



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE



FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TRABALHO DE LICENCIATURA

TEMA: AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ACTIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS DE PLANTAS *KIGELIA AFRICANA*, *COMBRETUM MOLLE* E *TRICHILIA EMETICA* PARA O CONTROLO DE FITOPATÓGENOS



AUTOR: Cremildo Vitorino Zucula

Maputo, Dezembro de 2011



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE



FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TRABALHO DE LICENCIATURA

TEMA: AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ACTIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS DE PLANTAS *KIGELIA AFRICANA*, *COMBRETUM MOLLE* E *TRICHILIA EMETICA* PARA O CONTROLO DE FITOPATÓGENOS



AUTOR: Cremildo Vitorino Zucula

Supervisor: Prof. Doutor François Munyemana

Co-Supervisor: Eng.º João Bila

Maputo, Dezembro de 2011

DEDICATÓRIA

À minha amada mãe Angelina Manuel Fulane Machava pelo apoio incondicional, pela confiança na minha capacidade, paciência, dedicação e ajuda na conquista de mais uma etapa da minha vida pondo me sempre em primeiro plano, suprimindo muitas vezes os seus sonhos para a realização dos meus. Agradeço imensamente pelo amor, criação exemplar, zelo desde o primeiro dia da vida até o dia de hoje e pelo incentivo aos estudos prezando sempre a qualidade.

Às minhas queridas irmãs Florência Zucula e Isaura Zucula pela fé e bondade, por todo o carinho, incentivo, confiança e orgulho que sei que sentem por mim, compartilhando comigo momentos de apoio e de felicidade.

À minha amada Calda Salatiel Uane por todo companheirismo, por toda compreensão, carinho, incentivo, amizade e por todo o amor incondicional que me tem proporcionado.

Em memória à minha avó Isabel Ndimá

AGRADECIMENTOS

Ao tornar público este trabalho de licenciatura não podia deixar de nele exarar o meu profundo agradecimento a quantos, por qualquer forma, contribuíram, através de orientação, simples estímulo ou de ajuda propriamente dita, para a sua concretização, mesmo correndo o risco de não nomear, por esquecimento e não por falta de reconhecimento.

A Deus pelo dom de vida, e por me conduzir em todos os dias da minha vida.

Aos meus supervisores Prof. Doutor François Munyemana e Eng^o João Bila pelo apoio, incentivo, disponibilidade, orientação e ensinamentos prestados ao longo do seu desenvolvimento e pela leitura crítica e revisão do presente trabalho, bem como a confiança, atenção e amizade que têm demonstrado por mim.

Ao Eng^o Amândio Miguel Muthambe pelo auxílio inestimável, sugestões e colaboração prestada durante a realização dos testes antifúngicos e correcção do trabalho.

À Prof. Doutora Fung Dai Kin pelas críticas, sugestões e correcção do trabalho.

À Eng^a Lourena Rebeca Luciano Arone pelo ensinamento prestado na preparação da suspensão do fungo e contagem de esporos.

Quero agradecer a todos os funcionários do Laboratório Fitopatologia do Departamento de Produção e Protecção Vegetal da Faculdade de Agronomia e Engenharia Florestal pela colaboração e prestabilidade mostrada e, em especial, à Sra. Lucrecia Pereira pela sua inestimável contribuição na preparação do meio de cultura (PDA) sempre com o sorriso no rosto. Ao meu doce primo Félix Jacinto Tovela, pelo apoio e sorriso meigo que tantas vezes me fortaleceu e me fez esquecer as preocupações da vida.

Ao colega do laboratório de Fitopatologia Sabate Massango por me ter fornecido o microrganismo (*Colletotrichum gloeosporioides*) utilizado no ensaio.

Os meus agradecimentos são extensivos ao corpo docente, funcionários e técnicos de laboratórios do departamento de Química da Faculdade de Ciências da UEM pelos momentos de amizade durante a formação académica.

Aos meus amigos de sempre e para sempre: Eugénio Anastácio José, Paulo Cumbane e Isaías Armando Mucindo Mathe e Sarmiento Júnior Mazivila por estarem sempre com os braços livres para me erguer nas horas de sufoco.

DECLARAÇÃO SOB COMPROMISSO DE HONRA

Declaro por minha honra que este trabalho de licenciatura nunca foi apresentado, na sua essência, para a obtenção de qualquer grau e que ele constitui o resultado da minha investigação pessoal, estando no texto e nas referências bibliográficas as fontes utilizadas.

Maputo, Dezembro de 2011

(Cremildo Vitorino Zucula)

RESUMO

A procura por novos agentes antimicrobianos, a partir de plantas, é intensa devido à crescente resistência dos microrganismos patogénicos frente aos antimicrobianos já disponíveis no mercado. Além disso, o uso dos pesticidas a longo prazo, causa impactos negativos para a sociedade e para o meio ambiente devido à poluição causada pelos resíduos químicos. Frente a este problema, uma estratégia actual da agricultura, vem sendo buscar métodos alternativos para o controlo de doenças e pestes, que visem causar menos danos ao ambiente e à saúde humana. O objectivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* o efeito de extractos das cascas do caule e de raízes de *Kigelia africana* e *Trichilia emetica* bem como fracções do extracto do pó das folhas de *Combretum molle* sobre o desenvolvimento de fitopatógenos em plantas.

Os extractos foram obtidos por maceração usando os solventes hexano, diclorometano, acetato de etilo e metanol segundo a metodologia descrita por Araújo *et al.* (2010) com alguma modificação enquanto as fracções foram obtidas usando os solventes hexano, clorofórmio, n-butanol e metanol a 65% segundo a metodologia descrita por Mavie (2007). Os testes fitoquímicos de identificação de metabólitos secundários foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Mouco *et al.*, (2003) e Rezende *et al.*, (2011). Para a avaliação antifúngica foram usadas culturas puras de *A.niger* e *C.gloeosporioides* isolados de milho e castanha de caju, usando os métodos de difusão em disco e perfuração em agar (poços).

Os testes fitoquímicos realizados nos extractos de *Kigelia africana*, revelaram a presença de flavonóides, saponinas, antraquinonas e triterpenóides/esteróides. A prospecção fitoquímica realizada nos extractos de *Trichilia emetica* revelou a presença de terpenos, flavonóides e taninos. Para *Combretum molle*, os testes de reconhecimento de classes de metabólitos secundários revelaram a presença de flavonóides, taninos, terpenos e saponinas.

Os extractos DCM, EtOAc e MeOH de *Kigelia africana* inibiram o crescimento dos microrganismos. O extracto hexânico de todas as plantas não exibiu actividade antifúngica.

As fracções aquosa, clorofórmica, butanólica e hidrometanólica de *Combretum molle* inibiram o crescimento dos microrganismos. Os extractos DCM e EtOAc de *Trichilia emetica* apresentaram actividade contra *A. niger* e os extractos hexânico e metanólico não foram activos.

O potencial antifúngico, parcial ou total, dos extractos vegetais contra os fitopatógenos, mostra que os extractos das plantas em estudo podem ser uma alternativa viável para o controlo de doenças em plantas.

ÍNDICE GERAL

DEDICATÓRIA	i
AGRADECIMENTOS	ii
DECLARAÇÃO SOB COMPROMISSO DE HONRA	iii
RESUMO.....	iv
ÍNDICE DE TABELAS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS	xiii
I. INTRODUÇÃO	1
II. OBJECTIVOS DO TRABALHO	4
2.1 Objectivo geral.....	4
2.2. Objectivos específicos	4
III. METODOLOGIA	5
IV. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
4.1 Descrição das plantas em estudo.....	7
4.1.1 <i>Kigelia africana</i>	7
4.1.2 Descrição taxonómica.....	7
4.1.3 Composição fitoquímica	8
4.1.4 Compostos químicos isolados da <i>Kigelia africana</i>	8
4.1.5 Usos de <i>Kigelia africana</i>	10
4.1.6 Actividade antifúngica de <i>Kigelia africana</i>	10
4.2 <i>Combretum molle</i>	11
4.2.1 Descrição taxonómica.....	11
4.2.2 Ocorrência.....	12
4.2.3 Composição fitoquímica	12
4.2.4 Compostos químicos isolados de <i>Combretum molle</i>	12

4.2.5	Actividade antifúngica da família Combretaceae	13
4.3.	<i>Trichilia emetica</i>	14
4.3.1	Descrição taxonómica	14
4.3.2	Ocorrência.....	15
4.3.3	Composição fitoquímica	15
4.3.4	Compostos químicos isolados.....	16
4.3.5	Usos de <i>Trichilia emetica</i>	18
4.3.6	Actividade antifúngica da família Meliaceae.....	18
4.4	Características gerais dos fungos	18
4.4.1	<i>Aspergillus niger</i>	20
4.4.2	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	20
4.5	Controlo de doenças de plantas.....	21
4.5.1	Doenças de plantas.....	21
4.5.2	Controlo químico de doenças de plantas.....	22
4.5.3	Extractos vegetais no controlo de doenças de plantas.....	23
4.5.4	Resistência induzida em plantas a patógenos.....	24
4.6	Principais classes de metabólitos secundários com actividade antifúngica	25
4.6.1	Flavonóides	25
4.6.2	Taninos.....	26
4.7	Terpenos/Esteróides	28
4.8	Limonóides	29
5.1	Extracção.....	32
5.2	Métodos de extracção.....	32
5.2.1	Extracção por maceração	32
5.2.2	Extracção por infusão.....	33
5.2.3	Extracção por decocção	33

5.2.4	Extracção por soxhlet.....	33
5.2.5	Extracção por percolação	33
5.3	Métodos cromatográficos.....	33
5.4	Cromatografia em camada fina (TLC).....	34
5.5	Métodos Espectroscópicos	35
5.6	Espectroscopia no Ultravioleta -Visível (UV-Vis)	36
VI.	PARTE EXPERIMENTAL	37
6.1	Material Vegetal.....	37
6.1.1	Colheita e identificação botânica da planta.....	37
6.1.2	Secagem e moagem da amostra	37
6.2	Preparação dos extractos.....	38
6.2.1	Extracção do pó das folhas de <i>Combretum molle</i>	38
6.2.2	Extracção do pó das raízes e cascas do caule de <i>Kigelia africana</i>	40
6.3	Testes Fitoquímicos	41
6.4	Análise cromatográfica	43
6.5	Testes de actividade antifúngica	44
6.5.1	Cultivo do patógeno	44
6.5.2	Identificação do patógeno	45
6.5.3	Isolamento e obtenção de cultura pura.....	45
6.5.4	Preparação das soluções de extractos vegetais.....	46
6.5.5	Preparação dos discos de papel.....	46
6.5.6	Preparação da suspensão fúngica	46
6.5.7	Inoculação da suspensão do fungo.....	46
6.5.8	Aplicação dos discos de sensibilidade	47
VII.	RESULTADOS.....	48
7.1	Resultados de testes fitoquímicos	48

7.2	Resultados dos Testes de Actividade antifúngica	50
7.3	Resultados de Cromatografia em Camada fina (TLC).....	55
VIII.	DISCUSSÃO DE RESULTADOS	57
IX.	CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	60
9.1	Conclusões	60
9.2	Recomendações.....	61
	BIBLIOGRAFIA	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Frutas de <i>Kigelia africana</i>	7
Figura 2. Alguns exemplos de compostos químicos isolados da <i>Kigelia africana</i>	8
Figura 3. Alguns exemplos de compostos isolados de <i>Kigelia africana</i>	9
Figura 4. Alguns exemplos de compostos químicos isolados da <i>Kigelia africana</i>	10
Figura 5. Folhas de <i>Combretum molle</i>	11
Figura 6. Alguns exemplos de compostos químicos isolados de <i>Combretum molle</i>	12
Figura 7. Alguns exemplos de compostos químicos isolados de <i>Combretum molle</i>	13
Figura 8. Frutas de <i>Trichilia emetica</i>	14
Figura 9. Alguns compostos químicos isolados de <i>Trichilia emetica</i>	17
Figura 10. Micélio de <i>Aspergillus fumigatus</i> cultivado em placa de Petri, no laboratório.	19
Figura 11. Morango mofado. Ilustração da formação do micélio.....	19
Figura 12. Conídios de fungo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz) observados no microscópio óptico composto a ampliação de 40X	21
Figura 13. Esqueleto básico dos flavonóides	26
Figura 14. Estruturas de taninos hidrolisáveis: A) taninos gálicos (pentagalactose), B) taninos elágicos (vescalagina e castalagina).....	27
Figura 15. Estrutura fundamental dos principais flavon-3-óis (flavonóides) presentes na natureza	28
Figura 16. Limonóides do grupo I.	29
Figura 17. Limonóides do grupo II.....	30
Figura 18 Limonóides do grupo III.....	30
Figura 19. Limonóides do grupo V	30
Figura 20. Limonóides do grupo VI	31
Figura 21. Limonóides do grupo VII	31
Figura 22. Determinação de R _f no Cromatograma de Camada Fina (TLC).....	34
Figura 23. Espectro electromagnético envolvendo uma faixa de comprimentos de onda e frequência, desde ondas de rádio na região de baixa frequência até os raios gama na região de alta frequência.....	36
Figura 24: Esquema geral seguido para extracção e fraccionamento solvente/solvente do pó das folhas de <i>Combretum molle</i>	39

Figura 25. Esquema geral seguido para obtenção de extractos de *Kigelia africana* e *Trichilia emetica* 40

Figura 26. Obtenção de cultura pura de *Colletotrichum gloeosporioides* com micélio após 7 dias (figura A) e *Aspergillus niger* com esporos após 7 dias (figura B) 45

