



Faculdade de Ciências

Departamento de Química

Licenciatura em Química Ambiental

Trabalho de Licenciatura

TEMA:

Avaliação da composição fitoquímica e da actividade antimicrobiana *in vitro* dos extractos das sementes da planta *Nigella sativa* (Cominho preto)



Autora

Deolinda Márcia Domingos

Maputo, Janeiro de 2024



Faculdade de Ciências

Departamento de Química

Licenciatura em Química Ambiental

Trabalho de Licenciatura

TEMA

Avaliação da composição fitoquímica e da actividade antimicrobiana *in vitro* dos extractos das sementes da planta *Nigella sativa* (Cominho preto)

Autora

Deolinda Márcia Domingos

Supervisora

MSc. Amélia L. Furvela

Co -Supervisora

MSc. Alice Manjate

Maputo, Janeiro de 2024

DEDICATÓRIA

Este trabalho dedico de todo o meu coração, aos meus queridos pais Domingos Mário Sozinho e Inês Domingos (em memória), e aos meus queridos amados irmãos Belkiss e Chelton.

A vós dedico.

*“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas,
mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana”*

Carl Jung

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, em especial minha avó Elisa de Sousa, e tias Elizabeth e Arcénia Sozinho por depositarem a confiança em mim e por me incentivarem a persistir.

Às minhas supervisoras, Mestre Amélia Limóneo Furvela e Mestre Alíce Manjate, pela orientação, apoio, conhecimento transmitido, incentivo, disponibilidade, paciência e por acreditarem no meu potencial.

À equipe do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da UEM, pelo auxílio, acompanhamento e fornecimento de todos os recursos para a realização das análises durante os ensaios laboratorial.

Ao Mestre Silvestre Muiambo, pela disponibilidade e acompanhamento no manuseamento de equipamento do Laboratório Central do Departamento de Química.

A todos os professores do Departamento de Química, que contribuíram para a minha formação.

A todos os membros da Associação Moçambicana para Desenvolvimento e Ensino (ADEF), em especial as irmãs Adefianas pelo companheirismo, pela familiaridade, pelo apoio moral, pela convivência e amizade construída ao longo dos cinco anos.

Aos meus colegas do curso, em especial Lic. Eliseu Leite e Belita Mutaolima.

A todos aqueles que contribuíram directa ou indirectamente para a realização deste trabalho.

DECLARAÇÃO DE HONRA

Eu, Deolinda Márcia Domingos, declaro por minha honra, que este Trabalho de Licenciatura com o tema "Análise Fitoquímica e Avaliação da Actividade Antimicrobiana *in vitro* dos extractos das sementes da planta *Nigella sativa* (Cominho preto)", é fruto da minha própria pesquisa sob orientação das minhas supervisoras, nunca foi submetido em nenhuma outra instituição para a obtenção de qualquer grau académico.

Maputo, Fevereiro de 2025

A Autora

(Deolinda Márcia Domingos)

RESUMO

A *N. sativa* é uma planta da família *Ranunculaceae*. As sementes são utilizadas na medicina tradicional moçambicana para tratamento de diversas doenças como bronquite, diarreia, reumatismo, asma, doenças de pele, e outros; na culinária como tempero, e em questões culturais e religiosas. O presente trabalho teve como objectivo avaliar o perfil fitoquímico e a actividade antimicrobiana *in vitro* dos extractos das sementes da *N. sativa*.

Os extractos brutos foram obtidos pelos métodos de maceração, infusão e decocção. Realizou-se a triagem fitoquímica qualitativa preliminar nos extractos brutos usando testes colorimétricos e testes de precipitação com reagentes específicos e na fitoquímica quantitativa foram usados métodos padrões de análise. A actividade antimicrobiana foi determinada pelo método de disco-difusão em ágar em meio sólido contra duas cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* cultivadas em meio Muller Hinton e fungo *Candida albicans* cultivado em Sabourand Dextrose.

A análise fitoquímica dos diferentes extractos das sementes revelou presença de flavonóides, alcalóides, flavonóis, taninos, cumarinas, saponinas, esteróides e triterpenos. O extracto macerado etanólico apresentou maiores teores de fenóis totais ($6.2914 \pm 0.0059 \text{ mgEAGg}^{-1}$), flavonóides totais ($11.066 \pm 0.001 \text{ mgEQg}^{-1}$) e alcalóides totais ($239.374 \pm 1.857 \text{ mgEAg}^{-1}$). Os extractos das sementes apresentaram actividade antimicrobiana perante os microorganismos em estudo.

Os resultados obtidos revelaram uma susceptível actividade antimicrobiana, assim como existência de fitoquímicos que sustentam a utilização destas sementes na medicina tradicional para o tratamento das doenças causadas pelas cepas estudadas. As sementes da *N. sativa* merecem mais exploração das suas actividades pois revelaram ser uma fonte de diferentes compostos.

Palavras-chaves: *Nigella sativa*, compostos fitoquímicos, antimicrobiana, *in vitro*.

GLOSSÁRIO DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS

AD – Água destilada

AT – Água da torneira

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CM – Cumarinas

CTX – Cefotaxima

DAD/DAT – Decocção Água Destilada e Torneira

EDAD – Extracto Decocto Água Destilada

EDAT – Extracto Decocto Água da Torneira

EIAD – Extracto Infuso Água Destilada

EIAT – Extracto Infuso Água da Torneira

EMA – Extracto Macerado Aquoso

EME – Extracto Macerado Etanólico

ET – Esteróides

FLO – Flavonóis

FLT – Flavonóides Totais

FLU – Fluconazol

IAD/IAT – Infusão Água Destilada e Torneira

LEV – Levofloxacin

ME/MA – Maceração Etanólica e Aquoso

OMS – Organização Mundial da Saúde

SP – Saponinas

TA – Teor de alcalóides

TN – Taninos

TP – Triterpenos

UV-Vis – UltraVioleta Visível

ÍNDICE

	Pág.
DEDICATÓRIA	i
AGRADECIMENTOS	ii
DECLARAÇÃO DE HONRA.....	iii
RESUMO.....	iv
GLOSSÁRIO DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS	v
CAPÍTULO I	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Objectivos.....	2
1.1.1. Geral.....	2
1.1.2. Específicos	2
1.2. Justificativa.....	2
1.3. Metodologia do trabalho	4
CAPÍTULO II	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Plantas medicinais	5
2.2. A <i>Nigella sativa</i>	6
2.3. Descrição botânica da <i>N. sativa</i>	7
2.3.1. Distribuição morfológica e territorial da planta.....	7
2.3.3. Uso medicinal da <i>N. sativa</i>	9
2.4. Características fitoquímicas da <i>N. sativa</i>	10
2.4.1. Compostos fenólicos.....	12
2.4.2. Flavonóides.....	13
2.4.3. Taninos.....	14

Avaliação da composição fitoquímica e da Actividade Antimicrobiana in vitro dos extractos das sementes da planta *Nigella sativa*

2.4.4.	Alcalóides	15
2.4.5.	Terpenos.....	16
2.5.	Actividade antimicrobiana da <i>N. sativa</i>	17
2.6.	Microorganismos.....	19
2.6.1.	<i>Staphylococcus aureus</i>	19
2.6.2.	<i>Escherichia coli</i>	19
2.6.3.	<i>Candida albicans</i>	19
2.7.	Métodos de avaliação da actividade antimicrobiana.....	20
2.7.1.	Método de difusão em disco	20
2.7.2.	Métodos de diluição em ágar	21
CAPÍTULO III.....		22
3.	PARTE EXPERIMENTAL	22
3.1.	Desenho de pesquisa	22
3.2.	Colheita e tratamento das amostras.....	23
3.3.	Procedimento de extracção.....	23
3.4.	Prospecção fitoquímica qualitativa	24
3.4.1.	Teste de alcalóides	24
3.4.2.	Teste de saponinas (Teste de espuma).....	24
3.4.3.	Teste de cumarinas (Teste de basicidade com <i>NaOH</i>).....	24
3.4.4.	Teste de taninos (Teste de FeCl_3 e $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$ a 5%)	24
3.4.5.	Teste flavonóides	25
3.4.6.	Flavonóis (Teste de NaOH)	25
3.4.7.	Teste de triterpenos e esteróides	25
3.5.	Análise fitoquímica quantitativa	25
3.5.1.	Quantificação de fenóis totais.....	25

Avaliação da composição fitoquímica e da Actividade Antimicrobiana in vitro dos extractos das sementes da planta Nigella sativa

3.5.2.	Quantificação de flavonóides.....	26
3.5.3.	Quantificação de alcalóides	26
3.6.	Avaliação da actividade antimicrobiana	27
CAPÍTULO IV		28
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1.	Resultados	28
4.1.1.	Prospensão fitoquímica qualitativa	28
4.1.2.	Fitoquímica quantitativa	28
4.1.3.	Actividade antimicrobiana	30
4.2.	Discussão.....	31
4.2.1.	Análise fitoquímica qualitativa	31
4.2.2.	Análise fitoquímica quantitativa	32
4.2.3.	Actividade antimicrobiana	36
CAPÍTULO V		39
5.	CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	39
5.1.	Conclusões	39
5.2.	Recomendações.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		41
ANEXOS		49

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Classificação taxonómica da N. sativa.....	9
Tabela 2. Classificação dos terpenos	16
Tabela 3. Resultados da triagem fitoquímica de Nigella sativa.....	28
Tabela 4. Resultados do teor de fenóis totais e flavonóides totais.....	29
Tabela 5. Resultados do teor de Alcalóides	29
Tabela 6. Resultados do teste da actividade antimicrobiana dos extractos de N. sativa pelo método de difusão em disco (halo de inibição em mm).	30
Tabela 7. Resultados dos testes antimicrobianos na determinação de CIM dos extractos de N. sativa (halo de inibição em mm).....	30

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Flor da planta Nigella sativa.....	7
Figura 2. Sementes da Nigella sativa.....	8
Figura 3. Classificação dos compostos fenólicos.	13
Figura 4. Representação estrutural básica de um flavonóide.....	13
Figura 5. Subclasses dos flavonóides.....	14
Figura 6. Alguns representantes de Taninos	15
Figura 7. Exemplos de alguns alcalóides.....	16
Figura 8. (A) Filtração das amostras; (B) Amostras nos tubos de polietileno de centrifuga.	24
Figura 9. Equação de formação de iões de molibdénio.	33
Figura 10. Formação de complexos da quercetina.....	33

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
ANEXOS 1: Materiais e Reagentes.....	A
ANEXOS 2: Absorvâncias medidas durante a leitura das amostras e dos padrões.....	C

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

As plantas funcionam como fábrica e armazém de muitos compostos químicos que lhes conferem certas propriedades para serem consideradas as chamadas plantas medicinais. Estas plantas produzem naturalmente substâncias orgânicas em grande escala, cujas propriedades benéficas são utilizadas pelo homem desde o advento da civilização humana. Estas substâncias orgânicas presentes nas plantas são classificadas como metabólitos secundários, moléculas de alto peso que podem ser encontrados em todos os órgãos da planta, seja nas sementes, raízes, caules e flores (Veiga Jr *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2020). Os metabólitos secundários dão às plantas várias propriedades biologicamente activas, como actividade antimicrobiana, antioxidante, antiparasitária, tornando desta forma, seu uso na saúde humana muito importante e na protecção contra algumas doenças (Simões *et al.*, 2007).

Nigella sativa é uma planta que pertence ao género da família *Ranunculaceae*, as suas sementes possuem nomes diferentes, como sementes pretas, cominho preto e Kaludji. Possui uma diversa utilidade na área da saúde. Tem sido amplamente utilizada há mais de dois mil anos como substância curativa e preventiva contra diversas doenças em alguns países asiáticos e africanos. A composição química única da *N. sativa* levou os investigadores a explorarem o efeito potencial desta semente contra bactérias. O uso das sementes da *N. sativa* é atribuída à sua ampla gama de propriedades medicinais, incluindo antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena, antimicrobiana, anti-hipertensiva, cardio-gastroprotectora e antidiabética. *N. sativa* conquistou o lugar entre os medicamentos fitoterápicos baseados em evidências com melhor classificação (Ahmad *et al.*, 2013; Hannan *et al.*, 2021).

A actividade antimicrobiana destaca-se dentre a actividade biológica de origem vegetal mais importante. Esta actividade é realizada pelos agentes antimicrobianos, que agem sobre as doenças de infecções bacterianas com vista a inibir ou destruir o crescimento de microorganismos (Burt, 2004; Machado *et al.*, 2019).

O presente trabalho visa avaliar os fitoconstituintes presentes nas sementes da planta *Nigella sativa* e sua acção antimicrobiana *in vitro* a partir dos extractos de infusão, decocção e maceração.

1.1. Objectivos

1.1.1. Geral

- Avaliar a composição fitoquímica e a actividade antimicrobiana *in vitro* dos extractos das sementes da planta *Nigella sativa*.

1.1.2. Específicos

- Preparar os extractos das sementes da planta *Nigella sativa* pelas técnicas de extracção por maceração, infusão e decocção;
- Identificar e caracterizar os metabólitos secundários presentes nos extractos das sementes da planta *Nigella sativa*;
- Quantificar os flavonóides, fenóis totais, alcalóides nos extractos das sementes de *Nigella sativa*;
- Avaliar a actividade antimicrobiana dos extractos das sementes da planta *Nigella sativa* frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*;
- Determinar a concentração inibitória mínima dos extractos sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*;
- Correlacionar a actividade antimicrobiana dos extractos e a sua composição fitoquímica.

1.2. Justificativa

As sementes da planta *N. sativa* (cominho ou sementes pretas) são da família Ranunculaceae, frequentemente usadas no continente asiático, e em vários pontos do mundo. Em Moçambique são usadas pela comunidade muçulmana que por estes é conhecida de Kaludji e usadas para diferentes fins, como tratamento de doenças, infecções bacterianas, na culinária como tempero, em questões culturais e religiosas (os muçulmanos usam no tratamento de doenças respiratórias (bronquite, asma) e muitas outras doenças.

Segundo Ahmad *et al.* (2013) os extractos destas sementes revelam um amplo espectro de actividades farmacológicas, incluindo imunopotenciação e actividades anti-histamínica, antidiabética, antiparasitária, anti-hipertensiva, anti-inflamatória e antimicrobiana.

A natureza é composta por inúmeros seres, do micro ao macro (homem, animais e plantas), e cada um desempenhando a sua função no meio ambiente. São seres de menor dimensão e podem ser chamados de microrganismos, como por exemplo *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, podendo estar presentes no ar, na poeira, na água, entre outras partes do meio ambiente (Nascimento, 2010; Vieira & Fernandez, 2012).

As plantas medicinais apresentam um papel importante na história, sendo de suma importância a existência de uma área científica para estudá-la. Assim a área fitoquímica vem auxiliando e dispondo de todos os estudos químicos com espécies de interesse popular e cultural, tendo como objectivo conhecer os compostos químicos das espécies vegetais e analisar a sua presença nas mesmas, identificando grupos de metabólitos secundários relevantes e avaliando também as actividades biológicas (Rodrigues, 2018). A descoberta destas substâncias (agentes antimicrobianos), vem sendo valorizada com o aumento de microrganismos como bactérias resistentes a estes agentes. Por isso a Química de Produtos Naturais, ao lado da Bioquímica, vem reforçando a descoberta de novos antibióticos para tratamento das doenças e a confirmação das propriedades terapêuticas dessas plantas (Calixto, 2000).

Segundo Albuquerque *et al.* (2007) toda a área de conhecimento que tem a preocupação de estudar a relação das pessoas com as plantas, possui o interesse em saber as estratégias desenvolvidas pelas populações locais visando utilizar estas informações em benefícios dessas populações. A Química de Produtos Naturais é a ciência que busca descobrir e classificar compostos químicos de plantas. Segundo (Sousa, 2015) a investigação química de uma planta visa descobrir os compostos químicos presentes nos vegetais e, até mesmo, quantificá-los. Como forma de minimizar as doenças, o homem recorre às plantas para seu bem-estar, devido às propriedades biológicas que estas apresentam no tratamento de algumas doenças.

A resistência antimicrobiana tornou-se o maior risco para a saúde em muitos lugares do mundo, o que prejudica a saúde humana e aumenta a taxa de mortalidade e o risco de doenças associadas a condições graves e potencialmente fatais. As propriedades antibacterianas e antifúngicas das plantas contra bactérias multirresistentes estão, portanto, sendo estudadas por numerosos especialistas de várias nações de maneira contemporânea (Elkhawas *et al.*, 2022).

Por essa razão o presente trabalho tem como objectivo analisar os metabólitos secundários, e avaliar a actividade antimicrobiana das sementes da planta *Nigella sativa* frente as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*.

