



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE



FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TRABALHO DE LICENCIATURA

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS
RAÍZES DA *TILIACORA FUNIFERA*



Autor: Domingos Manuel Zunguze

Maputo, Maio de 2010



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE



FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TRABALHO DE LICENCIATURA

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS
RAÍZES DA *TILIACTORA FUNIFERA*



Autor: Domingos Manuel Zunguze

Supervisor: Prof. Doutor François Munyemana

Maputo, Maio de 2010



Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

DEDICATÓRIA

Dedico especialmente este trabalho de licenciatura à minha mãe Florinda Pascoal Zavala, ao meu pai Manuel Patrício Zunguze e aos meus irmãos que ao longo dos meus estudos sempre me acompanharam, compartilhando os meus sucessos e insucessos.

AGRADECIMENTOS

Pela sublime presença de Deus em minha vida, importante força directora de minha consciência, que ensina o amor e a linguagem silenciosa da vida, a fim de espraiar a luz ao próximo, dando-nos sentido da verdadeira felicidade.

Agradecimentos especiais ao meu supervisor Prof. Doutor François Munyemana, pela orientação, paciência e apoio prestado ao longo de todas as etapas da realização do presente trabalho.

À dra Amélia Furvela, pela paciência e ajuda prestada ao longo da execução do trabalho experimental.

Agradeço às autoridades da Faculdade de Veterinária pela permissão para a realização do trabalho inerente a actividade antimicrobiana.

Aprecio também a imensa contribuição do Dr. Langa, dra. Benigna e não menos importante a Sra Salda pela sua incansável paciência e assistência técnica.

Endereço também o presente trabalho à minha família em geral pela apoio e confiança que sempre depositaram em mim.

Os meus agradecimentos são extensivos ao corpo docente e aos estudantes do departamento de Química da Faculdade de Ciências da UEM pelos momentos de amizade com passei durante a fase académica.

A todos meus colegas vão também os meus sinceros agradecimentos pelo espírito de companheirismo e irmandade.

A todos aqueles que directa ou indirectamente contribuíram para a realização deste trabalho de licenciatura, vai o meu muito obrigado.



DECLARAÇÃO SOB O COMPROMISSO DE HONRA

O presente trabalho de licenciatura foi elaborado pelo autor com base nos recursos a que ao longo do texto se faz referência.

O autor

(Domingos Manuel Zunguze)

Índice

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Declaração sob o compromisso de honra.....	iii
Índice geral.....	iv
Índice de figuras.....	vii
Índice de tabelas.....	xiii
Índice de esquemas.....	ix
Abreviaturas.....	x
Índice de anexos.....	xii
Resumo.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJECTIVOS DO TRABALHO.....	4
2.1.Objectivo geralí í í í í í í í í í í íí í í í í í í í í í .4	
2.2.Objectivos específicosí í í í í í í íí í í í í í í í í í í ..4	
3. METODOLOGIA.....	5
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
4.1. Caracterização e descrição da planta em estudoí í í í í í ..í í í í ..6	
4.1.1. Descrição taxonómica.....	6
4.1.2. Usos medicinaisí í í í í í í í í í í í6	
4.2. Actividade biológica das plantas da família menispermaceae.....	7
4.2.1. Plantas com sabor amargo.....	7
4.2.2. Plantas estimulantes do SNC.....	7
4.2.3. Plantas antihelménticas (vermífugas).....	7
4.2.4. Plantas para problemas ginecológicos.....	8
4.2.5. Plantas antimaláricas.....	8

.....	9
Alcalóides.....	9
4.3.2. Classificação dos alcalóides.....	10
4.3.2.1. Classificação de acordo com a sua origem biossintética.....	10
4.3.3. Nomenclatura e Propriedades gerais.....	11
4.3.4. Aspectos de distribuição.....	13
4.3.5. Extracção dos alcalóides.....	14
4.3.6. Testes de identificação.....	14
4.3.7. Biossíntese dos alcalóides.....	16
4.4. Alcalóides da família Menispermaceae.....	16
4.4.1. Alcalóides isoquinolínicos.....	18
4.4.2. Alcalóides presentes na planta <i>Tiliacora funifera</i>	18
4.5. Considerações sobre a actividade antimicrobiana.....	20
4.5.1. Algumas doenças causadas por agentes antimicrobianos.....	21
4.5.1.1. Tratamento da disenteria na medicina tradicional.....	22
5. TÉCNICAS E MÉTODOS DE ANÁLISE DE PLANTAS.....	23
5.1. Extracção.....	23
5.1.1. Métodos de extracção.....	23
5.1.1.1. Maceração.....	24
5.1.1.2. Infusão.....	24
5.1.1.3. Decocção.....	24
5.1.1.4. Soxhlet.....	24
5.2. Métodos cromatográficos.....	24
5.3. Métodos espectroscópicos.....	29
5.3.1. Ultravioleta (UV).....	29
5.3.2. Infravermelho (IV).....	29
5.3.3. Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	30
5.3.4. Espectroscopia de Massa (MS).....	30
6. PARTE EXPERIMENTAL.....	31
6.1. Colheita e identificação botânica da planta.....	32
6.2. Secagem e moagem das amostras.....	32

.....	32
.....	34
6.3.2. Extracção por Soxhlet.....	34
6.4. Extracção solvente / solvente.....	35
6.5. Extracção dos alcalóides totais.....	36
6.6. Testes fitoquímicos.....	38
6.7. Análises cromatográficas.....	40
6.7.1. Análise dos extractos brutos e semi brutos.....	40
6.7.1.1. Aplicação da amostra.....	41
6.7.1.2. Desenvolvimento das placas.....	41
6.7.1.3. Sistema de detecção.....	41
6.7.2. Cromatograma dos extractos brutos.....	41
6.7.3. Cromatograma dos extractos semi brutos.....	41
6.8. Fraccionamento.....	42
6.8.1. Fraccionamento por Cromatografia em Coluna normal.....	42
6.8.1.1 Enchimento e montagem da coluna CC.....	42
6.8.1.2. Fraccionamento do extracto diclorometânico.....	43
6.8.1.3. Fraccionamento do extracto de éter de petróleo.....	45
6.8.2. Cromatografia em Camada Fina Preparativa ó TLCP do extracto bruto de diclorometano.....	46
6.9. Testes antimicrobianos.....	47
6.9.1. Preparação dos meios de cultura.....	48
6.9.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	51
7. DISCUSSÃO DE RESULTADOS.....	52
8. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	55
8.1. Conclusões.....	55
8.2. Recomendações.....	56
BIBLIOGRAFIA.....	57
ANEXOS.....	61

[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Figura 1 ó Determinação prática do Rfí 26

Figura 2 ó Esquema geral seguido no trabalhoí .31

Figura 3 ó Esquema geral para a obtenção dos extractos para o estudo fitoquímico.....33

Figura 4 ó Esquema geral para a obtenção dos extractos para os testes antimicrobianos.33

Figura 5 ó Esquema geral para a extracção S/Sí í í í í í í í í í í í í í í í35

Figura 6 ó Esquema geral para a obtenção dos alcalóides totaisí í í í í í í í í í í ..37

Figura 7 ó Fotografia da montagem da coluna de CCí í í í í í í í í í í í í í í .í .43

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Tabela 1	Resultados da extracção por maceração e Soxhlet	34
Tabela 2	Resultados da extracção S/S	36
Tabela 3	Resultados dos testes fitoquímicos	40
Tabela 4	Resultados da CC ó DCM	44
Tabela 5	Resultados de CC ó EEP	45
Tabela 6	Fracções isoladas por TLCP	46
Tabela 7	Resultados da Actividade Antimicrobiana em A/N	49
Tabela 8	Resultados da Actividade Antimicrobiana em A/S	50
Tabela 9	Resultados da determinação da CIM na <i>Salmonella sp.</i>	51
Tabela 10	Resultados da determinação da CIM na <i>E.coli.</i>	51
Tabela 11	Resultados da determinação da CIM na <i>Staphylacoccus sp.</i>	51



Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Esquema 1: Sequência biossintética para a formação da (S) -Norcoclorina.....17

Esquema 2: Alguns alcalóides derivados da fenilalanina e tirosina.....19

AE ó acetato de etilo

A/N ó Agar nutriente

Aquo ó Aquoso

A/S ó Agar Sangue

AT- Alcalóides Totais

BBi – Alcalóides bisbenzilisoquinolínicos

Bu- Butanol

CC ó Cromatografia em Coluna

C₆H₁₂- Ciclohexano

CIM - Concentração Inibitória Mínima

DCM ó Diclorometano

EEP ó Extracto de Éter de Petróleo

E. coli – Escherichia coli

Fig. ó Figura

IIAM ó Instituto de Investigação Agrária de Moçambique

IV- Infravermelho

MPLC ó Cromatografia Líquida de Média Pressão

MS- Espectroscopia de Massa

OMS ó Organização Mundial da Saúde

P- Placa

Rf ó Factor de retenção

RMN ó Ressonância Magnética Nuclear

SNC- Sistema Nervoso Central

Sp ó Espécie

S/S ó Solvente ó Solvente

Tab. ó Tabela

T. funifera-Tiliacora funifera

TLC ó Cromatografia em Camada Fina

TLCP- Cromatografia em Camada Fina Preparativa

UA- União Africana

UV-Vis ó Ultravioleta e Visível

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Anexo 1: Cromatograma dos extractos brutos TLC-I	í í í í í í í í í í í í í í	.I
Anexo 2: Cromatograma dos extractos obtidos por extracção S/ S TLC-II	í í í í	...II
Anexo 3: Cromatogramas das fracções da CC do extracto de DCM (TLC IIIa e IIIb)	í	.III
Anexo 4: Cromatograma das fracções de DCM agrupadas TLC-IV	í í í í í í íIV
Anexo 5: Cromatogramas das fracções da CC do EEP TLC-Va e Vb	í íí	..í ..V
Anexo 6: Cromatograma das fracções do EEP agrupadas TLC-VI	í í í í í í í	.VI
Anexo 7: Fotografias (P1 e P2) e Cromatograma dos AT (TLCP-VII)	VII
Anexo 8: Cromatogramas das manchas isoladas do extracto DCM	í í í í í í í	...VIII

A planta *Tiliacora funifera* pertence à família Menispermaceae da qual fazem parte 75 géneros e 520 espécies e distribuem-se nos países tropicais e subtropicais, sendo que 25 géneros com 101 espécies são encontrados em África.

Esta planta é utilizada em Moçambique na medicina tradicional para o tratamento de várias doenças de origem microbiana, destacando-se entre elas as diarreias e disenteria.

Neste trabalho, foi feito o estudo fitoquímico e a avaliação da actividade antimicrobiana das raízes da *Tiliacora funifera*. Para a obtenção dos extractos brutos foram usados dois métodos principais de extracção: Extracção por maceração e Soxhlet.

O extracto metanólico bruto obtido por maceração foi submetido à extracção por partição solvente-solvente com éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo e n-butanol e as fracções obtidas foram submetidas à cromatografia em camada fina TLC para determinação do seu perfil cromatográfico.

Os testes fitoquímicos foram realizados para detectar os principais grupos químicos presentes nesta planta, onde foram detectados os alcalóides, flavonóides, taninos e saponinas, sendo que os alcalóides representam o principal grupo presente nas raízes.

A identificação dos alcalóides foi realizada usando os reagentes de precipitação dos alcalóides e a cromatografia em camada fina TLC, enquanto que para o fraccionamento foram usadas a cromatografia em coluna normal e a TLC preparativa.

Foram isoladas através da Cromatografia em Camada Fina Preparativa (TLC-P) 3 manchas do extracto de diclorometano bruto com características cromatográficas dos alcalóides, porém, não foi possível proceder a identificação das mesmas.

Para a avaliação da actividade antimicrobiana e a determinação da concentração inibitória mínima dos extractos foram usados o método de difusão em disco e o de diluição respectivamente. Os microorganismos utilizados foram: *Candida sp*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Staphylacoccus* e *Streptococcus sp*, onde os extractos aquoso, de metanol e de alcalóides totais foram os mais promissores, apresentando uma actividade significativa sobre a *Escherichia coli*, *Salmonella sp* e *Staphylacoccus sp* respectivamente.

Da terra, o Senhor criou os remédios, e o homem de bom senso não os despreza. Não foi para manifestar o poder do Senhor que as águas foram adoçadas com um pedaço de madeira? O Senhor deu aos homens a ciência para que pudessem glorificá-lo por causa das maravilhas dele. Com elas, o médico cura e elimina a dor, e o farmacêutico prepara as fórmulas. Dessa maneira, as obras de Deus não têm fim, e dele vem o bem-estar para a terra. ECLESIÁSTICO 38, 4-8

Ao longo dos séculos, o processo de reconhecimento e identificação das ervas medicinais acompanhou a par e passo o próprio processo de afirmação do homem e das suas estratégias de sobrevivência reflectindo o progressivo conhecimento da natureza e a consolidação de um conjunto de saberes e práticas que se inscreve como memória da comunidade a que cada um pertence [11].

Transmitido de geração em geração, e evidenciando aspectos particulares da identidade própria de cada uma das comunidades face às suas congéneres, estes saberes são parte integrante do património cultural de cada comunidade que importa preservar.

Em Moçambique o reconhecimento de ervas e plantas medicinais locais e a aprendizagem da sua aplicação vem desde os finais do século XVI; eram já de uso comum alguns *remédios de terra*, como o óleo de coco e de riano, as raízes de abutua e as de calumba, de comprovada eficácia no tratamento de feridas, diarreias e problemas gastrointestinais. Comercializados nos portos de Moçambique desde finais do século XVIII, a integrar as farmacopeias ocidentais as botânicas portuguesas enviadas para outros territórios do império. Em simultâneo e apesar da desconfiança face aos curandeiros e as suas práticas de cura, os portugueses reconheciam a sua importância e necessidade de aprender a curar e fazendo uso das plantas e ervas medicinais locais que, muitas vezes, se revelaram mais eficazes [10].

As principais doenças que afectavam as populações eram, tal como hoje a malária, vários tipos de diarreias e doenças do foro respiratório e sexual. A maioria destas doenças era tratada na medicina tradicional que, tal como hoje, a maior parte da população indígena ou não dependia da medicina tradicional e que, em muitas situações, as práticas fitoterapêuticas apresentavam excelentes resultados. O caso da malária é paradigmático,

utilizados pelos europeus desde o século XVI, era tratada com uma combinação de várias plantas [5] [11].

Nos últimos anos um interesse particular sobre as plantas medicinais e a medicina tradicional foi manifestado nos países africanos sob recomendação e apoio da OMS e UA. É assim que estudos etnobotânicos e fitoquímicos vêm sendo realizados em muitos países africanos. Em Moçambique estudos semelhantes foram realizados em alguns centros de investigação, institutos de pesquisas, no Ministério da Saúde e nas universidades [5].

Estudos recentes realizados na África do Sul na universidade de Johannesburgo sobre as folhas e raízes da planta *Tiliacora funifera* mostraram que foram isolados cerca de oito (8) alcalóides Bisbenziltetrahydroisoquinolínicos desta planta. Das raízes foram isoladas a Funiferina, Nortiliacorina-A, Tiliacorina, Nortiliacorina-A e a Funiferina-N-óxido enquanto nas folhas foram isoladas a Tiliafunimina, Isotetrandrina e a Talrungsosina que revelaram dentre muitas actividades a antibacteriana [30].

Neste contexto, a necessidade da comprovação experimental da avaliação fitoquímica da planta *Tiliacora funifera* que ocorre em Moçambique, é importante para que ao ser realizado o seu estudo, uma vez detectado algum composto com actividade biológica significativa, se possa utilizar a planta como um instrumento fitoterapêutico para o combate de doenças que assolam o nosso país, pois foi comprovada a sua eficácia no tratamento de doenças como a diarreia, disenteria em algumas regiões da África do Sul. A disenteria é uma doença diarréica que tem afectado o nosso país na última década, bem como países da América Central, do Sul e a Ásia, sendo a disenteria bacteriana ou *Shigelose* a mais resistente aos medicamentos.