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Massa em gramas das fracções do pó das folhas de <i>Combretum molle</i>	48
Tabela 2. Massa em gramas dos extractos de <i>Kigelia africana</i> e <i>Trichilia emetica</i>	48
Tabela 3. Resultados dos testes fitoquímicos das fracções de <i>Combretum molle</i>	48
Tabela 4: Resultados de testes de identificação de metabólitos secundários dos extractos de <i>Kigelia africana</i>	49
Tabela 5. Resultados de testes de identificação de metabólitos secundários dos extractos de <i>Trichilia emetica</i>	49
Tabela 6. Diâmetros em milimetro (mm) de inibição das fracções de <i>Combretum molle</i> com os respectivos desvios padrão pelo método de perfuração em agar.	50
Tabela 7. Diâmetros em milimetro (mm) de inibição das fracções de <i>Combretum molle</i> com os respectivos desvios padrão pelo método de difusão em disco	50
Tabela 8. Médias dos halos em milimetro (mm) de inibição dos extractos de <i>Kigelia africana</i> contra <i>A. niger</i> e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> e intervalos de confiança, pelo método de difusão em disco	51
Tabela 9. Médias dos halos em milimetro (mm) de inibição dos extractos de <i>Kigelia africana</i> contra <i>A. niger</i> e <i>C. gloeosporioides</i> e intervalos de confiança, pelo método de perfuração em agar.....	52
Tabela 10. Médias e intervalos de confiança dos diâmetros em milimetro (mm) de inibição dos extractos de <i>Trichilia emetica</i> contra <i>A. niger</i> e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> pelo método de difusão em disco	53
Tabela 11. Médias dos diâmetros em milimetro (mm) de inibição dos extractos de <i>Trichilia emetica</i> contra <i>A. niger</i> e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> e os intervalos de confiança pelo método de perfuração em agar	54

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Recuperação do solvente em rotavapor.....	a
Anexo 2. Cromatograma de extractos brutos das cascas do caule de <i>Kigelia africana</i> TLC-I	a
Anexo 3. Cromatograma de extractos brutos da raíz de <i>Kigelia africana</i> TLC-II	b
Anexo 4. Cromatograma de fracções do pó das folhas de <i>Combretum molle</i> TLC-III	b
Anexo 5. Cromatograma dos extractos de <i>Trichilia emetica</i>	c
Anexo 6. Halos de inibição dos microrganismos testados.....	c
Anexo 7. Esquema de maceração sob agitação constante	d

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
<i>C. gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAc	Extracto acetónico
EHM	Fracção de metanol a 90%
EHX	Extracto de hexano
EHAc	Extracto hidroacetónico
EtOAc	Extracto de acetato de etilo
FAq	Fracção aquosa
FBL	Fracção butanólica
FCL	Fracção clorofórmica
FHX	Fracção hexanica
FHM	Fracção hidrometanólico (MeOH a 90% e 65%)
IAM	Instituto de Investigação Agrária de Moçambique
MeOH	Metanol
n-ButOH	n-butanol
Pb(Ac) ₂	Acetato de chumbo
PDA	Potato dextrose agar
Rf	Factor de retenção
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatográfica em Camada Fina
UEM	Universidade Eduardo Mondlane
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

I. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a agricultura tem feito um grande esforço para aumentar anualmente a produção de alimentos para suprir os mercados internos ou externos. O uso de pesticidas está intimamente ligado à necessidade de suprimento de alimentos em função do crescimento populacional. Prevendo que a população mundial duplicará nos próximos trinta ou quarenta anos e, atendendo que, no presente momento, somente um terço da humanidade tem alimento suficiente, as perspectivas futuras mundiais de alimentos não cubrirão as demandas. Segundo os prognósticos, as Nações Unidas prevêem que os suprimentos alimentares precisam de ser triplicados até o fim do século, objectivando proporcionar a todos os países do mundo um nível de nutrição razoável (Macedo, 2002).

Actualmente, com a disponibilidade de várias ferramentas que levam ao incremento da produção de alimentos, a maior preocupação dos governos passou a ser em relação à segurança e à qualidade do alimento. A globalização influencia diferentes aspectos da vida humana, incluindo a segurança da cadeia alimentar que pode ser relacionada com a presença ou não de contaminantes químicos ou microrganismos indesejáveis. A segurança alimentar tem sido um tema cada vez mais importante em metas governamentais, não apenas no sentido de garantir que a população dos países tenha acesso a alimentos, mas que estes estejam dentro de padrões de qualidade nutricional e dentro dos limites de resíduos químicos ou de microrganismos que causem prejuízos à população.

Em Moçambique, o controlo de doenças de plantas cultivadas é feito quase exclusivamente com produtos químicos sintéticos. Este facto ocorre devido à tradição do uso desses produtos junto dos produtores, facilidade de aplicação e disponibilidade de equipamentos e serviços no mercado (Berger *et al.*, 2011). O uso indiscriminado de produtos químicos sintéticos para controlar doenças causadas por fitopatógenos resulta, na sua grande maioria, em irregularidades.

Por outro lado, o uso generalizado e intensivo de pesticidas na agricultura pode ocasionar acúmulo de substâncias nocivas, o surgimento de plantas invasoras e populações de microrganismos resistentes aos compostos químicos e danos em espécies não visadas. Os agrotóxicos podem causar problemas de ordem ambiental nomeadamente: a contaminação dos alimentos, do solo, da água e dos animais, a intoxicação de agricultores, o surgimento de doenças

iatrogénicas, o desequilíbrio biológico que altera a ciclagem de nutrientes e da matéria orgânica e a redução da biodiversidade (Bettioli & Morandi, 2009; Dixon, 2001).

Nesse enfoque, uma nova política agrícola através da agricultura alternativa tem sido desenvolvida, voltada à minimização desses impactos no ambiente e ao homem por meio do controlo alternativo de doenças de plantas, o qual inclui o controlo biológico, a indução de resistência em plantas e a utilização de subprodutos de plantas medicinais como extractos brutos e óleos essenciais, uma vez que apresentam, na sua composição, substâncias com propriedades antimicrobianas. Esses compostos possuem a vantagem de serem geralmente menos prejudiciais ao homem e ao meio ambiente, de menores custos, facilmente disponíveis aos agricultores e, em alguns casos, podem inclusive superar os produtos sintéticos na sua acção antimicrobiana (Venturoso *et al.*, 2011)

Devido à grande riqueza química das plantas medicinais que possuem princípios activos com actividade antimicrobiana, elas tornam-se fontes potenciais de moléculas que podem ser empregadas na defesa de plantas contra fitopatógenos. Esses compostos pertencem a várias classes distintas de substâncias químicas, como alcalóides, terpenos, lignanas, flavonóides, cumarinas, quinonas, xantonas, lactonas, esteróides, entre outros.

A diversidade de substâncias activas em plantas medicinais tem motivado o desenvolvimento de pesquisas envolvendo o uso de extractos vegetais, com o intuito de explorar as suas propriedades antimicrobianas.

Trabalhos desenvolvidos com extracto bruto e óleo essencial, obtidos a partir de plantas medicinais, têm indicado o potencial das mesmas no controlo de fitopatógenos, tanto na sua acção fungitóxica directa, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela indução de fitoalexinas (Lyon *et al.* 1995; Schwan-Estrada *et al.*, 2000).

Estudos levados a cabo por Khan *et al.*, (2000) na Tanzânia sobre a avaliação da actividade antifúngica dos extractos das cascas do caule de *Combretum molle* contra *Candida albicans*, constataram que os mesmos exibiram uma actividade significativa com CIM de 5 mg/mL.

Baba-Moussa *et al.* (1999) constataram que os extractos das folhas de *Combretum molle* exibiram um excelente efeito antifúngico contra alguns dermatófitos, como *Microsporium gypseum* e *Trichophyton mentagrophytes* com CIM de 0.25 mg/mL.

Um outro estudo realizado por Carvalho *et al.* (2002) citados por Gabriel & Olubunmi (2009) na Nigéria sobre a avaliação *in vitro* da actividade antimicrobiana de extractos metanólico, clorofórmico e aquoso das cascas de caule de *Kigelia africana* contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus Cereus* (Gram-positivo) *E.coli*, *Enterobacter aerogens* e *Klebsiella*, pelo método de difusão em disco, mostrou que o extracto metanólico apresenta maior actividade para os microrganismos testados relativamente aos outros extractos.

É neste âmbito que o presente trabalho de licenciatura se propõe a realizar a avaliação *in vitro* da actividade antifúngica dos extractos vegetais das plantas: *Combretum molle* (Combretaceae), *Kigelia africana* (Bignoniaceae) e *Trichilia emetica* (Meliaceae) sobre o desenvolvimento micelial dos fungos, *Aspergillus niger* e *Colletotrichum gloeosporioides*.

II. OBJECTIVOS DO TRABALHO

2.1 Objectivo geral

- Avaliar *in vitro* a actividade antifúngica de extractos das plantas *Kigelia africana*, *Combretum molle* e *Trichilia emetica* contra fitopatógenos.

2.2. Objectivos específicos

- Identificar as principais classes de metabólitos secundários presentes nos extractos das raízes, cascas de caule de *Trichilia emetica*, *Kigelia africana* e folhas de *Combretum molle*.
- Realizar actividade antifúngica *in vitro* de extractos e fracções das plantas em estudo, contra os fungos *Aspergillus niger* e *Colletotrichum gloeosporioides*.
- Determinar a concentração inibitória mínima de extractos e fracções.
- Estabelecer uma correlação entre a actividade antifúngica observada e a composição fitoquímica dos extractos e fracções.

III.METODOLOGIA

O presente trabalho foi realizado obedecendo à seguinte sequência:

a) Revisão bibliográfica

A revisão bibliográfica consistiu na recolha de informação sobre a composição química de *Kigelia africana*, *Trichilia emetica* e *Combretum molle*, métodos de extracção de metabólitos neles presentes, métodos de avaliação da actividade antifúngica *in vitro*, métodos de determinação de concentração inibitória mínima dos extractos vegetais em várias fontes tais como: artigos científicos, livros de produtos naturais, química analítica e publicações da internet.

b) Parte experimental

i) Colheita de amostra

A colheita de amostra foi feita na localidade de Incaia, distrito de Bilene na província de Gaza, no dia 29 de Novembro de 2010. Depois foi levada para o laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da UEM.

ii) Preparação da amostra

A preparação da amostra consistiu em lavar o material vegetal com água corrente, depois com água destilada e posterior remoção das cascas (no caso da raíz).

Cortou-se o material vegetal em pequenos pedaços com ajuda de uma faca e deixou-se secar em separado à temperatura ambiente.

iii) Preparação dos extractos para testes fitoquímicos e antifúngicos

Os extractos foram preparados usando a maceração sob agitação constante à temperatura ambiente.

iv) Testes qualitativos de identificação de metabólitos secundários

Para identificação de metabólitos secundários, foram realizados testes colorimétricos e de precipitação

v) Testes antifúngicos

Os testes antifúngicos foram realizados usando os métodos: difusão em disco e perfuração em agar.

c) Discussão e interpretação dos resultados:

Os resultados dos testes antifúngicos foram submetidos ao cálculo da média e desvio padrão. No final estabeleceu-se a correlação entre a actividade antifúngica dos extractos e a sua composição fitoquímica.

IV. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Descrição das plantas em estudo

4.1.1 *Kigelia africana*



Nome científico: *Kigelia africana* (Lam) Benth

Nome vernacular: Pfungura (Gaza)

Reino: Plantae

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Lamiales

Família: Bignoniaceae

Género: *Kigelia*

Figura 1. Frutas de *Kigelia africana*

4.1.2 Descrição taxonómica

A *Kigelia africana* ou *Kigelia Pinnata* é uma árvore grande e robusta com ramos tortos que pode atingir mais de 20 metros de altura quando adulta e 1 metro de largura, com um tronco grosso e arredondado cascas cinzentas e lisas. As flores são muito atractivas, mas têm um cheiro desagradável de cor castanha avermelhada e enrugadas.

As folhas são duras e opostas, com 3 ou 4 pares de folíolos inteiros, possuem cerca de 20 cm de comprimento e 6 cm de largura. As frutas são enormes de forma cilíndrica, podem atingir cerca de 30-100 cm de comprimento e 18 cm de diâmetro, pesam entre 5 – 10 kg e contêm 9.000-10.000 sementes por kg (Owolabi *et al.*, 2007; Gabriel & Olubunmi, 2009; Rønne & Jøker, 2005).

É muito comum nas savanas africanas, principalmente na Africa do Sul, Malawi, Zimbabwe, Moçambique, Senegal, Botswana, Eritreia, Tchad e Namíbia. Também é amplamente cultivada

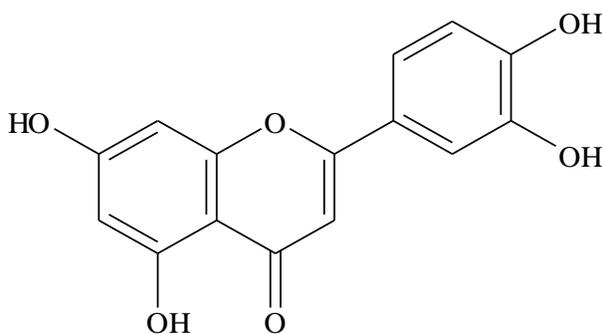
como planta ornamental nas regiões tropicais como Cabo Verde, Madagáscar, Iraque, Paquistão, Índia, China, Ásia, Austrália, Hawaii, na região sul da Nigéria e nas regiões central e sul da América (Rønne *et al.*, 2005; Mujanje, 2007; Azu *et al.*, 2011).

4.1.3 Composição fitoquímica

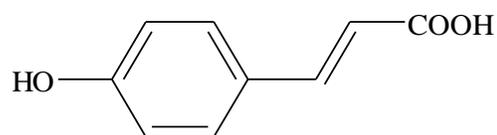
Pesquisas feitas sobre a planta em estudo destacam a presença de numerosos metabólitos, nomeadamente carboidratos, irridóides, flavonóides, naftoquinonas, compostos voláteis, saponinas, terpenóides, isocumarinas, ácidos gordos, glicósidos, lignanas, esteróides e derivados de cumarinas (Saini *et al.*, 2009; Azu *et al.*, 2010; Olatunji & Olubunmi, 2009; Dada *et al.*, 2010).