1.3. Metodologia do trabalho

Para a elaboração do presente trabalho obedeceu-se os diferentes momentos e etapas que se seguem:

- **Revisão bibliográfica:** consistiu na recolha, selecção e análise das informações do campo das plantas medicinais ou produtos naturais, abrangendo a distribuição e nomenclatura taxonómica da planta *Nigella sativa*, caracterização dos metabólitos secundários, análise fitoquímica qualitativa e quantitativa, a actividade antimicrobiana, recorrendo a artigos científicos, livros sobre produtos naturais e diversas publicações na internet.
- **Parte experimental ou ensaios laboratoriais:** procedeu-se desde a recolha das amostras até ao tratamento das mesmas. Consistiu-se em duas fases, a primeira foi realizada no laboratório de Química dos Produtos Naturais do Departamento de Química da UEM, onde foram preparadas as amostras, realizando a extracção pelos métodos de maceração (aquosa e etanólica), infusão (de água destilada e corrente), a decocção (de água destilada e corrente) e por fim a propensão fitoquímica qualitativa e de seguida submeteu-se a análise fitoquímica quantitativa. A segunda etapa foi realizada no laboratório de microbiologia da Faculdade de Medicina (UEM), onde a partir dos extractos obtidos foram feitos testes de avaliação da actividade antimicrobiana.
- **Apresentação dos resultados:** os resultados recolhidos durante a execução laboratorial estão apresentados em forma de tabelas e gráficos. Recorreu-se a técnicas e ferramentas estatísticas (Teste t e GraphPad prism) para analisar e comparar os resultados obtidos para dar um juízo final acerca dos mesmos.
- **Compilação do trabalho:** consistiu na junção de todas as informações, dados e resultados, observando todos os requisitos impostos para a elaboração do trabalho de culminação de curso vigente na Faculdade de Ciências.

CAPÍTULO II

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Plantas medicinais

O reino vegetal além de manter o equilíbrio do meio ambiente e fornecer oxigénio sustentador da vida, desempenha um papel essencial na dieta humana, funcionando como fonte inevitável de medicamentos modernos (Hannan *et al.*, 2021).

Como afirmado por Hannan *et al.* (2021), nas últimas décadas os conceitos de “nutracêuticos” ou “alimentos funcionais” tornaram-se populares entre os indivíduos preocupados com a saúde, uma vez que existe uma ligação estreita entre uma dieta saudável e a esperança média de vida. Esses conceitos também têm atraído a atenção de nutricionistas, cientistas de alimentos, médicos, bem como das indústrias alimentícia e farmacêutica.

As plantas medicinais têm sido uma importante fonte de agentes terapêuticos desde a antiguidade para curar doenças humanas. A Índia é considerada o “Jardim Botânico do mundo” e mais de 2.200 espécies de plantas medicinais e aromáticas foram identificadas após estudos. O renascimento do interesse pelos medicamentos naturais começou principalmente devido à crença generalizada de que a medicina verde é mais saudável do que os produtos sintéticos. Hoje em dia, há um grande aumento nas indústrias baseadas em plantas medicinais devido ao aumento do interesse no uso de plantas medicinais em todo o mundo, que crescem a uma taxa de 7 a 15% ao ano (Paarakh, 2010).

Apesar dos grandes avanços da medicina moderna, o desenvolvimento de novos medicamentos a partir de produtos naturais ainda é considerado importante. Isto parece ser ainda mais relevante para os países em desenvolvimento, onde o custo para desenvolver um medicamento é proibitivo. Desde 1980, a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem incentivado os países a identificar e explorar a medicina tradicional e a fitoterapia (Paarakh, 2010).

Kooti *et al.* (2016) relatam que o uso de plantas medicinais é considerado para o tratamento de doenças humanas desde a antiguidade. Erva medicinal é uma planta capaz de alterar os processos fisiológicos e patológicos, podendo ser utilizada na prevenção ou tratamento de doenças. Nos últimos anos há um aumento significativo no uso de plantas medicinais em comparação com os

medicamentos químicos, devido a diversos factores como fácil acesso sem prescrição médica, baixo custo, não necessidade de encaminhamento a profissionais de saúde, bem como acreditar em menos efeitos colaterais nos tratamentos com produtos naturais.

Segundo a OMS, cerca de 80% da população mundial recorre à medicina tradicional para o tratamento de diversas doenças. Portanto é necessário avaliar o rico património das medicinas tradicionais; no entanto, apenas algumas espécies de plantas foram exaustivamente estudadas quanto às propriedades terapêuticas, mecanismo de acção, segurança, toxicidade; e tantas outras pesquisas sobre plantas medicinais estão por ser feitas. A este respeito uma dessas plantas é *Nigella sativa*, que é uma pequena e elegante erva anual distribuída e cultivada em toda a Índia. No Islam, é considerada uma das maiores fontes de medicina curativa disponíveis. O profeta islâmico Maomé afirmou certa vez que a semente negra pode curar todas as doenças, excepto a morte (Kooti *et al.*, 2016; Paarakh, 2010).

2.2. A *Nigella sativa*

Nigella sativa, conhecida como semente preta ou cominho preto e habbat al-barakah em árabe, ocupa um lugar importante na matéria médica fitoterápica no Oriente Médio, na África Oriental e na Ásia. No entanto, a erva é menos conhecida na Europa Ocidental e nas Américas. A semente preta pertence à família *Ranunculaceae*. Como o nome comum sugere, as minúsculas sementes pretas em forma de barco (2–4 mm de comprimento) são usadas na alimentação e na medicina. As belas partes inferiores brancas ou azuis têm sépalas e folhas mal divididas. A sua planta é amplamente cultivada e pode ser cultivada como planta anual de jardim em muitas partes do Estados Unidos. (Al-Quorain, 2015).

De acordo com Farhan *et al.* (2021) a semente de cominho preto tem sido usada na medicina tradicional desde os antigos egípcios, gregos e romanos. A semente de cominho preto é uma planta herbácea anual cultivada em diversas partes do mundo, principalmente em países banhados pelo Mar Mediterrâneo.

Foi demonstrado que um frasco datado de aproximadamente 1650 a.C. de um templo em ruínas da civilização hitita no centro da Turquia contém sementes pretas. Não se sabe inequivocamente qual

é o antigo nome egípcio desta erva, portanto, se ela era realmente usada naquela época não está claro, mas é fortemente suspeito. O fitoterapeuta grego Dioscórides discutiu o que chamou de *melantion* na secção 79 do seu terceiro volume da sua matéria médica no primeiro século d.C. (Farhan *et al.*, 2021).

A descrição da planta identifica-a inequivocamente como *Nigella sativa*, incluindo o facto de ser usada para fazer pão, o que ainda hoje é verdade em partes do Médio Oriente. Dioscórides recomenda sementes pretas para dores de cabeça, inchaços, verrugas, dores de dente, resfriados, dispneia e picadas de aranha, entre outras. É supostamente a erva mais mencionada no Alcorão. É discutido como um remédio para melhorar a energia corporal na massiva matéria médica de Avicena (980-1037 d.C.), o Cânone da Medicina (Qanun i al-Tibb). O cultivo da semente preta é discutido na Bíblia em Isaías 28:25-27 (Al-Quorain, 2015).

2.3. Descrição botânica da *N. sativa*

2.3.1. Distribuição morfológica e territorial da planta

N. sativa é uma planta anual que atinge cerca de 20 a 90 cm de altura, com folhas finamente divididas, as flores são brancas, amarelas, rosa, azul claro ou roxo claro, com 5 a 10 pétalas (Figura 1). O fruto é uma cápsula grande e inflada composta por 3-7 folículos unidos, cada um contendo diversas sementes. (Majid, 2018). Segundo Farhan *et al.* (2021) também pode crescer até 20 a 30 cm de altura, com folhas lineares finamente divididas.



Figura 1. Flor da planta *Nigella sativa*. **Fonte:** Asif *et al.* (2015).

As sementes são pequenas (Figura 2), dicotiledóneas, trigonasas, angulares, tuberculosas, pretas externamente, e brancas internamente, odor levemente aromático e sabor amargo. O período de cultivo da *N. sativa* é geralmente entre Novembro e Abril e a germinação dura cerca de 10 a 15 dias após o plantio das sementes. As épocas de floração e frutificação da planta são geralmente de Janeiro a Abril (Kooti *et al.*, 2016; Majid, 2018).



Figura 2. Sementes da *Nigella sativa*. **Fonte:** Asif *et al.* (2015).

2.3.2. Nomes comuns e Classificação taxonómica

É uma planta da família *Ranunculaceae*. Esta família também é conhecida como botão de ouro ou pé de galinha. É composto por mais de 2.000 espécies conhecidas de plantas com flores em 43 géneros, distribuídas em todo o mundo. Os maiores géneros são Ranúnculos. Compreende 600 espécies que também inclui *N. sativa* (Ahmad *et al.*, 2021)

Cominho preto, semente preta, coentro romano, diabo no mato, semente de cebola selvagem (Asif *et al.*, 2015). O nome popular em Urdu desta planta é ‘Kalonji’. É conhecido como ‘Siyah Danch’ e Cork em persa e turco, respectivamente. A planta também é conhecida como Love-in-a-mist, Habatul Barakah, Sonez, Krishana, Jiraka e Sidadanah (Ahmad *et al.*, 2021).

A tabela 1 ilustra a classificação taxonómica da *N. sativa*.

Tabela 1. Classificação taxonómica da *N. sativa*.

Reino	Plantae
Sub-reino	Tracheobionta
Superdivisão	Spermatophyta
Filo	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Ranunculales
Família	Ranunculaceae
Género	Nigella
Espécie	<i>N. sativa</i>

2.3.3. Uso medicinal da *N. sativa*

As sementes de *N. sativa* são utilizadas no tratamento de diversas doenças como bronquite, diarreia, reumatismo, asma e doenças de pele. Actuam como tónico hepático, antidiarreico, estimulante do apetite. É usado em distúrbios digestivos para aumentar a produção de leite em mães que amamentam, para combater infecções parasitárias e para fortalecer o sistema imunológico. As sementes também são utilizadas na alimentação como aditivo aromatizante em pães e pickles, pois apresentam baixíssimo nível de toxicidade. As sementes são úteis no tratamento de vermes e erupções cutâneas (Asif *et al.*, 2015).

No mesmo prisma de conhecimento de Asif *et al.* (2015), as abordagens de Kooti *et al.* (2016) afirmam que os usos alimentares e terapêuticos do óleo e das sementes de *N. sativa* têm uma longa história na cultura indiana e árabe. De acordo com relatórios recentes, o xarope do grão foi benéfico para a digestão, perda de apetite, amenorreia, dismenorreia e tratamento de vermes e erupções cutâneas. Avicena, no seu famoso livro Cânone da Medicina, apontou diversas propriedades do

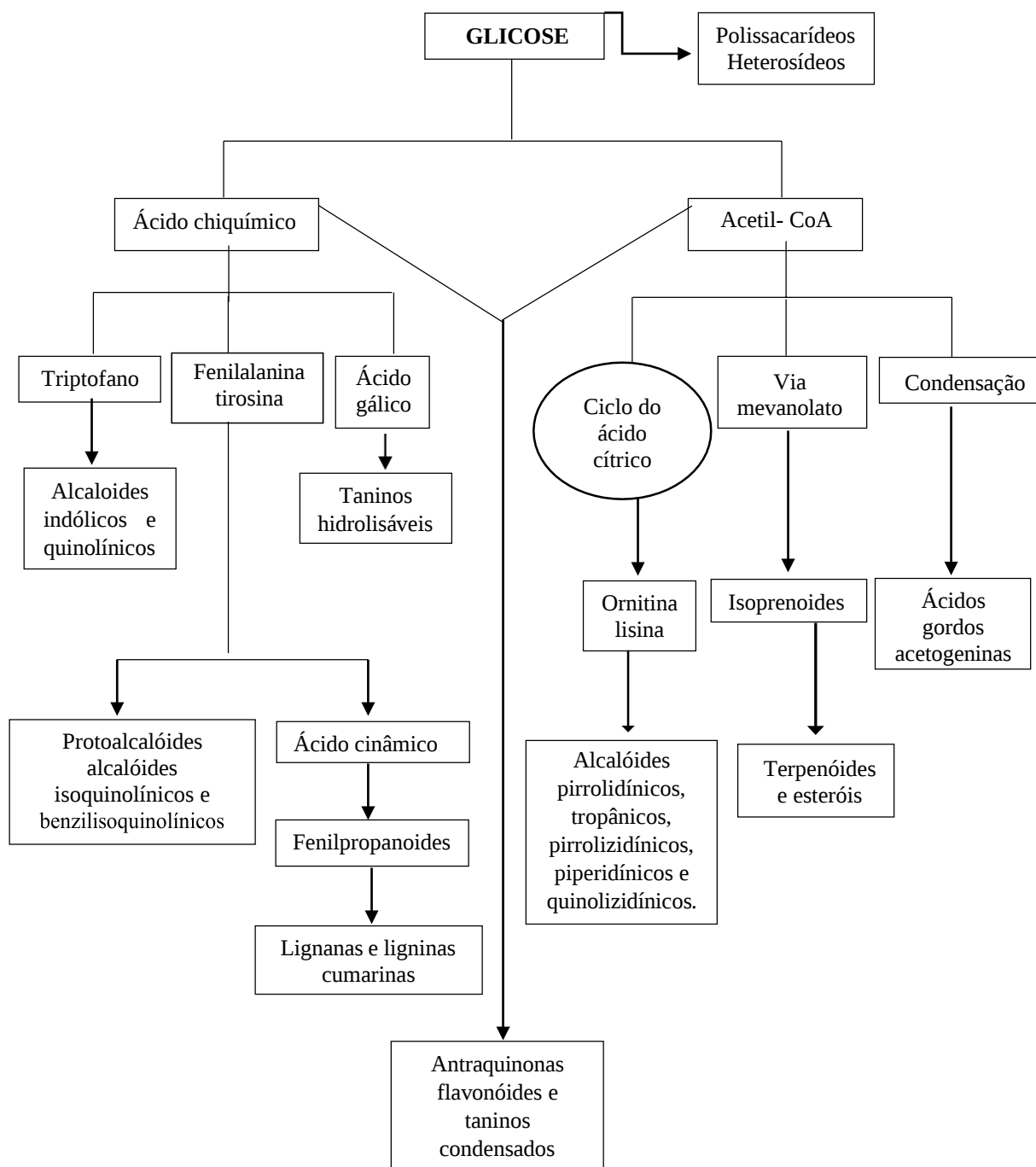
cominho preto, como melhoria da fadiga e recuperação de energia. A medicina islâmica também alistou efeitos para a saúde desta planta.

Não obstante aos usos expostos, coadunando com outras literaturas Hannan *et al.* (2021) afirmam que, a aplicação externa de óleo de cominho preto tem valor antisséptico e anestésico local. O óleo também tem sido usado topicamente para abscessos nasais, orquite, articulações inchadas e para tratar doenças de pele, como bolhas e eczema. Cominho preto foi encontrado na tumba do faraó egípcio Tutancâmon. A antiga civilização egípcia utilizava o cominho preto como conservante no processo de mumificação, provavelmente devido às suas acções antibacterianas e repelentes de insectos (Dalli *et al.*, 2022).

2.4. Características fitoquímicas da *N. sativa*

De acordo com os estudos de Kooti *et al.* (2016), até agora vários compostos químicos foram extraídos e identificados de diferentes espécies de *Nigella*. A composição fitoquímica do cominho preto varia dependendo das regiões de cultivo, estágio de maturidade, métodos de processamento e técnicas de isolamento. Os fitoquímicos bioactivos do cominho preto, compreendendo metabólitos principais e secundários, foram categorizados em diferentes classes químicas de acordo com Al-Quorain (2015).

Os metabólitos secundários são produzidos a partir da glicose, que é um produto do metabolismo primário, que derivam especialmente do metabolismo da glicose via dois intermediários: ácido chiquímico e acetato (Esquema 1) (Taiz & Zeiger, 2013).



Esquema 1. Biossíntese de metabólitos secundários. Fonte: Simões *et al.* (2007).

Os metabólitos primários são aqueles considerados imprescindíveis à vida, exercendo papéis fundamentais associadas à fotossíntese, respiração, crescimento e desenvolvimento, metabolismo secundário que originam compostos que são estruturalmente diferentes, sendo, muitos deles distribuídos entre um número muito limitado de espécies dentro do reino vegetal, pois não são necessários para todas as plantas, por isso podem ser utilizados para diagnósticos em estudos quimiotaxonómicos (Saxena *et al.*, 2013; Crozier *et al.*, 2006; Salazar *et al.*, 2018). Apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular, actividades biológicas marcantes, podendo ser encontrados em baixas concentrações e em grupos de plantas específicos (Simões *et al.*, 2007). Devido ao grande número de substâncias denominadas de metabólitos secundários, esses compostos foram divididos em três grupos: compostos fenólicos, compostos nitrogenados ou alcalóides e terpenos ou terpenóides (Borges & Amorim, 2020; Taiz & Zeiger, 2013).