Das quatro espécies de *Shiguella* mais comuns, a *Shiguella dysenterae* tipo I (Sd1) tem sido consistentemente resistente a uma larga variedade de antibióticos.

Em Moçambique a espécie identificada é a Sd1, uma bactéria enteropatogénica capaz de causar epidemias e endemias de disenteria com alta taxa de letalidade. Uma vez que o parasita tem mostrado resistência perante várias drogas antidisentéricas, actualmente têm

do a contrariar esta tendência através de investigação
as ou originadas directamente das plantas [3] [5].

É neste âmbito que no presente trabalho se propõe realizar um estudo fitoquímico e avaliação da actividade antimicrobiana da planta medicinal *Tiliacora funifera* (Menispermaceae).

2.1. Objectivo Geral

- ✓ Este trabalho tem como objectivo geral realizar o estudo fitoquímico da planta *Tiliacora funifera* e avaliar a sua actividade antimicrobiana.

2.2. Objectivos Específicos

- ✓ Identificar as principais classes dos princípios activos presentes nas raízes e folhas da *Tiliacora funifera*
- ✓ Realizar a extracção dos alcalóides totais presentes nas raízes da planta
- ✓ Realizar a extracção solvente/solvente para obtenção de fracções pouco complexas.
- ✓ Comparar por cromatografia em camada fina a composição fitoquímica dos extractos brutos das raízes e folhas
- ✓ Fazer testes antimicrobianos dos extractos brutos e fracções das raízes da planta *Tiliacora funifera*.

à seguinte sequência:

- ✓ Pesquisa bibliográfica;
- ✓ Recolha das amostras no campo;
- ✓ Trabalho experimental que teve as seguintes etapas:
 - Preparação das amostras (secagem e moagem);
 - Extracção e fraccionamento;
 - Testes antimicrobianos;
- ✓ Análise e discussão dos resultados;
- ✓ Elaboração do relatório final.

4.1. Caracterização e descrição da planta em estudo

Nome comum: *Tiliacora funifera* Miers

Sinónimo: *Hypserpa funifera* Miers

Nome vernacular: Xiwezira (Changana)

Género: *Tiliacora*

Família: Menispermaceae

4.1.1. Descrição taxonómica [27]

É uma liana de limbo foliar 5-20 cm x 3-10 cm, ovado-lanceolado, ovado oblongo ou largamente ovado, subcordado a arredondado ou um tanto obtuso na base, obtuso a agudo no ápice, papiráceo ou coriáceo, glabro, com 3-5 pares de nervuras, por vezes esparsamente pubérulo na página inferior; pecíolo com 1.5-5 cm, delgado, pubérulo ou glabrascente.

Ocorrência:

Cabo Delgado: Mecúti, quedas do rio Lúrio.

Zambézia: Morrumbala, serra de Morrumbala, alt. 1000 m.

Sofala: Gorongosa, Parque Nacional.

Inhambane: Massinga, Inhacengo.

Maputo: Ilha de Inhaca.

Também no Togo, Gana, Angola, Zâmbia, Zimbabwe e Malawi. Em florestas sempre verdes em altitudes baixas ou elevadas, florestas ribeirinhas e lugares sombrios da floresta aberta, de 220-1250 m.

4.1.2. Usos medicinais [9] [110] [22]

Esta planta tem sido muito usada na medicina tradicional para a purificação do sangue no tratamento de dores de bexiga, malária, diarreia, cólera, cólicas, etc.

Na medicina tradicional é normalmente administrada em doses mínimas como se duma bebida brande se tratasse. Usa-se a infusão e a decocção para a sua preparação.

Plantas da família menispermaceae

O valor medicinal das plantas da família menispermaceae pode provavelmente ser atribuído à larga variedade e concentração dos alcalóides. Esta actividade biológica pode ser classificada de acordo com os 5 tipos de aplicação [24] [30].

4.2.1. Plantas com sabor amargo

As espécies da família menispermaceae são muitas vezes usadas como plantas fortificantes. Este facto pode ser atribuído à alta concentração dos alcalóides nessas plantas. Estas plantas estimulam o apetite e podem aliviar a falta de apetite ou anorexia. Estas plantas também podem melhorar o micro-ambiente da área gastrointestinal, aumentam o fluxo da bÍlis, regulam a secreção da insulina glucagon pelo pâncreas endócrino [24] [30].

4.2.2. Plantas estimulantes do SNC

As doenças ou condições associadas com o SNC (Sistema Nervoso Central) incluem dores, enxaqueca, febres, perda de memória e condições de saúde mental; o seu tratamento inclui, dentre outros, sedativos e analgésicos. Os alcalóides são bem conhecidos pelas suas actividades sobre o SNC. Muitos alcalóides possuem uma acção bifásica. Em doses baixas, muitos estimulam o coração e o sistema respiratório; em doses altas muitos actuam como sedativos e em doses tóxicas, podem levar à morte devido a deficiência respiratória ou cardíaca [30].

4.2.3. Plantas antihelmínticas (vermífugas)

Um antihelmíntico é um agente que destrói ou causa a expulsão de parasitas intestinais. Alguns antihelmínticos actuam paralisando vermes, que posteriormente podem ser expelidos por purgação; outros destroem o parasita. Em outros casos as drogas inibem a fosfo-fructokinase, reduzindo assim a energia necessária para que os vermes se mantenham no organismo. Muitos constituintes com actividade antibacteriana são também antihelmínticos. Os alcalóides são muitas vezes os constituintes activos [30].

Ginecológicos

remédios para a infertilidade em homens e mulheres (capacidade afrodisíaca), para problemas de menstruação incluindo: a menstruação irregular, promoção da menstruação, ausência da menstruação e outros. O alcalóide yohimbina encontrado nas cascas da árvore *Pausinystalia johimbe* que cresce na África Central, tem sido usado há séculos como um afrodisíaco. Estudos revelam que a yohimbina, em combinação com outras drogas, é efectiva no tratamento da disfunção da erecção masculina e quando combinado com L-arginina glutamato, aumenta a excitação sexual nas mulheres [30].

No sul da África, um total de 156 plantas medicinais estão registadas como sendo usadas para os problemas ginecológicos. Algumas das espécies mais usadas são: *albertisia delagoensis*, *Antizoma angustifolia*, *cissampelos campesis*, *Cissampelos mucronata* e *Cissampelos torulosa*. Alguns dos alcalóides destas espécies, tal como a pronuciferina, crotsparina, cicleanina e insularina com a sua actividade espasmolítica podem exercer um papel no tratamento de alguns problemas ginecológicos.

4.2.5. Plantas antimaláricas

Segundo dados da OMS aproximadamente 300 milhões da população mundial é afectada pela malária e entre 1 e 1.5 milhões morrem por ano, 8% desses casos ocorrem na África tropical. Cerca de 800 000 crianças abaixo dos 5 anos morrem de malária a cada ano, tornando esta doença uma das maiores causas da mortalidade infantil e juvenil.

A resistência de *Plasmodium falciparum* perante antimaláricos sintéticos tal como a cloroquina e a sulfadoxina/pirimetamina, adicionada à resistência do vector do mosquito perante insecticidas, tem levado à pesquisa de novos antimaláricos mais eficazes.

Em África 18 espécies da família menispermaceae estão registadas para o tratamento da malária e 11 no resto do mundo. Estas plantas incluem 6 dos 7 géneros (*Albertisia*, *Cissampelos*, *Cocculus*, *Stephania*, *Tiliacora* e *Tinospora*) das plantas desta família existentes no sul da África.

4.3.1. Definição dos alcalóides

No processo de extracção dos princípios activos nas raízes, folhas e nas frutas das plantas muitas vezes obtêm-se substâncias chamadas *alcalóides*. O nome alcalóide provém do facto dessas substâncias serem alcalinas (*al kaly* = soda; aparência de uma base), isto é, uma vez que os alcalóides são aminas, muitas vezes reagem com ácidos para formar sais [15] [20].

Não existe uma definição exacta para os alcalóides. A definição actualmente aceite para alcalóide deve ser a de Pelletier que considera alcalóides as moléculas cíclicas que contêm azoto e que são verdadeiros metabólitos secundários. Esta definição exclui as aminas simples e os derivados de amoníaco acíclicos e ainda os compostos nitro e nitrosos (uma vez que nos alcalóides o átomo de azoto tem de possuir estado de oxidação negativo). Os alcalóides formam um grupo muito vasto de metabólitos que podem ocorrer tanto em microrganismos como em plantas superiores e inferiores e ainda em animais, apesar de nestes últimos ocorrerem com muito menor frequência [15].

Os átomos de nitrogénio de muitos alcalóides estão presentes nos anéis heterocíclicos e em poucos casos, o nitrogénio pode estar presente na forma de uma amina primária ou em forma de aminogruppo quaternário [4].

4.3.2. Classificação dos alcalóides [15]

Habitualmente os alcalóides são classificados em função da estrutura, distinguindo-se principalmente os compostos heterocíclicos dos não heterocíclicos. Mas também podem ser classificados:

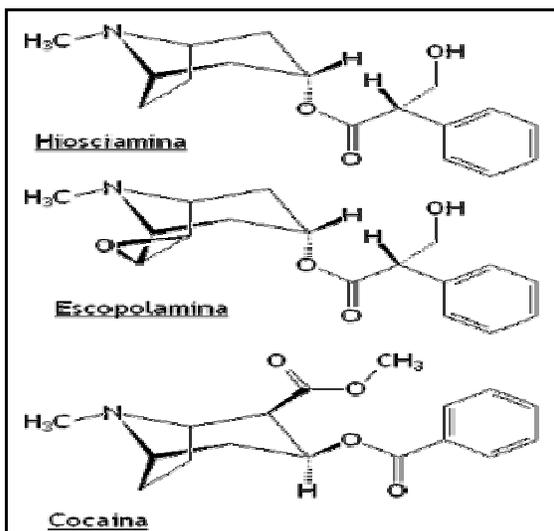
- De acordo com as suas propriedades farmacológicas
- De acordo com a sua distribuição botânica.
- De acordo com a sua origem biossintética.

Alcalóides com a sua origem biossintética

- Alcalóides verdadeiros
- Protoalcalóides
- Pseudoalcalóides
- Alcalóides imperfeitos

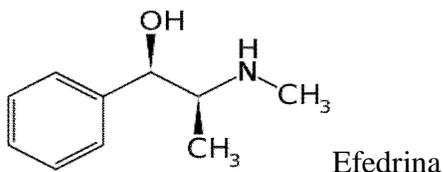
Alcalóides verdadeiros cumprem estritamente com as características da definição dos alcalóides: têm sempre um nitrogénio heterocíclico, são de carácter básico e existem na natureza normalmente em estado de sal, biologicamente são formados a partir de aminoácidos.

Exemplos:



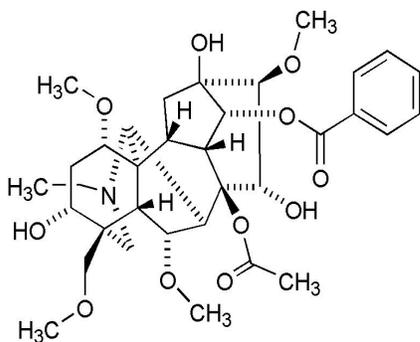
Protoalcalóides são aminas simples com nitrogénio extracíclico, de carácter básico e são produtos de metabolismo dos aminoácidos.

Exemplo:



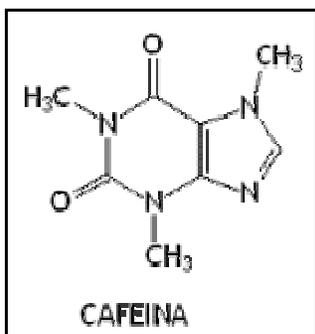
as características da definição dos alcalóides mas não

Exemplo:



Aconitina

Alcalóides imperfeitos são derivados de bases purínicas, não precipitam com os reagentes específicos para alcalóides. Um exemplo deste tipo de alcalóides é a cafeína.



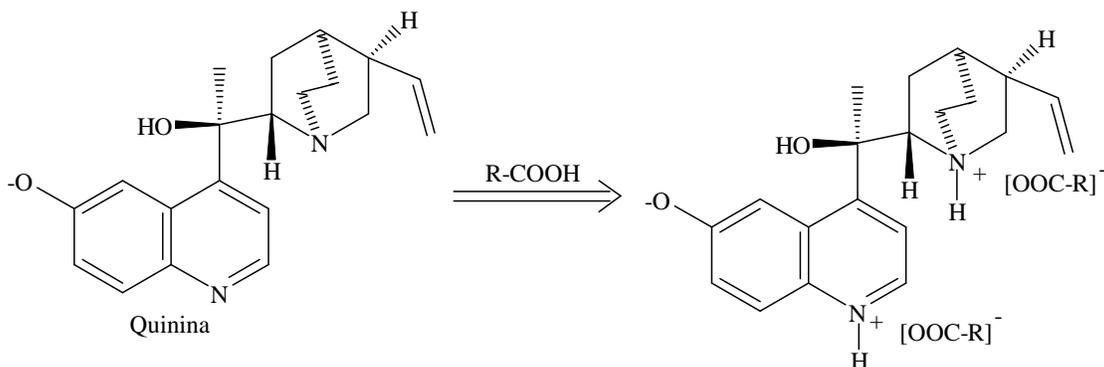
4.3.3. Nomenclatura e Propriedades gerais [15] [19]

Os alcalóides apresentam uma característica comum que é a terminação *ina*, que reflecte o facto de estes serem aminas. Geralmente os alcalóides são especificados de acordo com a família ou plantas onde se encontram, tipo de anel heterocíclico a que pertencem.

- Os alcalóides têm um ou mais átomos de nitrogénio endocíclicos no estado terciário. São em geral cristalinos, incolores, não voláteis, e não solúveis em água.

icamente activa e possui um sabor amargo.

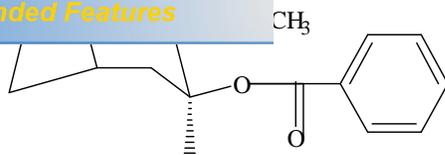
- Ocorrem na natureza em forma de sais, todos são fisiologicamente extremamente activos, têm efeitos tóxicos, afectam o sistema nervoso central e respiratório.
- Formam precipitados insolúveis com ácidos: pícrico, fosfomolibdénico, fosfotungsténico, tânico e também com o tetraiodomercurato de potássio (reagente de Mayer).
- Possuem um carácter lipofílico muito acentuado- solúveis nos solventes orgânicos apolares e no álcool de elevada graduação.
- Pelas características básicas reagem com os ácidos e originam sais solúveis na água ou nas soluções hidroalcoólicas mas insolúveis nos solventes orgânicos apolares.



Solubilidade nos solventes apolares
orgânicos, insolubilidade na água

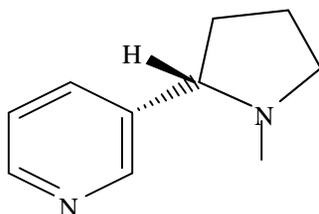
Solubilidade na água
Solubilidade nos solventes polares

- Os alcalóides oxigenados cristalizam facilmente, são inodoros e não voláteis (é o caso da cocaína). Em geral são incolores excepto casos raros como é o caso da berberina e da sanguinarina.



Cocaína

- Os que não possuem oxigénio são líquidos odoríferos e voláteis (coniina, nicotina, etc.). Excepcionalmente os que possuem massas moleculares mais baixas e baixa percentagem de oxigénio são também líquidos ou cristalizam dificilmente.



Nicotina

- Todos os alcalóides originam precipitados com os reagentes gerais dos alcalóides.

4.3.4. Aspectos de distribuição

Existe uma diferença qualitativa e quantitativa dos alcalóides nos tecidos das plantas, isto pode ser devido a factores como: clima, meio ambiente e a composição (química) do solo [8].

O teor de cada alcalóide também pode ser influenciado pela estação do ano. A ocorrência (presença significativa) de diferentes alcalóides pode ser especificamente restrito a determinadas partes de plantas, enquanto outros compostos são distribuídos em todas as partes das plantas, variando simplesmente o teor nos diferentes tecidos, como folhas, caules e raízes [12] [21].