4.1.4 Compostos químicos isolados da *Kigelia africana*

Picerno *et al.* (2005) e Akunyili *et al.* (1993) citados por Olatunji *et al.*, (2009), levaram a cabo o estudo fitoquímico da planta *Kigelia africana* que resultou no isolamento de esteróides (stigmasterol e β -sitosterol), Lignanas (balanofonina), irridóides (capatol e seus derivados speciósido, verminósido e minecósido) e naftoquinonas.



luteolina



ácido cumárico

Figura 2. Alguns exemplos de compostos químicos isolados da *Kigelia africana*

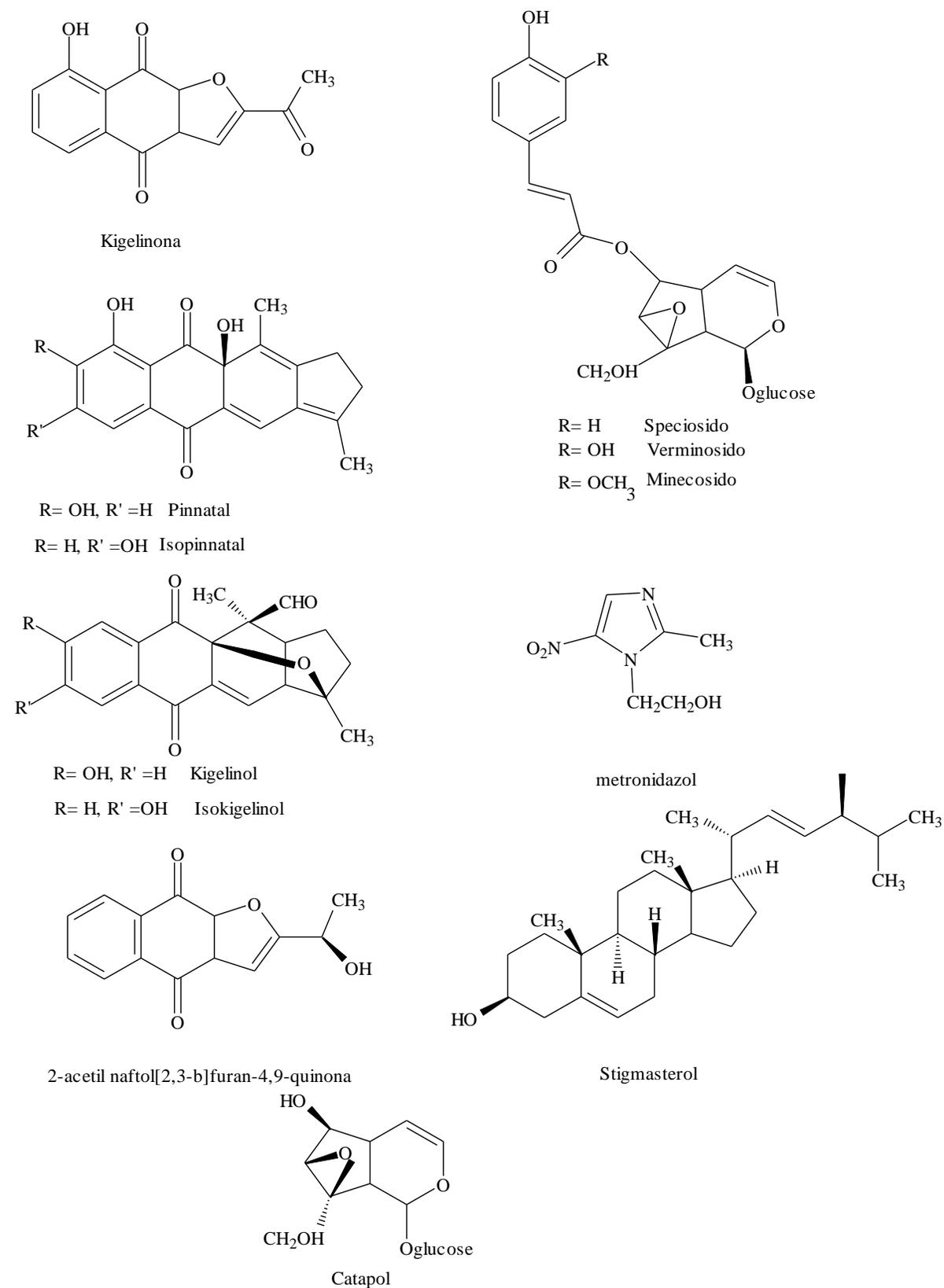


Figura 3. Alguns exemplos de compostos isolados de *Kigelia africana*

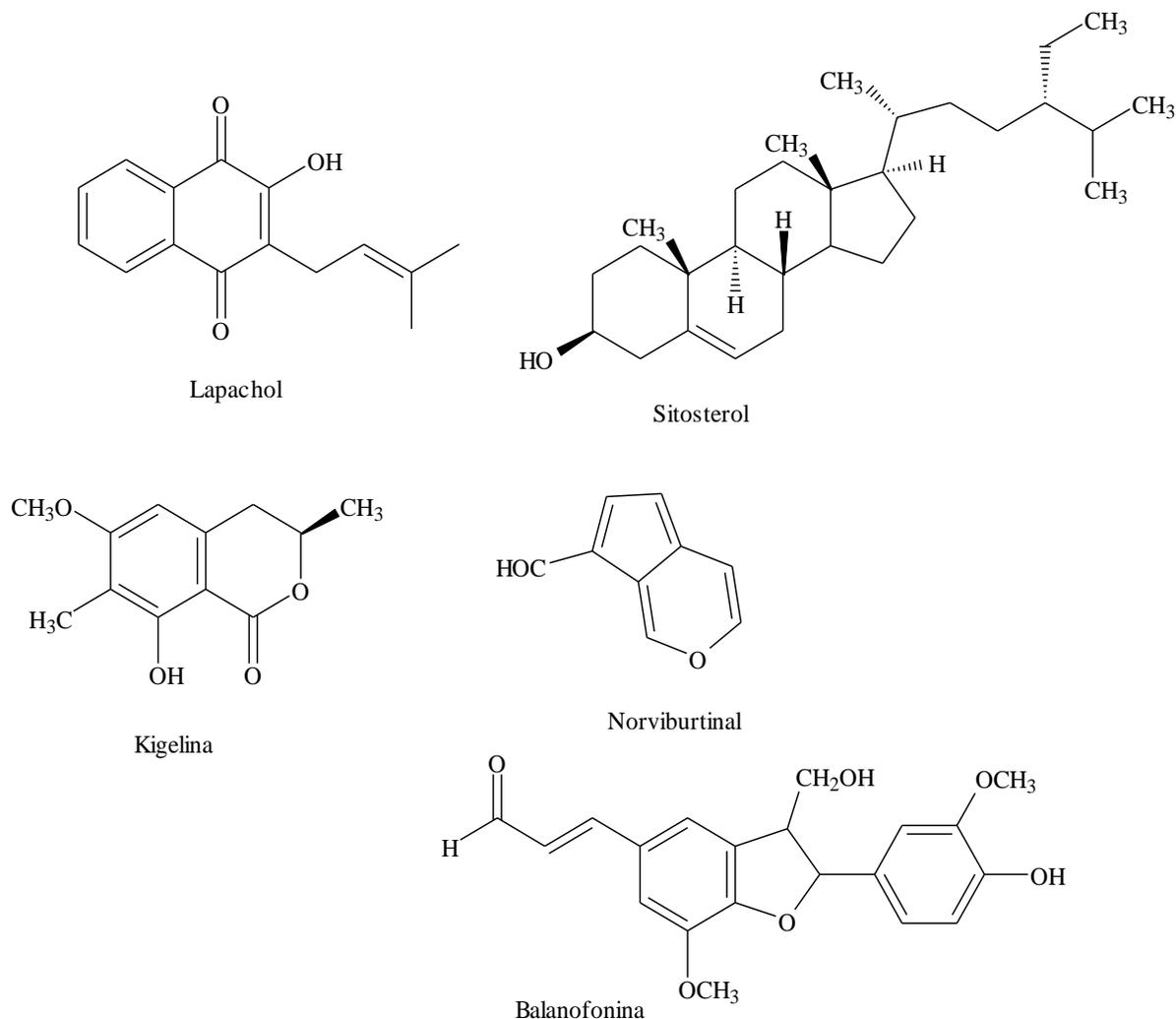


Figura 4. Alguns exemplos de compostos químicos isolados da *Kigelia africana*

4.1.5 Usos de *Kigelia africana*

Esta planta é usada na construção civil, carpintaria no fabrico de armários, gavetas e na construção de instrumentos musicais. É usada como planta de ornamentação, devido à beleza da sua floração. Em Moçambique os médicos tradicionais usam o tronco para fins cerimoniais. No vale do Zambeze, as frutas são aplicadas na preparação de cosméticos (Mujanje, 2007)

4.1.6 Actividade antifúngica de *Kigelia africana*

Saini *et al.* (2009), levaram a cabo um estudo de actividade biológica do extracto metanólico das cascas do caule de *Kigelia africana* contra os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Candida albicans* e

pullularia pullularis (*Aureobasidium sp.*), tendo exibido actividade frente aos patógenos testados.

Os mesmos autores realizaram estudo *in vitro* da actividade biológica do extracto aquoso das cascas do caule frente a *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* que resultou na inibição do crescimento dos microrganismos.

4.2 *Combretum molle*



Nome científico: *Combretum molle*

Nome vernacular: Xicucutsi

Reino: Plantae

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Myrtales

Família: Combretaceae

Género: *Combretum*

Figura 5. *Folhas de Combretum molle*

4.2.1 Descrição taxonómica

Combretum molle é uma planta perene, grande e robusta com ramos muitos tortos, desorganizados. Possui tiras fibrosas e pode atingir mais de 20 metros de altura quando adulta e um metro de largura, com um tronco grosso arredondado com cascas pretas-acinzentadas e lisas. As folhas são estreitamente elípticas, normalmente com cerca de 60-100 mm de comprimento e 40- 60 mm de largura. As flores são amarelas-esverdeadas, atractivas, de cheiro desagradável. As frutas têm a forma de asas e possuem geralmente 15-20 mm de comprimento e 15-20 mm de largura; quando secas apresentam a cor marrom-avermelhado (Orwa *et al.*, 2009; Ojewole, 2008).

4.2.2 Ocorrência

É comum nas florestas abertas e savanas e com larga distribuição na África Austral, Tropical e na Arábia. Também ocorre em Botswana, República Centro Africana, República Democrática de Congo, Djibuti, Eritreia, Etiópia, Gabão, Quênia, Lesotho, Namíbia, Senegal, Somália, África do Sul, Sudão, Suazilândia, Tanzânia, Uganda, Zâmbia, sul da Arábia Saudita, Nigéria e Iémen.

Em Moçambique é distribuída em quase todo o território mas com maior predominância nas províncias de Maputo, Gaza, Zambézia, Nampula e Tete (Mavie, 2007; Orwa *et al.*, 2009).

4.2.3 Composição fitoquímica

A triagem fitoquímica feita em diferentes partes da planta revelou a presença de vários metabólitos tais como alcalóides, esteróides, saponinas, carboidratos, flavonóides, taninos, ácidos esteroidais e glicosídeos cardíacos (Simon *et al.*, 2008).

4.2.4 Compostos químicos isolados de *Combretum molle*

Estudo fitoquímico levado a cabo por Ponou *et al.*, (2008), culminou com o isolamento de triterpenos do tipo lanosterol, designados combreteno-A e combreteno-B, Arjunglucósido I, Arjungenino e Combreglucósido além de glucósido do ácido mólico.

As figuras 6 e 7 mostram alguns compostos isolados da planta *Combretum molle*.

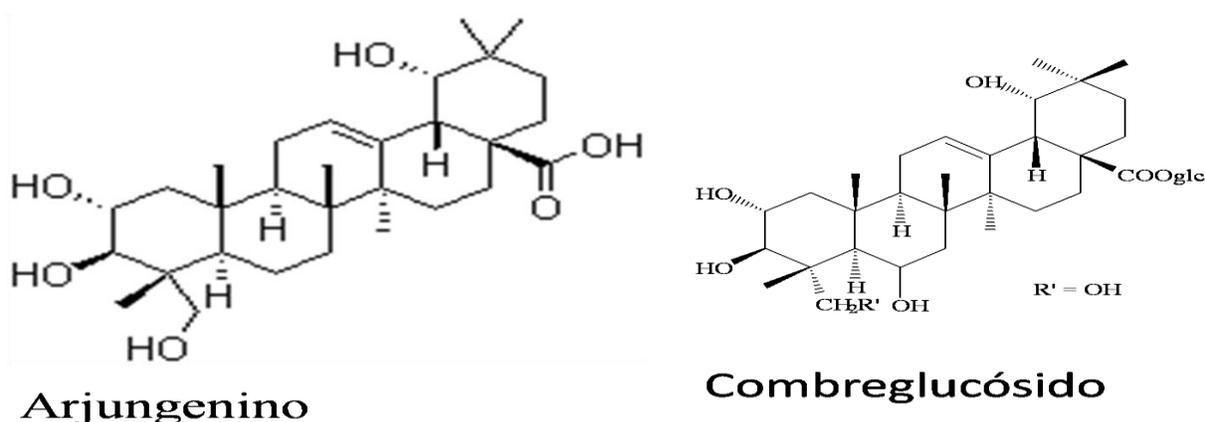
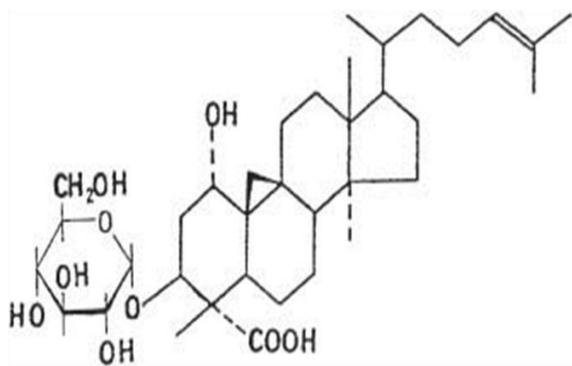
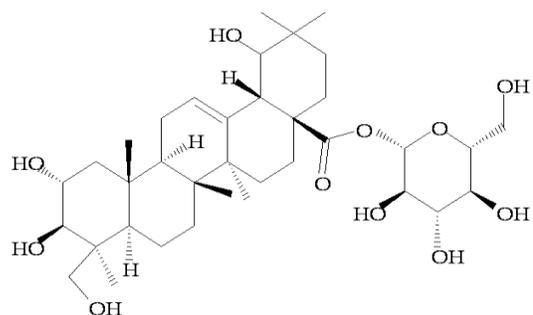


