, foi aplicado o tratamento estatístico no pacote SPSS, de modo estabelecer a curva padrão que facilitou obter a equação para calcular as concentrações inibitórias dos extratos sobre o *N. gonorrhoeae* e, por conseguinte construção de gráficos correspondentes.

O levantamento etnofarmacológico da *Millettia auera* assim como a coleta do material vegetal (raiz e folhas) foi realizado e colhido em Junho de 2019 no distrito de Montepuez Provincia de Cabo Delgado – Moçambique (13 ° 7 '32 "Sul, 38 ° 59' 59" Leste).

PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

A preparação dos extratos foi feita a partir das raízes e folhas da *Millettia aurea*, secas a temperatura ambiente e protegida da luz em local para retirar a umidade, posteriormente moído e pesou-se 400g de raiz e 400g de folha num total 800g. De seguida, submeteu-se com etanol (70%) e



maceração água em quatro balões separados de acordo com o tipo de solvente, durante 72h a temperatura ambiente com agitação diária. Depois deste período, a mistura foi filtrada com papel de filtro e algodão com ajuda de um funil, de modo acomodar o papel permitido escoar o líquido (extrato bruto), os solventes foram evaporados a partir de uma estufa a uma temperatura de 50°C num período de 24h para extrato etanólico e 72h para extrato aquoso.

Obtidos os extratos hidroetanólicos e aquosos, foi determinado rendimento de cada extrato onde foram feitas três medições do extrato fluido, 2mL cada em cadinho de porcelana previamente tarada e pesada para ter a massa do cadinho numa balança analítica sem e com os extratos; em seguida, foram colocados na estufa a uma temperatura de 105 °C durante 3 horas e depois foram esfriados em dissecadores e de novo pesados. A determinação do rendimento foi com base na seguinte equação:

$$\% \text{ Rendimento} = \frac{\text{Massado Extrato Sólido}}{\text{Massado Extrato Líquido}} * 100$$

ANÁLISE FITOQUÍMICA QUALITATIVA

No ensaio químico, fez-se análise de compostos com atividade antimicrobiana, nomeadamente, alcaloides, flavonoides, taninos e saponinas por serem os compostos mais estudados para o tratamento de doenças de transmissão sexuais que têm mostrado muita atividade sobre espécies de vários microrganismos segundo (BROWN, et. al., 2016).

Na identificação dos alcaloides foram usados os seguintes reagentes: ácido clorídrico, reativos de Bouchardat (iodo-iodeto de potássio) e reagente de Mayer HgCl (cloreto de mercúrio) + KI (iodeto de potássio). Adicionou-se 1mL de extrato hidroetanólico em 1mL de solução de HCl a 5% e atos de reativos de Bouchardat (solução do iodo).

Para os flavonoides, os testes foram feitos com base na adição de 2mL de água destilada num tubo de ensaio contendo 0,5mL de extrato hidroetanólico bruto e depois adicionou-se pela parede do tubo uma gota de cloreto férrico a 2%. Como evidência, a presença de cor que varia entre verde, amarelo acastanhado e violeta, mostra a presença de flavonoides.

Os procedimentos foram extensivo para os taninos onde adicionou – se 2,5mL do extrato hidroetanólico num tubo de ensaio e, em seguida, adicionaram-se suas gotas de solução alcoólica de cloreto férrico a 2%.



Adicionaram-se um tubo de ensaio 1mL de extrato bruto diluído a uma proporção de 1:2; em seguida, adicionaram-se 2 gotas de acetado de chumbo a 10%.

Quanto às saponinas, adicionaram-se 2mL de extrato hidroetanólico num tubo de ensaio; em seguida adicionou-se 5mL de água destilada, agitou-se vigorosamente por 2 a 3 minutos e deixou-se em repouso por 20 minutos. De seguida, houve a persistente e abundante de espuma que indicou a presença de saponinas.

ANÁLISE FITOQUÍMICA QUANTITATIVA

Para quantificação dos alcaloides, flavanoides e taninos foram usadas como padrões a Boldina, Rutina e Catequina, ambas substâncias da Sigma Aldrich.

Preparou-se a solução estoque de padrão Boldina (400µg/mL) em etanol, que foi diluída em etanol (70%) para 40, 80, 120, 160, 200, 240 e 280µg/mL. Usou-se como reagente a solução etanólica de cloreto de Ferro-III hexahidratado (2%). Aferiu-se o volume de todas as amostras com a solução de etanol (70%). O branco foi composto pela solução de cloreto de alumínio e etanol. As leituras foram realizadas no espectrofotômetro UV/VIS – KASUAKI (Leitor de microplacas) a 366 nm após 20 min de reação. Todas as análises foram realizadas em triplicata e a curva padrão foi estabelecida.