Para a extracção dos alcalóides existem dois métodos principais que se fundamentam na solubilidade diferencial das bases e dos seus sais.

Método A- Extracção com solventes orgânicos em meio alcalino:

Bases: amónia, carbonatos, mistura de hidróxido de sódio e hidróxido de cálcio.

Solventes: solventes clorados, éter dietílico, etc.

- 1. Processo de Extracção:** da maceração à extracção contínua em Soxhlet.
- 2. Concentração do extracto orgânico:** destilação com ou sem vácuo.
- 3. Tratamento com solução aquosa ácida.**
- 4. Alcalinização da solução aquosa e re-extracção com solvente apolar.**
- 5. Eliminação do solvente.**

Método B- Extracção em meio aquoso ácido:

- 1. Extracção do material vegetal com solução aquosa (ou hidroalcoólica) ácida.**
- 2. Alcalinização.** (amónia, carbonatos, mistura de hidróxido de sódio e hidróxido de cálcio).
- 3. Extracção com solvente orgânico.**
 - I- Eliminação do solvente.
 - II- Fixação selectiva em resinas de troca iónica seguida da eluição com ácido forte.
 - III- Precipitação selectiva sob a forma de iodomercuratos.

4.3.6. Testes de identificação

As reacções de identificação podem ser características do átomo de nitrogénio ou de outros grupos funcionais na molécula.

Reagentes gerais

O átomo de nitrogénio (N) forma complexos com os iões de Bi, Hg e I₂.

Mercurato de potássio $K_2 [HgI_4]$

Soluções neutras ou pouco ácidas forma precipitados brancos ou ligeiramente amarelos. Precipita quase todos os alcalóides com exceção da Cafeína e Colchicina.

2. Reagente de Wagner (I_2/KI)

Este reagente forma precipitados floculentos com a maioria dos alcalóides; forma com as soluções aquosas acidificadas dos sais dos alcalóides precipitados castanhos.

3. Reagente de Dragendorff (Tetraiodobismutato de potássio $K [BiI_4]$)

Forma com os cloridratos e sulfatos dos alcalóides precipitados amorfos de cor laranja-vermelha ou vermelha-castanha.

4. Reagente de Marmé (Tetraiodocadmiato de potássio $K_2 [CdI_4]$)

Este reagente forma precipitados brancos ou amarelos com os alcalóides.

5. Ácido fosfotungsténico ($H_3PO_4 \cdot 12WoO_3 \cdot H_2O$)

Forma precipitados amorfos brancos com quase todos os alcalóides.

6. Ácido tânico

A solução aquosa do ácido tânico a 5% precipita a maioria dos alcalóides. Estes precipitados são, regra geral, solúveis em ácidos diluídos ou soluções de amónia.

7. Ácido pícrico a 1%

Reage com quase todos os alcalóides com a formação de picratos ó precipitados de cor amarela.

8. Sal de Reinecke (Tetratiocianodiaminocromato (III) de amónio ó $NH_4 [Cr (NH_3)_2 (SCN)_4]$)

É uma solução aquosa saturada, cerca de 4%, pouco acidificada com HCl. Forma com a maioria dos alcalóides um precipitado de cor rosa, solúvel em solução de acetona a 50%.

A biossíntese dos alcalóides inclui sempre pelo menos um aminoácido. São também incorporadas outras unidades provenientes de piruvato, malonato ou mevalonato. Com precursores de origem biossintética tão distinta é fácil entender a complexidade e diversidade estrutural que se encontra nestes metabolitos, sendo hoje conhecidos mais de 5 000 alcalóides [8] [21].

Os principais precursores são: ornitina, lisina, ácido nicotínico, triptofano, ácido antranílico e histidina.

A ornitina conduz à formação de alcalóides pirrolidínicos e tripânicos, a lisina conduz a formação dos alcalóides dos grupos: peperidínico, quinolizidínicos e indolizidínicos, enquanto o ácido nicotínico conduz à formação de alcalóides piridínicos.

A tirosina produz alcalóides dos grupos feniletilamina, tetrahydroisoquinolina, benziltetrahydroisoquinolina e feniletilisoquinolina.

O triptofano conduz à formação dos alcalóides do grupo β -carbolina, quinolinapirrolindol e os alcalóides de Ergot.

O ácido antranílico actua como precursor para a formação de alcalóides do grupo quinolina e acridina, enquanto que a histidina produz alcalóides derivados de imidazol.

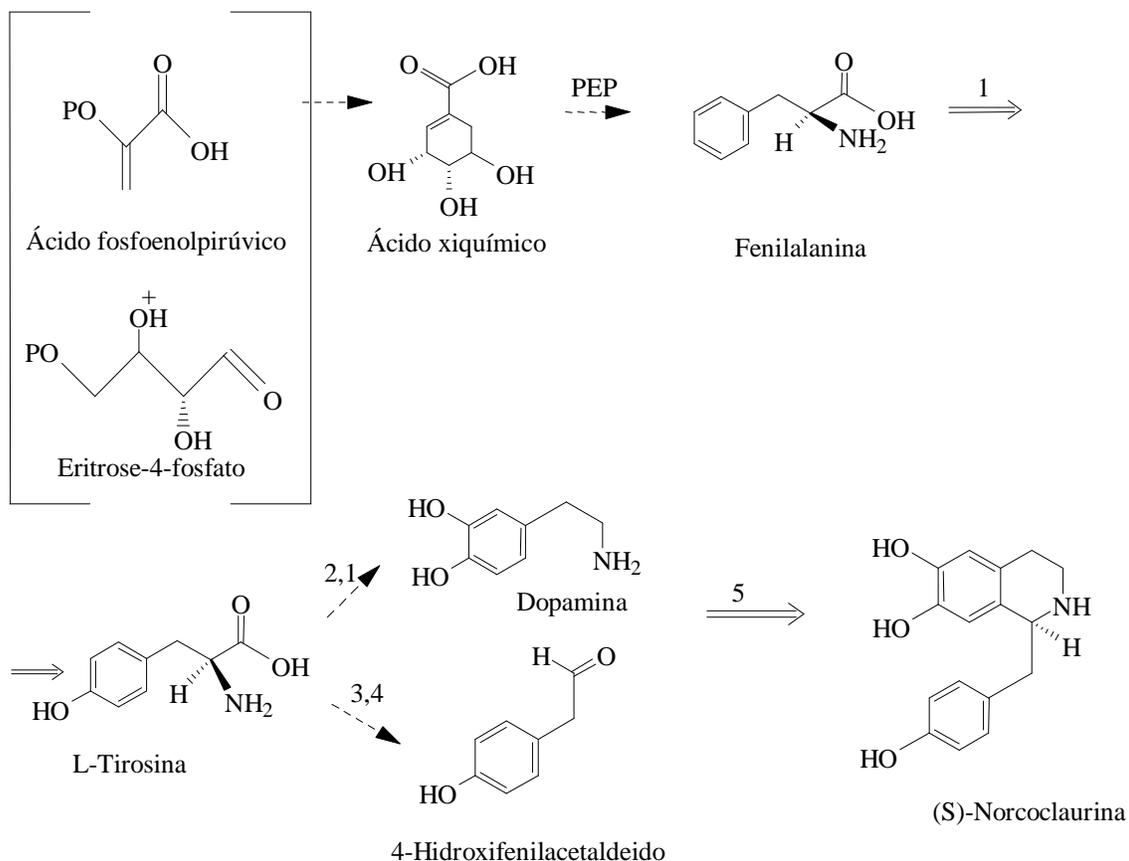
4.4. Alcalóides da família Menispermaceae

Nos finais do ano 1996, cerca de 1858 alcalóides foram isolados em cerca de 244 plantas da família menispermaceae a maioria dos quais isoquinolínicos [30].

(S) - Norcoclorina, um alcalóide benziltetrahydroisoquinolina, foi identificado como um intermediário muito importante para a formação da maior parte dos alcalóides presentes nas plantas desta família [29].

A sequência de biossíntese provável para a formação de (S) - Norcoclorina, inicia-se com a reacção do ácido fosfoenolpirúvico com eritrose-4-fosfato para formar o ácido xiquímico que, por sua vez, reage com o ácido fosfoenolpirúvico, seguindo-se uma série de etapas que levam a formação do ácido fenilpirúvico que, após aminação redutiva, é transformado em fenilalanina. O aminoácido fenilalanina sofre uma descarboxilação e

amina e fenilacetaldeído respectivamente que, por fim, Norcoclaurina (**Esquema 1**) [16].



Esquema 1: Sequência biossintética para a formação da (S) -Norcoclaurina

As enzimas envolvidas no processo são: 1- Fenolase; 2-L-Tirosina descarboxilase; 3-L-Tirosina transminase; 4-*p*-Hidroxifenilpiruvato descarboxilase; 5-(S)-Norcoclaurina sintase.

Ao grupo dos alcalóides isoquinolínicos pertencem muitos alcalóides possuindo como elemento principal a molécula isoquinolina ou o anel tetrahydroisoquinolina. Dentre os alcalóides isoquinolínicos destacam-se 8 grupos principais, nomeadamente: benzilisoquinolinas e benziltetrahydroisoquinolinas, aporfinas, protoberberinas, benzofenantridinas, protopinas, ftalidiisoquinolinas, morfinaos e emetinas. Inclui-se também nos alcalóides do grupo isoquinolona um subgrupo com uma estrutura dimérica, bis-benzil-isoquinolinas (BBI) [16].

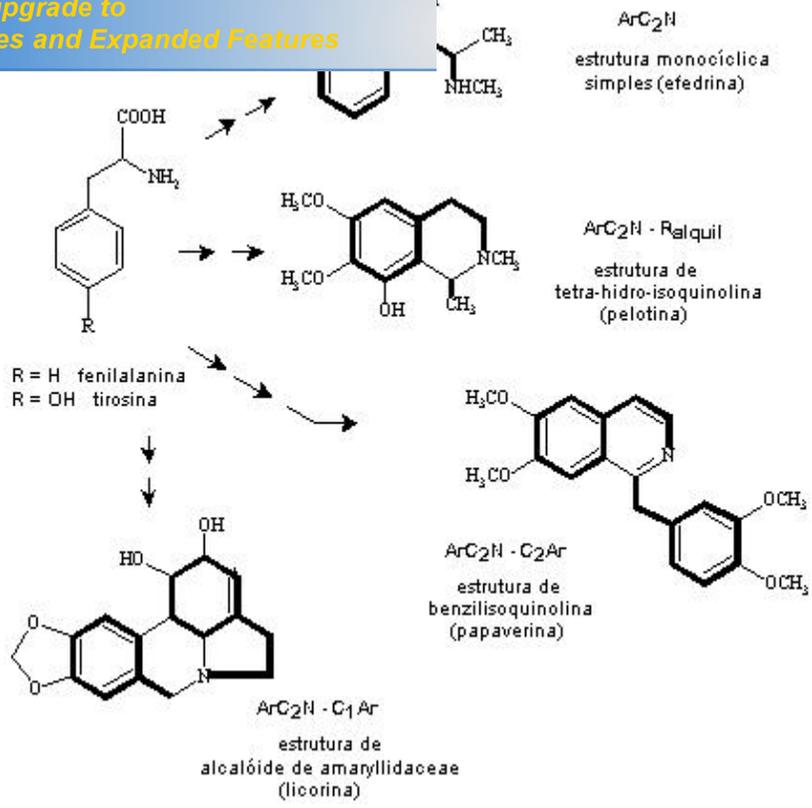
Biogeneticamente, os alcalóides isoquinolínicos são classificados em: provenientes do grupo fenilalanina ou seus hidroxiderivados (tirosina). Estes precursores fazem parte da síntese das moléculas dos alcalóides [29].

Por exemplo, alcalóides do tipo benzilisoquinolina são sintetizados a partir da fenilalanina e fenilacetaldéido. Da condensação do precursor proveniente do aminoácido com outra unidade estrutural, ArC_2 ou ArC_1 (proveniente da degradação da cadeia lateral dos aminoácidos aromáticos) resultam estruturas de benzilisoquinolinas (tetra-hidro-benzilisoquinolinas), $(ArC_2N - C_2Ar)$. No processo biossintético estão envolvidas reacções do tipo acoplamento fenólico e/ou rearranjos do tipo dienona-fenol (esquema 2).

A ocorrência e significância medicinal dos alcalóides do grupo isoquinolina espalham-se nas plantas das famílias: Ranunculales, Papaverales, Geraniales, Rutales, Plumboginales, Myrtiflorae, Rosales e Menispermaceae [21].

O material da planta, que contém os alcalóides do grupo isoquinolina, pode ser usado na terapia e é incluído dentro da farmacopeia ou usado como fonte de compostos individuais usados na terapia [2].

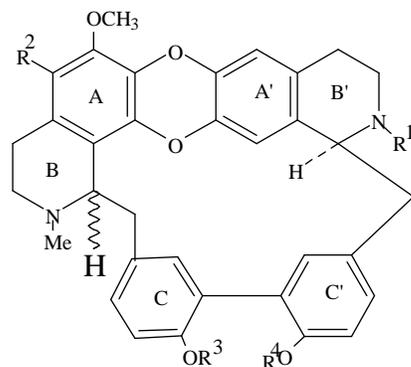
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features



Esquema 2: Alguns alcalóides derivados da fenilalanina e tirosina

4.4.2. Alcalóides presentes na planta *Tiliacora funifera*

Vários alcalóides foram isolados e elucidados estruturalmente das folhas e raízes desta planta, destacando-se os descritos abaixo [16].



			R ³	R ⁴	Nome
			CH ₃	H	(1S, 1øS) -Noryanagin
2	H	OH	CH ₃	H	(1R, 1øS) -Norisoyanagin
3	CH ₃	OH	CH ₃	H	Yanangin
4	H	H	CH ₃	H	Nortiliacorina A
5	CH ₃	H	CH ₃	H	Tiliacorina
6	CH ₃	H	CH ₃	H	Tiliacorinina
7	H	H	CH ₃	H	Nortilacorinina A
8	CH ₃	OH	CH ₃	H	Tiliacorina-N-óxido
9	CH ₃	OH	H	CH ₃	Tilianagin
1	CH ₃	H	H	CH ₃	Yanangcorinina
11	CH ₃	H	H	CH ₃	Dinkilacorina

4.5. Considerações sobre a actividade antimicrobiana

Os antimicrobianos, no sentido mais estrito, são substâncias produzidas por diversas espécies de microrganismos (bactérias, fungos, etc.), que suprimem o crescimento de outros microrganismos. Os antimicrobianos possuem um largo campo de aplicação em medicina humana e veterinária, nas farmácias, na agricultura, na indústria de produção de alimentos, nos cosméticos e noutras áreas.

Os antimicrobianos são importantes componentes do sistema imunitário de muitas espécies e compreendem três grandes classes: Antibacterianos, Antiprotozoários e Antifúngicos.

A actividade antimicrobiana dos produtos naturais de origem vegetal, tanto extractos de plantas como substâncias puras, pode ser detectada quando se coloca essas amostras em contacto com vários microrganismos e observa-se a resposta do crescimento microbiano [1].

Um composto pode ser quantificada com base na concentração mínima do composto capaz de inibir o crescimento de um dado microrganismo, um valor chamado **CIM** (Concentração Inibitória Mínima), ou **MIC** ("Minimum Inhibitory Concentration") em inglês. Este valor pode ser determinado através do **método das diluições sucessivas** ou do **método da difusão em agar**, ou ainda através do uso de tiras contendo um gradiente de concentração de antibiótico, conhecido como E-teste [17] [28]

4.5.1. Algumas doenças causadas por agentes microbianos [5] [14]

Muitas doenças são causadas por microrganismos e várias delas são contagiosas. As mais perigosas são as infecções gastrointestinais e outras como a tuberculose e a malária. Por exemplo a disenteria (diarreia com sangue) é um dos tipos de diarreia mais perigosos. Em geral, é mais grave e mais provável que resulte em morte do que noutras formas de diarreia aguda. Os surtos (epidemias) de disenteria em grande escala são uma ameaça especial a saúde pública. A taxa de letalidade pode ser tão alta como 15% e os cuidados de saúde são gravemente sobrecarregados, durante as epidemias. Mesmo quando correctamente tratadas, cerca de 5% das pessoas com disenteria podem morrer durante uma epidemia. A bactéria responsável pela epidemia de disenteria é a *Shigella dysenterae* tipo 1 (Sd1). A *Shigella dysenterae* é uma das quatro espécies de *Shigella*. As outras são: *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* e *Shigella boydii*. Estas espécies são normalmente menos perigosas que a Sd1 e não provocam grandes epidemias. Outros patogénicos causadores de disenteria endémica nas crianças são: *Campylobacter jejuni*, estirpes invasivas de *Escherichia coli*, espécies de *Salmonella* não tifóide e a *Entamoeba histolytica*.