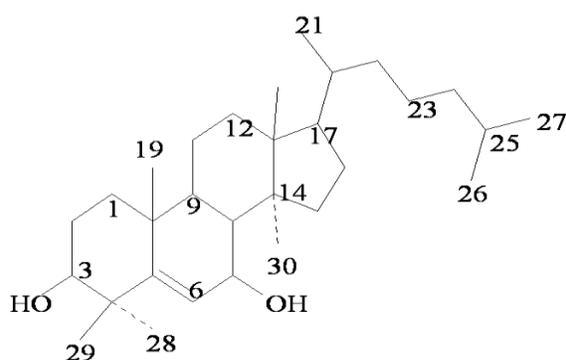
Figura 6. Alguns exemplos de compostos químicos isolados de *Combretum molle*



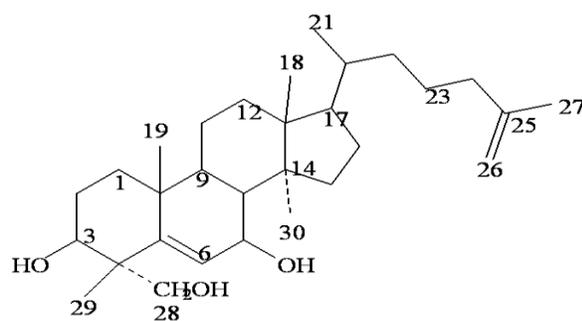
Glucósido do ácido mólico



Arjunglucósido I



Combreteno A



Combreteno B

Figura 7. Alguns exemplos de compostos químicos isolados de *Combretum molle*

4.2.5 Actividade antifúngica da família Combretaceae

Masoko *et al.*, (2007) levaram a cabo um estudo sobre avaliação da actividade antifúngica dos extractos de *combretum terminalia* contra os patógenos *Candida albicans*, e *Aspergillus fumigatus* e determinaram a concentração inibitória mínima (CIM). Neste estudo concluíram que os extractos apresentam actividade antifúngica e que a concentração inibitória mínima é 0.02 e 0.08 mg/mL respectivamente.

Num outro estudo realizado *in vitro* por Kiyinlma *et al.*, (2010) na Costa de Marfim com extractos de *Terminalia ivorensis* e *Terminalia superba* (Combretaceae) frente a *Aspergillus fumigatus*, mostraram-se activos contra o microrganismo testado.

4.3. *Trichilia emetica*



Nome científico: *Trichilia emetica*

Nome vernacular: Mafura (Português)

Reino: Plantae

Divisão: Angiosperma

Classe: Euricots

Ordem: Rosids

Família: Meliaceae

Género: *Trichilia*

Figura 8. Frutas de *Trichilia emetica*

4.3.1 Descrição taxonómica

Trichilia emetica é uma árvore perene e oleaginosa, muito ramificada que atinge geralmente 20-35m de altura, constituída por tronco inchado na base, às vezes tornando-se canelado com a idade, caule lenhoso e raiz apumada.

As folhas são compridas, chegando a atingir 50 cm de comprimento, compostas de forma desigual com 3-5 pares de folíolos de cor verde-escuro e brilhantes na parte superior. São cobertas com cabelos curtos castanhos na parte inferior, margens inteiras, com veias proeminentes na superfície inferior.

Os frutos são arredondados, peludos e vermelhos para castanhos, com três cápsulas de válvula. Estas cápsulas, dividem-se em três ou quatro partes que possuem 3-6 sementes pretas brilhantes de 18 mm de comprimento e 8 mm de largura cada uma. A frutificação ocorre principalmente entre Janeiro e Maio (Komane *et al.*, 2011).

4.3.2 Ocorrência

Esta planta é amplamente distribuída em toda a África sub-sahariana, do Senegal até o Mar Vermelho, ao longo da África Oriental e Central, Congo, na região sul da África do sul, Zimbabwe, na região norte dos Camarões, Sudão, Uganda, na zona leste da Eritreia e Malawi. Também ocorre preferencialmente em áreas com alta pluviosidade e é abundante ao longo das áreas costeiras.

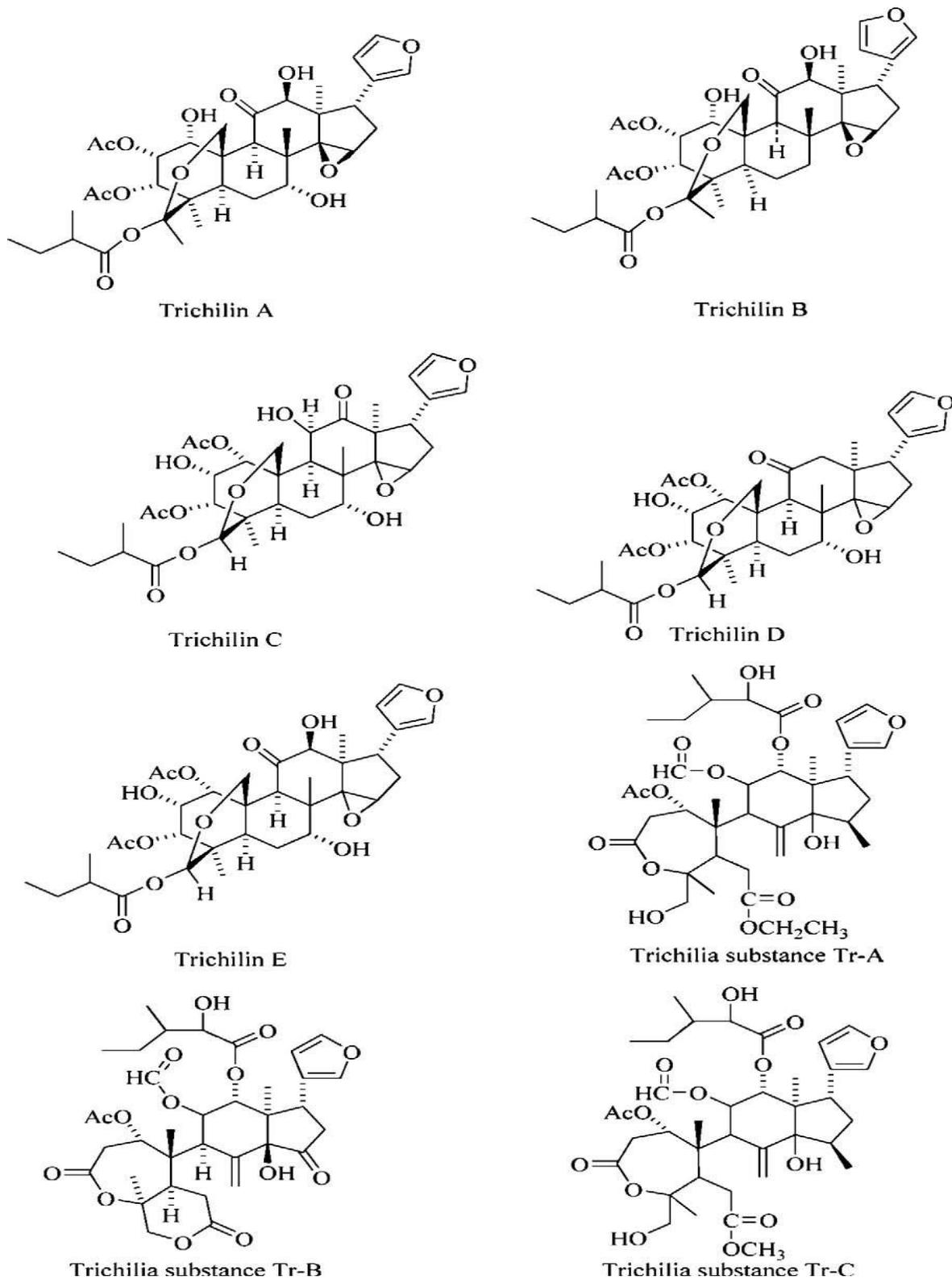
Em Moçambique, a *Trichilia emetica* encontra-se distribuída em quase todas as províncias do país, com excepção da província do Niassa, sendo que maioritariamente encontra-se na região sul, no distrito de Zavala na província de Inhambane (Faiela, 2007; Komane *et al.*, 2011; Msanga & Maghembe, 1993).

4.3.3 Composição fitoquímica

O estudo fitoquímico feito em diferentes partes da planta, revelou a presença de terpenos, flavonóides, cumarinas, lignanas, limonóides e taninos (Faiela, 2007).

4.3.4 Compostos químicos isolados

A figura 9 mostra alguns limonóides isolados da planta *Trichilia emetica*.



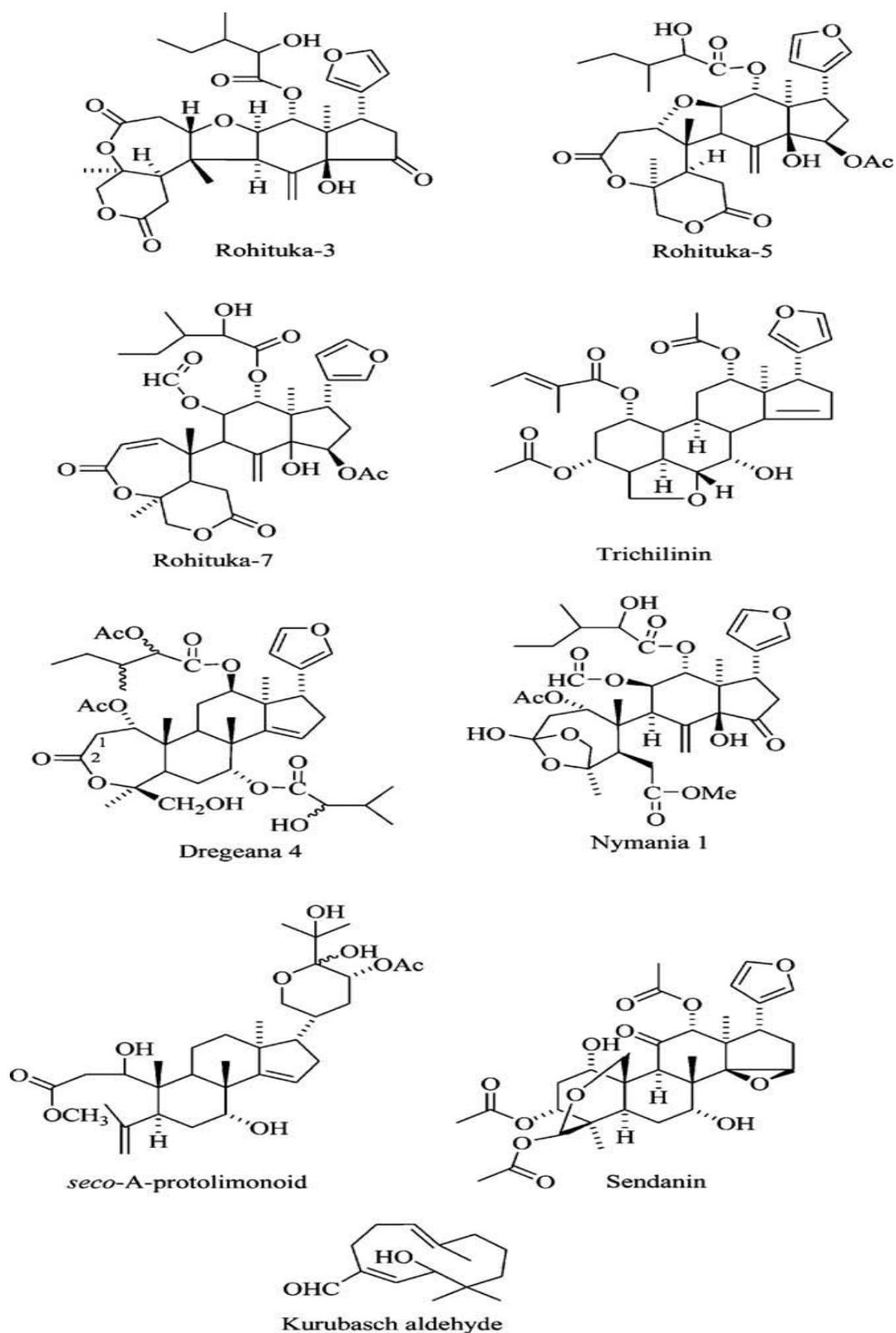


Figura 9. Alguns compostos químicos isolados de *Trichilia emetica*.

4.3.5 Usos de *Trichilia emetica*

O caule é usado para esculpir ornamentos, mobília e instrumentos domésticos. Na Africa do Sul usa-se a madeira para o fabrico de instrumento musical tradicional chamado mbila. O leite extraído da amêndoa é usado na indústria para o fabrico de sabão. Os seus frutos são comestíveis. A madeira proveniente do tronco serve para fazer embarcações, postes e, também é usado como lenha (Komane *et al.*, 2011; Faiela, 2007).

4.3.6 Actividade antifúngica da família Meliaceae

As espécies da família Meliaceae são ricas em limonóides, metabólitos com uma actividade antibacteriana, insecticida e antifúngica.

Govindachari *et al.* (1998) levaram a cabo um estudo sobre a actividade antifúngica de terpenóides constituintes do óleo de *Azadirachta indica* A. Juss, e observaram que a azadiractina não inibiu o crescimento dos três fungos fitopatogénicos sendo eles *Drechslera oryzae* (Breda de Haan) subran & Jain, *Fusarium Oxyspotum* e *Alternaria tenuis* (Nees) porém a salanina, nimbina, epoxiazadiradiona, deacetilnimbina e azadiradiona, apresentaram diferentes níveis de controlo. Esses cinco terpenóides foram eficazes no controlo de fungos e apresentaram maior acção quando em mistura do que quando testados isoladamente.