A partir de 10mg/mL do extrato seco, transferiu-se 5mL de cada solução (triplicata) e acidificou-se com HCl 1N; em seguida, foram transferidos 5mL da solução acidificada para cada tubo, agitou-se (triplicata) e a cada tubo foram adicionados 2mL do Reagente de Dragendorff e de novo agitou-se; desprezou-se o sobrenadante e tratou-se o resíduo com 1mL de álcool etílico absoluto; foram adicionados 2mL de sulfito de sódio a 1% e também com uma agitação de modo a homogeneizar e, a seguir, desprezou-se o sobrenadante, tendo-se tratado o resíduo com 2mL de ácido nítrico concentrado; transferiu-se o conteúdo resultante para balão volumétrico de 50mL, completou-se o volume com água destilada; foi tomado 1 mL desta solução, o etanol foi usado como branco; para a amostra foi procedeu-se à leitura a 366 nm.

Para quantificar os flavonoides, primeiro foi preparada a solução padrão de rutina a 400µg/mL em etanol e seguida diluída em água destilada conforme a percentagem de preparação dos extratos de 70% para quantidades de 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200µg/mL, respetivamente. O reagente específico foi a solução etanólica de cloreto fêrrico a 2%. A solução composta por cloreto fêrrico e



etanol onde as leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV/VIS no comprimento de onda de 415 nm, após 20 min da reação. Todas as análises foram feitas em triplicata para aferir a fiabilidade e a curva padrão foi feita com base das médias de absorbâncias e das concentrações.

Conforme o procedimento feito na preparação de solução padrão, a solução extrativa, usou-se a solução de cloreto fêrrico a 2% como está descrita na solução padrão. O produto obtido é composto pela solução de cloreto fêrrico e etanol. Para cada amostra a ser analisada, a solução específica é composta por solução extrativa na concentração 10mg/mL. Depois de 20 minutos as leituras foram realizadas no espectrofotômetro a 415 nm.

Quanto aos taninos foram feitos com base na preparação de solução padrão etanólica de catequina de 1000 μ g/mL e foi diluída em 20, 30, 40, 50, 60, 70 μ g/mL, respetivamente. A mistura de vanilina a 4% e ácido clorídrico concentrado a 37% foi usado com reagente específico. De seguida, foi contabilizado o volume total das amostras com o etanol. O branco foi composto pela solução vanilina/ácido clorídrico e extrato hidroetanólico. As leituras foram feitas no espectrofotômetro UV/VIS a 500 nm, após 20 min da reação. Todas as análises foram feitas em triplicatas e a curva padrão foi estabelecida através das respetivas médias de absorbâncias e as concentrações determinadas.

De acordo com o procedimento descrito anteriormente relativo à preparação da solução padrão, foi preparada a solução extrativa com a mistura de vanilina a 4% e HCl concentrado (37%). Depois de ser conferido o volume total de amostra, o produto obtido foi composto pela solução vanilina/ácido clorídrico e extrato hidroetanólico. A solução específica é composta por solução extrativa na concentração 10mg/mL onde a leitura foi feita em espectrômetro UV/VIS a 500 nm, após 20 min da reação. Todas as análises foram feitas em triplicata.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Num balão volumétrico, 40g do meio de cultura agar Muller Hinton, foram dissolvidos em 100mL de água destilada de acordo com as recomendações do fabricante. A dissolução a quente foi feita em banho-maria a 50°C e, posteriormente, o meio foi esterilizado em autoclave, durante 1h a uma temperatura de 125°C.



Depois do arrefecimento, 15mL o meio de cultura foi distribuído em cada uma das placas de Petri de 90 mm de diâmetro, previamente esterilizadas. As placas foram incubadas numa estufa a 37°C, durante 24 horas para confirmar a esterilidade do meio de cultura. 24h depois da incubação, foi confirmada a sua esterilidade e não se observando o crescimento de fungos ou bactérias. O meio foi considerado útil para a realização dos testes de sensibilidade antimicrobiana. As placas foram conservadas na geleira a 7°C.

Preparou-se 100, 200, 300, 400 e 500mg/mL dos extratos hidroetanólicos e aquosos das raízes e folha de *M. aurea*. O padrão de referência antibacteriana usou-se a solução de penicilina (50mg/mL), para comparação dos resultados da atividade dos extratos.

Foi usada a técnica do disco difusão para testar a sensibilidade dos microrganismos em estudo frente aos extratos hidroetanólicos e aquosos das raízes e folha de *M. aurea*. O extrato foi inoculado num disco e introduzido em placas contendo os microrganismos cultivados, durante 1 dia e posteriormente, mediu-se o halo de inibição e calculou-se a percentagem dos microorganismos mortos. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada através da menor concentração dos extratos que inibiu completamente o crescimento bacteriano, (figura 1).