As doenças causadas pela Sd1 têm tendência a ser mais divulgadas em crianças, velhos e pessoas mal nutridas. A mortalidade também é mais elevada nestes grupos.

A diarreia causada pela Sd1 também pode resultar em complicações graves, incluindo diarreia persistente (diarreia que dura 14 dias ou mais), septicemia (infecção do sangue),

co-urémico (SHU). O SHU é uma situação grave que
ção do sangue.

Desde que a Sd1 foi identificada, nos finais do século passado, registaram-se grandes epidemias em África, Ásia e América Latina.

As epidemias tendem a decorrer durante os estações quentes, húmidas e chuvosas, embora nem sempre assim seja.

A Sd1 é extremamente virulenta (apenas algumas bactérias precisam ser engolidas para causar a doença).

Para o tratamento da disenteria usam-se antibióticos e nem sempre é fácil escolher o apropriado. Nos últimos anos, o agente causal da disenteria epidémica, a Sd1, tem vindo a tornar-se cada vez mais resistente a uma série de medicamentos.

4.5.1.1. Tratamento da disenteria na medicina tradicional

Existe no país uma crença muito forte nos chamados òmédicos tradicionais. Na medicina tradicional, a concepção da doença é bastante diferente da do modelo biomédico. A doença é fruto não só de um desequilíbrio físico, mas também de uma disfunção das relações entre o ser humano, o meio social, o meio ambiente e os antepassados. Acredita-se que os antepassados continuam a fazer parte da vida da comunidade. Na medicina tradicional as doenças são classificadas e divididas de duas formas: aquelas causadas por condições biofísicas/naturais que podem ser resolvidas pelos membros mais velhos da comunidade que possuem conhecimento para curar a doença; doenças provocadas pela intervenção de forças maléficas que exigem um tratamento mais complexo, pois necessitam da ajuda dos espíritos dos antepassados e da comunicação com entidades sobrenaturais.

Devido à natureza do seu trabalho, os praticantes da medicina tradicional são em grande regra, bastante respeitados e influentes na comunidade. O médico tradicional geralmente assume o papel de guardião de valores, até porque este pode combinar a função de líder religioso e comunitário.

Em Maputo os praticantes da medicina tradicional distinguem pelo menos quatro tipos de diarreias. A sua diferenciação baseia-se em sintomas diferentes, mas as mais comuns são: diarreia simples, diarreias com sangue ou disenteria designada *xicuna* na língua nativa,

doenças diarreicas, cólera e diarreias relacionadas com
tratamento é feito com raízes fervidas que se dá ao
doente para beber ou se mistura com papas para ele comer (para limpar os intestinos).
Outros recomendam que se esmaguem raízes, folhas e dão o suco para tomar.

5. TÉCNICAS E MÉTODOS DE ANÁLISE DE PLANTAS

5.1. Extração

A extração é uma técnica para purificação e separação de sólidos. Baseia-se no facto de que a solubilidade dos sólidos varia em função do solvente. Compostos orgânicos, por exemplo, são, em geral, mais solúveis em solventes também orgânicos e pouco solúveis em água [13].

Esta técnica é bastante usada para separar substâncias de soluções ou suspensões líquidas - extração líquido ó líquido; ou para separar uma substância de um sólido por meio de um solvente ó extração sólido-líquido.

A extração líquido-líquido consiste na agitação de duas soluções imiscíveis, num funil de separação, deixando em repouso durante algum tempo até à separação nítida das duas camadas. Os diferentes solutos presentes distribuem-se entre as fases de acordo com as solubilidades relativas [22].

5.1.1. Métodos de Extração

Os métodos de extração sólido-líquido conhecidos, dos quais alguns foram usados neste trabalho são os seguintes:

- Maceração
- Infusão
- Decocção e
- Soxhlet

maceração é o nome dado a uma operação física que consiste em retirar ou extrair de um sólido, certas substâncias que são consideradas princípios activos. Esses princípios activos podem ser posteriormente utilizados com certas finalidades, quer farmacológicas, quer químicas.

A maceração é normalmente feita, moendo previamente o corpo ou substância a macerar, seguido-se a utilização de um solvente para extracção do ou dos princípios activos à temperatura ambiente.

5.1.1.1. Infusão

Consiste em impregnar um solvente em ebulição sobre um material sólido previamente moído, deixando ficar em contacto durante certo tempo.

5.1.1.2. Decocção

Consiste em ferver substâncias para lhes extrair princípios activos. Se o material é sólido, previamente moído, junta-se-lhe o solvente adequado e submete-se à fervura.

5.1.1.3. Soxhlet

A extracção por Soxhlet consiste num processo de extracção exaustiva de um sólido (amostra) previamente moído por meio de um líquido: faz-se um refluxo contínuo durante um certo tempo até à descoloração completa do material em extracção contido no interior de um cartucho de material poroso.

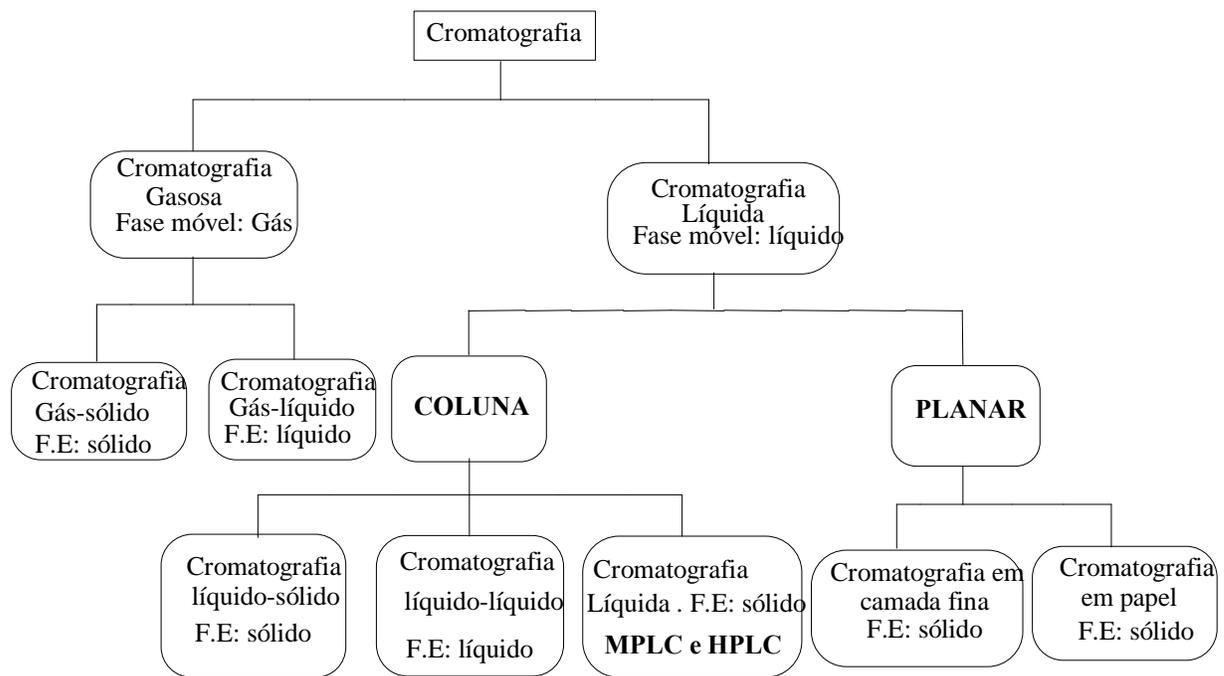
5.2. Métodos Cromatográficos

A cromatografia pode ser definida como uma técnica usada para separar e identificar os componentes de uma mistura e baseia-se nas diferentes velocidades de arrastamento dos solutos por meio de um solvente, num meio apropriado. A cromatografia, por si só ou associada a outra técnica, constitui uma das técnicas mais importantes da actualidade,

...rea de separação dos componentes de misturas, serve para a separação desses componentes [21].

Existem diferentes técnicas cromatográficas que podem ser subdivididas em vários tipos de acordo com a natureza das fases, ou mecanismos de separação.

No esquema amostrado abaixo faz-se a classificação da cromatografia com base no estado físico das fases móvel e estacionária.



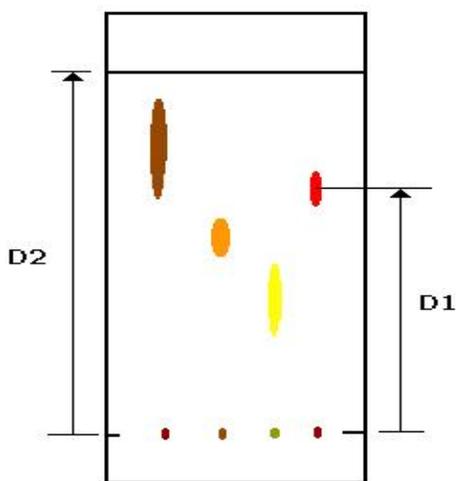
Para o presente trabalho foram usadas as seguintes técnicas cromatográficas:

- Cromatografia em coluna (CC);
- Cromatografia em camada fina (TLC);
- Cromatografia em Camada Fina Preparativa (TLCP)

Camada Fina (TLC)

A Cromatografia em Camada Fina é um tipo de cromatografia de adsorção, na qual os componentes de uma mistura são adsorvidos à superfície do sólido (por interacção dipolo-dipolo), a diferentes velocidades, à medida que a fase móvel se desloca ao longo da fase estacionária. O factor que condiciona a separação é a diferença de afinidades que as substâncias a separar têm, entre a fase estacionária e a móvel (eluente), requerendo neste caso que os compostos da mistura sejam polares [5] [6].

As diferenças entre os componentes a eluir podem ser expressas como distâncias relativas percorridas em períodos de tempo fixo com a fase móvel (valores de R_f) ou tempos relativos que os componentes levam a percorrer uma distância constante (tempos de retenção).



$$R_f = \frac{\text{distância da amostra (D1)}}{\text{distância da frente do solvente (D2)}}$$

Figura 1: Determinação prática do R_f

A Cromatografia em Camada Fina apresenta várias vantagens em relação às outras técnicas cromatográficas, algumas das quais são;

- Uso de pequenas quantidades de solvente;
- A polaridade do solvente ou o tipo de mistura de solventes pode ser alterado em pouco tempo;

mesma placa várias amostras ao mesmo tempo. Numa
10 cm podem-se analisar simultaneamente cerca de

dezoito amostras.

- É uma técnica de baixo custo e com reprodutibilidade dos resultados.

A maior desvantagem da TLC consiste na dificuldade de pulverização uniforme da amostra contida na camada adsorvente nas placas de suporte.

Preparação do eluente

Os solventes usados na eluição devem ser puros. Alguns solventes são higroscópicos e podem ser afectados pela humidade, baixando a reprodutividade.

Deve-se preparar a mistura eluente e mantê-la fechada e evitar a evaporação da mistura eluente para não se alterar a composição desta.

Aplicação da amostra

Usar uma micro pipeta ou tubos capilares de vidro.

Realizar a eluição sempre numa superfície plana.

Colocar as amostras a cerca de 1 a 1,5 cm da base.

No caso de amostras diluídas colocar por diversas vezes, secando após cada aplicação.

Desenvolvimento das placas

A eluição foi feita de modo ascendente em tinas cromatográficas adequadas previamente saturadas com o eluente a usar para cada caso tendo-se o cuidado de controlar o nível do eluente de modo que não atingisse os pontos de aplicação da amostra durante o processo de imersão.

Métodos de visualização

Os métodos de visualização empregues são:

- Uso da lâmpada ultravioleta (256 e 366 nm);

f como revelador.

b) Cromatografia em Coluna Normal (CC)

Este processo baseia-se nas interações do soluto com os centros activos de um adsorvente sólido finamente dividido que é a fase estacionária. Esta técnica pode ser usada para o fraccionamento dos compostos da mistura de acordo com a sua polaridade, podendo também ser usada como uma técnica de pré-purificação.

c) Cromatografia em camada fina preparativa

É uma TLC na qual a amostra é aplicada na forma de banda numa placa, normalmente de dimensões 20 x 20 cm. Nesta técnica as zonas separadas são facilmente removidas da placa. Se a aplicação da banda for manual, torna-se difícil isolar uma substância de outras sem contaminação devido à ondulação da banda

5.3.1. Ultravioleta (UV)

Os espectrómetros do ultravioleta comumente usados medem a absorção da luz no visível e na região ultravioleta <<próximo>>, ou seja, no intervalo 200-750 nm. Numa transição para um nível electrónico mais elevado, a molécula pode passar de um qualquer de vários subníveis ó correspondentes a vários estados vibracionais e rotacionais ó *para* qualquer um de entre outros subníveis; por essa razão as bandas de absorção são largas.

Neste instrumento um feixe de luz é dividido em dois; uma das metades do feixe (o feixe da amostra) passa através de uma célula transparente que contém solução do composto que estiver sendo analisado, e a outra metade (o feixe de referência) passa através da outra célula idêntica à primeira, porém contendo o solvente da solução, mas não o composto.

O instrumento opera de modo a poder fazer uma comparação entre as intensidades dos dois feixes em cada comprimento de onda da região. O instrumento dá uma resposta na forma de um gráfico ó o do comprimento de onda (λ) contra a absorvância (A) da luz em cada comprimento de onda.

5.3.2. Infravermelho (IV)

De todas as propriedades de um composto orgânico, é o respectivo espectro do infravermelho aquele que, em si, fornece mais informações acerca da estrutura do composto.

Uma molécula está em constante vibração: as suas ligações interatómicas *distendem-se* (e contraem-se), e *flextem-se* relativamente umas às outras.

O espectrómetro de infravermelho opera de maneira semelhante aos espectrómetros de visível e UV. Um feixe de radiação IV passa pela amostra e é constantemente comparado com um feixe de referência, à medida que a frequência da radiação incidente vai sendo alterada. O espectrómetro plota os resultados na forma de um gráfico que mostra a absorção em função da frequência ou do comprimento de onda.

lear (RMN)

Os núcleos de certos átomos, na espectroscopia de ressonância magnética nuclear consideram-se, como os electrões, animados de *spin*. A rotação destas partículas carregadas ó rotação de carga ó gera um *momento magnético* orientado segundo o eixo do spin, o que significa que estes núcleos funcionam como minúsculas barras magnéticas. Um desses núcleos, precisamente aquele em que estaremos interessados, é o do átomo do hidrogénio ordinário, ^1H , ou seja, o *protão*.

Segundo a Mecânica Quântica, se colocar um protão num campo magnético externo, o respectivo momento magnético pode orientar-se de uma das duas maneiras seguintes: *com* ou *contra* o campo externo.

O alinhamento segundo o sentido do campo é o mais estável e terá de haver absorção de energia para fazer saltar o minúsculo magnete protónico para o alinhamento menos estável, contra o campo.

A energia mínima necessária para operar esta inversão do protão depende, como se poderia esperar, da intensidade do campo externo: quanto mais forte for o campo, tanto maior será a tendência para se manter o alinhamento, e mais alta será a frequência da radiação necessária para efectuar a inversão.

5.3.4. Espectroscopia de Massa (MS)

Na espectroscopia de massa, as moléculas são bombardeadas com um feixe de electrões de alta energia. As moléculas ionizam-se e cindem-se em muitos fragmentos, algumas das quais são iões positivos. Cada espécie de iões possui determinado valor da razão da massa para a carga, ou valor m/z . Como na maioria dos iões, a carga é 1, m/z é simplesmente a massa do ião.