Um outro estudo levado a cabo por Carpinella *et al.* (1999) citados por Araújo *et al.* (2009) sobre actividade antifúngica dos extractos das frutas maduras da *Melia Azedarach* L. contra *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme*, *Microsporium canis* e *Candida albicans*, tendo exibido acção fungica contra os microrganismos testados.

4.4 Características gerais dos fungos

Muitas vezes os fungos foram comparados a vegetais, no entanto, são organismos que não possuem clorofila nas suas células e, portanto, não realizam fotossíntese. Todos os fungos são eucarióticos e podem ser unicelulares (leveduras, quitrídias) ou multicelulares. Normalmente possuem dois núcleos em suas células os quais podem ser visualizados pelo microscópio óptico empregando-se técnicas de coloração apropriadas.

As células fúngicas agrupam-se em filamentos, podendo ou não apresentar septos entre elas porém, mesmo quando presentes, as funções metabólicas ocorrem sem impedimentos entre as células. Esses filamentos celulares são denominados hifas e o agrupamento intenso de hifas

constitui os micélios (Figuras 10 e 11). É importante salientar que micélios fúngicos nunca constituem tecidos (Silva & Coelho, 2006).



Figura 10. Micélio de *Aspergillus fumigatus* cultivado em placa de Petri, no laboratório.



Figura 11. Morango mofado. Ilustração da formação do micélio.

Quanto ao crescimento das hifas é apical, porém, existem algumas regiões com extrema capacidade de crescimento, principalmente aquelas relacionadas as funções reprodutivas. Um diminuto fragmento de hifa pode originar um novo indivíduo. As hifas interagem entre si mesmo quando originadas de micélios ou esporos diferentes e com isso, aumentam a superfície e relações que estabelecem com o ambiente.

As células dos fungos não possuem plastídios e nem centríolo. As mitocôndrias são constituídas por cristas planas. Também estão presentes a estrutura de Golgi e os peroxissomos. Possuem parede celular constituída principalmente por quitina e β -glucanos. A membrana celular é constituída por ergosterol, um esteroide característico de fungos, também presente em algumas

microalgas. Flagelos podem estar presentes somente nas estruturas de reprodução em alguns grupos (Silva & Coelho, 2006).

São organismos heterotróficos que obtêm nutrientes por absorção, ou seja, lançam enzimas aos substratos onde colonizam e absorvem os nutrientes através da parede e membrana celular. Nas células dos fungos existe um fluxo citoplasmático o qual permite a difusão de nutrientes solúveis favorecendo o metabolismo entre as células. Exibem reprodução sexuada e/ou assexuada de diversas formas, bem como o fenómeno de parassexualidade, que consiste na recombinação genética na mitose. As estruturas de reprodução são diferentes daquelas somáticas, exibindo uma variedade de formas, as quais são utilizadas na classificação dos fungos (Silva & Coelho, 2006).

4.4.1 *Aspergillus niger*

Aspergillus é um género anamórfico, com reprodução pela produção de fialosporos (conídio produzido nas fiálides). As espécies de *Aspergillus* formam colónias filamentosas de diferentes características que microscopicamente apresentam hifas septadas de aproximadamente 4µm de diâmetro, e estruturas de frutificação típica formada por célula-pé, conidióforo, vesícula, métula e/ou fiálide que promovem a reprodução assexuada do fungo através da produção de fialoconídios.

O conidióforo é constituído pela cabeça conidial e pelo estipe. O estipe geralmente apresenta a forma de T ou L no ponto de conexão com a hifa vegetativa, essa porção é conhecida como célula basal, porém não é uma célula separada. As espécies deste género são caracterizadas por apresentarem rápido crescimento de colónias, atingindo de dois a nove centímetros de diâmetro após quatro dias em meios de cultura (Xavier *et al.*, 2008).

Aspergillus niger é um fungo filamentosamente denominado como mofo negro. Pertence à ordem *Eurotiales*, suas colónias apresentam-se nas cores brancas e amarelo pálido, mas rapidamente formam milhares de esporos. Este microrganismo é causador da aspergilose, mofo preto em algumas frutas e vegetais, como uvas, cebolas e amendoim e é um contaminante comum de alimentos.

4.4.2 *Colletotrichum gloeosporioides*

Segundo Agrios (1997) citado por Comé (2009), *Colletotrichum gloeosporioides* é um fungo fitopatogénico pertencente à classe dos fungos imperfeitos (Deuteromicetes) com micélio septado e bem desenvolvido. Os esporos da antracnose são reproduzidos em conidióforos

denominados conidiósporos ou conídios. Pertence à subclasse Coelomicetidae que produz conídios no interior de picnídios ou ácerulos e ordem Melanconiales, cujos conídios são produzidos no interior de ácerulos.

De acordo com Mole *et al.*, (1999) citado por Comé (2009), o fungo da antracnose produz dois tipos de material de propagação: ascosporos (sexuados) e conídios (assexuados) (FIGURA 12) e, pode ser isolado da natureza e cultivado com sucesso em meios artificiais tais como PDA, ODA e OYA. A produção de esporos pode ocorrer dentro de 7 dias a 28° C sob iluminação constante e germinam à temperatura média de 0°C e humidade relativa de 95% durante pelo menos 10 a 12 horas.



Figura 12. Conídios de fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) observados no microscópio óptico composto a ampliação de 40X

4.5 Controlo de doenças de plantas

4.5.1 Doenças de plantas

Gaumann (1946) citado por Agrios (2005), define doença de planta, como um processo dinâmico, no qual hospedeiro e patógeno, em íntima relação com o ambiente, se influenciam mutuamente, do que resultam modificações morfológicas e fisiológicas.

As doenças estão entre os principais factores causadores da redução à produção em uma lavoura, sejam elas causadas por fungos, bactérias, vírus ou nematóides. Dentre estes patógenos que ocorrem sobre as espécies de plantas de expressão económica na agricultura, os fungos têm

assumido uma importância crescente, quer pela gravidade das enfermidades que incitam nas culturas, ou pela facilidade com que se disseminam ou ainda pelas dificuldades encontradas no controlo das enfermidades por elas causadas (Romeiro *et al.*, 2005; Silva, 2007).

Vários tipos de patógenos afectam diversas culturas causando doenças e acarretando perdas significativas na produção. Entre estes, destacam-se o *Aspergillus niger*, agente causal do mofo preto para vegetais e *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose.

Para a redução na severidade de doenças e obtenção da produtividade esperada, recomenda-se manejo integrado da cultura, utilizando várias medidas de controlo que incluem o uso de culturas resistentes ou tolerantes, rotação de culturas e sementes certificadas, aração profunda para incorporação de restos de culturas infectados, boa preparação e fertilidade do solo, época de sementeira e boa irrigação bem como o uso de fungicidas sintéticos.

4.5.2 Controlo químico de doenças de plantas

O controlo químico de doenças de plantas é feito através de vários tipos de produtos, comumente denominados agroquímicos, incluindo fertilizantes e pesticidas. Fertilizantes, quando utilizados no controlo de doenças fisiogénicas (aquelas devidas a desequilíbrios nutricionais), como deficiência de boro em crucíferas ou podridão estilar do tomateiro, actuam pelo princípio da regulação; quando utilizados no controlo de doenças infecciosas, podem envolver o princípio da regulação, como no caso da diminuição do pH para o controlo da sarna da batata.

Os pesticidas utilizados no controlo de doenças incluem: insecticidas e acaricidas, para controlar insectos e ácaros vectores de patógenos; fungicidas, bactericidas e nematocidas, para controlo dos fungos, bactérias e nematóides fitopatológicos; e herbicidas, para controlar plantas hospedeiras alternativas de patógenos que afectam culturas específicas.

O emprego de pesticidas no controlo de doenças envolve, pelo menos, um princípio de controlo. Insecticidas e acaricidas actuam predominantemente pelo princípio da exclusão, prevenindo a disseminação dos patógenos, geralmente vírus, pela eliminação ou diminuição dos vectores; herbicidas actuam pela erradicação do patógeno junto com o hospedeiro, diminuindo a sobrevivência e a probabilidade de disseminação. Os insecticidas, acaricidas e herbicidas, não tendo acção directa sobre os agentes infecciosos mais importantes (fungos, bactérias, vírus e nematóides), não são muito utilizados no controlo de doenças.

4.5.3 Extractos vegetais no controlo de doenças de plantas

O uso de produtos derivados da indústria química no controlo de doenças na agricultura moderna tem sido alvo de constantes questionamentos pela sociedade. Isso ocorre principalmente em função dos efeitos adversos causados por estes e expressos através do surgimento de resistência de patógenos a princípios activos. A intensificação do uso do controlo de fitopatógenos à base de produtos químicos, provoca sérias perturbações no ecossistema e no agroecossistema. Dentre os principais efeitos adversos desta interacção, destaca-se os riscos de contaminação do homem e do meio ambiente e o surgimento de indivíduos resistentes. Na agricultura o número elevado de pulverizações com agroquímicos tem como finalidade reduzir e/ou controlar os índices de infecção no campo gerando uma colheita de qualidade com elevados índices de produtividade. No entanto, o uso indiscriminado de fungicidas para o controlo de doenças traz um completo desequilíbrio do sistema de produção convencional (Bettiol & Morandi, 2009; Dixon, 2001).

Na busca de alternativas menos agressivas para o controlo de doenças de plantas, o uso de extractos vegetais apresenta-se como prática promissora, uma vez que apresentam na sua composição, substâncias com propriedades antimicrobianas. Essas substâncias possuem a vantagem de serem geralmente menos prejudiciais ao homem e ao meio ambiente, de menores custos, facilmente disponíveis aos agricultores nas zonas rurais e, em alguns casos, podem inclusive superar os produtos sintéticos na sua acção antimicrobiana (Venturoso *et al.*, 2011).

Esses compostos pertencem a várias classes distintas de substâncias químicas, como alcalóides, terpenos, lignanas, flavonóides, cumarinas, quinonas, xantonas, lactonas e esteróides, entre outras (Lyon *et al.* 1995; Schwan-Estrada *et al.*, 2000).

Camatti-Sartori *et al.*, (2011) avaliaram os extractos acéticos e etanólicos de alecrim, cavalinha, gengibre, alho, camomila, louro, manjeriço, menta e eucalipto sobre o desenvolvimento de fitopatógenos *Fusarium* sp. e *Botrytis* sp. Desse estudo, observaram que o extracto etanólico de camomila inibiu em 52% o crescimento micelial de *Fusarium* sp. O fungo *Botrytis* sp. foi inibido com os extractos acéticos de alecrim, eucalipto e menta.

Resende *et al.*, (2007) utilizando extractos elaborados a partir de ramos de lobeira (*Solanum grandiflorum* R. P.) infectados por *Crinipelis pernicioso* observaram a capacidade dos extractos em induzir respostas de defesa em mudas de cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.) contra o mesmo patógeno. Carvalho *et al.*, (2006) utilizando extracto aquoso das cascas de barbatimão

(*Stryphnodendron barbatiman* L.) observaram uma redução significativa na incidência da fusariose (*Fusarium gutiforme*) em abacaxizeiro (*Ananas comosus* L.), com aplicação do extracto em substituição dos fungicidas durante o período de abertura das flores. Actualmente, a busca por substâncias biologicamente activas a partir de extractos vegetais com reconhecida actividade antibacteriana ou antifúngica norteia as pesquisas actuais. Em 1971, os pesquisadores Whittaker e Fenny destacaram que uma das principais funções das substâncias que compõem os extractos vegetais (metabólitos secundários) é fornecer protecção às plantas contra o ataque de fitopatógenos. Para Schwan-Estrada e Stangarlin (2003) a riqueza das plantas medicinais que possuem princípios activos com actividade antimicrobiana está na capacidade de utilização destas fontes no controlo de fitopatógenos, tanto pela actividade antimicrobiana quanto pela promoção de respostas de defesa em plantas a fitopatógenos.

4.5.4 Resistência induzida em plantas a patógenos

As plantas são continuamente expostas a um grande número de patógenos como resultado, apresentam um complexo mecanismo de defesa para reconhecer e se proteger, através do desenvolvimento de barreiras, como mecanismos de defesa pré e pós formados que restringem a infecção e/ou colonização. Em ambas as categorias, os factores envolvidos na resistência podem ser subdivididos em estruturais ou bioquímicos. Os estruturais actuam como barreiras físicas, enquanto os bioquímicos actuam através da produção de substâncias tóxicas ou repelentes ao patógeno ou criando condições adversas ao estabelecimento deste na planta (David *et al.*, 2010).

Os mecanismos pré-formados que exibem actividade antimicrobiana estão envolvidos na resistência das plantas contra fitopatógenos. Geralmente, essas substâncias estão presentes em altas concentrações nos tecidos sadios da planta e, em alguns casos, como resultado da infecção, podem ser convertidas em substâncias altamente tóxicas. Dentre as substâncias pré-formadas, cuja natureza química pode envolver, por exemplo, fenóis, alcalóides, lactonas, terpenóides e até mesmo, proteínas pode-se citar ácido clorogénico, ácido protocatecólico e catecol, α -tomatina, avenacinas, tuliposídeos, glicosídeos fenólicos, glicosídeos cianogénicos, β -1,3-glucanases e quitinases (Nicholson & Hammerschmidt, 1992). Por outro lado, os mecanismos de defesa pós-formados são mais eficientes na protecção da planta, podendo permanecer inactivos ou latentes, sendo apenas activados após a chegada do patógeno.

Os mecanismos bioquímicos pós-formados podem englobar o acúmulo de fitoalexinas, proteínas protectoras relacionadas com a patogénese, subdivididas em diversos grupos (β -1,3-glucanases, quitinases, peroxidases, etc) e espécies reactivas de oxigénio. Esses mecanismos actuam na planta no sentido de evitar ou retardar a entrada de um microrganismo no interior da mesma, bem como criar condições adversas para a colonização dos tecidos vegetais pelo patógeno (Paxton, 1981).