Figura 1: *Neisseria gonorrhoeae*



Fonte: Autoria própria (2020)



RESULTADOS

Os resultados da análise fitoquímica qualitativa que consistiu em testes usando reagentes específicos para aferir mudanças de cor, formação de precipitado de substâncias envolvidas na reação, entre outros fenômenos são ilustrados no quadro 1.

Quadro 1: Resultados de análise fitoquímica qualitativa

Metabólitos Secundários	Raiz		Folhas	
	E. EtOH	E. Aq	E. EtOH	E. Aq
Flavonoides	++	+++	++	++
Alcaloides	+++	-	++	++
Taninos	+	+++	-	+++
Saponinas	-	-	+++	-

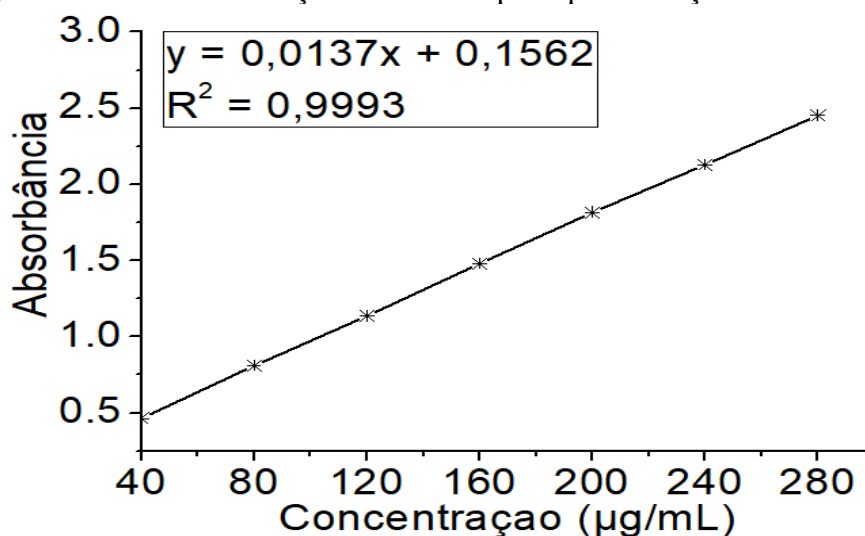
Fonte: Autoria própria (2020).

E.EtOH- Extrato hidroetanólico/ E. Aq. – Extrato Aquoso. (+++) Presença de compostos em alta concentração; (++) presença de compostos em concentração moderada; (+) Presença de compostos e (-) Ausência de composto.

ANÁLISE QUÍMICA QUANTITATIVA

Como base nos resultados das análises espectrofotométricas das médias de absorbâncias dos extratos hidroetanólicos e aquosos das raízes e folha, foram determinadas as concentrações das substâncias bioativas através das equações das curvas de calibração ilustradas nas figuras 2, 3 e 4 correspondentes alcaloides, flavonoides e taninos respectivamente.

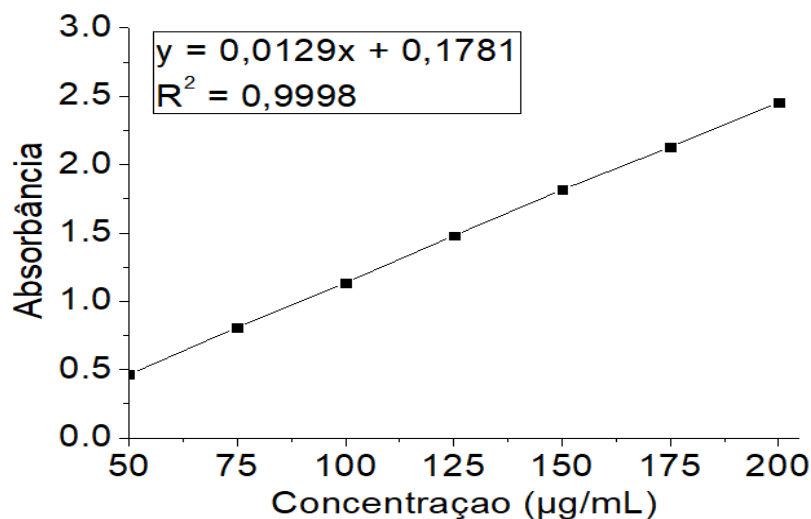
Figura 2: Curva de calibração de Boldina para quantificação de alcaloides.