2.4.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos possuem um anel aromático com um grupo hidroxilo ligado. A sua síntese ocorre a partir da fenilalanina ou acetil CoA. Os compostos fenólicos podem ser simples e até mesmo mais complexos, isso porque estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares e proteínas. Os compostos fenólicos dividem-se em dois grupos (Figura 3), os considerados flavonóides, conhecidos como polifenóis, e os que não são flavonóides como fenóis simples ou ácidos (Soares, 2002). Os efeitos antioxidante, antibacteriano, antitumoral e anti mutagénico são actividades biológicas fornecidas pelos compostos fenólicos (Bhandari & Kawabata, 2004).

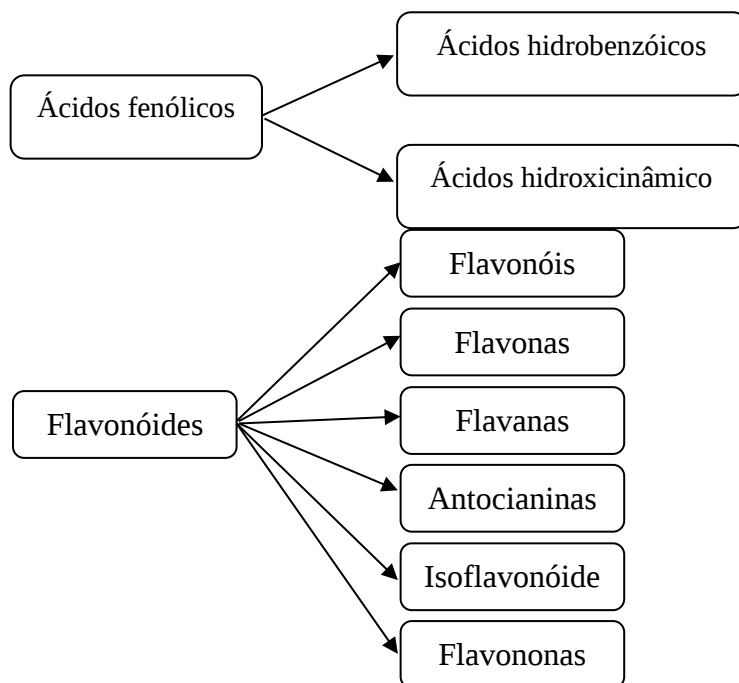


Figura 3. Classificação dos compostos fenólicos. **Fonte:** Soares (2002).

2.4.2. Flavonóides

Os flavonóides são a maior classe de compostos fenólicos presentes nas plantas, tendo sido identificados mais de quatro mil compostos dentro das principais classes (Heim *et al.*, 2002).

Os flavonóides são compostos tricíclicos onde dois anéis aromáticos (A e B) são ligados por uma cadeia alifática de 3 carbonos, vale ressaltar que normalmente encontra-se condensado na forma de pirano, o anel C (Figura 4) (Rio *et al.*, 2012; Heim *et al.*, 2002). Flavonóides apresentam grande diversidade estrutural que pode ser atribuída ao nível de oxidação e às variações no esqueleto carbónico básico, promovidas por reacções de alquilação, glicosilação ou oligomerização (Lima & Bezerra, 2012; Coutinho *et al.*, 2009).

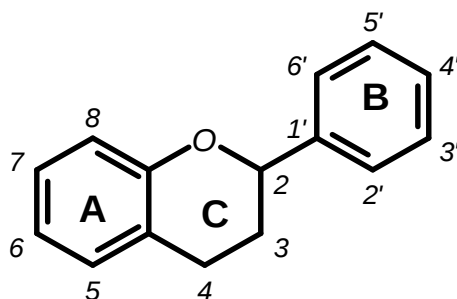


Figura 4. Representação estrutural básica de um flavonóide.

Fonte: Lima & Bezerra (2012).

As subclasses de flavonóides e seus representantes incluem flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavonóides, entre outros (Figura 5) (De Souza *et al.*, 2011; Crozier *et al.*, 2006). Os flavonóides, apesar de ainda não serem completamente conhecidos, apresentam um importante potencial terapêutico e diferentes actividades biológicas, como actividade antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antibacteriana, antiparasitária, actividade imunomoduladora, anti-inflamatória e antioxidante [intimamente ligada à estrutura dos flavonóides e ao número de substituintes hidroxilos (radicais fenólicos)] (Flambó, 2013; De Souza *et al.*, 2011).

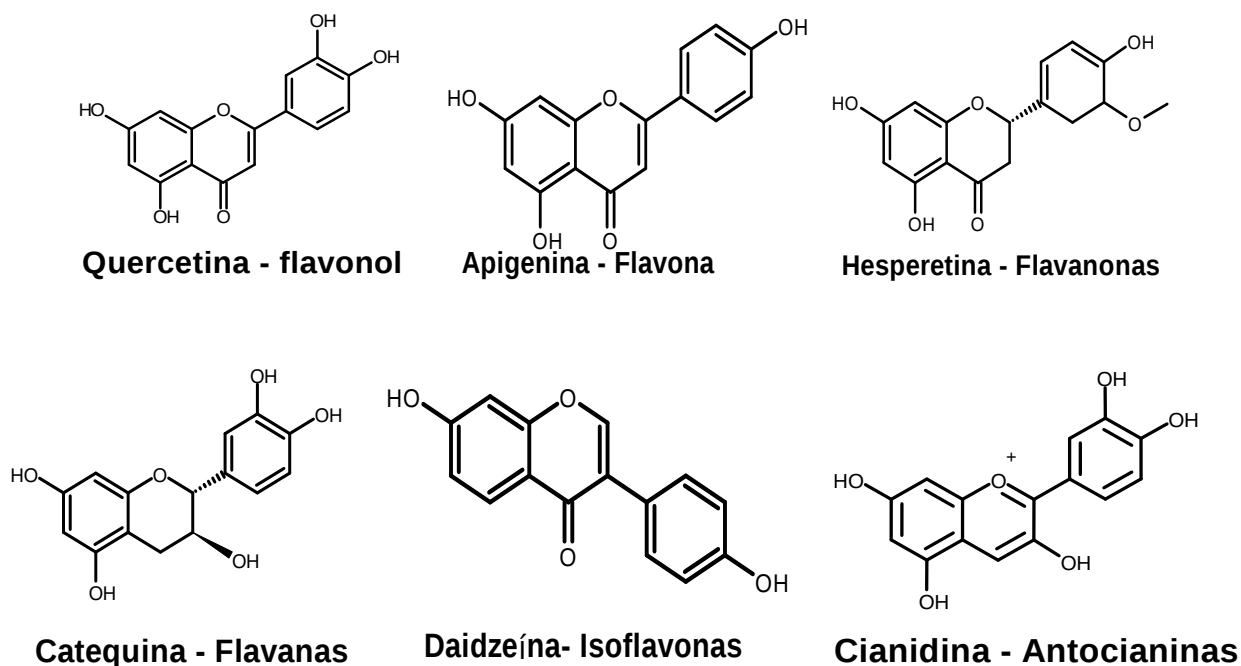


Figura 5. Subclasses dos flavonóides. **Fonte:** Crozier *et al.* (2006).

2.4.3. Taninos

Os taninos são uma classe de polifenóis que por definição, têm a capacidade de interagir e de se combinar, de forma estável, com alcalóides, gelatinas e outras proteínas e ainda com outros polímeros como polissacáridos. Os taninos podem ser classificados, com base nas suas estruturas químicas, em quatro categorias, os taninos condensados, os taninos hidrolisáveis (Figura 6) os taninos complexos e ainda os florotaninos (Costa *et al.*, 2003; Saxena *et al.*, 2013).

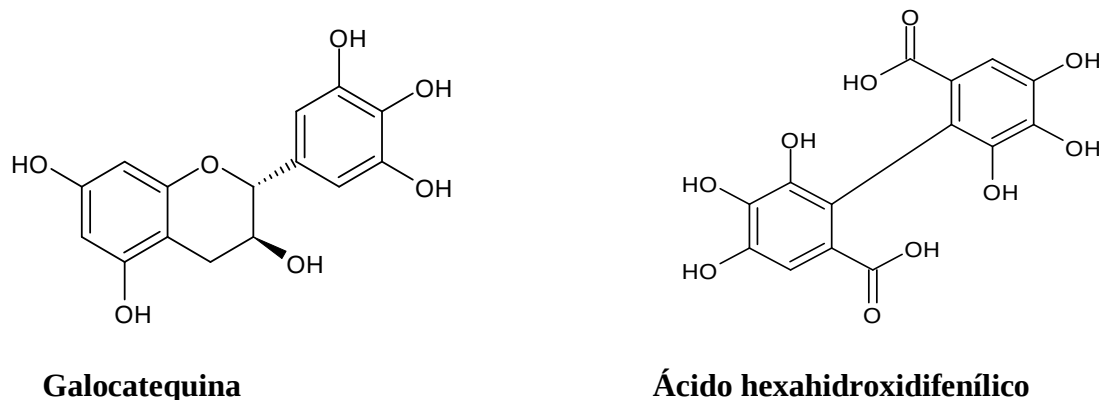


Figura 6. Alguns representantes de Taninos

2.4.4. Alcalóides

Os alcalóides são substâncias nitrogenadas de baixo peso molecular, com um ou mais átomos de nitrogénio dispostos como aminas primárias, secundárias ou terciárias, conferindo a essas substâncias, um carácter básico. Estas substâncias apresentam grande diversidade estrutural e a sua classificação é baseada na natureza da porção que contém o nitrogénio, ou seja, na parte do esqueleto derivada dos aminoácidos (Santos, 2015). Segundo Almeida *et al.* (2017), os alcalóides possuem propriedade antibacteriana, antifúngica, antiplasmódica e antitumoral pela capacidade de desestabilizar as membranas biológicas. Os alcalóides são compostos nitrogenados farmacologicamente activos e são encontrados principalmente nas angiospermas. Quando esses compostos possuem um átomo de nitrogénio em um anel heterocíclico eles são chamados de **alcalóides verdadeiros**. Quando o átomo de nitrogénio não pertence a um sistema heterocíclico eles são classificados como **protoalcalóides**. Já os **pseudoalcalóides** são compostos nitrogenados com e sem anéis heterocíclicos que não são derivados de aminoácidos. A figura 7 mostra exemplos de compostos pertencentes a cada grupo de alcalóides.

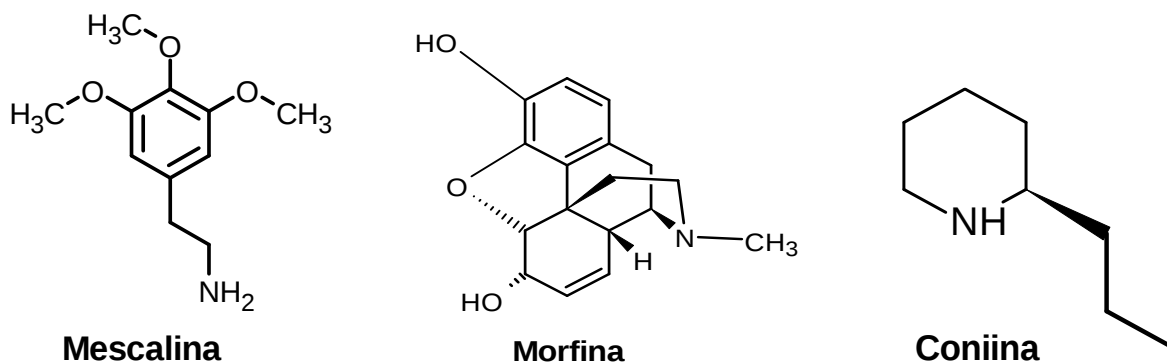
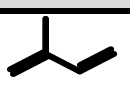
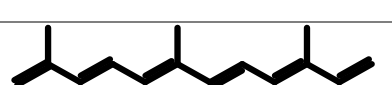


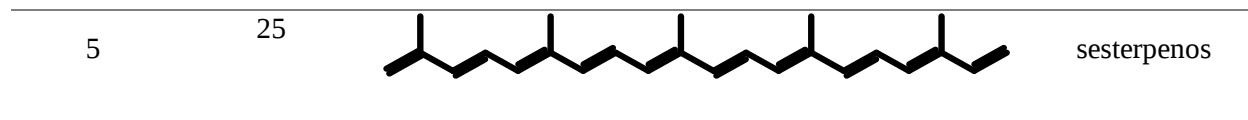
Figura 7. Exemplos de alguns alcalóides.

2.4.5. Terpenos

Os terpenóides são derivados das unidades do isopreno, sendo utilizados para diversas finalidades. Cowan (1999), evidenciou nos seus estudos uma ampla acção terapêutica atribuída a diferentes tipos de terpenos, abrangendo as principais classes de antimicrobianos. Os terpenos são classificados quanto ao número de carbonos presentes na estrutura e quanto ao número de unidades isoprénicas (Tabela 2), onde os menores terpenos contêm 5 carbonos no seu esqueleto e apenas uma unidade isoprénica que são denominados hemiterpenos (Nascimento, 2016).

Tabela 2. Classificação dos terpenos

Nr de unidades	Nrs de átomos de carbono	Estruturas	Classe ou Nome
1	5		Isopreno
2	10		monoterpenos
3	15		sesquiterpenos
4	20		diterpenos



Fonte: Nascimento (2016)

2.5. Actividade antimicrobiana da *N. sativa*

A resistência aos antibióticos tornou-se um grave problema de saúde global, com um enorme fardo económico para a comunidade, aumentando o custo do tratamento e as taxas de hospitalização, particularmente nos países em desenvolvimento que já sofrem com crises económicas, saneamento deficiente e uso indevido de medicamentos antibióticos (OMS, 2012)

Até agora, verifica-se que o desenvolvimento de novos antibióticos, que são processos dispendiosos e demorados, uma vez que os agentes patogénicos desenvolvem intensamente a resistência a estes novos antibióticos. Assim, as plantas medicinais aparecem como a melhor fonte alternativa para novos medicamentos antimicrobianos (Abdallah, 2011).

Numerosos estudos relataram que alguns compostos fitoquímicos das plantas possuem potente actividade antimicrobiana, como os fenólicos, flavonóides, alcalóides, terpenóides, saponinas, taninos, antraquinonas, entre outros que pode matar bactérias ou células fúngicas ao inibir o crescimento, afectar a permeabilidade da membrana celular, interferir em alguns processos metabólicos e modular a transdução de sinal ou expressão génica. Umas infinidades de pesquisas científicas foram publicadas sobre a bioactividade e propriedades medicinais das sementes de *Nigella sativa* (Omojate *et al.*, 2014).

Antimicrobianos são substâncias químicas que provocam morte ou inibição do crescimento de microrganismos, cuja essência é a toxicidade selectiva, ou seja, não devem afectar o hospedeiro. O principal objectivo do uso de um antimicrobiano é o de prevenir ou tratar uma infecção, diminuindo ou eliminando os organismos patogénicos e, se possível, preservando os germes da microbiota normal (Machado *et al.*, 2019; Melo *et al.*, 2012).

Hannan *et al.* (2008) avaliaram a actividade antimicrobiana da *N. sativa* usando diferentes extractos brutos de *N. sativa*, os extractos exibiram propriedades antimicrobianas, eficácia contra diferentes cepas bacterianas que incluíam bactérias gram-negativas e gram-positivas. Os extractos brutos de *N. sativa* mostraram um efeito potencial contra alguns dos organismos testados.

Estudos antibacterianos *in vitro* realizados por Hannan *et al.* (2021) demonstraram que o óleo essencial tinha uma actividade antibacteriana pronunciada contra vários organismos, incluindo *Staphylococcus albus*, *E. coli*, *Salmonella typhi* e *Vibrio cholera*, mesmo em diluições de 1:1000. O óleo foi considerado mais eficaz contra organismos gram-positivos do que gram-negativos. A timohidroquinona obtida do óleo volátil de *N. sativa* no estudo dermatológico realizado por Aljabre *et al.* (2015a), sobre esta planta teve efeito altamente significativo contra microrganismos gram-positivos, incluindo *Staphylococcus aureus*. O extracto de éter dietílico de *N. sativa* foi investigado por possuir o efeito inibitório dependente da concentração nas bactérias gram-positivas *S. aureus* e nas bactérias gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. (Ahmad *et al.*, 2021).

Khan (2016), estudando o aspecto antibacteriano da *N. sativa* nos extractos de etanol e n-hexano registrou notáveis efeitos antibacterianos dependentes da dose contra diferentes cepas gram-positivas e gram-negativas, nomeadamente *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumonia* e *Salmonella typhmuri*. No entanto, nenhuma actividade antibacteriana foi detectada contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter aerogens*.