Alguns mecanismos de resistência latente na planta podem ser activados através do tratamento da planta com agentes bióticos e abióticos que causam a indução de resistência. A indução de resistência pode ser local, quando apenas o tecido da planta com o indutor apresenta indução de resistência, ou sistémica, quando a indução de resistência se manifesta a distância do local onde foi aplicado o indutor (Berger *et al.*, 2011).

4.6 Principais classes de metabólitos secundários com actividade antifúngica

As principais classes de metabólitos secundários com acção antifúngica e antimicrobiana são os taninos, os flavonóides, principalmente os isoflavonóides, os terpenos, as Lignanas, os esteróides e alguns derivados fenólicos.

4.6.1 Flavonóides

Os flavonóides compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana. Entretanto, tais compostos possuem uma série de propriedades farmacológicas que os fazem actuar sobre sistemas biológicos. Estruturalmente, os flavonóides constituem substâncias aromáticas com 15 átomos de carbono (C15) no seu esqueleto básico, sendo compostos fenólicos, que possuem nessa estrutura anéis aromáticos C6-C3-C6. O esqueleto C15 dos flavonóides é biogeneticamente derivado do fenilpropano (C6-C3) e três unidades de acetato (C6) (FIGURA 13)(Yokozawa *et al.*, 1997).

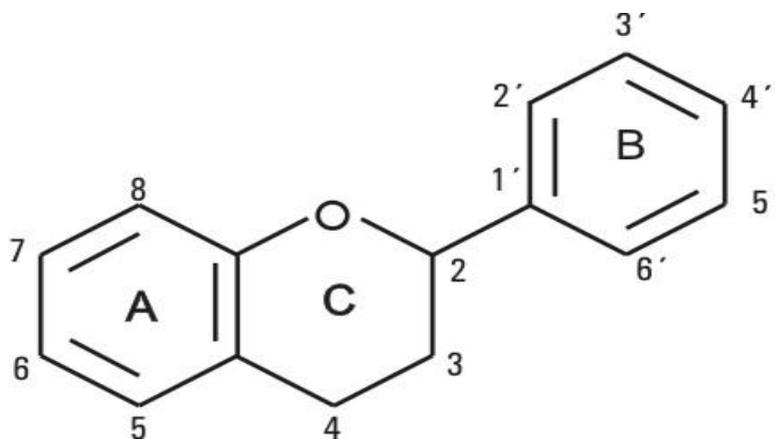


Figura 13.Esqueleto básico dos flavonóides

O grupo dos flavonóides é o mais diversificado em termos estruturais e subdivide-se em diversas classes tais como as antocianidinas, flavonas, chalconas, flavanonas, flavonois, dihidroflavonois, flavan-4-ois, flavan-3,4-diois, flavan-3-ois, isoflavonas e proantocianidinas.

A acção antimicrobiana dos flavonóides, provavelmente está relacionada a capacidade de complexar proteínas extracelulares e solúveis, bem como estruturas da parede celular. Flavonóides mais lipofílicos podem actuar provocando o rompimento de membranas microbianas.

As actividades bioquímicas dos flavonóides e de seus metabólitos dependem da sua estrutura química e, podem variar com substituições incluindo hidrogenação, hidroxilações, metilações, malonilações, sulfatações e glicosilações. Flavonóides e isoflavonóides ocorrem comumente como ésteres, éteres ou derivados glicosídicos ou ainda uma mistura deles (Machado *et al.*, 2008)

4.6.2 Taninos

Taninos são compostos fenólicos solúveis em água, com alto peso molecular, que contêm grupos hidroxilos, fenólico, capazes de complexar e precipitar proteínas em soluções aquosas.

Os taninos podem ser classificados como hidrolisáveis e não hidrolisáveis ou condensados. Os taninos hidrolisáveis por hidrólise ácida libertam ácidos fenólicos: gálico, caféico, elágico e um açúcar. Esses ácidos fenólicos, assim como os demais compostos fenólicos existentes em diversos vegetais, apresentam actividade antioxidante, a qual é considerada uma importante função fisiológica (Carvalho, 2007).

4.6.2.1 Taninos hidrolisáveis

Os taninos hidrolisáveis são, como o nome indica, passíveis de serem degradados por hidrólise química ou enzimática nas várias unidades estruturais que os compõem. São constituídos por uma parte polialcoólica (normalmente a glucose, mas também o ácido quínico, outros fenóis e outros glicósidos) e por uma parte fenólica (e.g. o ácido gálico) ligada através de uma ligação éster (Queiroz *et al.* 2002).

Os taninos hidrolisáveis podem ser divididos em taninos gálicos (galotaninos), em que a parte fenólica é o ácido gálico, e taninos elágicos (elagitaninos), em que a parte fenólica é o ácido hexahidroxidifénico (que após a hidrólise origina ácido elágico). A pentagaloilglucose (PGG) e a vescalagina são exemplos de taninos gálicos e elágicos, respectivamente (Carvalho, 2007).

A figura 14 mostra a estrutura dos taninos hidrolisáveis (taninos gálicos A e taninos elágicos B).

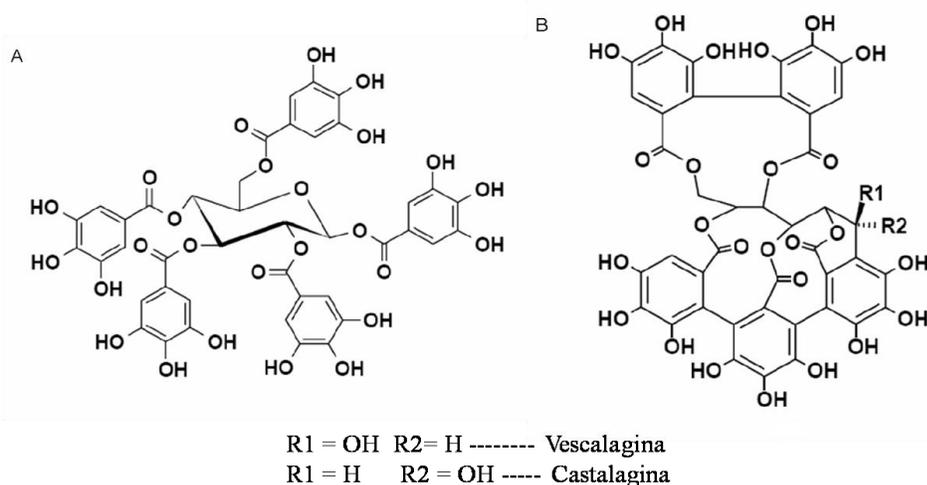
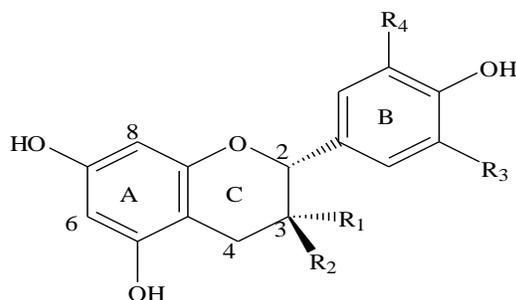


Figura 14. Estruturas de taninos hidrolisáveis: A) taninos gálicos (pentagaloilglucose), B) taninos elágicos (vescalagina e castalagina).

4.6.2.2 Taninos condensados (proantocianidinas)

Os taninos condensados são polímeros constituídos por duas ou mais unidades de flavan-3-ol (Figura 15). Quando aquecidos em meio ácido estes compostos originam antocianidinas (reacção de Bate-Smith), daí que também sejam conhecidos por proantocianidinas (Carvalho, 2007).



Afzelequinas:

$R_1=H$; $R_2=OH$; $R_3=H$; $R_4=H$ -----(+)-afzelequina

$R_1=OH$; $R_2=H$; $R_3=H$; $R_4=H$ (-)- epiafzelequina

Catequinas

$R_1=H$; $R_2=OH$; $R_3=H$; $R_4=OH$ ----(+)-Catequina

$R_1=OH$; $R_2=H$; $R_3=H$; $R_4=OH$ (-)- epicatequina

Galocatequinas:

$R_1=H$; $R_2=OH$; $R_3=OH$; $R_4=OH$ -----(+)-Galocatequina

$R_1=OH$; $R_2=H$; $R_3=H$; $R_4=H$ (-)- epigalocatequina

Figura 15. Estrutura fundamental dos principais flavon-3-óis (flavonóides) presentes na natureza

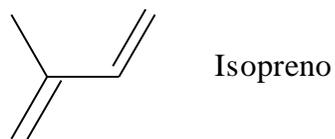
O mecanismo de acção antimicrobiana dos taninos explica-se por três hipóteses: 1) pressupõe-se que os taninos inibem enzimas bacterianas e fúngicas e/ou se complexam com os substratos dessas enzimas; 2) inclui a acção dos taninos sobre as membranas celulares dos microrganismos, modificando o seu metabolismo; 3) fundamenta-se na complexação dos taninos com iões metálicos, diminuindo a disponibilidade daqueles que são essenciais para o metabolismo microbiano. Diversos substratos ricos em taninos conseguem inibir o desenvolvimento dos fungos pertencentes aos géneros *Aspergillus*, *Botrytis*, *Penicillium* e *Trichoderma*. Esta interacção é influenciada pela estrutura dos polifenóis e das proteínas, pela concentração relativa de ambos e pelas condições do meio (Carvalho, 2007).

Compostos fenólicos apresentam acção sobre os microrganismos provocando a privação do substrato e a ruptura da membrana plasmática. Ácidos fenólicos, como o ácido cinámico têm acção antibacteriana, porém, o mecanismo exacto é desconhecido.

4.7 Terpenos/Esteróides

Os terpenos formam uma diversificada família de substâncias naturais, com funções diferenciadas nos vegetais. Ocorrem naturalmente em plantas e são compostos por átomos de

carbono, hidrogénio e oxigénio, porém não apresentam aromaticidade. Os terpenos são compostos que apresentam estruturas que derivam de unidades isoprénicas e, dependendo do número em que essas unidades se repetem, podem ser classificados em monoterpenos (2 unidades), sesquiterpenos (3 unidades), diterpenos (4 unidades) e triterpenos (6 unidades), sendo os dois primeiros encontrados principalmente em óleos essenciais (Prado, 2007).



4.8 Limonóides

Os limonóides são compostos pentacíclicos constituídos por três anéis ciclohexano e um anel furano ligado ao carbono 17 e os diferentes anéis podem sofrer alterações na estrutura básica e resultar em diferentes tipos de limonóides. São compostos incolores, cristalinos e têm pontos de fusão elevados. São substâncias opticamente activas e difíceis de caracterização devido sua pouca reactividade (Faiela, 2007)

Os limonóides são tetranotriterpenóides e talvez os maiores representantes da classe dos terpenos como substâncias insecticidas. Os limonóides são também conhecidos como meliacinas, devido ao seu sabor amargo, ocorrem principalmente nas plantas das famílias Meliaceae, Rutaceae e Cneoraceae (Araújo *et al.*, 2009)

Os limonóides são agrupados de acordo com o tipo de anel que apresentam no carbono 17 e modificação que sofrem dentro da estrutura dos seus anéis.

Grupo I. Quando a estrutura básica do limonóide apresentar no C17 um anel ciclo-THF e pirano, designa-se protolimonóide: A-melianotriol e B: bourjotionolone (Figura 16)

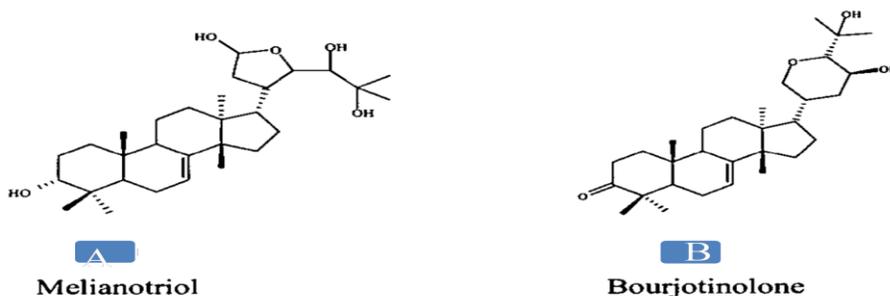


Figura 16. Limonóides do grupo I.

b) Grupo II. Quando a estrutura básica do limonóide apresenta no C17 um anel furano e sem alteração na estrutura dos quatro anéis, designa-se apo-eufol: azadirona (C) e 14-epoxiazadiradiona (D) (Figura 17).