Fonte: Autoria própria (2020)

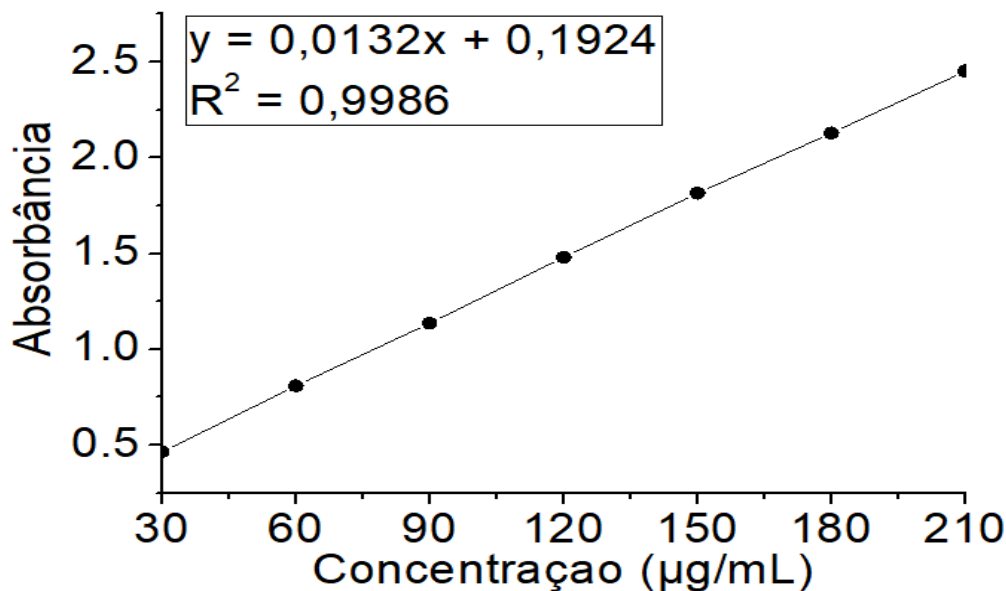


Figura 3: Curva de calibração de Ritina para quantificação de flavonoides.



Fonte: Autoria própria (2020)

Figura 4: Curva de calibração de Catequina para quantificação de taninos.



Fonte: Autoria própria (2020)

O quadro 2 ilustra os dados referentes à concentração em relação aos metabólitos em extratos aquosos e hidroetanólicos das raízes e folha de *M. aurea*, as médias das concentrações dos três tipos de metabólitos, nos dois extratos são numericamente bastante diferenciadas.



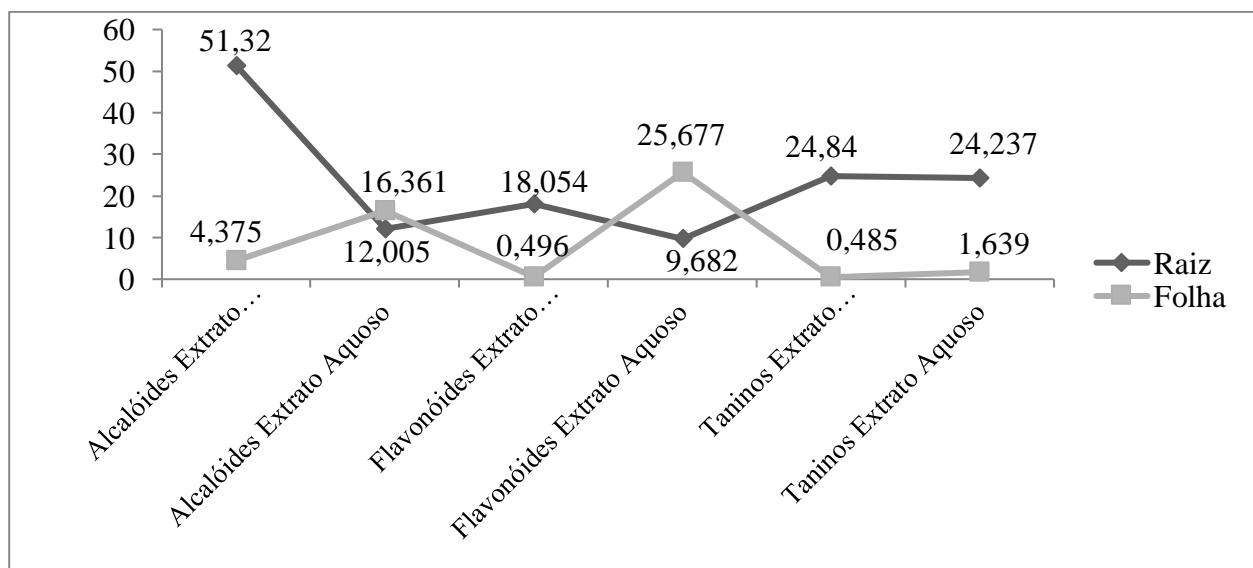
Quadro 2: Comparação de médias de concentrações de metabólitos secundários em extrato hidroetanólico e aquoso das raízes e folha