Em outro estudo realizado por Aljabre *et al.* (2005b), a actividade antifúngica dos quininos da semente de cominho preto, ditimoquinona, timohidroquinona e timoquinona foi avaliada *in vitro* contra seis espécies de leveduras deteriorantes de lacticínios. A timohidroquinona e a timoquinona possuíam actividade anti-levedura significativa. No trabalho similar ainda realizado por Aljabre *et al.* (2015a), a timoquinona isolada de *Nigella sativa* revelou alta actividade antifúngica contra *Aspergillus niger*, *Fusarium solani* e *Scopnlariopsis brevicaulis*; esta actividade foi comparável à do medicamento antifúngico anfotericina-B.

Os extractos etéreos de *N. sativa* também apresentam resultados antifúngicos, mas produzem uma acção mais favorável em concentrações mais elevadas. Os extractos inibem 80-100% do crescimento da maioria dos dermatófitos na faixa de 40 mg/mL, enquanto a concentração inibitória mínima de TQ contra diferentes dermatófitos variou de 0,125 a 0,25 mg/mL, no trabalho realizado por Aljabre *et al.* (2005a).

2.6. Microorganismos

2.6.1. *Staphylococcus aureus*

O género de bactérias *Staphylococcus* são membros da família *Micrococcaceae*, pertencentes ao grupo dos cocos gram-positivos, caracterizados pela forma esférica, que se apresentam isolados ou em cachos. *Staphylococcus aureus* é um patógeno oportunista e está associada a infecções brandas, tais como infecções de pele e intoxicações alimentares, mas também podem causar infecções graves, potencialmente fatais, como pneumonias, bacteremias e infecções relacionadas a dispositivos médicos invasivos. Dentre as espécies, *Staphylococcus aureus* é a mais patogénica por possuir uma diversidade de factores de virulência (Stark, 2013; ANVISA, 2020). A sua capacidade de gerar diversas doenças é o reflexo de seus factores que propiciam a sua multiplicação em circunstâncias críticas e são fundamentais para que essa bactéria se possa espalhar pelo organismo (Stark, 2013).

2.6.2. *Escherichia coli*

A *Escherichia coli*, também denominada de *E. coli*, é uma bactéria gram-negativa, encontrada amplamente na natureza, incluindo no trato gastrointestinal de humanos e animais de sangue quente. A *E. coli* possui a capacidade de crescer em temperaturas mais elevadas em relação às outras bactérias e tem o seu habitat quase que exclusivamente limitado ao trato intestinal de seres humanos e animais de sangue quente (Bianchi, 2023). No entanto, algumas cepas podem ser patogénicas, causando infecções intestinais e do trato urinário tanto em humanos quanto em animais (Delgado, 2020)

2.6.3. *Candida albicans*

A *Candida albicans* é um fungo dimórfico pertencente ao grupo Eumicota, a qual é um patógeno oportunista para o homem, existindo como parasita em pelo menos 50% da população humana. *C. albicans* é a espécie mais vista em isolados clínicos (Nonoka *et al.*, 2008). Trata-se de um fungo de colonização assintomática, sendo portanto parasita: quando há um comprometimento da microbiota normal e sistema imunológico, torna-se patogénico. *C. albicans* está entre as leveduras que causam infecção invasiva, e embora frequentemente infecta pele e mucosas, ela pode causar infecções sistémicas como pneumonia, septicemia e endocardites em pacientes imunodeprimidos, apresentando morbidade entre 30 e 50%. A infecção mais comum é a candidíase pode ser aguda ou crónica, com lesões superficiais ou profundas (Alangaden, 2011; Pemán *et al.*, 2011).

2.7. Métodos de avaliação da actividade antimicrobiana

O facto de um extracto vegetal apresentar actividade antimicrobiana é interessante, mas esta parte preliminar dos dados deve ser confiável e permitir o pesquisador comparar resultados, evitar trabalhos em que os pesquisadores utilizem a investigação da actividade antimicrobiana apenas como complemento de um estudo fitoquímico (Balouiri *et al.*, 2016).

Uma variedade de métodos laboratoriais podem ser usados para avaliar ou rastrear a actividade antimicrobiana *in vitro* de um extracto ou composto puro. Os métodos mais conhecidos e básicos são os métodos de difusão em disco e diluição em caldo ou ágar. Outros métodos são usados especialmente para testes antifúngicos, como a técnica de alimentos envenenados. Para estudar ainda mais o efeito antimicrobiano de um agente em profundidade, teste time-kill e citofluorometria de fluxo são os métodos recomendados que fornecem informações sobre a natureza do efeito inibitório (bactericida ou bacteriostático) dependente do tempo ou da concentração e o dano celular infligido ao microrganismo em teste (Balouiri *et al.*, 2016).

2.7.1. Método de difusão em disco

O teste de difusão em ágar de disco ou Kirby-Bauer, desenvolvido em 1940 (Trussel & Baird, 1947), é o método oficial usado em muitos laboratórios de microbiologia clínica para testes de susceptibilidade antimicrobiana de rotina. Hoje em dia, muitos padrões aceites e aprovados são publicados pelo Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais para testes de bactérias e leveduras (CLSI, 2012; Sheehan *et al.*, 2004)

Neste procedimento bem conhecido, placas de ágar são inoculadas com inóculo padronizado do microrganismo teste. Em seguida, discos de papel de filtro (cerca de 6 mm de diâmetro), contendo o composto de teste na concentração desejada, são colocados na superfície do ágar. As placas de Petri são incubadas em condições adequadas. Geralmente o agente antimicrobiano difunde - se no ágar e inibe a germinação e o crescimento do microrganismo de teste e então os diâmetros das zonas de inibição de crescimento são medidos (Balouiri *et al.*, 2016). No entanto, este método determina uma CIM aproximada que pode ser calculada para alguns microrganismos e antibióticos, comparando as zonas de inibição com algoritmos armazenados (Nijs *et al.*, 2003).

A técnica de difusão em ágar é bastante utilizada, sendo considerada de fácil execução, reprodutível e permite a experimentação de diversas concentrações das substâncias-teste em uma mesma placa. O ensaio de difusão em disco oferece muitas vantagens sobre outros métodos: simplicidade, baixo custo, capacidade de testar um enorme número de microrganismos e agentes antimicrobianos e facilidade de interpretação dos resultados fornecidos (Kreger *et al.*, 1980).

2.7.2. Métodos de diluição em ágar

Os métodos de diluição em ágar e diluição em caldo são duas técnicas altamente semelhantes usadas para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de agentes antimicrobianos. A CIM é a concentração mais baixa de um agente antimicrobiano que inibe o crescimento visível de uma bactéria específica. A diferença básica entre os métodos de diluição em ágar e diluição em caldo reside no meio utilizado: a diluição em ágar utiliza placas de ágar, enquanto a diluição em caldo utiliza tubos de caldo líquido. Ambos os métodos envolvem a incorporação de diferentes concentrações da substância antimicrobiana no meio, seguida pela aplicação de um número padronizado de células microbianas ao meio. A CIM é determinada pela observação do crescimento ou ausência de crescimento do microrganismo (Hossain, 2023)

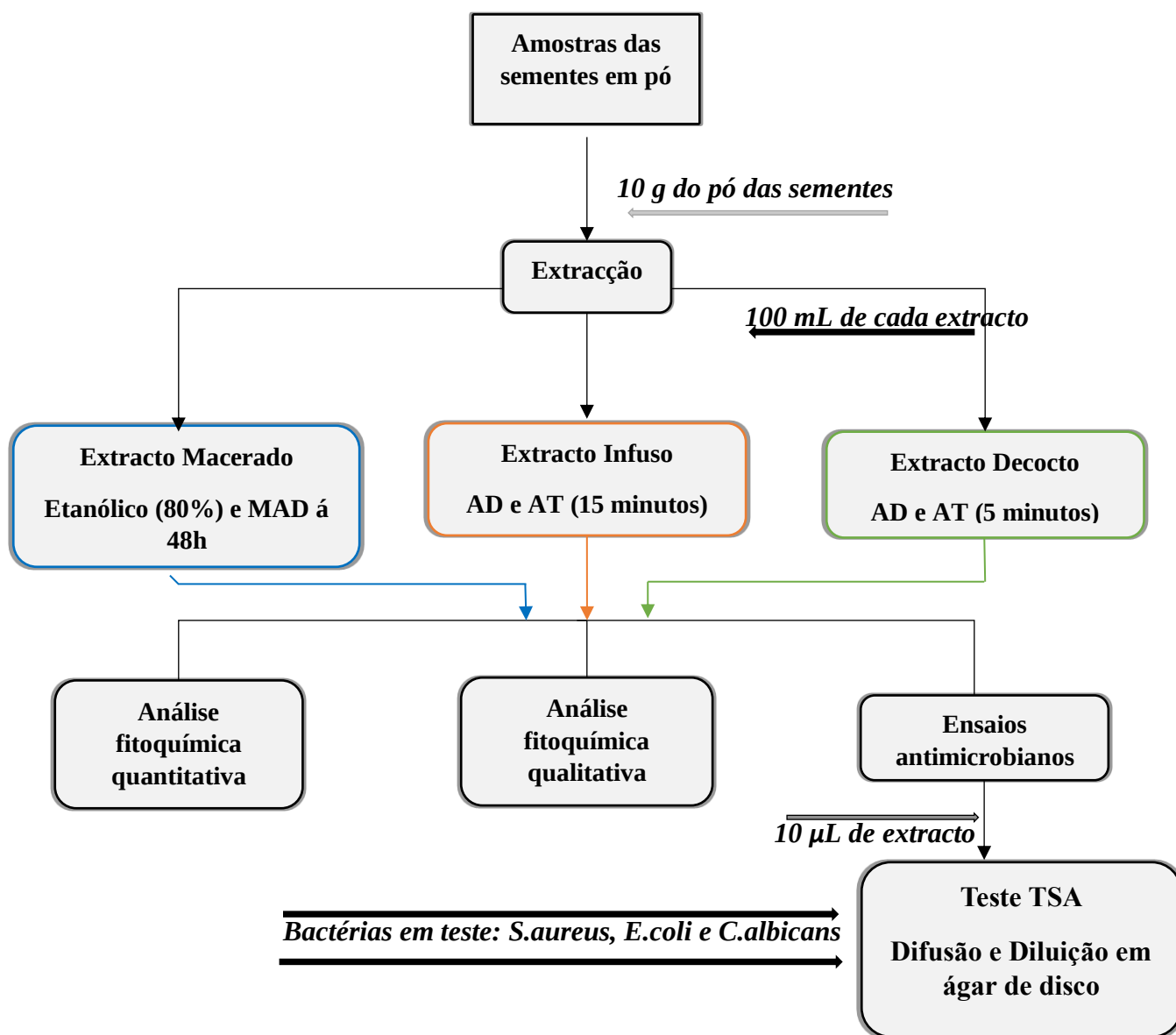
O método de diluição em ágar envolve a incorporação de diversas concentrações desejadas do agente antimicrobiano em um meio ágar (meio ágar fundido), habitualmente usando diluições duplas em série, seguida pela inoculação de um inóculo microbiano definido na superfície da placa de ágar. Esta técnica é adequada para testes de susceptibilidade antibacteriana e antifúngica. Se vários isolados estiverem sendo testados contra um único composto, ou se o composto (ou extracto) testado mascarar a detecção de crescimento microbiano no meio líquido com a sua coloração, o método de diluição em ágar é frequentemente preferido à diluição em caldo para a determinação da CIM (Balouiri *et al.*, 2016).

CAPÍTULO III

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Desenho de pesquisa

O fluxograma 1 apresenta o esquema que foi seguido para a análise fitoquímica e avaliação da actividade antimicrobiana dos extractos da semente da *Nigella sativa*.



Esquema 2. Fluxograma geral dos ensaios laboratoriais.

3.2. Colheita e tratamento das amostras

As sementes utilizadas no presente estudo foram adquiridas na cidade de Maputo, concretamente na loja de produtos naturais asiáticos, secas e embaladas num frasco advindas da Arábia Saudita. As sementes foram armazenadas e conservadas em local fresco, seco, à temperatura ambiente e protegidas da luz, por um período de 30 dias no laboratório de produtos naturais do departamento de Química. A identificação da espécie *Nigella sativa* foi baseada nas informações fornecidas pelos praticantes da Medicina tradicional, assim como também pelos técnicos do Herbário do Departamento de Ciências Biológicas da UEM. As sementes foram submetidas a trituração com auxílio de triturador doméstico e de seguida armazenadas na forma de pó num recipiente de vidro de âmbar até início da preparação dos extractos.

3.3. Procedimento de extracção

A preparação dos extractos foi realizada usando três métodos, e para cada método usou-se 2 tipos de solventes extractores obtendo-se assim 6 extractos. Primeiramente usou-se o método de Maceração aquosa (água destilada) e etanólica a 80% por 24h, de seguida o método de Infusão com água destilada e zda torneira por 15 minutos e por fim a Decocção com água destilada e água da torneira por 5 minutos. Para completar cada extracção pesou-se 10g do pó e adicionou-se 100 mL de cada líquido extractor, conforme o esquema 2. De seguida filtrou-se a amostra para um Becker usando um suporte universal, funil e papel de filtro e transferiu-se para tubo de polietileno de centrifuga como mostra a figura 8.

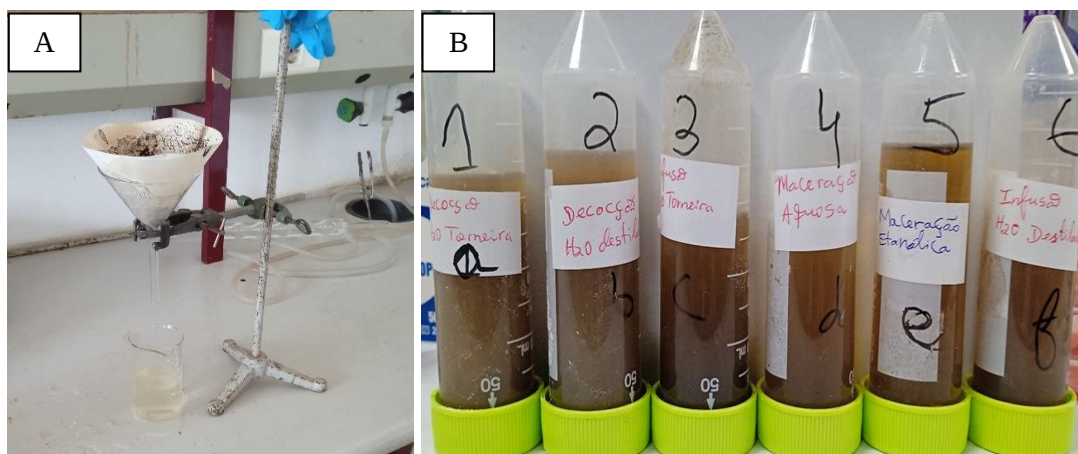


Figura 8. (A) Filtração das amostras; (B) Amostras nos tubos de polietileno de centrifuga.

3.4. Prospeção fitoquímica qualitativa

Para identificação dos metabólitos secundários presentes nas sementes da *Nigella sativa* foi realizada uma triagem fitoquímica qualitativa baseada em testes colorimétricos e testes de precipitação usando reagentes específicos nos seis extractos preparados.

3.4.1. Teste de alcalóides

Em um tubo contendo 1 mL de extracto foi adicionado 8 gotas de HCl (2%), de seguida filtrou-se a solução. Separou-se o filtrado em dois tubos diferentes, onde em um foi adicionado 3 gotas do reagente de Mayer e no outro adicionou-se 3 gotas do reagente de Dragendroff. O aparecimento de um precipitado amarelo indicou a presença de alcalóides com reagente de Mayer e uma precipitação turva indicou presença de alcalóides com o reagente de Dragendroff.

3.4.2. Teste de saponinas (Teste de espuma)

Tomou-se 1 mL de cada extracto e colocou-se em tubos de ensaio, de seguida adicionou-se 1 mL de clorofórmio, 2.5 mL de água destilada em cada tubo. Procedeu-se com filtração das soluções contidas nos tubos para novos tubos de ensaio, agitando-se as soluções permanentes por 3 minutos seguidos. A presença de espuma branca indicou a presença de saponinas.

3.4.3. Teste de cumarinas (Teste de basicidade com NaOH)

Tomou-se 1 mL de cada extracto e colocou-se em tubos de ensaios e adicionou-se 1 mL de NaOH a 10%. O aparecimento da cor verde-amarelada indicou a presença de cumarinas.

3.4.4. Teste de taninos (Teste de FeCl₃ e (CH₃COO)₂Pb a 5%)

Adicionou-se 2 mL de água destilada e agitou-se, de seguida 3 gotas de cloreto férrico a 5% para um tubo contendo 1 mL de extracto. Repetiu-se o procedimento substituindo cloreto férrico por acetato de chumbo. A formação de uma coloração verde na solução sugere a presença de taninos condensados e coloração azul ou precipitado branco sugere a presença de taninos hidrossolúveis.

3.4.5. Teste flavonóides

Em um tubo de ensaio contendo 1 mL do extracto foi adicionado 1 mL de clorofórmio, seguido da adição de 1 mL de NH_4OH (1%). O surgimento da coloração amarela na camada de amónia indicou a presença de flavonóides.