Nesta parte são apresentados os procedimentos usados desde o trabalho de campo (colheita da amostra) até à realização dos ensaios laboratoriais de acordo com os objectivos definidos e com as condições técnicas e materiais disponíveis.

O esquema apresentado abaixo resume as actividades seguidas durante a realização do presente trabalho

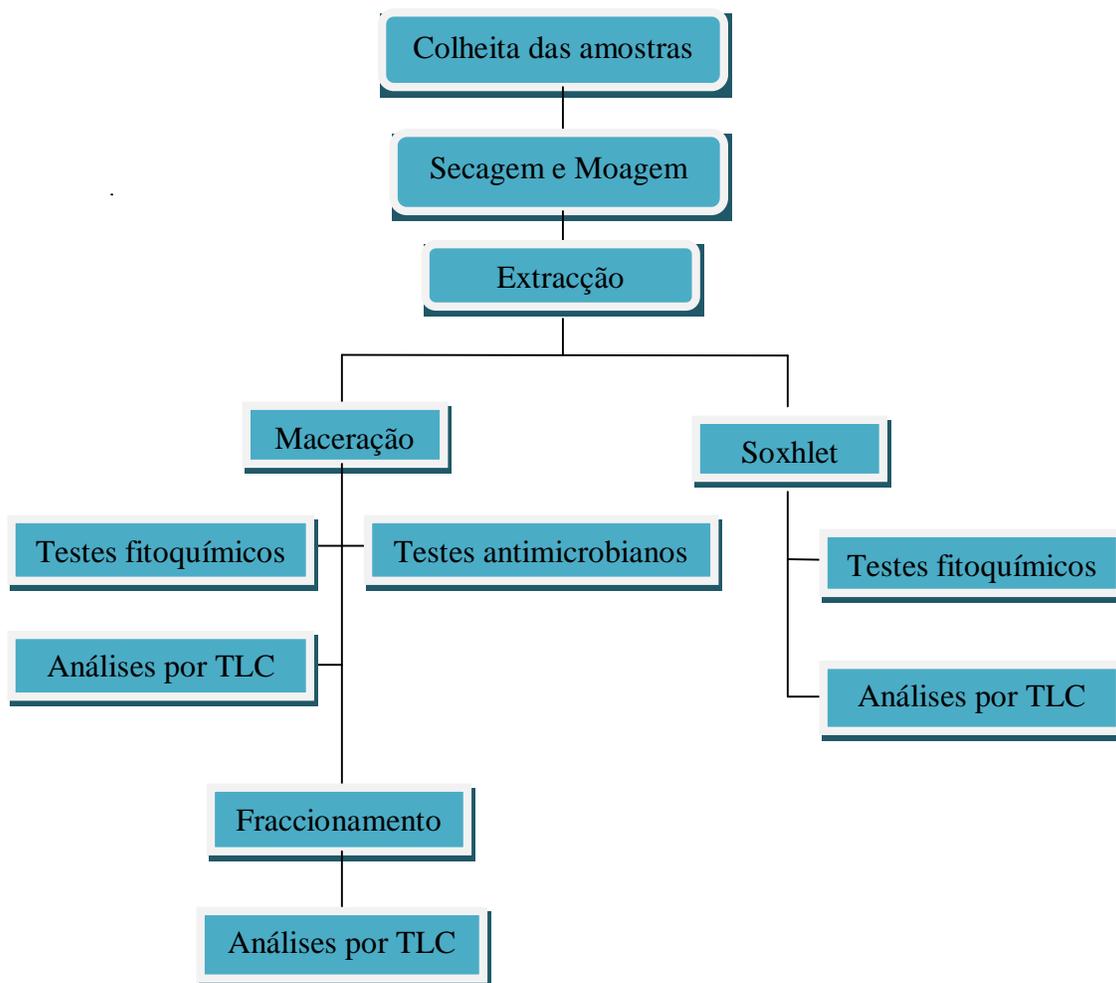


Figura 2: Esquema geral seguido no trabalho

Química da planta

As raízes e folhas da planta em estudo (*Tiliacora funifera*) foram colhidas no bairro de Khokhole, no distrito da Moamba na província de Maputo. A colheita do material foi realizada no dia 31.07.2009, seguindo-se a devida confirmação no herbário do Departamento das Ciências Biológicas da UEM, espécime número 63.

6.2. Secagem e moagem das amostras

A secagem da amostra obedeceu às fases distintas de acordo com a parte da planta (raízes ou folhas) em questão:

- ✓ Para as raízes procedeu-se em duas fases sendo que a primeira fase de secagem decorreu durante cerca de de 10 dias, secagem esta que foi realizada na estufa (Scientific ó series 2000) a uma temperatura regulada de 50° C, enquanto a segunda fase de secagem foi realizada à temperatura ambiente durante 45 dias no laboratório dos produtos naturais do Departamento de Química;
- ✓ Para as folhas a secagem foi realizada também no laboratório dos produtos naturais do Departamento de Química apenas à temperatura ambiente durante cerca de 50 dias.

A moagem das folhas foi feita no laboratório dos produtos naturais do Departamento de Química enquanto a moagem das raízes foi feita no IIAM (Instituto de Investigação Agrária de Moçambique).

6.3. Preparação dos extractos

Todos os extractos utilizados no estudo fitoquímico foram obtidos através da extracção por maceração com agitação e por Soxhlet seguindo o esquema geral ilustrado na figura 3, enquanto que os extractos utilizados na avaliação da actividade antimicrobiana foram obtidos seguindo o esquema geral da figura 4.

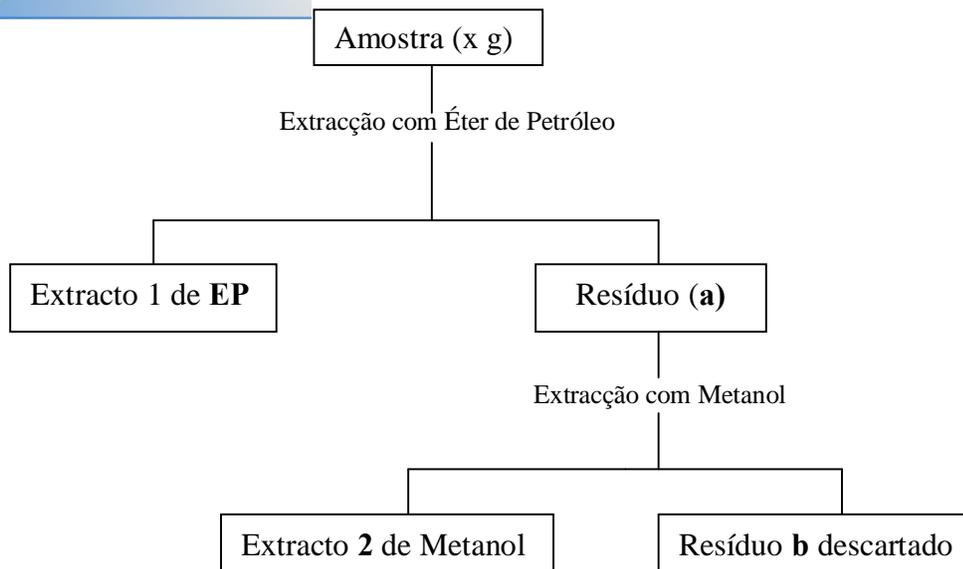


Figura 3: Esquema geral para a obtenção dos extractos brutos

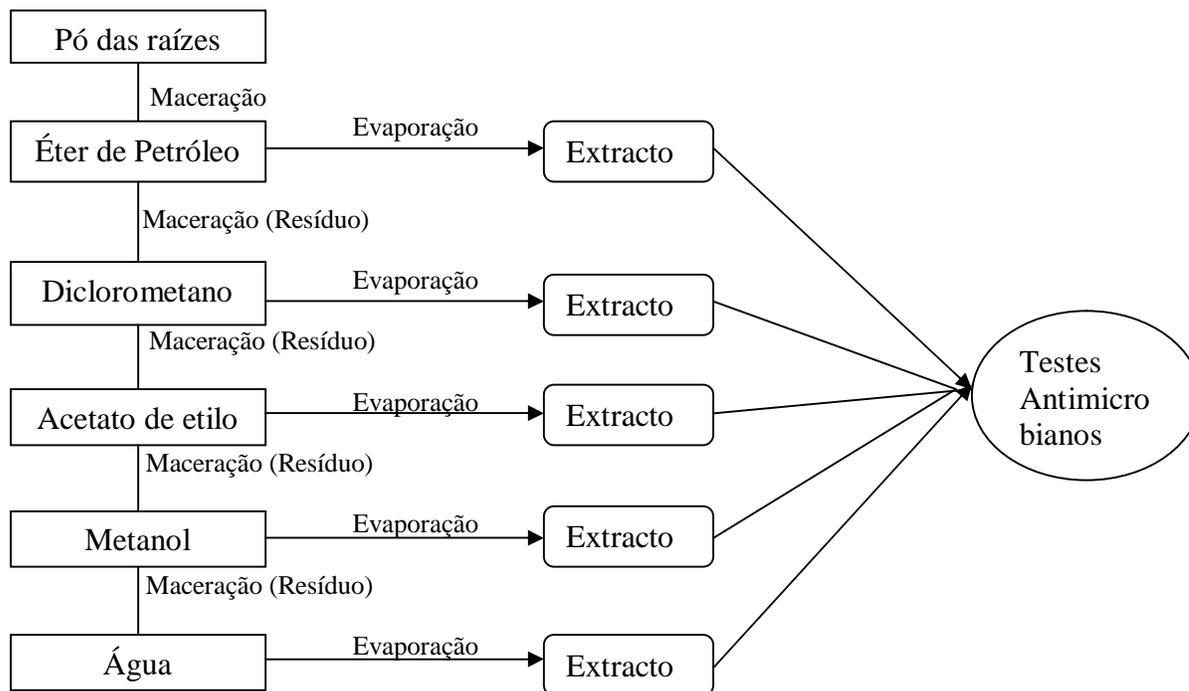


Fig. 4. Esquema geral para a obtenção dos extractos para os testes antimicrobianos.

Na extracção por maceração, 100 g do pó das raízes foram tratados com o éter de petróleo 40-60 (1000 mL) durante 72 h, filtrou-se e o filtrado foi concentrado no rotavapor obtendo-se um extracto de éter de petróleo (5 g) oleoso de cor castanha. O pó das raízes extraído com éter de petróleo depois da secagem foi dividido em 2 balões Erlenmeyers de 1000 mL e foram adicionados para cada 300 mL de metanol e submeteu-se a maceração sob agitação durante 72 horas. Filtrou-se e o filtrado foi concentrado no rotavapor até quase à secura obtendo-se assim um resíduo (7.29g) oleoso de cor castanha. Dissolveu-se 5 gramas deste resíduo em 100 mL de água destilada e procedeu-se com a extração sucessiva (duas vezes) com éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo e *n*-butanol com volumes iguais de 25 ml, obtendo-se duas fases para cada caso, nomeadamente a orgânica e a aquosa. De seguida as fases orgânicas foram concentradas no rotavapor obtendo-se assim os respectivos extractos secos de 1.10 para o éter de petróleo, 0.12 para o diclorometano, 0.38 para o acetato de etilo e 0.56 gramas para o *n*-butanol.

6.3.2. Extração por Soxhlet

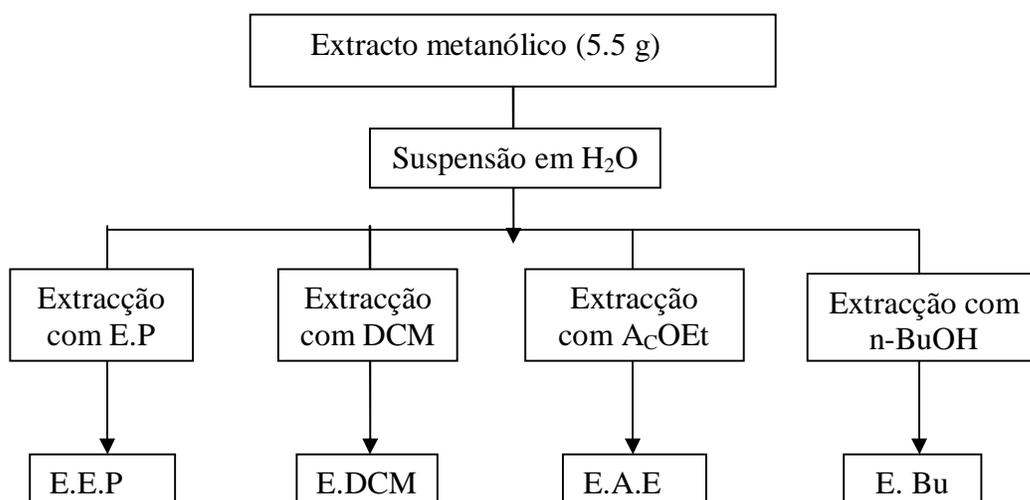
Na extração por Soxhlet 20 g do pó das raízes e folhas da *Tiliacora funifera* foram tratados com éter de petróleo 40-60 durante 8 horas, obtendo-se extractos de éter de petróleo de cor verde de massa 0.60 gramas para as folhas e castanha com 1.18 g no caso das raízes após a evaporação do solvente no rotavapor. Após a secagem, os resíduos previamente tratados com éter de petróleo foram novamente submetidos a um refluxo contínuo com o metanol durante 8 horas, obtendo-se extractos metanólicos de cor verde-escuro nas folhas e castanha nas raízes, ambos pesando 4.0 gramas.

Tabela 1: Massa e percentagem dos extractos do pó das raízes e folhas da *T.funifera*

Extractos	<i>Raízes</i>		<i>Folhas</i>
	Maceração	Soxhlet	Soxhlet
Éter de petróleo	5.00 g (5%)	1.18g (5.9%)	0.60 g (3%)
Metanol	7.29 g (7.29%)	4.00 g (20%)	4.00 g (20%)

6.4. Extração solvente / solvente [21]

Parte do extracto metanólico obtido por maceração foi dissolvida em água destilada e posteriormente submetida ao processo de extração por partição usando como solvente de extração o éter de petróleo (**EP**), diclorometano (**DCM**), acetato de etilo (**AE**) e butanol (**Bu**), obtendo-se assim após a concentração 4 extractos designadamente simbolizados por: **EEP**- extracto de éter de petróleo, **EDCM**- extracto diclorometânico, **EAE**- extracto de acetato de etilo e **EBu**- extracto butanólico. O esquema geral da extração solvente / solvente está ilustrado a seguir.



Onde: E.E.P ó Extracto do éter de petróleo; E.DCM ó Extracto diclorometânico; E.A.E ó Extracto de acetato de etilo; E.Bu ó Extracto butanólico.

Fig. 5. Esquema geral para extração solvente /solvente

Em todos os casos, iguais volumes de solvente foram usados e o processo foi repetido até a solução ficar límpida. No fim o extracto aquoso resultante da suspensão do extracto metanólico em água também foi evaporado, obtendo-se uma massa de 3.22 g. Não foi necessária a aplicação da centrifugação para separar as fases.

percentagem do fraccionamento solvente / solvente. A
fracções aquosa e butanólica.

Tabela 2. Resultados da extracção solvente / solvente

Extracto	(m) % de peso do material seco
Éter de petróleo	(1.10g) 20
Diclorometano	(0.12g) 2.2
Acetato de etilo	(0.38g) 7.0
Butanólico	(0.56g) 10.2
Aquoso	(3.22g) 57.5

6.5. Extracção dos alcalóides totais [21]

A extracção dos alcalóides totais foi feita em meio alcalino segundo o procedimento de Stas-Otto (fig. 6), onde 100 g do pó das raízes foram alcalinizados com hidróxido de amónio a 25 %, seguindo a extracção contínua com o clorofórmio. O extracto clorofórmico foi submetido a partição com ácido clorídrico a 2% resultando em duas fases: clorofórmica e aquosa ácida. A fase aquosa ácida foi alcalinizada com hidróxido de amónio concentrado até um PH 9 e depois submetida à partição com clorofórmio. A fase clorofórmica resultante (final) foi submetida a secagem com sulfato de sódio, filtração e evaporação obtendo-se assim um extracto dos alcalóides totais (A.T) de massa igual a 0.91 g. Para a confirmação foram realizados 2 testes com os reagentes de Mayer e Dragendorff, enquanto para a avaliação do perfil cromatográfico, uma parte do extracto foi dissolvida em metanol e submetida a uma TLC no sistema DCM:MeOH (60:40) (anexo 7).