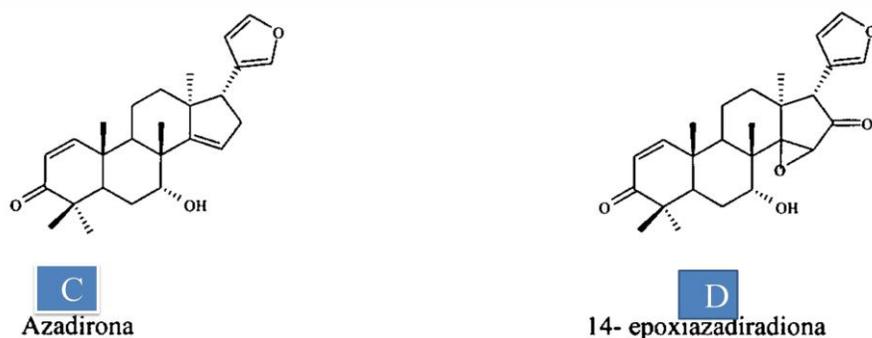


Figura 17. Limonóides do grupo II

C) Grupo III. Quando o esqueleto carbónico do limonóide apresenta alterações no anel D (oxidado no anel D), designa-se seco D: 7-deacetilgedunina (E) (Figura 18)

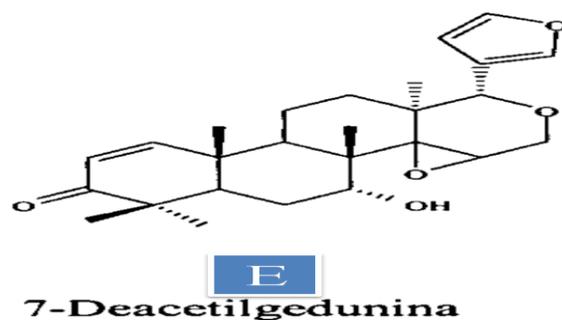


Figura 18 Limonóides do grupo III

d) Grupo IV e V. Quando o esqueleto carbónico do limonóide apresenta alterações no anel D e B (oxidado no anel D e B), designam-se secos D e B: metil angolensate (F) (Figura 19)

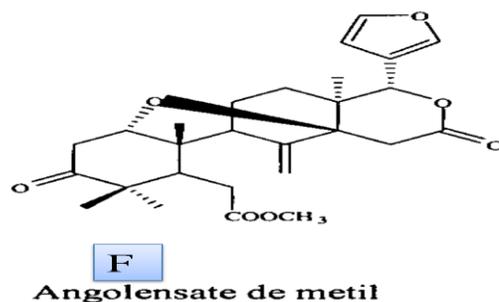


Figura 19. Limonóides do grupo V

e) Grupo VI. Quando o esqueleto carbónico do limonóide apresenta alterações no anel A (oxidado no anel A), designa-se seco A: tecleanina (G) e evadulona (H)

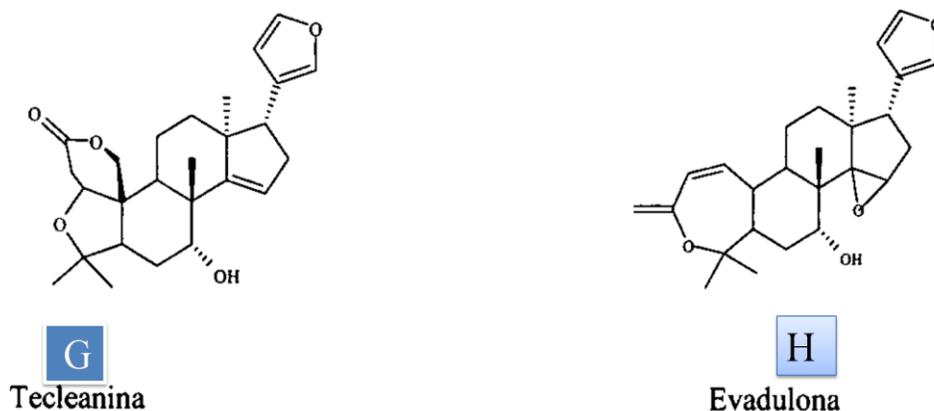


Figura 20. Limonóides do grupo VI

Grupo VII. Quando o esqueleto carbónico do limonóide apresenta alterações nos anéis A e B (oxidado no anel A e B), designam-se secos A e B: acetatopreurianina (I) (Figura 18)

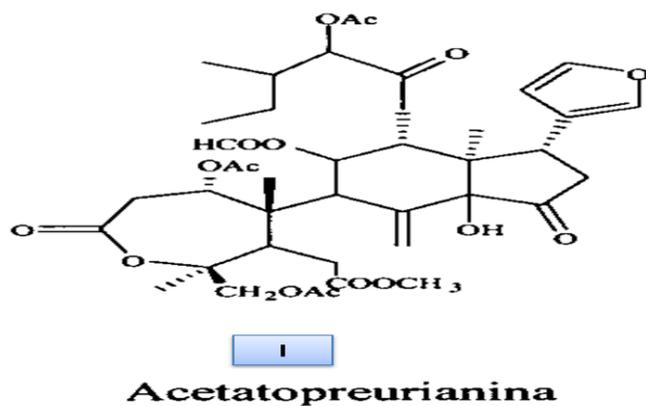


Figura 21. Limonóides do grupo VII

V. TÉCNICAS E MÉTODOS DE ANÁLISE DE PLANTAS

No estudo fitoquímico das plantas são usadas as seguintes operações: extracção, separação, isolamento e identificação dos metabólitos.

5.1 Extracção

A extracção é uma técnica usada para separar um componente de uma mistura por meio de um solvente ou mistura de solventes.

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

A extracção líquido-líquido consiste na agitação de duas soluções imiscíveis, num funil de separação, deixando em repouso durante algum tempo até que haja separação nítida entre as duas camadas. Os diferentes solutos presentes distribuem-se entre as fases de acordo com as suas solubilidades relativas (Mavie, 2007).

5.2 Métodos de extracção

Os processos mais utilizados são os seguintes: maceração, infusão, decocção, soxhlet e percolação.

5.2.1 Extracção por maceração

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

A Maceração é normalmente feita, moendo previamente o material vegetal; posteriormente deixa-se a droga vegetal em simples contacto com o líquido extractor (solvente de extracção recomendado), por um período determinado. O tempo de contacto da amostra bruta com o solvente varia de horas, semanas, ou mesmo meses com ou sem agitação, à temperatura ambiente.

5.2.2 Extracção por infusão

A extracção dá-se pela permanência, durante certo tempo do material vegetal em água fervente, num recipiente tapado. É aplicável a partes de vegetais de estrutura mole, que devem ser cortadas para que possam ser facilmente penetradas pelo solvente durante um certo tempo.

5.2.3 Extracção por decocção

É uma técnica para análise química, que consiste em manter o material vegetal previamente moído em contacto durante certo tempo com um solvente adequado em ebulição, num intervalo de tempo.

5.2.4 Extracção por 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.

5.2.5 Extracção por percolação

Sem dúvida nenhuma é o processo que, pela dinâmica e artifícios possíveis, permite uma maior extracção, uma extracção eficiente. A passagem do líquido extractor através da droga moída, em aparelhos conhecidos por percoladores, com o controlo do fluxo e variação da mistura dos solventes extractores, otimiza o processo (Anónimo, 2010).

5.3 Métodos cromatográficos

De acordo com Sherma (2004) e Peres (2002), a cromatografia é fundamentalmente um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária, que estão em contacto íntimo e baseia-se nas diferentes velocidades de deslocamento das moléculas através de um meio poroso (fase estacionária), quando arrastadas por um eluente (líquido ou gasoso) em movimento (fase móvel). A cromatografia pode ser usada quer como método analítico no qual se determina o número e natureza dos componentes de uma mistura sem proceder ao seu isolamento, quer como um método preparativo em que se procede ao isolamento dos componentes de uma mistura.

A separação cromatográfica está relacionada com o fenómeno de adsorção (aderência de partículas, moléculas ou iões) à fase estacionária, que pode ser um pó de celulose, sílica gel (especialmente para compostos menos polares), alumina, etc. A cromatografia é uma ferramenta versátil e poderosa para separar espécies químicas semelhantes. Além disso, ela pode ser empregada para identificação qualitativa, quantitativa e purificação das espécies separadas (Skoog *et al.*, 2005).

5.4 Cromatografia em camada fina (TLC)

A Cromatografia em camada fina é um tipo de cromatografia de adsorção, onde se faz passar lentamente através de uma coluna de material adsorvente uma mistura líquida, cujos componentes se vão depositando em zonas distintas da coluna, pois as separações ocorrem baseadas nas diferenças de velocidade de arrastamento de cada um, isto é na velocidade de migração. Neste caso, a velocidade do movimento dum dado componente da mistura depende da solubilidade na fase estacionária e não de fenómenos de adsorção. As substâncias mais solúveis caminham mais lentamente através da coluna, sofrendo todas elas diferentes partições entre as duas fases.

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). Teoricamente o valor de R_f deverá ser uma característica reprodutível da substância (Skoog *et al.*, 2005; Gonçalves, 1996).

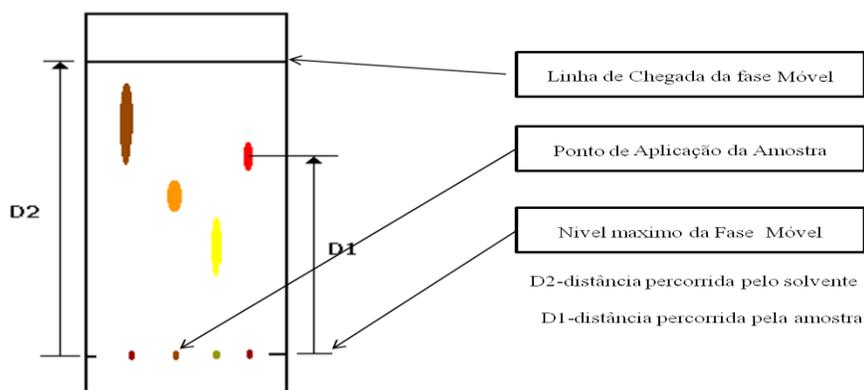


Figura 22. Determinação de R_f no Cromatograma de Camada Fina (TLC)

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

A reprodutibilidade do R_f para um determinado solvente depende, de alguns factores como a constância da actividade do adsorvente, a saturação da câmara de cromatografia, a espessura da camada e da temperatura (Becker *et al.*, 1975).

A Cromatografia em camada fina apresenta várias vantagens em relação às outras técnicas cromatográficas, nomeadamente: a preparação da amostra é simples; as amostras podem ser comparadas directamente durante a corrida; o desenvolvimento paralelo de amostras relacionadas e não relacionadas pode ser feito simultaneamente; vários procedimentos de detecção podem ser aplicados, frequentemente na mesma placa; a separação pode ser acompanhada todo o tempo e interrompida quando desejado ou quando se troca o sistema de solventes; o volume dos solventes e outros reagentes é muito pequeno; análise simultânea de várias amostras e é uma técnica de baixo custo e com reprodutibilidade dos resultados (Vogel, 2002).

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

5.5 Métodos Espectroscópicos

Os métodos espectroscópicos de análise são baseados na medida da quantidade de radiação produzida ou absorvida pelas moléculas ou pelas espécies atómicas de interesse. Podemos classificar os métodos espectroscópicos de acordo com a região do espectro electromagnético envolvida na medida. As regiões espectrais que têm sido empregadas incluem os raios γ , os raios X, UV-Vis, infravermelha (IV), microondas e radiofrequência (RF) (Skoog *et al.*, 2005).

Colectivamente, esses tipos compõem o espectro electromagnético, mostrado na figura 23 (McMurry, 2006).

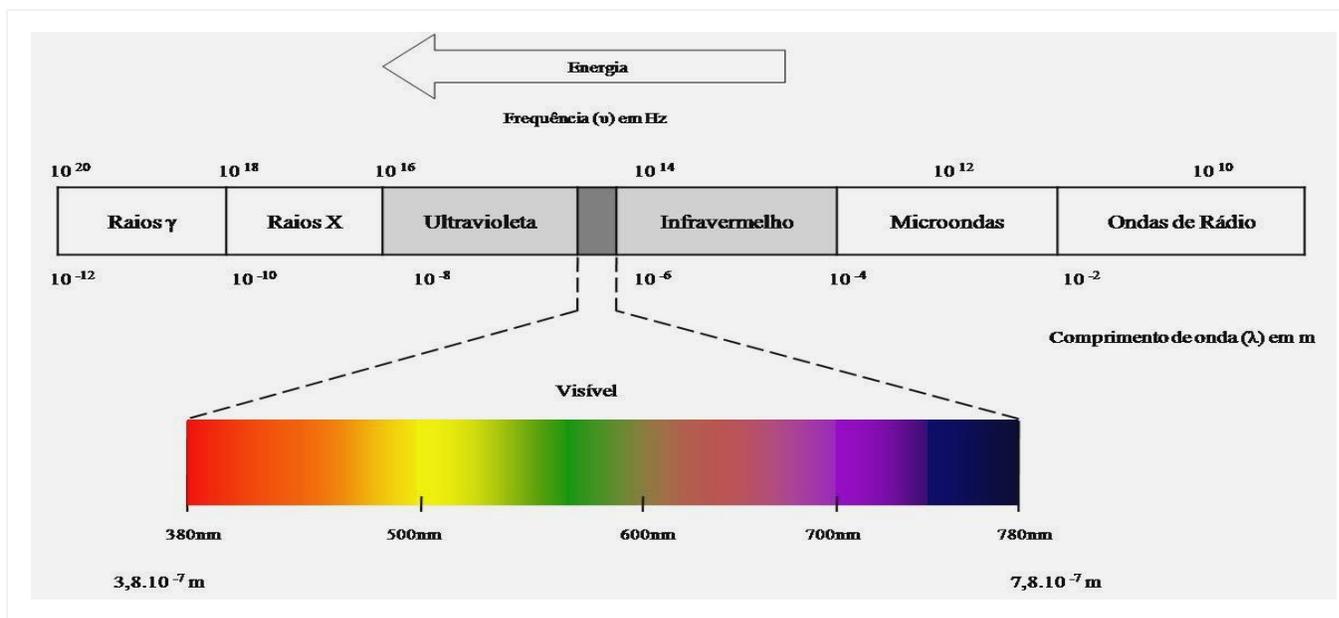


Figura 23. Espectro electromagnético envolvendo uma faixa de comprimentos de onda e frequência, desde ondas de rádio na região de baixa frequência até os raios gama na região de alta frequência

5.6 Espectroscopia no Ultravioleta -Visível (UV-Vis)

Na espectroscopia de absorção molecular UV-Vis, os electrões de ligações químicas de substâncias orgânicas normalmente absorvem energia da *radiação* electromagnética na faixa que compreende um intervalo de comprimento de onda de 190 a 800 nm.

As moléculas sofrem três tipos diferentes de transições quantizadas quando excitadas pela *radiação* ultravioleta e visível. Essas transições obedecem a regras de selecção que satisfazem o princípio de Franck-Condon. Para a *radiação* ultravioleta e visível, a excitação envolve a promoção de electrões presentes em um orbital molecular ou atómico de baixa energia para um orbital de maior energia. Além das transições electrónicas, as moléculas exibem dois tipos adicionais de transições induzidas por *radiação*: transições vibracionais e transições rotacionais. As transições vibracionais ocorrem porque a molécula apresenta um número muito grande de níveis energéticos quantizados (ou estados vibracionais) associados com as ligações que mantêm a molécula unida (Skoog *et al.*, 2005; Gonçalves, 1996).