3.4.6. Flavonóis (Teste de NaOH)

Em um tubo de ensaio contendo 1 mL do extracto foram adicionados cerca de 3 gotas de HCl concentrado. De seguida adicionou-se o reagente de Shinoda (solução de magnésio metálico em metanol). O surgimento da coloração amarela a laranja indicou a presença de flavononas.

3.4.7. Teste de triterpenos e esteróides

Tomou-se 1 mL do extracto e adicionou-se 5 mL de clorofórmio. A solução resultante foi filtrada em papel de filtro e dividida igualmente em duas porções utilizando dois tubos de ensaios. No primeiro tubo realizou-se a reacção com reagente de Liebermann-Burchard (10 mL de anidrido acético + 2 gotas de ácido sulfúrico), agitou-se suavemente e o aparecimento de uma coloração azul esverdeada indicou a presença de triterpenos ou esteróides. No segundo tubo realizou-se a reacção adicionando algumas gotas de ácido concentrado (reacção de Salkowski), a ocorrência de uma variação da coloração de amarelo a roxo avermelhada indicou a presença de esteróides.

3.5. Análise fitoquímica quantitativa

3.5.1. Quantificação de fenóis totais

Para a determinação de fenóis totais aplicou-se o método calorimétrico de Folin-Ciocalteu, procedeu-se conforme Sousa *et al.* (2007) com algumas alterações, onde uma alíquota contendo 100 μL da amostra com 500 μL do reagente de Folin-Ciocalteu e 6 mL de água destilada foram misturados e agitados por 1 minuto. Passado este tempo, cerca de 2 mL de Na_2CO_3 a 15% foram adicionados à mistura e agitada por 30 segundos. Finalmente, a solução teve o seu volume acertado para 10 mL com água destilada e a cor azul intensa desenvolvida mostrou a presença de fenóis totais. Após 2 horas de incubação, as absorvâncias das amostras foram medidas a 750 nm utilizando-se cubetas de vidro em espectrofotómetro UV – visível JEMWAY 6850, tendo como “branco” o metanol e todos os reagentes, com excepção do extracto. O teor de fenóis totais (FT)

foi determinado por interpolação da absorvância das amostras contra uma curva de calibração (vide em anexo A) construída com padrões de ácido gálico (1-10 µg/mL) e expressos como miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extracto (mgEAGg⁻¹). A equação da curva de calibração do ácido gálico foi $Y = 0.4289X + 0.0861$, onde X é a concentração em µgmL⁻¹, Y é a absorvância a 750 nm e o coeficiente de correlação múltipla é $R^2 = 0,9931$. Todas os ensaios foram **triplicados** e o teor de fenóis totais calculado como média ± desvio padrão da média.

3.5.2. Quantificação de flavonóides

Os flavonóides totais (FLT) foram determinados usando o método de complexação selectiva de alumínio descrito por Kumar *et al.* (2008), onde 1 mL da amostra e 1 mL da solução padrão de quercetina (100, 200, 400, 600, 800, 1000 µg/mL) foi posicionado em tubos de ensaio e 5000 µL de água destilada e 300 µL de solução de nitrito de sódio a 5% foram adicionados em cada um, depois dos 5 minutos, adicionaram-se 300 µL de cloreto de alumínio a 10% , a 6 minutos 2 mL de hidróxido de sódio 1M foram adicionados. Finalmente, o volume foi completando até 10 mL com água destilada e misturou-se bem. Desenvolveu-se uma coloração laranja-amarelada, e as absorvâncias foram lidas no espectrofotómetro Jasco V-630 UV-visível a 510 nm de comprimento de onda. O branco foi feito com água destilada e todos os reagentes com excepção do padrão. As amostras foram realizadas em **triplicadas** e como referência, foi obtida uma curva analítica com a quercetina (em anexo A), que forneceu a equação da recta ($Y = 0.2594X - 0.0861$), onde X é a concentração em µgmL⁻¹, Y é a absorvância a 510 nm e o coeficiente de correlação múltipla é $R^2 = 0.9936$, e o teor de flavonóides foi calculado como média ± desvio padrão da média em miligramas equivalentes de quercetina por grama de extracto (mgEQg⁻¹).

3.5.3. Quantificação de alcalóides

Para a determinação do teor de alcalóides (TA), procedeu-se conforme Ganapaty *et al.* (2013), onde foi adicionado 1 mL de *HCl* 2 N em uma solução de atropina de 10-100 µg/mL e filtrados. De seguida a solução foi transferida para um funil de separação, adicionou-se 5 mL de solução verde de bromocresol e 5 mL de tampão fosfato. A mistura foi agitada com 1, 2, 3 e 4 mL de clorofórmio por agitação vigorosa e colectada em um balão volumétrico de 10 mL e diluir até ao

volume com clorofórmio. Desenvolveu-se uma coloração amarelada, e as absorvâncias foram medidas no espectrofotómetro Jasco V-630 UV-visível a 470 nm de comprimento de onda. O branco foi feito com água destilada e todos os reagentes com excepção do padrão. As amostras foram **triplicadas** e como referência, foi obtida uma curva analítica com a atropina (Anexo A), que forneceu a equação da recta ($Y = 0.0116X + 0.0233$), onde X é a concentração em $\mu\text{g mL}^{-1}$, Y é a absorvância a 470 nm e o coeficiente de correlação é $R^2 = 0.9903$, e o teor de alcalóides foi calculado como média $\pm$ desvio padrão da média em miligramas equivalentes de atropina por grama de extracto (mg EAg^{-1}).

3.6. Avaliação da actividade antimicrobiana

Para avaliação da actividade antimicrobiana utilizou-se 2 cepas bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* cultivadas em meio Muller Hinton e 1 fungo *Candida albicans* cultivada em Sabourand Dextrose. Foi determinada pelo método de Difusão em Ágar em meio sólido adaptado por Bauer descrito por Silva (2015) com algumas alterações. Após incubação a 37 °C por 24 horas os inóculos destes microrganismos foram retirados e foram preparados os discos de papel de filtro com 5mm de diâmetro, que foram impregnados com 10 μL de cada extracto (etanólico, aquoso da AD e AT) das sementes de *N. sativa* e enumerados da seguinte forma: 1a- EDAT; 2b- EDAD; 3c- EIAT; 4d- EMA; 5e- EME; 6f- EIAD, nas concentrações de 100 e 50 mg/mL e foram colocados nas placas de petri sobre os meios solidificados e incubados a 37 °C por um período de 48 horas. Os ensaios foram **duplicados**, acompanhados do controle positivo, os antibióticos Cefotaxima 30 μg /disco, Levofloxacina 5 μg /disco e Fluconazol 10 μg /disco com as respectivas bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Os resultados finais foram expressos como as médias das medidas dos halos em mm nas tabelas 6 e 7. Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) usou-se o método descrito por CLSI (2020). Os extractos com concentrações baixas que não permitem a visualização dos halos de inibição foram considerados como sendo as concentrações inibitórias mínimas.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Resultados

No presente capítulo estão apresentados os resultados laboratoriais referentes aos testes fitoquímicos qualitativos, quantitativos e avaliação antimicrobiana. Os resultados foram expressos sob a forma das médias e desvio padrão das réplicas.

4.1.1. Prospensão fitoquímica qualitativa

A tabela 3 apresenta o resumo da análise fitoquímica qualitativa dos extractos brutos.

Tabela 3. Resultados da triagem fitoquímica de *Nigella sativa*.

Técnica de Extracção	Extracto das Sementes <i>N. sativa</i>	Metabólitos secundários							
		Al	FL	FLO	TN	CM	SP	ET	TP
Maceração	Etanólica	+	+	+	+	+	+	-	+
	Aquosa (AD)	-	+	+	+	+	-	-	+
Infusão	Aquosa (AD)	+	+	+	+	+	-	+	+
	Aquosa (AT)	+	+	+	+	+	+	-	-
Decocção	Aquosa (AD)	+	+	-	+	-	-	+	-
	Aquosa (AT)	+	+	+	+	+	-	-	-

Legenda: +: Positivo; -: Negativo; AD: Água destilada; AT: Água da torneira; Al: Alcalóides; FL: Flavonóides; FLO: Flavonóis; TN: Taninos; CM: Cumarinas; SP: Saponinas; ET: Esteróides; TP: Triterpenos

4.1.2. Fitoquímica quantitativa

A tabela 4 apresenta os resultados fitoquímicos quantitativos de compostos fenólicos (fenóis totais e flavonoídes totais), e a tabela 5 é referente aos resultados fitoquímicos quantitativos dos alcalóides. No anexo A estão ilustrados os resultados das absorvâncias e as curvas de calibração dos padrões do ácido gálico, da quercetina e atropina.

A tabela 4 ilustra os teores dos fenóis totais e de flavonóides totais obtidos dos diferentes extractos da semente da *N. sativa*.

Tabela 4. Resultados do teor de fenóis totais e flavonóides totais

Teor dos Fenóis totais		Teor dos Flavonóides totais
Extractos	Teor (mgEAGg ⁻¹)	Teor (mgEQg ⁻¹)
EMA	0.1072 ± 0.0003	0.841 ± 0.001
EME	6.2914 ± 0.0059	11.066 ± 0.001
EDAT	1.1193 ± 0.0003	2.515 ± 0.001
EDAD	1.3020± 0.0096	2.817 ± 0.016
EIAT	0.5055 ± 0.0027	1.499 ± 0.004
EIAD	0.8505 ± 0.0199	2.070 ± 0.033

onde: **EMA** – extracto macerado aquoso; **EME** - extracto macerado etanólico; **EDAT** – extracto decocto água da torneira; **EDAD** - extracto decocto água destilada; **EIAT** - extracto infuso água da torneira; **EIAD** - extracto infuso água destilada.

A tabela 5 ilustra os teores dos alcalóides totais obtidos dos diferentes extractos da semente da *N. sativa*.

Tabela 5. Resultados do teor de Alcalóides

Teor dos Alcalóides totais	
Extractos	Teor (mgEAg ⁻¹)
EMA	9.376 ± 0.011
EME	239.374 ± 1.857
EDAT	46.799 ± 0.011
EDAD	53.555 ± 0.354
EIAT	24.103 ± 0.099
EIAD	36.862± 0.736

4.1.3. Actividade antimicrobiana

As concentrações preparadas dos extractos brutos das sementes da *N. sativa* para os testes antimicrobianos foram 50 e 100 mg.mL⁻¹ e os resultados são resumidamente apresentados nas tabelas 6 e 7, assim como a CIM (Concentração Inibitória Mínima) dos extractos.

Tabela 6. Resultados do teste da actividade antimicrobiana dos extractos de *N. sativa* pelo método de difusão em disco (halo de inibição em mm).

Amostras de Bactérias	Extracto Bruto (100 mg.mL ⁻¹)						Controlo positivo
	EME	EMA	EIAD	EIAT	EDAD	EDAT	
<i>S. aureus</i>	11.0 ± 1.4	10.0 ± 1.7	0.0	12.0 ± 0.0	0.0	0.0	CFX 30 (15 ± 1.3)
<i>E. coli</i>	9.0 ± 0.5	0.0	0.0	0.0	7.0 ± 0.0	7.0 ± 0.0	LEV 5 (22 ± 1.3)
<i>C. albicans</i>	9.0 ± 0.8	0.0	11.0 ± 1.0	12.0 ± 0.0	0.0	0.0	FLU 10 (35 ± 0.8)

Legenda: CFX 30: Cefotaxima 30 µg/disco; LEV 5: Levofloxacina 5 µg/disco; FLU 10: Fluconazol 10 µg/disco; ME/MA: maceração etanólica e aquosa; IAD/IAT: Infusão água destilada e torneira; DAD/DAT: Decocção água destilada e torneira.

Tabela 7. Resultados dos testes antimicrobianos na determinação de CIM dos extractos de *N. sativa* (halo de inibição em mm).

Amostras de Bactérias	Extracto (50 mg.mL ⁻¹)					
	EME	EMA	EIAD	EIAT	EDAD	EDAT
<i>S. aureus</i>	8.0 ± 0.9	6.0 ± 0.0	0.0	8.0 ± 0.0	0.0	0.0
<i>E. coli</i>	0.0 ± 0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>C. albicans</i>	7.0 ± 0.9	0.0	8.0 ± 0.5	8.0 ± 0.0	0.0	0.0

4.2. Discussão

4.2.1. Análise fitoquímica qualitativa

Os testes fitoquímicos são realizados com vista à identificação dos metabólitos secundários presentes nas diferentes partes de uma planta. Para o presente estudo, os resultados alcançados no laboratório para as análises fitoquímicas preliminares dos extractos das sementes da *N. sativa* revelaram a presença de várias classes de metabólitos secundários de relevante interesse farmacológico como é ilustrado na tabela 3. Dentre os extractos analisados, o extracto etanólico foi o que apresentou o maior número de metabólitos secundários com actividade biológica em relação aos demais extractos aquosos.

Acredita-se que a elevada presença de metabólitos secundários observada no extracto etanólico em relação aos extractos aquosos deve-se à relação das polaridades e solubilidades dos solventes. O etanol e a água são solventes polares, no entanto, o etanol é ligeiramente menos polar em relação à água, o que sugere que os metabólitos revelados das sementes da *N. sativa* são de carácter menos polar. Esta Observação que coaduna com o exposto por Tiwari *et al.* (2019), no estudo sobre a fitoquímica e farmacologia da *N. sativa*, que mostraram que, parte considerável dos metabólitos secundários poderiam ser revelados pelo etanol, justificando assim que muitos dos metabólitos secundários são mais solúveis em etanol.

Os alcalóides, flavonóides, flavonóis, taninos e cumarinas foram os metabólitos secundários que estiveram presentes em quase todos os extractos como pode ser mostrado na tabela 3. Por outro lado, as saponinas, esteróides e os triterpenos tiveram menos presença nos diferentes extractos das sementes. Os resultados obtidos da fitoquímica preliminar alinham com os obtidos por Shafodino *et al.* (2022), onde à triagem fitoquímica realizada sobre as sementes da *N. sativa* usando diferentes extractos (petróleo, éster acético, metanol e água), os extractos metanólicos e aquosos mostraram mais eficácia revelando os alcalóides, flavonóides, fenóis, taninos, esteróides, saponinas e terpenóides. Não muito distante do que foi revelado no presente trabalho, o extracto etanólico da fitoquímica realizada por Tiwari *et al.* (2019) revelou a presença de flavonóides, alcalóides, taninos, timoquinona, carvacrol e terpenóis. É de ressaltar o papel importante das técnicas de extracção usadas, pois elas possuem uma influência no que concerne à revelação dos metabólitos secundários presentes nos extractos.

A determinação do composto biologicamente activo a partir de um material vegetal é dependente do tipo de solvente usado no processo de extracção. Um bom solvente em extracções de plantas possui propriedades como: baixa toxicidade, facilidade de evaporação a baixa temperatura, absorção fisiológica rápida do extracto, acção conservante e incapacidade de fazer com que o extracto se dissocie ou torne-se complexo (Das *et al.*, 2010). Na extracção de compostos hidrofílicos, por exemplo, são usados solventes polares tais como metanol, etanol ou éster acético. Já para compostos mais lipofílicos, são usados diclorometano ou uma mistura de diclorometano ou metanol na proporção de 1:1 (Sasidharan *et al.*, 2011).

De facto, estes compostos bioactivos revelados da *N. sativa* sugerem que essas sementes podem providenciar uma importante força para atenuar os radicais livres que podem ser introduzidos por diferentes agentes tóxicos como peróxido de hidrogénio e gentamicina (Ouattar *et al.*, 2022), assim como fornecer uma resposta antimicrobiana contra as bactérias, fungos, vírus e parasitas (Shafodino *et al.*, 2022).

4.2.2. Análise fitoquímica quantitativa

As tabelas 4 e 5 está presente a síntese dos resultados da fitoquímica quantitativa referente aos fenóis totais, flavonóides totais e alcalóides totais dos extractos das sementes da *N. sativa*.

4.2.2.1. Fenóis totais e Flavonóides totais

A quantificação do teor de fenóis totais nos extractos foi realizada pelo método colorimétrico que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu, reagente que é vastamente usado para este tipo de quantificação em extractos de planta. Este reagente possui na sua composição o ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) e o ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) que apresenta uma coloração amarela. A reacção ocorre entre os iões molibdatos porque os tungstatos dificilmente sofrem redução em sais heteropoliácido.

Esta reacção trata-se de uma oxirredução em que carbonos do ácido gálico, com estado de oxidação +1, tornam-se +2 e o ião Mo^{6+} é reduzido a Mo^{5+} . (Rezende, 2010).