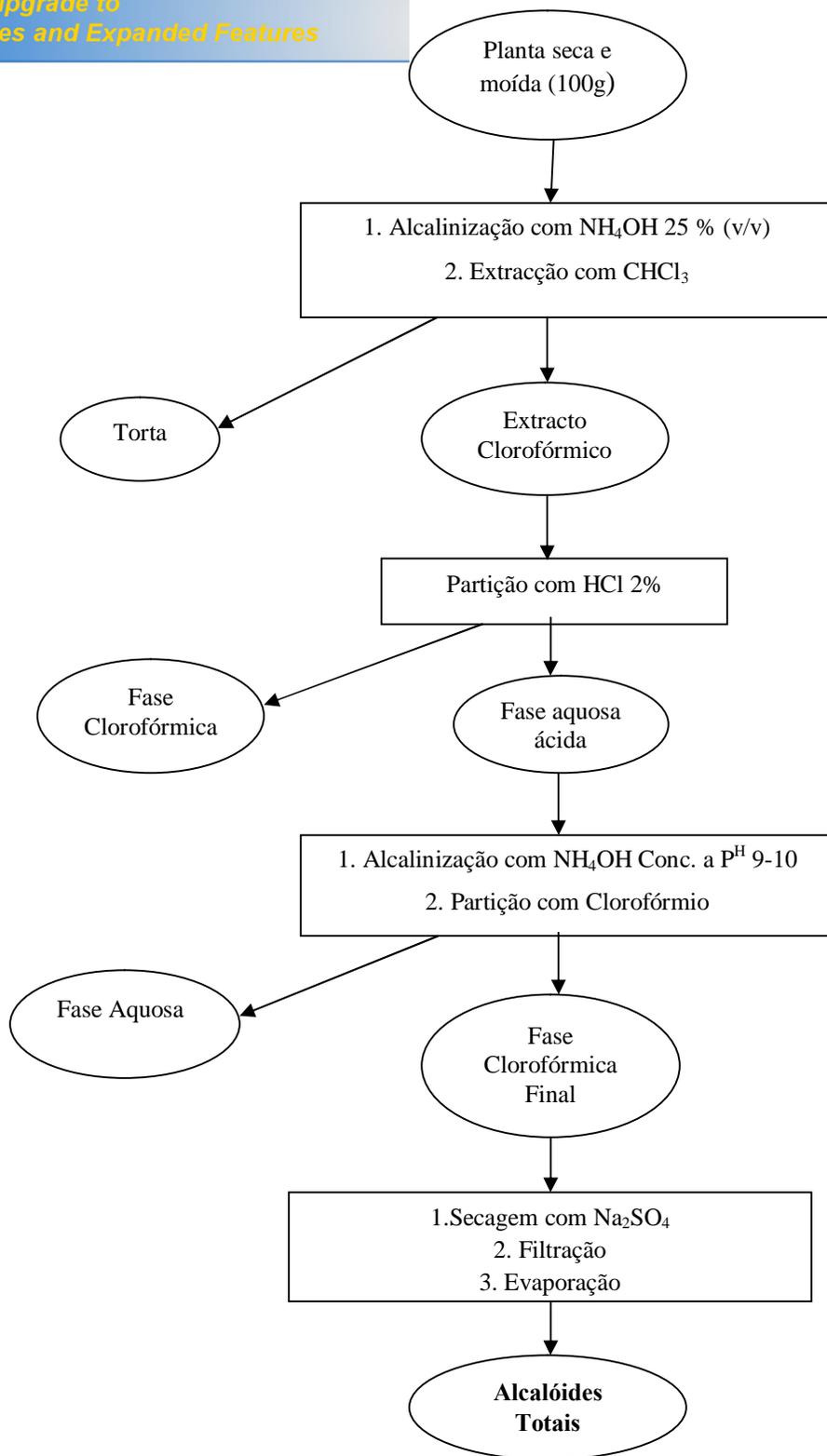


Fig. 6. Esquema para obtenção dos alcalóides totais

Com vista a apurar a composição fitoquímica das raízes e folhas foram realizados testes típicos de 6 classes principais dos metabólitos secundários em diferentes extractos brutos.

a) Ensaio de reconhecimento dos Flavonóides

1. Reacção com ácido sulfúrico

Tomou-se uma alíquota de cada extracto bruto, colocou-se num tubo de ensaio e adicionou-se 4 gotas de ácido sulfúrico concentrado.

2. Reacção de Shinoda

Tomou-se uma alíquota de cada extracto bruto que foi acidificada com HCl a 10% até ao pH 4 e, submetido a hidrólise durante 30 minutos. Após arrefecimento adicionou-se 10 mL de água destilada e fez-se a extracção com éter de petróleo. Da solução de éter retirou-se 1mL que foi colocado num tubo de ensaio e adicionou-se três pedaços de fita de magnésio metálico e algumas gotas de ácido clorídrico concentrado.

Para este teste a formação duma solução vermelha em cada um dos extractos é indicativo da presença de flavonóides.

b) Teste dos alcalóides livres

Dissolveu-se cada um dos extractos em 1.5 mL de HCl a 2%. Agitou-se com uma vareta de vidro até a dissolução total e dividiu-se a solução obtida em volumes iguais, por 3 tubos de ensaio:

Tubo 1 ó Adicionou-se 3 gotas de reagente de Mayer;

Tubo 2 ó Adicionou-se 3 gotas do reagente de Dragendorff;

Tubo 3 ó Testemunha.

Precipitados brancos com o reagente de Mayer e amarelos com o de Dragendorff são indicativos da provável presença dos alcalóides.

c) Teste de saponinas

...se aos extractos contidos em tubos de ensaios 6 mL
...camente por 3 minutos.

Neste caso a formação duma espuma persistente sugere a presença das saponinas.

d) Teste de Liebermann – Buchard para esteróides e triterpenos

Transferiu-se para um copo cada um dos extractos e extraiu-se com clorofórmio. Filtrou-se a solução clorofórmica para um tubo de ensaio seco, adicionou-se 1 mL de anidrido acético e agitou-se suavemente. Adicionou-se depois 3 gotas de H₂SO₄ concentrado e agitou-se suavemente.

Para este teste a formação de uma cor verde ou verde - azul após poucos minutos sugere a presença destes metabólitos.

e) Teste de taninos

Diluiu-se, em tubo de ensaio, 1 mL do extracto com 2 mL de água destilada. Agitou-se e adicionou-se 3 gotas de cloreto férrico a 1%. O mesmo procedimento foi repetido usando o acetato de chumbo.

Para este teste a formação de uma coloração azul sugere a presença de taninos hidrossolúveis enquanto a verde a presença de taninos condensados.

f) Teste de Borntrager para antraquinonas

Colocou-se um pequeno fragmento do extracto num tubo de ensaio e adicionou-se 5 mL de NH₄OH a 10 %. A coloração rósea, vermelha ou violeta sugere a provável presença das antraquinonas.

A pesquisa dos principais grupos de metabólitos secundários das folhas e raízes da *Tiliacora funifera* evidenciou a ausência dos alcalóides nas folhas enquanto das classes de constituintes encontradas nas raízes, destacam-se mais os alcalóides, que sabidamente estão presentes na planta em estudo.

Os resultados dos testes estão sumarizados na tabela 3.

Tabela 3. Resultados dos testes fitoquímicos das raízes e folhas da *T. funifera*

Secundários		Métodos Utilizados	Resultados			
			Raízes (M e S)		Folhas (S)	
			EEP	EM	EEP	EM
Flavonóides		Reacção de Shinoda e com H ₂ SO ₄	-	+	-	+
Alcalóides		Reacção com reagente de Dragendorff e Mayer	+	+	-	-
Saponinas		Formação de espuma	-	-	-	-
Antraquinonas livres e glicosídicas		Reacção de Borntrager directa	-	-	-	-
Taninos		Reacções clássicas: Acetato de chumbo; cloreto férrico	-	-	-	+
Terpenos e Esteróides		Reacção de Liebermann-Buchardø	-	-	-	-

EEP ó Extracto de Éter de Petróleo; EM ó Extracto Metanólico - Não detectado; + Detectado; M- Maceração; S- Soxhlet.

6.7. Análises Cromatográficas

6.7.1. Análise dos extractos brutos e semi brutos

Os extractos brutos de éter de petróleo e metanólico (EPm, EPsox, EMm e EMsox) obtidos por maceração e por Soxhlet, o extracto bruto dos alcalóides totais (EB) e os extractos semi brutos (EP, DCM, AE, Bu e Aquo) obtidos na extracção solvente / solvente foram dissolvidos em metanol.

Estes extractos foram depois submetidos à cromatografia em camada fina (TLC) usando como fase estacionária sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck) sobre as placas comerciais de alumínio (7 x 10 cm e 20 x10 cm) e DCM: MeOH (60:40) como sistema de eluição.

Os extractos depois de dissolvidos em metanol foram aplicados em placas cromatográficas a uma distância de 1 cm da extremidade inferior da placa usando tubos capilares de 2µl mantendo uma separação mínima de 0.75 cm entre os pontos de aplicação.

6.7.1.2. Desenvolvimento das placas

As placas foram introduzidas em tinas cromatográficas pré-saturadas de solvente evitando que o nível do solvente atingisse os pontos de aplicação durante a imersão.

A eluição foi feita de modo ascendente das placas.

6.7.1.3. Sistema de detecção

Os componentes separados foram visualizados numa lâmpada de luz UV a 254 nm e as placas foram depois pulverizadas com o reagente de Dragendorff e aquecidas a 100 °C durante 2-5 minutos.

6.7.2. Cromatograma dos extractos brutos

Feita a TLC (TLC-I anexo 1) dos extractos brutos (A.T, A, B, C e D), notou-se que:

- ✓ Todos os extractos apresentam uma mancha em comum com um Rf de cerca de 0.42 após a pulverização com o reagente de Dragendorff.
- ✓ Nenhuma mancha nítida foi observada sob a luz UV a 254 nm.
- ✓ Os extractos A, B e C apresentam uma mancha em comum com Rf 0.85
- ✓ O extracto B apresenta maior número de manchas em relação a outros.

6.7.3. Cromatograma dos extractos semi brutos

Feita a TLC (TLC-II vide anexo 2) dos extractos brutos obtidos por extracção solvente ó solvente após a pulverização com o Reagente de Dragendorff, notou-se que:

entam uma mancha em comum com um Rf de 0.43.

- ✓ Os extractos de acetato de etilo e butanol possuem uma mancha em comum com um Rf de 0.32.
- ✓ Os extractos de éter de petróleo (EP) e de diclorometano (DCM) apresentam cada uma única mancha com Rf 0.43.
- ✓ O extracto aquoso possui o maior número de manchas (3) em relação à todos extractos.

6.8. Fraccionamento

O fraccionamento das amostras foi feito usando a Cromatografia em Coluna (CC) Normal.

Para o presente trabalho no âmbito de isolar alcalóides, foram fraccionados os extractos de éter de petróleo e diclorometânico ambos obtidos por extracção solvente ó solvente a partir do extracto bruto metanólico.

6.8.1. Fraccionamento por Cromatografia em Coluna Normal

6.8.1.1 Enchimento e Montagem da coluna CC

Enche-se a coluna de vidro com sílica gel 60 até uma altura de 10 cm, comprimindo-se muito bem com ajuda de uma vareta de vidro. A amostra é introduzida do mesmo modo, separando-a da sílica gel por meio de um filtro (algodão). Compacta-se a amostra sobre a sílica gel e coloca-se novamente o algodão na extremidade superior e finalmente elui-se a coluna (vide a figura 7).

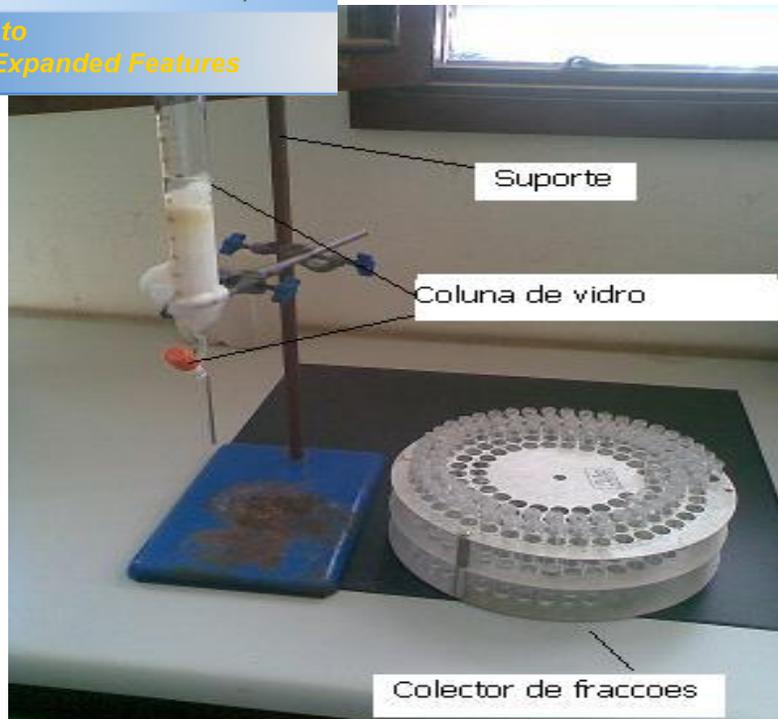


Fig.7. Fotografia da montagem da coluna de CC

6.8.1.2. Fraccionamento do extracto diclorometânico

Cerca de 12 mg do extracto de diclorometano (DCM) obtido por partição solvente - solvente foram misturados com 3g sílica gel 60 e moídos para melhor homogeneização. Esta mistura foi introduzida na coluna previamente montada, contendo sílica gel 60 que constituía a fase estacionária, enquanto que como fase móvel, foi usado o sistema diclorometano: metanol na ordem crescente de polaridade (50:0; 80:20; 60:40 e 0:50). As fracções foram recolhidas em tubos de ensaio e depois concentradas e submetidas à análise por TLC no sistema de solvente DCM:MeOH (60:40). Este processo resultou em 37 fracções e os resultados estão apresentados na tabela 4.

TLC-IIIa e TLC-IIIb vide anexo 3, fraccionamento do

Fracções	Nº de manchas	Cores das manchas		Rf em DCM: MeOH(60:40)
		UV 254 nm	Após revelação Com reagente de Dragendorff	
1-15	0	Não visível	Não visível	-----
16-17	6	Complexa	Não visível	0,74
		Complexa	Não visível	0,62
		Complexa	Não visível	0,62
		Não visível	Amarelo-alaranjada	0,48
		Não visível	Amarelo-alaranjada	0,43
		Complexa	Não visível	0,20
18-37	2	Não visível	Amarelo-alaranjada	0,53
		Não visível	Amarelo-alaranjada	0,35

As fracções foram depois agrupadas em 3 fracções segundo o seu perfil cromatográfico como ilustra o anexo 4 (TLC-IV).

- ✓ As fracções de 1 a 15 (agrupadas na **fracção I**) não revelaram nenhuma mancha.
- ✓ As fracções 16 e 17 (agrupadas na **fracção II**) apresentaram duas manchas, uma com Rf 0.43 e outra com Rf 0.48, ambas amarelo-alaranjadas após revelação com o reagente de Dragendorff.
- ✓ A fracção II apresentava ainda duas manchas com Rfs de 0.62 e 0.72 ambas de cor azul claro na lâmpada UV 254 nm.
- ✓ A fracção III (18-37) apresentava uma única mancha amarelo-alaranjada com Rf 0.35 após revelação com o reagente de Dragendorff.

Extracto de éter de petróleo

0,15 g do extracto de éter de petróleo (EEP) obtido por partição solvente - solvente foram misturados com 3g sílica gel 60 e moídos para melhor homogeneização.