Parte da planta	Tipo de Extrato	Metabólitos Secundários	n	Média (µg/mL)	Desvio padrão	Erro padrão
Raiz	Hidroetanólico	Alcaloides	3	12,005	0,304	0,175
		Flavonoides	3	9,682	0,893	0,516
		Taninos	3	24,237	0,644	0,372
	Aquoso	Alcaloides	3	51,320	1,931	1,115
		Flavonoides	3	18,054	0,763	0,441
		Taninos	3	24,384	0,854	0,493
Total			18	23,280	14,134	3,331
Folha	Hidroetanólico	Alcaloides	3	4,375	0,245	0,141
		Flavonoides	3	0,496	0,357	0,206
		Taninos	3	0,485	0,035	0,020
	Aquoso	Alcaloides	3	16,361	0,294	0,170
		Flavonoides	3	25,677	0,626	0,362
		Taninos	3	1,639	0,472	0,273
Total			18	8,172	9,845	2,320

Fonte: Autoria própria (2020)

No gráfico 1, pode-se observar facilmente todo o cenário de comparação de médias acima descritas.

Gráfico 1: Comparação de médias de metabólitos secundários em extrato hidroetanólico e aquoso das raízes e folha



Fonte: Autoria própria (2020)



ANÁLISE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS E AQUOSOS DAS RAÍZES E FOLHA SOBRE *Neisseria gonorrhoeae*.

O teste de Dunnett, realizou-se usando como categoria de referência a penicilina e fez-se uma comparação entre as letalidades e os níveis de inibições médios das soluções preparadas com base nas folhas de *M. aurea* e com base na raiz.

O descritivo apresentado no quadro 3 mostra que a letalidade média e o nível médio de inibição dos diferentes tratamentos (soluções hidroetanólica e aquosa preparadas com base nas raízes e folhas de *M. aurea* e penicilina) apresentam valores aproximadamente iguais, respetivamente.

A obtenção dos resultados teve em consideração as partes da planta escolhidas para este estudo, o microorganismo testado (*Neisseria gonorrhoeae*), as concentrações das substâncias experimentadas e de controlo, a letalidade percentual e valores médios halos de inibição (quadro 3).

Quadro 3: Médias de letalidade e nível de inibição de extratos hidroetanólico e aquoso sobre *Neisseria gonorrhoeae*

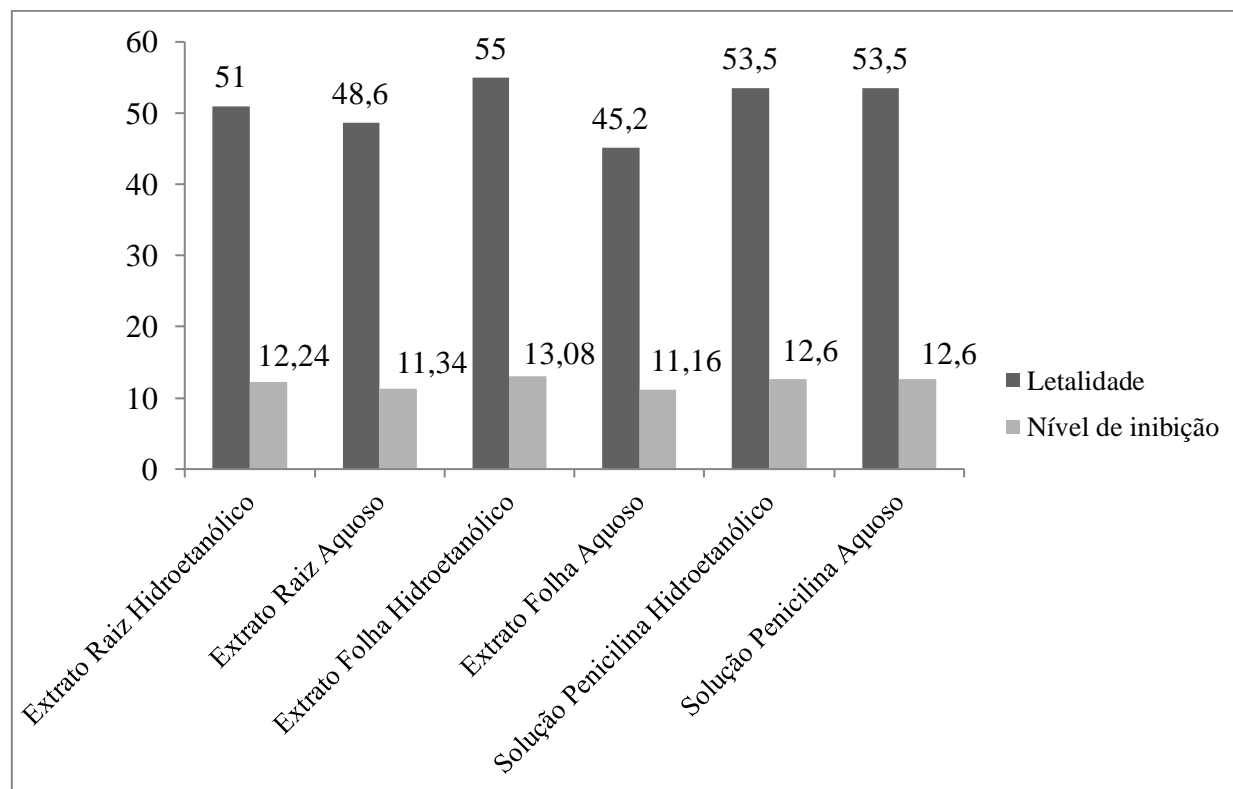
Meio	Letalidade	N	Médias	Nível de Inibição	N	Médias
Hidroetanólica	Raiz	5	51,000	Raiz	5	12,240
	Folha	5	55,000	Folha	5	13,080
	Penicilina	5	53,500	Penicilina	5	12,600
	Total	15	53,167		15	12,640
Aquoso	Raiz	5	45,200	Raiz	5	11,340
	Folha	5	48,600	Folha	5	11,160
	Penicilina	5	53,500	Penicilina	5	12,600
	Total	15	49,100		15	11,700