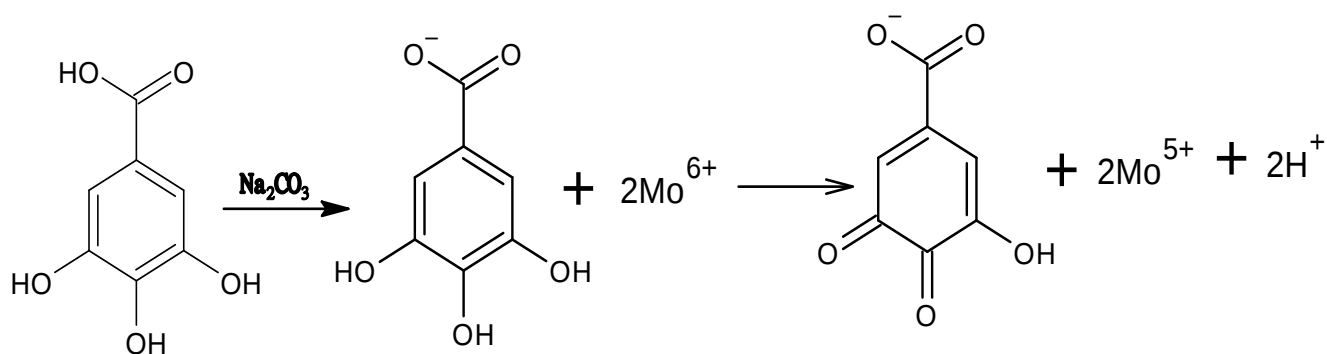


Figura 9. Equação de formação de iões de molibdénio.

Para os fenóis totais os resultados foram expressos como equivalentes ao ácido gálico (mgEAGg⁻¹) de extracto.

E para a quantificação dos flavonóides totais recorreu-se no método de complexação selectiva de alumínio, onde esta se baseia em uma reacção de complexação entre o cloreto de alumínio e a quercetina, de onde os átomos de oxigénio fazem um ataque nucleofílico ao Al^{3+} que é um ácido de Lewis como representa a figura 10 (Sousa, 2015).

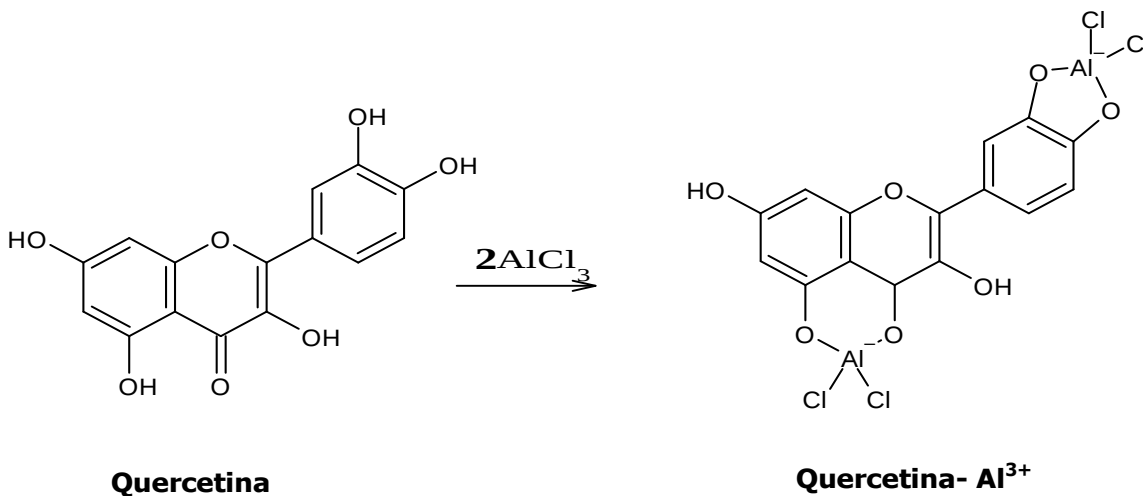


Figura 10. Formação de complexos da quercetina

Como ilustrado na tabela 4, a fitoquímica quantitativa dos fenóis totais e flavonóides totais revelou um comportamento semelhante nos extractos, sendo que o extracto macerado etanólico apresentou maior teor referente aos fenóis totais e flavonóides totais, seguido do extracto decocto água destilada, e o extracto macerado aquoso apresentou o menor teor de fenóis totais assim como de

flavonóides totais. Sendo assim, a quantificação dos fenóis e flavonóides nos extractos fica na seguinte ordem decrescente EME > EDAD > EDAT > EIAD > EIAT > EMA.

Considerando os resultados da fitoquímica preliminar, os elevados teores de fenóis totais e flavonóides totais no extracto macerado etanólico já era de se esperar, reforçando ainda a teoria da afinidade selectiva do etanol com os compostos polarizados presentes no extracto das sementes. Em contraste o macerado aquoso revelou o menor teor de fenóis e flavonóides, o que pode ser explicado pela capacidade limitada da água em extrair compostos hidrofóbicos como alguns fenóis e flavonóides. Não obstante a isso Kaushik & Barmanray (2022) afirmam que o uso da água como solvente, especialmente no método da maceração, pode não ser eficiente para extrair compostos específicos nesses processos.

Os valores referentes aos EDAD e EDAT, é de acreditar que a não complexidade da composição da água destilada em relação à água da torneira (que possui muitos minerais) facilitou a extracção dos fenóis e flavonóides presentes nesse extracto e desse modo quantificou-se mais o teor de fenóis e flavonóides no EAD do que no EAT. Estas observações são sustentadas por Kaushik & Barmanray (2022), que afirmam que o uso da água da torneira em análise fitoquímica não gera resultados muitos satisfatórios, pois este tipo de água pelo facto de possuir complexidade na sua composição (presença de minerais e outros) influencia na extracção de certos compostos, pois, estes agem como co-factores durante o processo de solubilização.

Os menores teores nos extractos registrados para o método de infusão indicam a limitação dessa técnica de extracção de compostos, pois, o mecanismo de acção (tempo e temperatura) sobre os extractos pode não ser suficiente para poder romper as ligações estáveis entre os compostos fitoquímicos existentes nas matrizes vegetais.

Teores similares de fenóis e flavonóides totais foram obtidos por Ouattar *et al.*, (2022), sendo os fenóis totais de 10.48 ± 1.33 mgEAG/g e 0.258 ± 0.058 mgQE/g para flavonóides totais. Kamal & Ahmad (2014), quantificaram um teor de 20.0 ± 0.03 mgEAG/g de fenóis totais e 24.90 ± 0.43 mgQE/g de flavonóides totais tendo como solvente o metanol. Por outro lado, estudo fitoquímico levado a cabo por Elkhawas *et al.*(2022), quantificou-se um teor de 295.21 ± 0.51 mgQE/g para flavonóides totais e 388.60 ± 1.02 mgGAE/g em metanol, valores muito acima em comparação com os obtidos com outros trabalhos.

Deve-se notar que o conteúdo fenólico das plantas está altamente ligado a numerosos factores intrínsecos e extrínsecos, tais como origem geográfica, condições climáticas, práticas de cultivo, maturidade na colheita e condições de armazenamento (Lefahal *et al.*, 2018).

Os fenóis e flavonóides desempenham um papel importante na protecção das plantas contra os efeitos deletérios dos raios UV e também contra certos microrganismos fitopatogénicos e são responsáveis pela maioria das propriedades medicinais da planta (Kamal & Ahmad, 2014).

Compostos fenólicos podem ter um impacto positivo na prevenção de doenças coronárias e cancro (Thilakarathna, 2018), além disso, os flavonóides causam uma diminuição na adesão das células inflamatórias ao subendotélio e, portanto, induzem uma diminuição na resposta inflamatória. (Kushawaha & Kumar, 2017).

4.2.2.2. Alcalóides

Os alcalóides são produtos naturais que possuem nitrogénio nas suas moléculas. Também são compostos farmacologicamente activos e com carácter básico devido à presença de nitrogénio (Agarwal *et al.*, 2020). Como ilustrado na tabela 5, os valores do teor dos alcalóides nos diferentes extractos seguiu uma tendência semelhante aos teores de fenóis e dos flavonóides, onde o extracto macerado alcoólico teve o maior teor e o extracto macerado aquoso teve o menor teor.

Como exposto sobre a polaridade do etanol face aos compostos nas matrizes das plantas, o maior teor dos alcalóides no extracto macerado alcoólico é justificado pela eficácia do solvente na dissolução dos alcalóides lipofílicos. A diferença observada entre o método de infusão e decocto destaca a possível influência da temperatura. O decocto, que envolve o aquecimento da mistura, pode ter permitido uma libertação mais eficiente dos alcalóides, explicando desse modo os teores mais altos em comparação com a infusão.

Os alcalóides são as principais moléculas de importância terapêutica da *N. sativa*. São compostos de indol heterocíclicos que demonstraram possuir propriedades farmacológicas, tais como actividade antifúngica, actividades hepatoprotectoras, antimicrobianas e antimaláricas como reportado por Kamal & Ahmad (2014).

4.2.3. Actividade antimicrobiana

Os testes de sensibilidade aos antibacterianos permitiram determinar a actividade antibacteriana do extracto das sementes da *N. sativa*, onde para o efeito foi usado o método de difusão-disco em ágar no meio sólido contra 2 cepas bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* cultivadas em meio Muller Hinton e 1 fungo *Candida albicans* cultivada em Sabourand Dextrose, tendo sido utilizado o controlo positivo Cefotaxima (30 µg/disco) para *Staphylococcus aureus*, Levofloxacina (5 µg/disco) para *Escherichia coli*, Fluconazol (10 µg/disco) para a *Candida albicans* e controlo negativo água. A avaliação antimicrobiana dos extractos das sementes foi a partir da medição do diâmetro do halo de inibição em torno do disco em milímetro, a 50 e 100 mgmL⁻¹. A ausência de um halo de inibição em torno do disco, indica que o extracto não é susceptível à cepa testada.

Na concentração de 100 mgmL⁻¹ as cepas da gram-positiva *S.aureus* mostraram-se bacteriostáticos aos extractos macerados (etanólico e aquoso) e ao extracto infuso da água da torneira, onde o da água da torneira apresentou maior diâmetro do halo na zona de inibição com 12 mm seguido do extracto macerado etanólico com 11 mm. E os extractos decoctos não se mostraram susceptível contra esta cepa. As actividades dos extractos mostram-se baixo comparado com o controle Cefotaxima que teve um halo de inibição maior, o que indica um potencial antibacteriano mais fraco do extracto em relação ao controle.

Na cepa da bactéria gram-negativa *E.coli*, observou-se actividade bacteriostática somente para o extracto macerado etanólico e os decoctos, onde o macerado apresentou o maior halo com 9 mm de diâmetro e os decoctos 7 mm para ambos. Assim como na cepa da *S.aureus*, nenhum dos extractos apresentou actividade acima do controle. Para o fungo *C.albicans* observou-se actividade anfúngica para o extracto macerado etanólico com um halo de 7 mm diâmetro e para os extractos infusos ambos com um halo de 8 mm de diâmetro.

Acredita-se que a presença de um halo de inibição significativo no extracto infuso com água da torneira contra as cepas da bactéria *S.aureus* deve-se à presença de compostos activos capazes de inibir o crescimento destas cepas, e a água pode ter fornecido minerais ou iões que interagiram positivamente com os componentes das sementes aumentando assim a eficácia antibacteriana, o que é sustentado por Shafodino *et al.* (2022) que afirmam que a presença de minerais neste tipo de

água facilita a solubilização deste com os componentes activos de certas plantas favorecendo deste modo o combate contra certas bactérias.

A falta de halos de inibição nos extractos decoctos e no infuso com água destilada para as cepas da *S.aureus* indica uma ausência de actividade antibacteriana nessas condições específicas. A água destilada pode ter extraído eficientemente os compostos activos, ou o processo decocto pode ter degradado esses compostos.

Como enfatizado acima, na fitoquímica quantitativa e qualitativa, o solvente etanol tem a capacidade de extrair uma grande variedade de compostos bioactivos. Acredita-se que possa ter extraído compostos das sementes que são eficazes contra a *E.coli*, onde dentre estes compostos refere-se à fenólicos e flavonóides que são comumente conhecidos pelas suas propriedades antimicrobianas. E a falta de halos nos extractos (macerado aquoso, infuso com água destilada e infuso com água da torneira) pode indicar que os compostos antimicrobianos presentes nas sementes não são facilmente extraídos em condições aquosas ou a quantidade extraída é insuficiente para exercer efeito sobre a *E.coli*.

Resultados obtidos por Shafodino *et al.* (2022) referente à investigação da actividade antimicrobiana sobre as sementes da *N. sativa*, revelaram uma zona de inibição de 8 mm para as cepas gram-negativa *E.coli* no extracto etanólico e 10 mm de diâmetro para as cepas gram-negativas *S.aureus*. Ainda no mesmo contexto, as investigações de Mehmood *et al.* (2021) sobre a actividade antibacteriana das sementes da *N. sativa* usando como solvente o metanol, revelaram um halo de inibição de 13 mm para as cepas gram-negativas da *E.coli* e 12 mm de diâmetro de halo para as cepas gram-positivas de *S.aureus*.

Obtendo valores de zonas de inibição muito abaixo em comparação com outras investigações, Al-Hussainy (2015) investigando a actividade antibacteriana das mesmas sementes em extracto etanólico, obteve um halo de 1.28 mm na zona de inibição para a bactéria gram-negativa *E.coli* e 0.92 mm para a bactéria gram-positiva *S.aureus*.

No presente estudo, é possível observar na tabela 6 que os halos de inibição obtidos da bactéria gram-positiva são maiores que as da gram-negativas, esses resultados corroboram com os resultados nos estudos de Mohammed *et al.* (2019) e Saleh *et al.* (2018) que relatam que cepas de bactérias gram-negativas possuem uma membrana celular externa dentro da parede celular que

pode actuar como uma barreira de permeabilidade. Isso pode minimizar a absorção de compostos como polifenóis pela célula bacteriana e, portanto, resultando em extractos menos eficazes em bactérias gram-negativas em comparação com as suas contrapartes.

Na concentração de 50 mgmL⁻¹ apenas a cepa da *E.coli* mostrou-se inactiva, sendo assim a concentração inibitória mínima do EME (9 mm), EDAD (7 mm) e EDAT(7 mm) para *E.coli* é de 100 mgmL⁻¹, e para as cepas *S.aureus* e *C.albicans* a concentração inibitória mínima é de 50 mgmL⁻¹ como mostra a tabela 7. Estudo semelhante verificou-se em extracto aquoso (Sulaiman & Muhammad, 2023), é a concentração inibitória mínima (CIM) para *E.coli* foi de 100 mgmL⁻¹.

Em outro estudo feito por Morsy *et al.*(2022), *N. sativa* obteve zona de inibição na faixa de 13-20 mm e CIM de 20 mg/mL contra *K.pneumonia*, e obteve também em 15,0±0,67 mm a CIM de 50mg/mL para *S. aureus*, pois quanto menor o CIM, mais eficaz é o extracto (Ahmad *et al.*, 2023).

CAPÍTULO V

5. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

5.1. Conclusões

Os resultados apresentados no presente trabalho, permitem concluir que:

A análise fitoquímica qualitativa e quantitativa realizados, possibilitaram a identificação de metabólitos secundários existentes nos extractos das sementes da *N. sativa*, assim como a sua quantificação. Os extractos aquosos e etanólicos revelaram a presença de alcalóides, flavonóides, flavonóis, taninos, cumarinas, saponinas, esteróides e triterpenos, exceptuando no extracto decocto que não revelou a presença de saponinas e triterpenos e no extracto macerato que não apresentou esteróides. Em análise quantitativa revelou que o extracto macerato etanólico apresenta alto teor de fenóis totais, flavonóides e alcalóides, tendo apresentado quantidades significativas e relevantes de $6.2914 \pm 0.0059 \text{ mgEAGg}^{-1}$, $11.066 \pm 0.001 \text{ mgEQg}^{-1}$ e $239.374 \pm 1.857 \text{ mgEAg}^{-1}$ respectivamente.

Na avaliação da actividade antimicrobiana revelou que a maioria dos extractos inibiu o crescimento de microorganismos nas concentrações de 100 e 50 mgmL⁻¹, revelando uma boa susceptibilidade dos extractos da *N. sativa*, principalmente *S.aureus* que se mostrou mais sensível ao extracto.

Os resultados da avaliação da actividade antimicrobiana mostraram uma boa correlação com o teor de alcalóides e flavonóides detectados nos extractos da *N. sativa*, sugerindo que são os principais responsáveis pela capacidade antimicrobiana evidenciada pelos extractos que se mostraram activos.

A presença dos metabólitos secundários e a actividade antimicrobiana nas sementes da *N. sativa*, revelada no presente estudo mostraram-se propícios a serem utilizados para o tratamento de doenças por concentrarem princípios activos contra as bactérias e fungo em estudo.