Esta mistura foi introduzida na coluna previamente montada, contendo sílica gel 60 que constituía a fase estacionária, e o sistema diclorometano: metanol na ordem crescente de polaridade (50:0; 80:20; 60:40 e 0:50) como fase móvel. As fracções foram recolhidas em tubos de ensaio e depois concentradas e submetidas à análise por TLC no sistema de solvente DCM:MeOH (60:40). Este processo resultou em 28 fracções e os resultados estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5: Resultados de CC (TLC-Va e TLC-Vb vide anexo 5, fraccionamento do extracto de éter de petróleo).

Fracções	Nº de manchas	Cores das manchas		Rf em DCM: MeOH (60:40)
		UV 254 nm	Após revelação Com reagente de Dragendorff	
1-11	0	Não visível	Não visível	-----
12-15	2	Azul claro Não visível	Não visível Amarelo-alaranjada	0,50 0,25
16-28	2	Não visíveis	Amarelo-alaranjadas	0,25 e 0,22

As fracções foram depois agrupadas em 3 fracções segundo o seu perfil cromatográfico como ilustra a figura no anexo 6 (TLC-VI).

- ✓ As fracções de 1 a 11 (agrupadas na **fracção I**) não revelaram nenhuma mancha.
- ✓ As fracções 12 a 15 (agrupadas na **fracção II**) apresentaram uma mancha, com Rf 0.5 de cor azul claro a UV 254 nm.

apresentavam ainda uma mancha com Rf 0.25 amarelo-alaranjada com o reagente de Dragendorff.

- ✓ A fracção III (16-28) apresentava uma mancha amarelo-alaranjada com Rf 0.25 e outra com Rf 0.22 após revelação com o reagente de Dragendorff.

6.8.2. Cromatografia em camada Fina Preparativa – TLCP do extracto bruto de diclorometano

Na tentativa de isolar produtos no extracto de diclorometano identificados na TLC, 90 mg deste extracto foram submetidas a uma cromatografia em camada fina preparativa que resultou no isolamento de 4 fracções (vide o anexo 8 TLCP VIII) e os resultados estão apresentados na tabela que se segue.

Tabela 6: Fracções isoladas por TLCP

Fracções	Nº de manchas	Cores das manchas			Rf no sistema $C_6H_{12}:CHCl_3:(Et)_2NH$
		UV 254 nm	UV 366 nm	Após revelação com Reagente de Dragendorff	
A (12,3mg)	---	----	---	---	---
B (17mg)	1	Não visível	Violeta	Amarelo-Alaranjada	0,42
C (13,3mg)	1	Não visível	Violeta	Amarelo-Alaranjada	0,56
D (16mg)	1	Não visível	Violeta	Amarelo-Alaranjada	0,61

Feito o isolamento, notou-se que as fracções B, C e D apresentam cada, uma única mancha, com Rfs iguais a 0,42, 0,56 e 0,61 respectivamente enquanto que a fracção A não apresenta nenhuma mancha.

A realização dos testes antimicrobianos foi efectuada no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Eduardo Mondlane. E Com vista a avaliar a actividade antimicrobiana e determinar as respectivas CIMs nos extractos das raízes obtidos seguindo o esquema da figura 4 contra alguns microrganismos, foram utilizados dois métodos principais:

- Método difusão em agar e
- Método de diluição.

a) Equipamentos para testes biológicos

- Autoclave
- Balança analítica
- Bico de Bunsen
- Estufa
- Freezer -20 °C

b) Material de vidro

- Copos de Becker
- Erlenmeyers
- Proveta graduada
- Placas de Petri
- Pipeta
- Provetas

c) Reagentes

- Água destilada
- Solução de etanol a 50%

Meios de cultura

- Agar nutriente
- Agar sangue

d) Microrganismos

Características	Microrganismos
Gram- positivo	<i>Staphylacoccus sp</i>
	<i>Streptococcus sp</i>
Gram-negativo	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Salmonella sp</i>
Fungo	<i>Candida sp</i>

Cultura

1. Pesar o pó e colocá-lo num copo de Becker
2. Acrescentar a metade dos 1000 mL de água destilada.
3. Dissolver os ingredientes em água agitando continuamente com um bastão de vidro ou com um agitador eléctrico (uso de barra magnética), evitando a formação de espuma. Após a formação de uma suspensão homogénea, completar o volume do meio com o restante da água
4. Quando necessário, dissolver os ingredientes do meio de cultura em banho-maria, vapor fluente em autoclave ou utilizando a chama do bico de Bunsen, ou chapa aquecedora eléctrica, protegida com tela de amianto, ou ainda em forno de microondas, até à ebulição, agitando sempre. Evitar o aquecimento desnecessário
5. Filtrar em papel de filtro qualitativo para retirar as impurezas
6. Verificar o pH através de potenciómetro ou fita indicadora de pH e ajustar para 7,2 usando solução de ácido láctico (0,1 %) ou hidróxido de sódio (1,0 N), com pipeta de 1 mililitro, gotejando aos poucos. O pH do òagar simplesö é ajustado antes da adiçãõ do agar-agar.
7. Distribuir os meios nas placas de Petri até quase a metade.
8. Esterilizar em autoclave a 121°C (1 atmosfera de pressão) por 20 minutos e já estão prontas para os ensaios

Após a preparação das placas com meios de cultura e espalhados os microorganismos, foram colocados os discos de papel de filtro contendo as amostras em concentrações mais elevadas de 200 mg/mL sobre os microorganismos e posteriormente incubadas por 24 h a 37 °C. Este procedimento preliminar tinha como objectivo apurar se os extractos eram ou não activos contra os microorganismos. Os resultados estão apresentados nas tabelas 7 e 8 abaixo.

Extracto (200mg/ml)	Microrganismos	Zona de inibição (mm)*
Ext. Ep	<i>E. Coli</i>	---
	<i>Candida sp</i>	---
	<i>Salmonella sp</i>	---
	<i>Staphylococcus sp</i>	---
	<i>Streptococcus sp</i>	---
Ext. DCM	<i>E. Coli</i>	---
	<i>Candida sp</i>	---
	<i>Salmonella sp</i>	---
	<i>Staphylococcus sp</i>	---
	<i>Streptococcus sp</i>	---
Ext. A.E.	<i>E. Coli</i>	---
	<i>Candida sp</i>	---
	<i>Salmonella sp</i>	---
	<i>Staphylococcus sp</i>	---
	<i>Streptococcus sp</i>	---
Ext. Met.	<i>E. Coli</i>	10
	<i>Candida sp</i>	---
	<i>Salmonella sp</i>	12
	<i>Staphylococcus sp</i>	---
	<i>Streptococcus sp</i>	---
Ext. Aq.	<i>E. Coli</i>	---
	<i>Candida sp</i>	08
	<i>Salmonella sp</i>	---
	<i>Staphylococcus sp</i>	---
	<i>Streptococcus sp</i>	---
Ext. A.T	<i>E. Coli</i>	---
	<i>Candida sp</i>	---
	<i>Salmonella sp</i>	11
	<i>Staphylococcus sp</i>	---
	<i>Streptococcus sp</i>	---

EP-Éter de petróleo, DCM- Diclorometano, A.E.- Acetato de etilo, Aq.- Aquoso, A.T- Alcalóides Totais

* Incluindo o halo do disco (6 mm), --- Sem inibição

Extracto (200mg/ml)	Microrganismos	Zona de inibição (mm)*
Ext. Ep	<i>E. Coli</i>	---
	<i>Candida sp</i>	---
	<i>Salmonella sp</i>	---
	<i>Staphylococcus sp</i>	10
	<i>Streptococcus sp</i>	---
Ext. DCM	<i>E. Coli</i>	---
	<i>Candida sp</i>	---
	<i>Salmonella sp</i>	---
	<i>Staphylococcus sp</i>	---
	<i>Streptococcus sp</i>	---
Ext. A.E.	<i>E. Coli</i>	---
	<i>Candida sp</i>	---
	<i>Salmonella sp</i>	---
	<i>Staphylococcus sp</i>	08
	<i>Streptococcus sp</i>	---
Ext. Met.	<i>E. Coli</i>	10
	<i>Candida sp</i>	---
	<i>Salmonella sp</i>	12
	<i>Staphylococcus sp</i>	15
	<i>Streptococcus sp</i>	---
Ext. Aq.	<i>E. Coli</i>	---
	<i>Candida sp</i>	09
	<i>Salmonella sp</i>	10
	<i>Staphylococcus sp</i>	---
	<i>Streptococcus sp</i>	---
Ext. A.T	<i>E. Coli</i>	---
	<i>Candida sp</i>	---
	<i>Salmonella sp</i>	10
	<i>Staphylococcus sp</i>	09
	<i>Streptococcus sp</i>	---

EP-Éter de petróleo, DCM- Diclorometano, A.E.- Acetato de etilo, Aq.- Aquoso, A.T- Alcalóides Totais

* Incluindo o halo do disco (6 mm), --- Sem inibição

Determinação Inibitória Mínima (CIM)

Os extractos a concentração máxima de 200 mg/mL que exibiram actividade antibacteriana foram diluídos para 150, 100, 50 e 25 mg/mL. Foram tomados 20 µL de cada concentração para os discos de papel de filtro, os quais foram depois impregnados nas placas de Petri contendo os respectivos meios de cultura (vide o anexo 8). Após a incubação a 37 °C durante 24 h as concentrações mais baixas que não permitem a visualização dos halos de inibição foram consideradas como sendo as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs). Os resultados alcançados estão ilustrados nas tabelas que se seguem.

Tabela 9: Determinação da CIM na *Salmonella sp*

Extracto metanólico										
1. <i>Salmonella sp</i> em agar nutriente						2. <i>Salmonella</i> em agar sangue				
Conc. (mg/mL)	200	150	100	50	25	200	150	100	50	25
Halo (mm)	12	10	10	08	---	12	11	10	08	---

Tabela 10: Determinação da CIM na *E.coli*

Extracto metanólico										
1. <i>E. coli</i> em agar nutriente						2. <i>E. coli</i> em ágar sangue				
Conc. (mg/mL)	200	150	100	50	25	200	150	100	50	25
Halo (mm)	10	08	08	---	---	10	09	08	---	---

Tabela 11: Determinação da CIM na *Staphylacoccus sp*

Extracto metanólico					
1. <i>Staphylacoccus</i> em agar sangue					
Conc. (mg/mL)	200	150	100	50	25
Halo (mm)	15	13	10	---	---

- Os testes fitoquímicos realizados sobre os extractos brutos de éter de petróleo e de metanol obtidos por maceração e Soxhlet revelaram a presença de taninos nas folhas e de alcalóides e flavonóides nas raízes, conforme ilustra a tabela 3. A presença dos alcalóides nas plantas da família menispermaceae está bem referenciada na literatura [32]. Trabalhos recentes realizados sobre a *Tiliacora funifera* demonstram que há uma abundância dos alcalóides bisbenzilisoquinolínicos nesta planta.
- Os alcalóides constituem a principal classe responsável pela actividade biológica da planta *Tiliacora funifera*, contudo, os flavonóides identificados nas raízes podem exercer uma actividade significativa, visto que o extracto metanólico que para além dos alcalóides possui flavonóides inibiu o crescimento da maior parte dos microrganismos testados (3 em 5) em relação ao extracto dos alcalóides totais (2 em 5). Este facto pode ser facilmente explicado pois a actividade antimicrobiana dos flavonóides está bem descrita na literatura.
- A análise comparativa por TLC dos extractos brutos das raízes obtidos por maceração e Soxhlet e usando o reagente de Dragendorff como revelador dos alcalóides mostrou haver uma semelhança com o extracto dos alcalóides totais na sua composição fitoquímica, conforme ilustra a TLC I- anexo 1.
- A extracção de 100 g do pó das raízes da *Tiliacora funifera* produziu cerca de 0.91g (0.91%) dos alcalóides totais, valor este que está de acordo com os resultados obtidos em estudos realizados na Universidade de Johannesburgo que indicam para a extracção dos alcalóides um rendimento de 0.5 a 1 % [30].
- O extracto metanólico das raízes obtido por maceração foi submetido a extracção solvente-solvente usando solventes de diferentes polaridades e solubilidades: éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo e *n*-butanol. Este processo resultou em

us que quando foram submetidas a TLC e reveladas com Dragendorff, mostraram manchas com características de alcalóides conforme mostra a TLCII- anexo 2.

- Na tentativa de isolar produtos com características de alcalóides, fez-se o fraccionamento dos extractos de diclorometano e de éter de petróleo usando a Cromatografia em Coluna normal (CC) e a Cromatografia em camada Fina Preparativa (TLCP).
 - a) No fraccionamento por cromatografia de coluna do extracto de diclorometano obtido por partição solvente-solvente, foram recolhidas 37 fracções que foram agrupadas em três fracções segundo o seu perfil cromatográfico. A fracção I (1-15) não apresentava nenhuma mancha, a fracção II (16-17) apresentava duas manchas com Rfs 0,48 e 0,43 ambas de cor amarelo-alaranjada após a revelação com o reagente de Dragendorff e finalmente a fracção III (18-37) apresentava uma única mancha com Rf 0,35 após a revelação com reagente de Dragendorff.
 - b) Na análise do extracto de diclorometano por TLC no sistema de solvente constituído por CH:CHCl₃:(Et)₂NH e usando sílica gel 60 Merck sobre a placa de alumínio como fase estacionária, foram visualizadas 4 manchas (A, B, C e D com Rfs 0.30, 0.42, 0.56 e 0.60 respectivamente) de cor violeta sob a luz UV a 366 nm e amarelo-alaranjadas após a revelação com o reagente de Dragendorff.

Na tentativa de isolar as 4 manchas, o extracto de diclorometano foi fraccionado pela cromatografia em camada fina preparativa. Deste processo foram isolados 3 produtos (B, C e D) com características de alcalóides conforme ilustra a TLC VIII no anexo 7.

- c) No fraccionamento do extracto de éter de petróleo obtido por partição solvente-solvente foram recolhidas 28 fracções que foram agrupadas em 3

(1-11) não apresentava nenhuma mancha após a
a 254 nm e com reagente de Dragendorff, a fracção

II (12-15) apresentava duas manchas uma com Rf 0,50 de cor azul claro na
luz UV a 254 nm e outra com um Rf 0,25 de cor amarelo-alaranjada após
revelação com o reagente de Dragendorff e finalmente a fracção III (16-28)
apresentava também duas manchas com Rfs 0,25 e 0,22 não visíveis a UV 254
nm e amarelo-alaranjadas após a revelação com o reagente de Dragendorff.

- Os testes antimicrobianos realizados sobre os extractos de éter de petróleo, de diclorometano, de acetato de etilo, de metanol, aquoso e o extracto dos alcalóides totais usando os microrganismos: *E.coli*, *Candida sp*, *Salmonella sp*, *Staphylacoccus sp* e *Streptococcus sp*, mostraram que:
 - a) O extracto de éter de petróleo e de acetato de etilo inibem o crescimento da *Staphylacoccus sp* em agar sangue.
 - b) O extracto metanólico é eficaz contra a *Escherichia coli* e *Salmonella sp*, enquanto que os extractos aquoso e dos alcalóides totais são mais eficazes contra a *Salmonella sp* nos dois meios de cultura. Esta actividade antimicrobiana observada, particularmente nesses extractos, pode ser devida aos agentes fitoquímicos presentes nesta planta nomeadamente os alcalóides e os flavonóides segundo resultados dos testes fitoquímicos.
- Os extractos previamente testados (a uma concentração máxima de 200 mg/mL) e que inibiram o crescimento dos microrganismos, foram diluídos para 150, 100, 50 e 25 mg/mL a fim de se determinar as respectivas Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) pelo método de diluição, donde foi constatado que podem ser usadas as concentrações inibitórias mínimas de 50 mg/ml contra a *Salmonella sp*, 100 mg/ml contra a *E. coli* e *Staphylacoccus sp* do extracto metanólico, conforme mostram as tabelas 9, 10 e 11.