Fonte: Autoria própria (2020)

O gráfico 2 ilustra que não existem diferenças significativas entre a letalidade média e o nível médio de inibição em relação aos três diferentes tipos de tratamentos.



Gráfico 2: Médias de letalidade e nível de inibição dos extratos hidroetanólico e aquosos das raízes e folha.



Fonte: Autoria própria (2020)

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos da análise fitoquímica qualitativa sobre os flavonoides, alcaloides, taninos e saponinas revelaram positivamente através das características apresentadas (mudança de cor e formação de precipitados). No entanto, para os resultados dos extratos aquosos das raízes, houve maior concentração nos flavonoides e taninos, os alcaloides e saponinas revelaram negativamente. Relativamente aos extratos aquosos das folhas, os que exibiram maior presença são flavonoides, alcaloides e taninos.

O extrato hidroetanólico de *M. aurea* de folhas secas no seu estudo fitoquímico demonstrou a presença dos constituintes fitoquímicos: taninos, alcaloides, flavonoides e saponinas (FONSECA, 2005).



O quadro 2 resultou do teste de múltiplas comparações de Mínima Diferença Significativa (DMS). Como se pode ver, quando, por exemplo, se comparam as concentrações médias de alcaloides em extratos aquoso e hidroetanólico das raízes de *M. aurea*, o teste mostra que tais médias são diferentes, visto que $p=0$. O fato também pode ser justificado através do intervalo de confiança (95%) que não apresenta o elemento zero, isto é, não mostra a existência da mínima possibilidade da diferença média dessas concentrações de vir a ser igual a zero. A diferença mínima entre as médias de alcaloides em extrato aquoso e hidroetanólico das raízes de *M. aurea* é de 39,3 com vantagem para alcaloides em extrato hidroetanólico das raízes. Portanto, os alcaloides são, em média, mais concentrados em extratos hidroetanólicos do que em extrato aquoso das raízes da planta em estudo. Em geral, na triagem preliminar das raízes detetaram-se alcaloides e taninos no extrato hidroetanólico (MATOS, et. al., 2014).

Por um lado, esta explicação é extensiva aos flavonoides, ou seja, este metabólito também apresenta maior concentração média em extratos hidroetanólicos das raízes do que em extratos aquosos das raízes de *M. aurea* (quadro 2), por outro lado, observa-se que as concentrações médias de taninos nos dois extratos não são significativamente diferentes, pois $p=0,864$, o que significa que não se pode rejeitar a hipótese nula, segundo a qual a concentração média de taninos em extrato aquoso é igual à concentração média de taninos em extrato hidroetanólico das raízes de *M. aurea*. Ou seja, este metabólito, tanto em extrato aquoso quanto em extrato hidroetanólico apresenta a mesma concentração.

Diferentemente aos extratos das raízes da planta em estudo, mostra-se uma diferença de concentrações dos três metabólitos no extrato aquoso em relação ao hidroetanólico das folhas, como mostra a quadro 2 ou facilmente visível no gráfico 1. Quando se comparam as concentrações médias de alcaloides em extrato aquoso das folhas com alcaloides em extrato hidroetanólico da mesma parte da planta, o teste mostra que tais médias são diferentes, visto que $p=0$, o que pode ser justificado também através do intervalo de confiança (95%) que não apresenta o elemento zero, o que mostra não existir a mínima possibilidade da diferença média dessas concentrações virem a ser igual a zero. A diferença mínima entre as médias de alcaloides em extrato aquoso das folhas e alcaloides em extrato hidroetanólico da mesma é de 11,98 com vantagem para flavonoides em extrato aquoso das folhas de



M. aurea. Portanto, os flavonoides são em média mais concentrados em extratos aquoso das folhas do que em extrato aquoso das raízes da mesma planta.