5.2. Recomendações

Recomenda-se:

- A continuidade no estudo das sementes utilizando métodos extractivos e solventes diferentes que os usados no presente estudo;
- Estudo de outras actividades biológicas, especialmente a actividade antioxidante;
- Estudo de isolamento, purificação e elucidação estrutural de princípios activos presentes nos extractos que revelaram acção inibitória contra os microrganismos, especialmente os alcalóides;
- Estudo da avaliação antimicrobiana com outras cepas bacterianas, bem como a determinação da concentração inibitória mínima dos extractos com recurso à método de microdiluição em caldo;
- Estudo toxicológico que forneça uma consistência científica para o uso seguro dos extractos da *N. sativa*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdallah, M. E. (2011). Plants: An alternative source for antimicrobials. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 04.09(6), 16–20.
- Agarwal, S., Tripathi, S., Arshi, A. & Mishra, N. (2020). Nutritional composition and antioxidant profiles of *Nigella sativa* L. seeds. *Annals of Phytomedicine: An International Journal*, 9(2). <https://doi.org/10.21276/ap.2020.9.2.18>
- Ahmad, A., Husain, A., Mujeeb, M., Khan, S. A., Najmi, A. K., Siddique, N. A., Damanhour, Z. A. & Anwar, F. (2013). A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(5), 337–352. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60075-1](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60075-1)
- Ahmad, J., Abdu, A., Mitiku, H. & Ataro, Z. (2023). *In vitro* Antibacterial Activities of Selected Medicinal Plants Used by Traditional Healers for Treating Urinary Tract Infection in Haramaya District , Eastern Ethiopia. *March*, 1327–1338.
- Ahmad, M. F., Ahmad, F. A., Ashraf, S. A., Saad, H. H., Wahab, S., Khan, M. I., Ali, M., Mohan, S., Hakeem, K. R. & Athar, M. T. (2021). An updated knowledge of Black seed (*Nigella sativa* Linn.): Review of phytochemical constituents and pharmacological properties. Em: *Journal of Herbal Medicine* (Vol. 25). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2020.100404>
- Al-Hussainy, A. D. L. (2015). Evaluation of the antimicrobial (antibacterial and antifungal) activity of ethanolic extracts of some medical plants. Em: *Journal of Natural Sciences Research* www.iiste.org ISSN (Vol. 5, Número 22).
- Al-Quorain, A. (2015). *Nigella Sativa*. *Saudi Journal of Medicine and Medical Sciences*, 3(1), 1. <https://doi.org/10.4103/1658-631x.149647>
- Alangaden, G. J. (2011). Nosocomial Fungal Infections: Epidemiology , Infection Control , and Prevention. *Infectious Disease Clinics of NA*, 25(1), 201–225. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2010.11.003>
- Albuquerque, U. P., Medeiros, M. Almeida., A. L. S., Monteiro, M., Machado, E., Lins, D. F., Melo, J. G. & Patr, J. (2007). Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil. *A quantitative approach*. 114, 325–354. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.08.017>

- Aljabre, S. H. M., Alakloby, O. M. & Randhawa, M. A. (2015a). Dermatological effects of *Nigella sativa*. *Journal of Dermatology & Dermatologic Surgery*, 19(2), 92–98.
<https://doi.org/10.1016/j.jdds.2015.04.002>
- Aljabre, S. H. M., Alakloby, O. M. & Randhawa, M. A. (2015b). Title : Dermatological effects of *Nigella sativa*. Em: *Journal of the Saudi Society of Dermatology and Dermatologic Surgery*, April. <https://doi.org/10.1016/j.jdds.2015.04.002>
- Aljabre, S. H. M., Randhawa, M. A., Akhtar, N., Alakloby, O. M., Alqurashi, A. M. & Aldossary, A. (2005). Antidermatophyte activity of ether extract of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone. *Journal of Ethnopharmacology*, 101(1–3), 116–119.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.002>
- Almeida, A. C., Faria, F. M., Dunder, R. J., Manzo, L. P. B., Souza-brito, A. R. M. & Luiz-ferreira, A. (2017). Recent Trends in Pharmacological Activity of Alkaloids in Animal Colitis : Potential Use for Inflammatory Bowel Disease. *Hindawi*, 24.
- ANVISA. (2020). *Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde*. (A. Cardenas, F. Esposito, R. Bonelli, J. L. Sampaio. & N. Lincopan. Módulo 10 – Detecção dos Principais Mecanismos de Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos pelo Laboratório de Microbiologia Clínica (eds.); 1ª edição).
- Asif, H. M., Akhtar, N., Iqbal, A., Nazar, H., Rehman, R. U. & Sultana, S. (2015). *Nigella sativa*: Monograph. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 4(4), 103–106.
- Balouiri, M., Sadiki, M. & Ibensouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity : A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79.
<https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Bhandari, M. R. & Kawabata, J. (2004). Food Chemistry Organic acid , phenolic content and antioxidant activity of wild yam (*Dioscorea spp.*) tubers of Nepal. *Food Chemistry*, 88, 163–168. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.12.027>
- Bianchi, T. L. (2023). *Avaliação de Resistência aos Antibióticos de Bactérias Escherichia Coli Presentes nos rios da Bacia Hidrográfica do Ribeirão dos Padilhas*. 101.
- Borges, P. L. & Amorim, V. A. (2020). Metabólitos secundários de plantas. *Revista agrotecnologia*. (11). January, 15.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications. *International journal of food microbiology*, 94, 223-253

- Calixto, J. B. (2000). Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33(2), 179–189. <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.2000095062>
- CLSI. (2012). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: Approved standard - *Eleventh edition* (Vol. 32, Número 1). <https://doi.org/M02-A11>
- CLSI. (2020). *Performance Standards for Antimicrobial*. 332.
- Costa, T. da S. A., Lima, A. & Lima, M. V. (2003). *Determinação de Tanino em Pedúnculo de Cajú: Método da Vanilina Versus Método do Butanol Ácido*. 26(October 2003), 1–4. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000500022>
- Coutinho, M. A. ., Muzitano, M. F. & Costa, S. S. (2009). Flavonoides : *Potenciais Agentes Terapêuticos para o Processo Inflamatório*. 1(3), 241–256. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20090024>
- Cowan, M. M. (1999). *Plant Products as Antimicrobial Agents*. 12(4), 564–582.
- Crozier, A., Clifford, M. N. & Ashihara, H. (2006). *Plant Secondary Metabolites Occurrence , Structure and Role in the Human Diet Edited by* (Blackwell).
- Dalli, M., Bekkouch, O., Azizi, S. E., Azghar, A., Gseyra, N. & Kim, B. (2022). *Nigella sativa* L. Phytochemistry and pharmacological activities: A review (2019–2021). *Biomolecules*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/biom12010020>
- Das, K., Tiwari, R. K. S. & Shrivastava, D. K. (2010). *Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent : Current methods and future trends*. 4(2), 104–111. <https://doi.org/10.5897/JMPR09.030>
- De Souza, G. H. B., Mello, J. C. P. & Lopes, N. P. (2011). *Farmacognisia - Coletânea Científica* (UFOP).
- Delgado, V. S. R. (2020). Evolução do perfil de suscetibilidade aos antibióticos de isolados bacterianos em uroculturas do laboratório da Cintramédica em dois períodos distintos (2014 e 2018). *Cintramédica*, 73.
- Elkhawas, I. A., Hamed, A. M., Elsousy, E. M., Mekky, A. E., Elhaw, M. H. & Mekky, A. (2022). Study of phytochemical analysis and antimicrobial activity of ethanolic extract of *Nigella Sativa* L and *Matricaria Chamomilla* L. *Al-Azhar Journal of Agricultural Research*, 47(2), 38–51. <https://doi.org/10.21608/ajar.2022.277829>
- Farhan, N., Salih, N. & Salimon, J. (2021). Physiochemical properties of Saudi *Nigella sativa* L.

- (Black cumin) seed oil. *OCL - Oilseeds and fats, Crops and Lipids*, 28(11), 1–9.
<https://doi.org/10.1051/ocl/2020075>
- Flambó, D. F. A. L. P. (2013). *Atividades Biológicas dos Flavonoides : Atividade Antimicrobiana*. Porto, 43.
- Ganapathy, S., Ramaiah, M., Ysaswini, K., Nuthakki, V. K. & Harikrishnareddy, D. (2013). Quantitative Phytochemical Estimation and Evaluation of Hepatoprotective Activity of Methanolic Extract of *Dendrobium ovatum* (L.) Kraenzl. *Whole Plant against CCl 4 Induced Hepatotoxicity. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry JPP*, 113(23), 113–118.
- Hannan, A., Rahman, A., Sohag, A. M., Uddin, J., Dash, R., Sikder, M., Binod, T., Munni, Y., Alam, M., Haque, N., Jahan, I., Afrin, T., Khan, K. & Kim, B. (2021). *Black Cumin (Nigella sativa L.): A Comprehensive Review on Phytochemistry, Health Benefits, Molecular Pharmacology, and Safety*. 13, 60.
- Hannan, A., Saleem, S., Chaudhary, S., Barkaat, M. & Arshad, M. U. (2008). Anti bacterial activity of *Nigella sativa* against clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad : JAMC*, 20(3), 72–74.
- Hannan, M. A., Rahman, M. A., Sohag, A. A. M., Uddin, M. J., Dash, R., Sikder, M. H., Rahman, M. S., Timalisina, B., Munni, Y. A., Sarker, P. P., Alam, M., Mohibbullah, M., Haque, M. N., Jahan, I., Hossain, M. T., Afrin, T., Rahman, M. M., Tahjib-Ul-arif, M., Mitra, S., ... Kim, B. (2021). Black cumin (*Nigella sativa* l.): A comprehensive review on phytochemistry, health benefits, molecular pharmacology, and safety. Em: *Nutrients* (Vol. 13, Número 6). <https://doi.org/10.3390/nu13061784>
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R. & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants : chemistry , metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572–584.
- Hossain, T. J. (2023). *Methods for screening and evaluation of antimicrobial activity : a review of protocols , advantages and limitations*. SSRN, 1–35.
- Kamal, A. & Ahmad, I. Z. (2014). Phytochemical studies of different phases of germination of *nigella sativa* linn a medicinally important plant. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(4), 318–323.
- Kaushik, N. & Barmanray, A. (2022). Evaluation Of Flavonoids Content , Phenolic Compounds

- And Antioxidant Properties Of Nigella Sativa Seed Extracts Using Different Solvents. *IJFANS International Journal of Food and Nutritional Sciences*, 11(3), 2964–2973.
- Khan, A. R. (2016). Wide spectrum antibacterial activity of Nigella Sativa L. seeds. *IOSR Journal of Pharmacy (IOSRPHR)*, 06(07), 12–16. <https://doi.org/10.9790/3013-06721216>
- Kooti, W., Hasanzadeh-Noohi, Z., Sharafi-Ahvazi, N., Asadi-Samani, M. & Ashtary-Larky, D. (2016). Phytochemistry, pharmacology, and therapeutic uses of black seed (Nigella sativa). *Chinese Journal of Natural Medicines*, 14(10), 732–745. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(16\)30088-7](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(16)30088-7)
- Kreger, B. E., Craven, D. E. & McCabe, W. R. (1980). Gram-negative bacteremia. IV. Re-evaluation of clinical features and treatment in 612 patients. *The American Journal of Medicine*, 68(3), 344–355. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(80\)90102-3](https://doi.org/10.1016/0002-9343(80)90102-3)
- Kumar, S., Shanmugam, S., Palvannan, T. & Kumar, B. (2008). *Evaluation of Antioxidant Properties of Elaeocarpus ganitrus Roxb. Leaves*. 7(November 2007), 211–215.
- Kushawaha, P. P. & Kumar, S. (2017). Advances in Biochemistry of Medicinal Plants. *Biochemistry and Therapeutic Uses of Medicinal Plants, November 2016*, 41–54.
- Lefahal, M., Zaabat, N., Ayad, R., Makhoulfi, E., Djarri, L., Benahmed, M., Laouer, H., Nieto, G. & Akkal, S. (2018). In Vitro Assessment of Total Phenolic and Flavonoid Contents, Antioxidant and Photoprotective Activities of Crude Methanolic Extract of Aerial Parts of Capnophyllum peregrinum (L.) Lange (Apiaceae) Growing in Algeria. *Medicines*, 5(2), 26. <https://doi.org/10.3390/medicines5020026>
- Lima, C. C., Pereira, Á. I. S., Santos, M. L. C., Sobrinho, O. P. L., Ribeiro, F. A. & Texeira, M. B. (2020). *Plantas medicinais e indicações terapêuticas* (Editora Ci).
- Lima, F. O. & Bezerra, A. S. (2012). *Flavonoides e radicais livres 1*. 13, 111–124.
- Machado, O. V. O., Patrocínio, C. A., Medeiros, M. S., & Bandeira, T. de J. G. (2019). *Antimicrobianos: revisão geral para graduandos e generalistas* (Vol. 1, pp. 1–452). www.graficalcr.com.br
- Majid, A. (2018). The Chemical Constituents and Pharmacological Effects of Nigella sativa. *Journal of Bioscience and Applied Research*, 4(4), 389–400. <https://doi.org/10.21608/jbaar.2018.151793>
- Mehmood, A., Naveed, K., Jadoon, N., Ayub, Q., Hussain, M. & Hassaan, M. (2021). Phytochemical screening and antibacterial efficacy of black cumin (Nigella sativa L.) seeds.

- FUUA *Journal of Biology*, 11(1), 23–28.
- Melo, V. V., Duarte, I. de P. & Soares, A. Q. (2012). Guia de Antimicrobianos. *Coordenação de Farmácia*, 1 ed, 57.
- Mohammed, S. J., Amin, H. H. H., Aziz, S. B., Sha, A. M., Hassan, S., Abdul Aziz, J. M. & Rahman, H. S. (2019). Structural Characterization, Antimicrobial Activity, and in Vitro Cytotoxicity Effect of Black Seed Oil. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2019, 9. <https://doi.org/10.1155/2019/6515671>
- Morsy, K., Hamdi, H. & Barty, A. (2022). *In vitro study of antimicrobial activity of some plant seeds against bacterial strains causing food poisoning diseases*. 82, 1–7.
- Nascimento, C. A. (2016). *Caracterização funcional de terpeno sintases de citros*. Campinas-Abril 2016, 49.
- Nascimento, J. S. (2010). *Biologia de Microrganismos*. 96.
- Nijs, A., Cartuyvels, R., Mewis, A., Peeters, V., Rummens, J. L. & Magerman, K. (2003). Comparison and evaluation of Osiris and Sirscan 2000 antimicrobial susceptibility systems in the clinical microbiology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(8), 3627–3630. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.8.3627-3630.2003>
- Nonoka, C. F. W., Nascimento, G. J. F., Goulart Filho, J. A. V, Lima, K. C. & Milan, E. P. (2008). *Candida dubliniensis* – levedura emergente associada à candidose oral. *Revista de Odontologia da UNESP*, 37(2), 125–132.
- Omojate, G. C., Enwa, F. O., Jewo, A. O. & Eze, C. O. (2014). Mechanisms of Antimicrobial Actions of Phytochemicals against Enteric Pathogens – A Review. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 2(2), 77–85.
- OMS. (2012). *A crescente ameaça da resistência antimicrobiana opções de ação*. 2, 15.
- Ouattar, H., Zouirech, O., Kara, M., Assouguem, A., Almutairi, S. M., Al-hemaid, F. M., Rasheed, R. A., Ullah, R., Abbasi, A. M., Aouane, M. & Mikou, K. (2022). In Vitro Study of the Phytochemical Composition and. *MDPI*, 27(5946).
- Paarakh, P. M. (2010). *Nigella sativa* Linn . A comprehensive review. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 1(4), 409–429.
- Pemán, J., Zaragoza, R., Quindós, G., Alkorta, M., Cuétara, M. S., Camarena, J. J., Ramírez, P., Giménez, M. J., Martín-mazuelos, E., Linares-sicilia, M. J. & Pontón, J. (2011). Clinical factors associated with a *Candida albicans* Germ Tube Antibody positive test in Intensive

- Care Unit patients. *Biomedcentral*, 60(March). <https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-60>
- Rezende, L. C. D. E. (2010). Avaliação da atividade antioxidante e composição química de seis frutas tropicais. Em *Tese (Doutorado em Química)* (Número Salvador). Universidade Federal da Bahia (UFBA).
- Rio, D. Del, Rodriguez-mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G. & Crozier, A. (2012). *Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases*. 00(00), 75. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4581>
- Rodrigues, A. T. (2018). *Farmacognosia* (C. C. Rotella, L. V. Olo, E. C. Silva, L. B. Pieroni. & R. J. Galdino (eds.); CIP).
- Salazar, D., Lokvam, J., Mesones, I., Pilco, M. V., Milagros, J., Zuñiga, A., Valpine, P. & Fine, P. V. A. (2018). *in a species-rich tropical tree lineage*. 11. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0552-0>
- Saleh, F. A., El-Darra, N., Raafat, K. & El Ghazzawi, I. (2018). Phytochemical analysis of *Nigella sativa* L. Utilizing GC-MS exploring its antimicrobial effects against multidrug-resistant bacteria. *Pharmacognosy Journal*, 10(1), 99–105. <https://doi.org/10.5530/pj.2018.1.18>
- Santos, D. Y. A. (2015). *Botânica Aplicada : metabólitos secundários na interação planta-ambiente*. 1, 124.
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., Latha, L. Y., Bedong-semeling, J. & Nasi, B. A. (2011). *Extraction, Isolation and Characterization of Bioactive Compounds from Plants' Extracts*. 8, 1–10.
- Saxena, M., Saxena, J., Nema, R., Singh, D. & Gupta, A. (2013). *Phytochemistry of Medicinal Plants*. 1(6), 168–182.
- Shafodino, F. S., Lusilao, J. M. & Id, L. M. M. (2022). Phytochemical characterization and antimicrobial activity of *Nigella sativa* seeds. *PLOS ONE*, 8(17), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272457>
- Sheehan, D. J., Brown, S. D., Pfaller, M. A., Warnock, D. W., Rex, Frcp. J. H., Chaturvedi, F. V., Espinel-Ingroff, A., Ghannoum, M. A., Moore, L. S., Odds, F. C., Rinaldi, Rcp. M. G. & Walsh, T. J. (2004). Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline. NCCLS Document MA44-A. Em *N* (Vol. 24, Número 15).