CONCLUSÕES

8.1. Conclusões

- Os testes fitoquímicos realizados sobre os extractos das raízes da *Tiliacora funifera* revelaram a presença de dois grupos principais de metabólitos secundários, os alcalóides e os flavonóides mas com uma predominância dos alcalóides enquanto que nos extractos das folhas foram detectados somente os taninos.
- Os testes antimicrobianos realizados sobre os extractos das raízes desta planta revelaram que os extractos de metanol, o extracto aquoso e o extracto dos alcalóides totais possuem uma actividade antimicrobiana significativa especialmente contra a *E.coli*, *Salmonella sp* e *Staphylacoccus sp* sendo que a *E.coli*, *Salmonella sp* se mostraram mais sensíveis aos 3 extractos.
- A actividade antimicrobiana da *Tiliacora funifera* pode estar associada principalmente à presença dos alcalóides na sua composição.
- Desta forma, os resultados obtidos no presente trabalho vêm confirmar de certa maneira a relação existente entre a utilização da planta *Tiliacora funifera* na medicina tradicional no tratamento de doenças de origem microbiana e a sua composição fitoquímica.

- Recomenda-se a realização de uma nova colheita das folhas da *Tiliacora funifera* numa estação do ano não seca afim de se apurar convenientemente a existência ou não dos alcalóides nesta parte da planta e a realização de outros testes antimicrobianos com espécies de microrganismos conhecidas.
- Atendendo e considerando a importância das plantas medicinais, que têm sido amplamente usadas como fonte alternativa para a obtenção de medicamentos curativos, e que a elucidação dos compostos responsáveis pela sua actividade ainda é muito reduzida, recomenda-se ao Departamento de Química da U.E.M, o melhoramento acrescido das condições e aparelhos cruciais para um melhor estudo das mesmas.
- Recomenda-se também uma melhor coordenação entre as instituições ou órgãos responsáveis pela pesquisa e estudo das diferentes espécies com propriedades curativas e os praticantes da medicina tradicional em Moçambique, para uma melhor administração das plantas.

- [1]. Ajani V., C. (2004). Antimicrobial activity of *Securidaca longipedunculata*, *Phytomedicine* **11**:701-703.
- [2]. Andrews, J.M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. **48** (1): 5-16.
- [3]. Barreto, A. (2003). *Manual de Prevenção e tratamento de disenteria, epidemia causada pela Sd1*. 2ª edição, Gabinete de Epidemiologia - Ministério da Saúde de Moçambique.
- [4]. Boligon, A.A. (2008). *Estudo da Actividade Antimicrobiana de extractos e fracções obtidos a partir dos ramos de Scuma buxifolia Russk*. Tese de doutoramento. UFSM, P.13
- [5]. Guiliche, A. L. (2008). *Estudo fitoquímico Preliminar do bolbo da planta Gladiolus Psittacinus Hook (Iridaceae)*. Trabalho de Licenciatura. UEM ó Departamento de Química, Maputo.
- [6]. Harbore, J.B. (1988). *Phytochemical Methods, a Guide of Modern Techniques of Plant Analysis*. 3rd edition, Chapman and Hall. London, Pp. 5-8; 16-28; 60-62; 76-88; 203-210.
- [7]. Hense, M. (2003). *Alkaloids*. Wiley-UCH. Germany. Pp. 1-7. Acedido em 22 de Agosto de 2009, em Books.google.br/books.
- [8]. Houghton, P. J.; Raman A. *Laboratory handbook for the Fractionation of Natural Extracts*. Chapman and Hall. P.39. (tudo sobre métodos de extracção, purificação e isolamento dos alcalóides).

- [10]. Jansen, P.C.M; Mendes, O. (1984). *Plantas Mediciniais - seu uso tradicional em Moçambique*. T.4, INLD, Maputo, P. 155
- [11]. Júnior, C.C. et al. (1994). *Cultivo de Plantas Mediciniais, Condimentares e Aromáticas*. 2ª edição, FUNEP, Jaboticabal. São Paulo.
- [12]. Mann, J. (2005). *Secondary Metabolism*, 2ª edição, University Press. Oxford. Acedido em 16 de Agosto de 2009, em Books.google.br/books.
- [13]. Mavie, C. G. (2007). *Isolamento e Caracterização dos Flavonóides nas folhas da planta Combretum molle*. Tese de Licenciatura. Universidade Eduardo Mondlane ó Departamento de Química. P.12.
- [14]. Ministério da Saúde (1994). Falando sobre diarreia. *Boletim de saúde*, série nº19. Maputo, Moçambique. Tudo sobre diarreia.
- [15]. Morrison, R. T; Boyd, R. N. (2005). *Química Orgânica*. 14ª edição, Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa, Portugal. Pp. 674-689.
- [16]. Pachaly, P.; Khosravian, H. (1998). Neve Bisbenzylisochinolin Alkaloide aus Tiliacora trindra. *Journal of Medicinal Plant Research*. **54 (5)**: 433-435.
- [17]. Quinn, P.J. *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolfe. Pp. 95-102
- [18]. Saiin, C.; Markmec, S. (2003). *Isolation of Antimarial Active Compoud from Yanang (Tiliacora triandra Diels.)*. Naresuan University. Thailand.

- Estudo Fitoquímico das Plantas Medicinai Usadas no
sadas por Protozoários e Micobactérias, Avaliação
dos Alcalóides de Grupo de Berberina nas Plantas Medicinai. Tese de
Licenciatura. UEM ó Departamento de Química. Maputo. Pp. 15-16
- [20]. Santos, C. (2006). *Estudo fitoquímico Biomonitorado da entrecasca de Maytenus Rigida Mart (Celastraceae)*. Tese de Doutoramento. Universidade Federal de Alagoas-Departamento de Química.
- [21]. Seigler, D. S. (1995). *Plant Secondary Metabolism*. KAP. Netherlands
- [22]. Shear, P. (2000). Antimicrobial resistance in the tropics. *Tropical Doctor*. **30** (2): 114-116.
- [23]. Skoog, D. A., et al. (1996). *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 7ª edição. USA.
- [24]. Sofowora, A. (1982). *Medicinal Plants and Tradicional medicine in Africa*. John Wiley. Chichester. P.179
- [25]. Suau, R.; (1998). Isoquinoline Alkaloids from *Berberis Vulgaris*. *Phytochemistry*. **49** (8): 2545-2547.
- [26]. S.A., J. et al (2008). *Evaluation of Securidaca longipendunculata leaf and root extracts for antimicrobial activities*. Acedido em: 14 de Outubro de 2009, em: www.academicjournals.org/ajmr.
- [27]. Troupin, G.; Gonçalves, M. L. (1973). *Flora de Moçambique*. Imprensa Portuguesa. Porto, Portugal.
- [28]. Valls, Dr. J. S. e Nacente, R. B. (2003). *Handbook of Microbiological Culture Media*. 8ª edição, Scharlau Microbiology. Pp. 28; 117-118; 187.

Alkaloids from Cyclea. Pp. 1249-1251

- [30]. Wet, H. (2005). *An Ethnobotanical and Chemotaxonomic Study of South African Menispermaceae*. Tese de Doutoramento. University of Johannesburg.



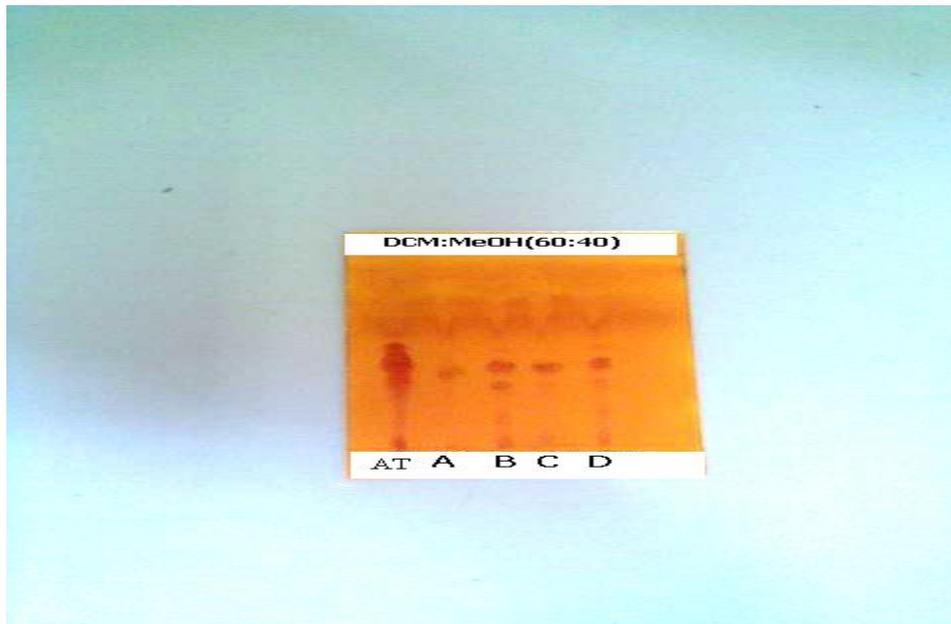
Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

ANEXOS (I-VIII)

Cromatograma dos extractos brutos dos alcalóides totais (EB) e dos extractos obtidos por maceração e Soxhlet com éter de petróleo (A e C) e metanol (B e D)

TLC-I



[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Cromatograma dos extractos semi brutos de: éter de petróleo (EP), diclorometano (DCM), acetato de etilo (AE), butanol (Bu) e água (Aquo) obtidos por extracção solvente - solvente

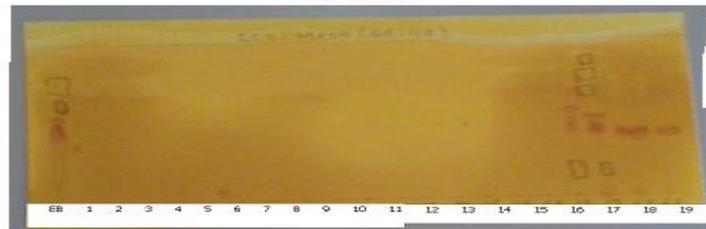
TLC-II



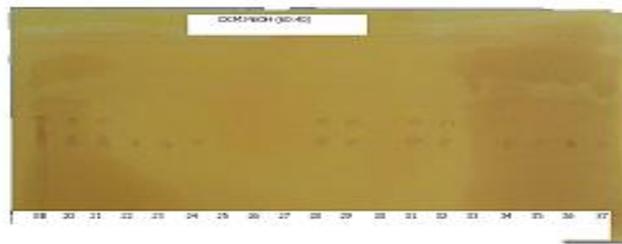
[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Cromatograma das fracções 1-57 da CC obtidas no fraccionamento do extracto de diclorometano (DCM) (TLC IIIa e IIIb)

TLC-IIIa



TLC-IIIb



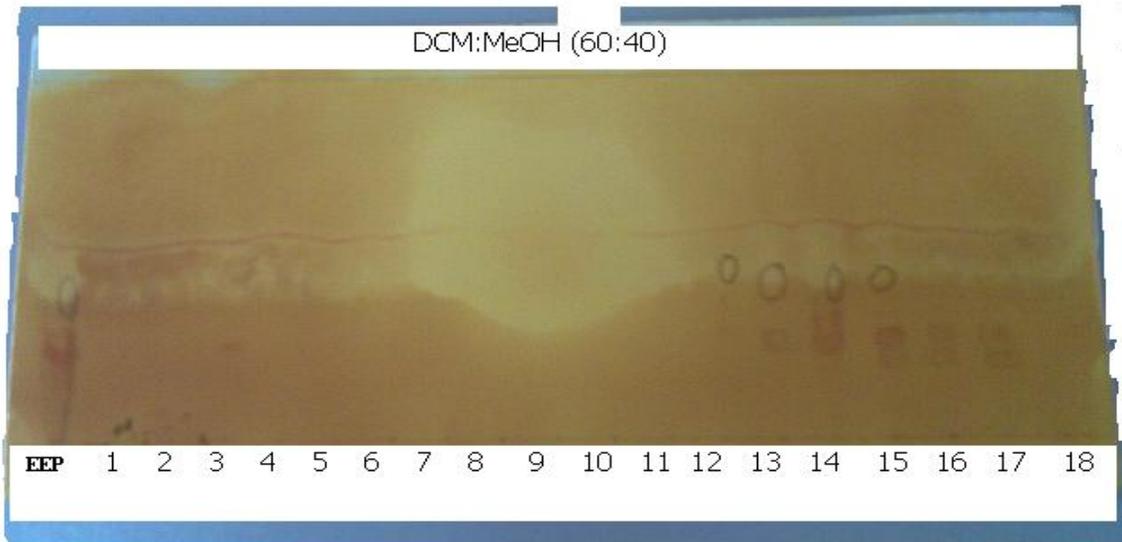
Cromatograma das fracções agrupadas do extracto de DCM



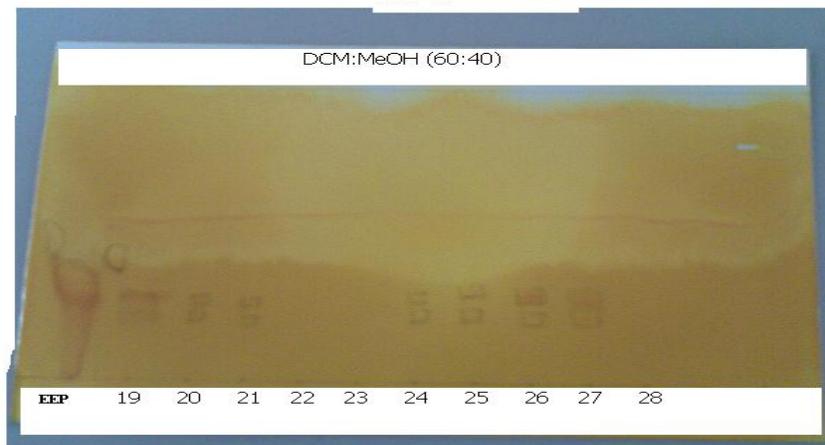
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Cromatograma das fracções 1- 28 da CC obtidas no fraccionamento do extracto de éter de petróleo (TLC Va e Vb).

TLC Va



TLC-Vb



[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

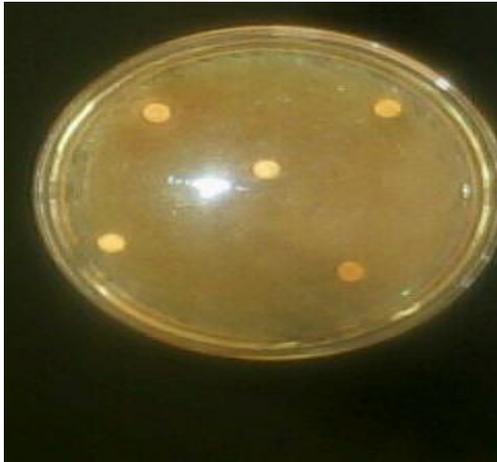
Cromatograma das traçoos agrupadas (F1, F2 e F3) do extracto de éter de petróleo

TLC-VI



a) Fotografias das placas após a incubação (P1 e P2)

P1



8a) Ágar nutriente

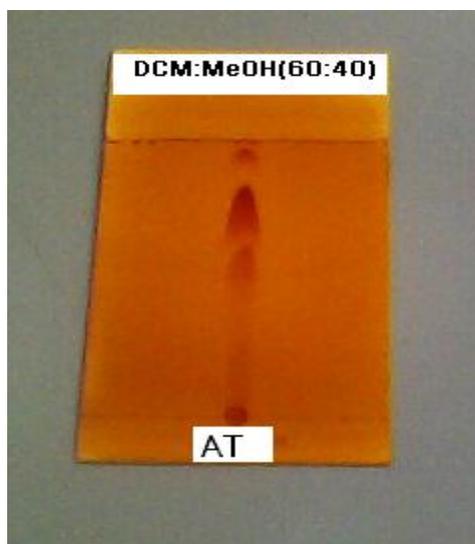
P2



8b) Ágar sangue

b) Cromatograma do extracto bruto dos alcalóides totais (AT)

TLC VII



[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Cromatogramas das manchas isoladas (A, B, C e D) do extracto de diclorometano revelados a luz UV 366 nm e com o reagente de Dragendorff.

TLCP VIII