Os flavonoides representam um dos grupos mais importantes e diversificados de origem vegetal que se encontram geralmente em folhas, flores, raízes e frutos das plantas (COWAN, 1999).

A explicação do autor acima é extensiva aos alcaloides e taninos, ou seja, estes metabólitos também apresentam maiores concentrações médias em extratos aquosos das folhas do que em extratos hidroetanólico das folhas de *M. aurea* (quadro 2).

Estas concentrações podem ser influenciadas por diversos fatores naturais como radiação solar, raios UV, estações do ano e ainda outros fatores como poluentes que podem alterar o metabolismo da planta. No entanto, os flavonoides exercem diversas funções destacando-se a proteção da radiação UV, a proteção contra microrganismos, ação antioxidante, inibição enzimática, entre outras (NIJVELDT, et. al. 2001). Isto indica que essa classe de composto desempenha um papel preponderante na natureza evitando que os outros ecossistemas tenham problemas ou sejam extintas por fenômenos do gênero.

Os dados referentes à letalidade assim como ao nível de inibição apresentam características similares, ou seja, verifica-se que os valores-p do teste de Levene é menor do que 5% ($p=0,019$ e $p=0,011$), o que significa que os dados são homogêneos, ou seja, apresentam variâncias estatisticamente iguais. Por outro lado, a quadro 3, mostra que os valores-p, tanto para a letalidade da solução quanto para o nível de inibição são maiores do que 5%, respectivamente, $p=0,404$ e $p=0,269$, o que significa que não se deve rejeitar a hipótese de que a letalidade média da solução aquosa preparada com base nas folhas de *M. aurea* é igual à letalidade da solução aquosa preparada com base na raiz. Igualmente, o nível de inibição médio da solução aquosa preparada com base nas folhas da planta em estudo é igual ao nível de inibição médio da solução aquosa preparada com base na raiz. Em suma, não há diferença de médias, tanto na letalidade quanto no nível de inibição nas duas soluções (preparada com base nas folhas de *M. aurea* e a preparada com base na raiz).

A penicilina apresenta propriedades de antibiótico ao ligar-se com B-latamase enzima responsável de destruir amida dentro do anel Blatâmico da penicilina produzindo o ácido penicilínico (MARTINS, 2006).



Neste contexto, pode-se afirmar que, os extratos da *M. aurea* têm propriedades que podem ser úteis no tratamento da gonorreia uma vez que conseguiu inibir crescimento da bactéria, (quadro 3). De uma forma geral, o efeito antibacteriano dos flavonoides deve-se também à atribuição de grupos fenólicos hidroxilo que apresentam afinidade para as proteínas e, por essa razão, atuam como inibidores de enzimas bacterianas, assim como interferem nas suas vias de síntese (LI, et. al., 2012).

A comparação das médias da letalidade e do nível de inibição da solução aquosa preparada com base nas folhas de *M. aurea* e com base na raiz da mesma planta, em diferentes testes, por exemplo, o teste de Tukey “HSD” mostra que não há diferenças significativas em termos de letalidade e de nível de inibição médio, entre a solução preparada com base na folha de *M. aurea* em relação à penicilina e solução preparada com base na raiz, pois apresentam p-valores maiores. Ou seja, o número médio de bactérias *N. gonorrhoeae* que a penicilina pode matar em solução aquosa não é significativamente diferente do número médio de bactérias *N. gonorrhoeae* que a solução preparada com base nas folhas de *M. aurea* e da solução preparada com base na raiz pode matar ($p=0,838$ e $p=0,376$). Por outro lado, a atividade anti-bacteriana da penicilina não difere do efeito do extrato das folhas de *M. aurea* e da solução preparada com base na raiz ($p=0,979$ e $p=0,383$).

Os microorganismos isolados de *N. gonorrhoeae* contêm plasmídeos portadores do gene, que codifica a enzima β -lactamase do tipo. Esta enzima hidrolisa o anel β -lactâmico da penicilina, desactivando-a. Os plasmídeos são facilmente transferíveis entre isolados de *N. gonorrhoeae*, espalhando-se rapidamente (CALADO, 2016).

Dessas comparações, como se pode ver, resultou na letalidade média assim como o nível médio de inibição de cada uma destas soluções não difere da letalidade e do nível médio da penicilina, visto que os respectivos valores-p resultantes de tal comparação são maiores. Por outras palavras, a semelhança das conclusões apuradas nos dois testes acima mencionados, pode-se dizer que o número médio de bactérias mortas por soluções aquosas preparadas com base nas folhas de *M. aurea* e na raiz é estatisticamente igual ao número médio de bactérias *N. gonorrhoeae* mortas pela penicilina. O mesmo sucede para o nível médio de inibição.