- Silva, G. A. (2015). Avaliação de atividades farmacológicas e toxicidade de plantas medicinais do semiárido do nordeste brasileiro. *Avaliação de atividades farmacológicas e toxicidade de plantas medicinais do semiárido do nordeste brasileiro - Universidade Federal do Rio Grande do Norte-RN*, 1, 182.
- Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Gosmann, G., Mello, J. C. P., Menz, L. A. & Petrovick, P. R. (2007). *Farmacognosia: da planta ao medicamento* (R. I. Santos (ed.); UFRGS-UFSC).
- Soares, S. E. (2002). Ácidos fenólicos como antioxidantes Phenolic acids as antioxidants. *Rev Nutrição*, 15(1), 71–81.
- Sousa, C. M. D. M., Rocha, H., Vieira-jr, G. M., Ayres, M. C. C., Costa, L. S., Araújo, D. S., Cavalcante, L. C. D., Barros, E. D., Breitner, P. & Brandão, M. (2007). *Fenóis totais e actividade antioxidante de cinco plantas medicinais*. 30(2), 351–355.
- Sousa, R. M. F. (2015). *Estudo Químico de Eugenia Calycina Cambess e Avaliação das Atividades antimicrobiana, Antioxidante e Inibidora de alfa- Amilase*. Tese (doutorado) Universidade Federal de Uberlândia.
- Stark, L. (2013). *Staphylococcus aureus - aspects of pathogenesis and molecular epidemiology* (Número 1371).
- Sulaiman, A. N. & Muhammad, M. H. (2023). *Phytochemical constituents and antibacterial activity of Nigella sativa seeds against some pathogenic bacteria*.
<https://doi.org/10.21608/mid.2023.243546.1638>
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2013). *Fisiologia Vegetal* (5 ed, Artm).
- Thilakarathna, R. C. N. (2018). Phytochemical Analysis of Indian and Ethiopian Black Cumin Seeds (*Nigella sativa*). *Agricultural Research & Technology: Open Access Journal*, 17(1).
<https://doi.org/10.19080/artoaj.2018.17.556011>
- Tiwari, P., Jena, S., Satpathy, S. & Sahu, P. K. (2019). *Nigella sativa: Phytochemistry, pharmacology and its therapeutic potential*. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 12(7), 3111–3116. <https://doi.org/10.5958/0974-360X.2019.00526.2>
- Trussel, P. C. & Baird, E. A. (1947). A rapid method for the assay of penicillin. *Canadian journal of research*, 25(1), 5–8. <https://doi.org/10.1139/cjr47e-002>
- Veiga Jr, V. F., Pinto, A. C. & Maciel, M. A. M. (2005). *Plantas Medicinais: cura segura?* 28(3), 519–528.
- Vieira, D. P. & Fernandez, N. C. A. Q. (2012). *Microbiologia Geral*. Inhumas-IFG, 100.

ANEXOS

ANEXOS 1: Materiais e Reagentes

Tabela A1. Materiais usados durante os procedimentos experimentais.

Materiais	
Tubos de ensaio (5000 µL)	Funil de vidro e de plástico
Ansas bacteriológicas	Marcador
Cubetas de vidro	Tubo de polietileno de centrífuga
Régua	Papel de filtro
Vidro de relógio	Triturador (liquidificador)
Balões volumétricos (25 e 100 mL)	Pinças de madeira e de metal
Condensador	Garra
Conta-gotas	Placas de Petri esterilizadas (15x90/100 mm de diâmetro)
Copo de precipitação (50 e 100 mL)	Provetas (5, 10, 25, 50, 250, 500 e 1000 mL)
Luvas	Vidro de âmbar
Erlenmeyers (250 e 500 mL)	Sacos plásticos esterilizados
Esguicho	Suporte de tubos de ensaios
Espátulas	Suporte universal

Tabela A2. Reagentes usados durante os procedimentos experimentais.

Reagentes	Meios de cultura
Água destilada e torneira	Muller Hinton
Reagente de Mayer (HgCl_2/KI)	Sabourand Dextrose
Hidróxido de sódio (NaOH) (10%)	Sabourand Dextrose a 2% glicose
Clorofórmio (CCl_4) (99%)	
Etanol absoluto ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) (80%)	
Ácido clorídrico (HCl) (2%)	
Reagente de Dragendroff	
Cloreto férrico (FeCl_3) (5%)	
Acetato de chumbo [$(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$] (5%)	

Avaliação da composição fitoquímica e da Actividade Antimicrobiana in vitro dos extractos das sementes da planta *Nigella sativa*

Hidróxido de amónio (NH₄OH) (1%)
Ácido clorídrico (HCl) (Concentrado)
Reagente de Liebermann-Burchard (CH₃COOH a 10% – FeCl₃ a 10% – H₂SO₄)
Ácido gálico
Atropina
Reagente Folin-Ciocalteu (10%)
Quercetina
Verde de bromocresol
Tampão fosfato
Cefotaxima
Levofloxacina
Fluconazol
Nitrito de sódio (NaNO ₂) (5%)
Cloreto de Alumínio (AlCl₃) (10%)
Carbonato de sódio (Na ₂ CO ₃) (15%)
Reagente de Shinoda (solução de magnésio metálico em metanol)

Tabela A3. Equipamentos usados durante a execução laboratorial

Equipamentos
Autoclave para esterilização a vapor (121 °C/15 °C)
Furador de papel
Cabine de biossegurança
Espectrofotómetro UV – visível JASCO 630
Densitómetro
Bico de bunsen
Manta eléctrica (ELECTROMANTLE)

Avaliação da composição fitoquímica e da Actividade Antimicrobiana in vitro dos extractos das sementes da planta *Nigella sativa*

Homogeneizador
Incubadora controlado com termostato (37,0 ±1) (Fornecedor: Heraeus)
Centrífuga
Geleira

ANEXOS 2: Absorvâncias medidas durante a leitura das amostras e dos padrões

a) Quantificação dos Flavonóides Totais

Tabela A4. Absorvâncias lidas das amostras

	Absorvância das Amostras					
Réplicas	EMA	EME	EDAT	EDAD	EIAT	EIAD
1	0.1322	2.7819	0.5663	0.6501	0.3039	0.4629
2	0.1319	2.7837	0.5662	0.6432	0.3035	0.4461
3	0.1321	2.7879	0.566	0.6403	0.3013	0.4437
Média	0.1321	2.7845	0.5662	0.6445	0.3029	0.4509
Desvio padrão	0.0001	0.0025	0.0001	0.0041	0.0011	0.0085

Tabela A5. Absorvâncias lidas do padrão Quercetina

	Absorvância do padrão Quercetina					
Réplicas	P1 (100)	P2 (200)	P3(400)	P4(600)	P5(800)	P6(1000)
1	0.1941	0.3884	0.7115	0.9984	1.1738	1.4076
2	0.1938	0.3822	0.7178	0.9984	1.1703	1.408
3	0.1936	0.3607	0.7074	1.0008	1.1768	1.4089
Média	0.1938	0.3771	0.7122	0.9992	1.1736	1.4082
Desvio padrão	0.0002	0.0119	0.0043	0.0011	0.0027	0.0005

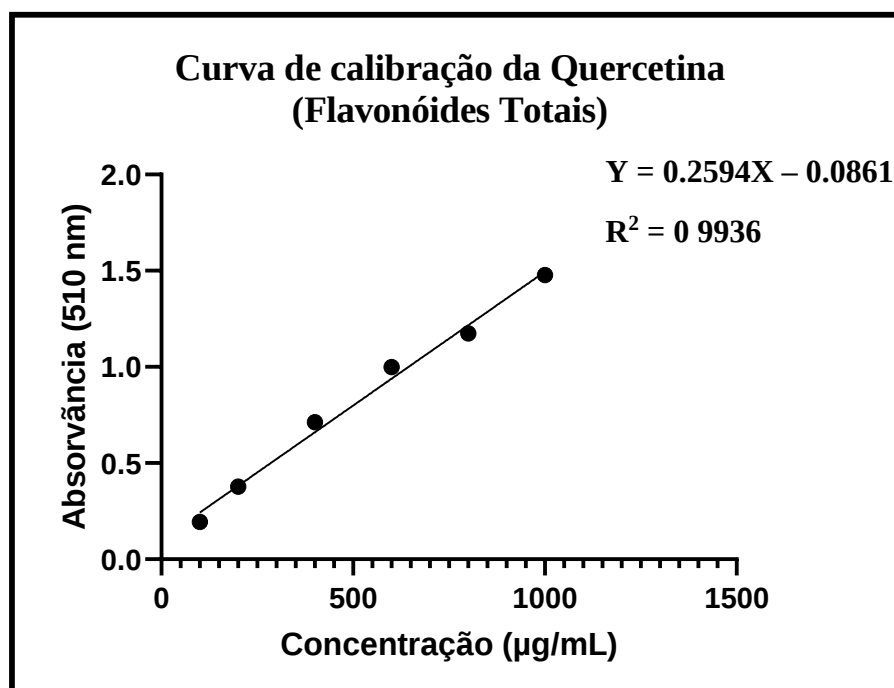


Figura A1. Curva analítica de Quercetina para determinação de Flavonóides totais.

b) Quantificação dos Fenóis Totais

Tabela A6. Absorvâncias lidas das amostras

Absorvância das Amostras						
Réplicas	EMA	EME	EDAT	EDAD	EIAT	EIAD
1	1.6175	1.9541	1.645	1.842	1.5213	1.4089
2	1.6187	1.9539	1.6446	1.8422	1.5214	1.4088
3	1.6189	1.9549	1.6446	1.8422	1.5212	1.4082
Média	1.6184	1.9543	1.6447	1.8421	1.5213	1.4086
Desvio padrão	0.0006	0.0004	0.0002	9.4E-05	8.16497E-05	0.0003

Tabela A7. Absorvâncias lidas do padrão Ácido Gálico

Absorvância do padrão Ácido Gálico						
Réplicas	P1(1)	P2(2)	P3(4)	P4(6)	P5(8)	P6(10)
1	0.5471	0.9071	1.4085	1.6984	2.3176	2.6452
2	0.5473	0.9071	1.4085	1.6967	2.3178	2.6462
3	0.5475	0.9072	1.4084	1.6971	2.318	2.6448
Média	0.5473	0.9071	1.4085	1.6974	2.3178	2.6454
Desvio padrão	0.0002	4.71E-05	4.7E-05	0.00073	0.0002	0.0006

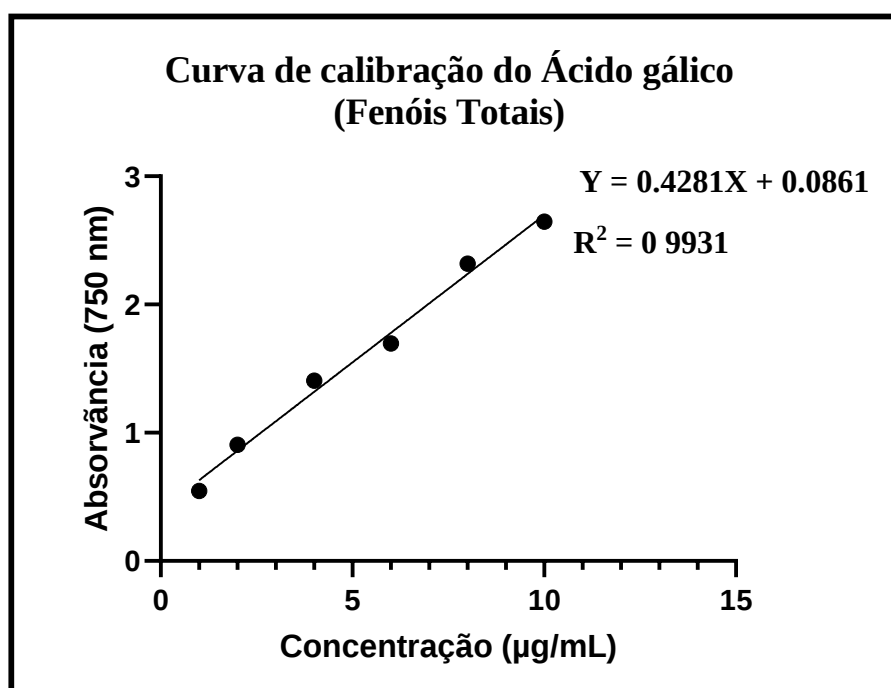


Figura A2. Curva analítica do ácido gálico para determinação de fenóis totais.

c) Quantificação dos Alcalóides Totais

Tabela A8. Absorvâncias lidas das amostras

Absorvância das Amostras						
Réplicas	EMA	EME	EDAT	EDAD	EIAT	EIAD
1	0.0936	0.2387	0.1086	0.1316	0.0914	0.0806
2	0.0932	0.2412	0.1092	0.1312	0.0913	0.0809
3	0.0935	0.2413	0.1095	0.1317	0.091	0.0811
Média	0.0934	0.2404	0.1091	0.1315	0.0912	0.0809
Desvio padrão	0.0002	0.0012	0.0004	0.0002	0.0002	0.0002

Tabela A9. Absorvâncias lidas do padrão Atropina

Absorvância do padrão Atropina						
Réplicas	P1(10)	P2(20)	P3(40)	P4(60)	P5(80)	P6(100)
1	0.0371	0.0457	0.0581	0.0689	0.0838	0.0944
2	0.0378	0.0449	0.0568	0.0653	0.0822	0.0945
3	0.0376	0.0444	0.0561	0.0652	0.0801	0.0939
Média	0.0375	0.0450	0.0570	0.0665	0.0820	0.0943
Desvio padrão	0.0003	0.0005	0.0008	0.0017	0.0015	0.0003

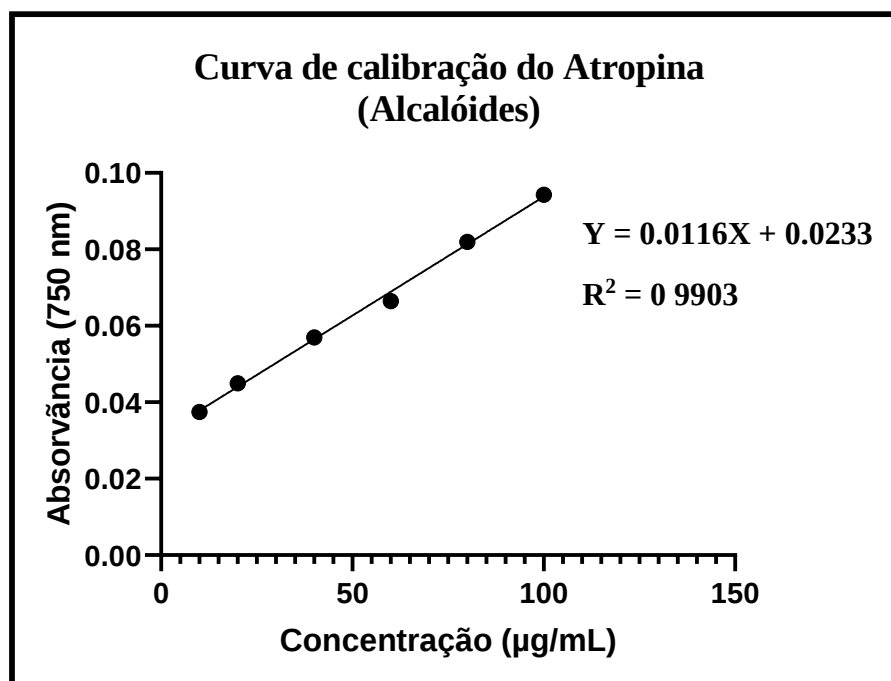


Figura A2. Curva analítica da atropina para determinação de alcalóides totais.