Observa-se na quadro 3 que as diferenças não significativas registadas no extrato aquoso são na sua maioria maiores do que as observadas no extrato hidroetanólico, o que, de certa forma, pode conduzir-nos a aferir que tais tratamentos são mais eficientes em extratos hidroetanólicos do que em



extratos aquosos. De salientar que dentro de cada extrato aquoso e hidroetanólico, verifica-se que as diferenças não significativas de médias tendem a dar um pouco de vantagem à solução preparada com base na raiz de *M. aurea* e da penicilina em detrimento da solução preparada com base nas folhas de *M. aurea*.

Portanto, apesar dos testes realizados mostrarem a não existência de diferenças significativas entre a letalidade média e o nível médio de inibição para os três tratamentos, a solução preparada com base na raiz de *M. aurea* e a penicilina podem ser um pouco mais eficientes do que a solução preparada com base nas folhas de *M. aurea* nos dois extratos aquoso ou hidroetanólico.

CONCLUSÃO

A partir da atividade experimental concluiu-se que os alcaloides, flavonoides, taninos e saponinas apresentaram maiores concentrações no extrato hidroetanólico das raízes em relação ao extrato aquoso das mesmas raízes. Pelo contrário, os mesmos metabólitos apresentaram maiores concentrações nos extratos aquosos das folhas em relação ao extrato hidroetanólico das folhas de *M. aurea*.

A eficiência de extratos das raízes e folhas de *M. aurea* (400 e 500mg/mL) não é significativamente diferente com a da penicilina (50mg/mL), pelo que ambos podem ser aplicados no tratamento da gonorreia. Os metabólitos secundários já identificados na planta em estudo, utilizados pela população do distrito de Montepuez - Moçambique, têm uma relação com atividade antibacteriana sobretudo com *Neisseria gonorrhoeae*.

REFERÊNCIAS

1. BARROS, Junior. et. al., *Antimicrobianos*, 3ª edição, artemed editora, São Paulo, 2004, (615-622).
2. BROWN, Michael. et. al., *Natural Products for the Treatment of Chlamydiaeae Infections. Microorganisms*, 2016, (4 - 39).



3. CALADO, Joana. *Perfil de resistência aos antibióticos e Caracterização molecular de estirpes resistentes de Neisseria gonorrhoeae isoladas numa população de homens que têm sexo com homens*; Lisboa. 2016, (1941–1948).
4. COWAN, Marjorie. *Plant Products as Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology Reviews*, 1999, (564-582).
5. FERREIRA, E. S. A., *Ecofisiologia de Millettia stuhlmannii Taub. em diferentes demandas atmosféricas e disponibilidade hídricas no solo*. 2015 (786-812).
6. FONSECA, Santos, *Farmacotécnica de fitoterápicos*. 2005, (62). Disponível na: WWW.farmacotecnica.ufc.br/arquivos/Farmacot_Fitoterapicos.PDF. Acesso em 11 de Maio de 2019, 17h05min.
7. FOWLER, Michael. *Plants, medicines and man*. JSci Food Agr. 2006, (1797-1804).
8. ILVA, et. al, *Testes fitoquímicos em extractos orgânicos de Baixa orellana*, instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Rorte, 2018, (169).
9. LI, Luo. et. al., *Design, synthesis and antimicrobial activities of nitroimidazole derivatives containing 1, 3, 4 oxadiazole scaffold as FabH inhibitors*. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2012, (4316-4322).
10. MARTINS, Costa; BERNARDO, Fernando. *Antimicrobial resistance in Enterococcus spp. isolated in inflow, effluent and sludge from municipal sewage water treatment plants*. *Water Research* 40, 2006, (1735-1740).
11. MATOS, Lécia, et. al., *Estudo farmacognóstico de folhas e raízes da Spiranthera odoratissima*, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, 2014, (574-584).
12. MELLO, J.; SANTOS, S. C. *Taninos*. In: SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3ª ed. Porto Alegre: UFRGS/UFSC, 2001, (234-235)
13. NIJVELDT, Robert. et. al., *Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications*. São Paulo, 2001, (418-25).
14. NODARI, R. O. GUERRA, M.P. *Biodiversidade, aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos*. In: SIMÕES, C. M. O. et al. *Farmacognosia*. Porto Alegre: UFRGS, 2000 (534-553).

Priceiro, E. (2020).



15. SILVA, Joana. *Enterococcus sp.: considerações clínicas e microbiológicas em endodontia*, Porto, 2013, (17-22).