VI. PARTE EXPERIMENTAL

6.1 Material Vegetal

6.1.1 Colheita e identificação botânica da planta

A colecta do material botânico (raízes e cascas do caule) de *Trichilia emetica*, foi feita na província de Gaza, na localidade de Incaia, distrito de Bilene no dia 29 de Novembro de 2010.

O material vegetal de *Combretum molle* foi colhido por Cândida de Graça Mavie no dia 20 de julho de 2006 na região de Xiboene, distrito de Moamba, Província de Maputo. A identificação foi feita no herbário do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências da UEM, a partir de um exemplar da espécie (n^o 7987).

As amostras das raízes e cascas de caule de *Kigelia africana* foram colhidas por Tendai Sairosse Mujanje no distrito de Marracuene, localidade de Bobole, no vale do Rio Incomati, na manhã do dia 13 de Agosto de 2005.

6.1.2 Secagem e moagem da amostra

O material foi levado para o laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da UEM, onde foi lavado com água corrente e posterior remoção das cascas e lavagem com água destilada.

Foi cortado em pedaços pequenos com ajuda de uma faca previamente lavada e secada em estufa de ar quente circulante (Scientific – series 2000) a uma temperatura regulada de 50°C, depois deixado secar em separado à temperatura ambiente durante 120 dias (quatro meses). A moagem das cascas de caule e raízes de *Trichilia emetica* foi feita no IIAM.

6.2 Preparação dos extractos

6.2.1 Extracção do pó das folhas de *Combretum molle*

O extracto e as fracções do pó das folhas foram obtidos aplicando o método de Martini (2001) citado por Mavie (2007) com alguma modificação.

50 g do pó das folhas secas foram tratados com 500 mL de acetona (9:1) durante 72 horas, filtrou-se com papel de filtro Whatman (nº 01) e o filtrado foi concentrado no rotavapor (BUCHI 011) até à formação de uma massa de consistência pastosa de cor castanha.

O extracto hidroacetónico (EHAc) foi dissolvido na mistura de CHCl_3 e água destilada (1:1) num balão de fundo redondo e transferido quantitativamente para um funil de separação, tendo sido separada em fracção aquosa (FAq) e fracção clorofórmica (FCL).

A fracção aquosa (FAq) foi misturada com igual volume de n-butanol (n-ButOH) e as duas fases foram separadas no funil em fracção aquosa (FAq) e fracção butanólica (FBL).

A fracção clorofórmica (FCL) foi concentrada no rotavapor até à formação de uma massa consistente e extraída com um volume igual da mistura de n-hexano e metanol a 90%. Transferiu-se para funil de separação tendo sido posteriormente separada em fracção hexânica (FHX) e fracção hidrometanólica a 90% (FHM) . Esta última fracção foi diluída a 65% de metanol por adição de 28.5 mL de água destilada. A esta última fracção adicionou-se clorofórmio e separou-se as duas fases no funil de separação em fracção clorofórmica (FCL) e fracção hidrometanólica (65% metanol) (FHM) como mostra a figura 24.

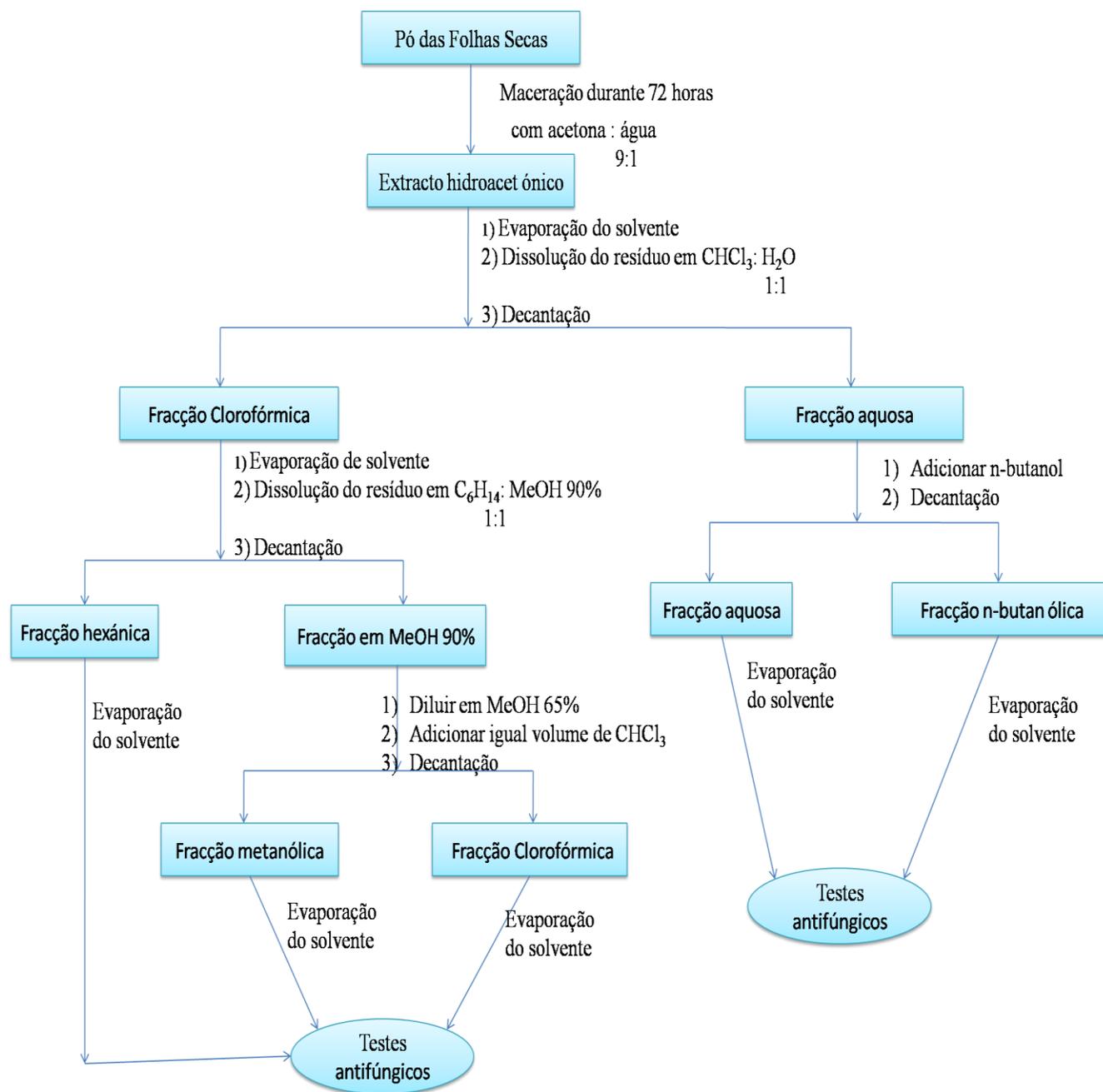


Figura 24: Esquema geral seguido para extracção e fraccionamento solvente/solvente do pó das folhas de *Combretum molle*.

6.2.2 Extracção do pó das raízes e cascas do caule de *Kigelia africana*

Para a obtenção de extractos das raízes e cascas de caule, foi aplicada a metodologia descrita por Araújo *et al.* (2010) com alguma modificação.

50 g do pó das raízes e 50 g das cascas do caule foram tratados durante 72 horas com 500 mL à temperatura ambiente, com solventes orgânicos na sequência de polaridade crescente: *n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo e metanol.

Usou-se o mesmo procedimento para obtenção de extractos brutos das raízes e cascas de caule de *Trichilia emetica* como mostra a figura 25.

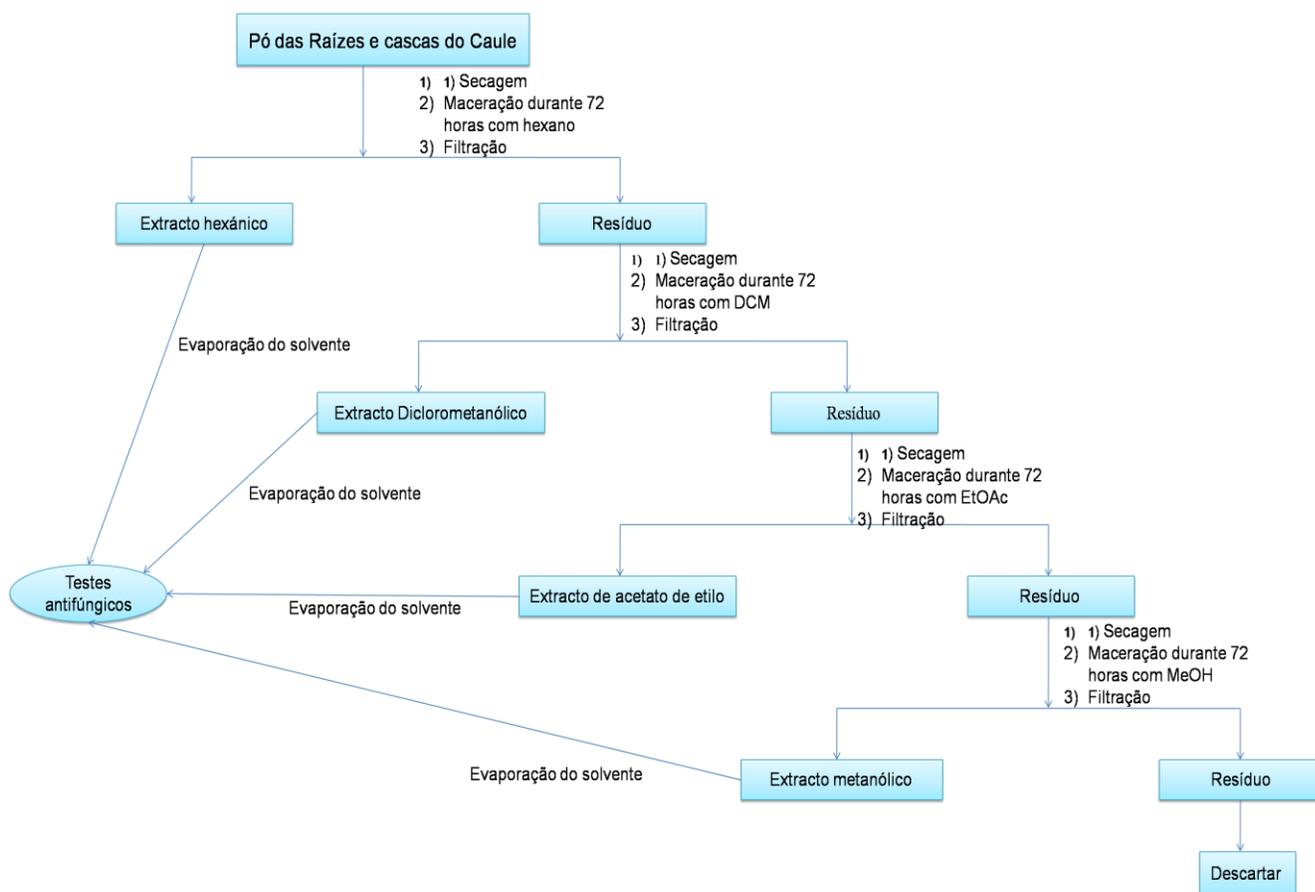


Figura 25. Esquema geral seguido para obtenção de extractos de *Kigelia africana* e *Trichilia emetica*

6.3 Testes Fitoquímicos

6.3.1 Teste de reconhecimento de flavonóides

Três testes foram realizados para saber as classes dos flavonóides presentes em diferentes extractos.

a) Reacção com ácido sulfúrico concentrado

Tomou-se uma alíquota do extracto bruto, colocou-se num tubo de ensaio e adicionou-se 4 gotas de ácido sulfúrico concentrado. A formação de uma solução vermelha no extracto é indicativa da presença de flavonóides.

b) Reacção com hidróxido de sódio a 5%

Diluiu-se 1 mL de extracto com água destilada na proporção de 1:2 e adicionou-se pela parede do tubo 2 gotas de solução de hidróxido de sódio. O desenvolvimento de coloração amarela que varia de intensidade confirma a existência de flavonóides. Esta reacção é genérica para reconhecimento de flavonóides

c) Reacção com cloreto de ferro (III) a 2%

Tomou-se 1 mL de extracto ligeiramente concentrado, diluiu-se com água destilada na proporção de 1:2 e, em seguida, adicionou-se pela parede do tubo duas gotas de cloreto férrico a 2%. O desenvolvimento da cor que varia entre verde, amarelo-castanho e violeta é indicativo de teste positivo de acordo com o tipo de flavonóides presentes.

6.3.2 Teste de reconhecimento de taninos e fenóis

Os taninos foram testados usando os seguintes reagentes: acetato de chumbo a 10% e cloreto férrico a 2%.

a) Reacção com acetato de chumbo a 10%.

Em um tubo de ensaio deitou-se 1 mL da solução extractiva diluída a uma proporção de 1:2 e adicionou-se 2 gotas da solução de acetato de chumbo a 10%.

A formação de uma turvação e aparecimento de um precipitado castanho avermelhado volumoso e denso significa teste positivo.

b) Reacção com cloreto férrico a 2%.

Deitou-se cerca de 1 mL da solução extractiva num tubo de ensaio e adicionaram-se-lhe 5.0 mL de água destilada e duas gotas de cloreto de ferro a 2% escorrendo-o pela parede do tubo.

O aparecimento da coloração preta, verde, azul ou precipitado indica a presença de taninos conforme o tipo de estrutura química, enquanto que o surgimento de coloração que varia entre azul e vermelho é indicativo de fenóis.

6.3.3 Teste de reconhecimento de saponinas

As saponinas foram testadas em diferentes fracções usando teste de espuma.

a) Teste de espuma

Para testar as saponinas, deitou-se num tubo de ensaio 2 mL da solução extractiva e adicionou-se 5 mL de água destilada e agitou-se energeticamente por 3 minutos. Neste caso a formação duma espuma persistente sugere a presença das saponinas.

6.3.4 Teste de reconhecimento de triterpenóides e esteróides

a) Reacção de Liebermann-Buchard

Para o ensaio de esteróides e triterpenóides, deitou-se num tubo de ensaio 2 mL do extracto e misturou-se 2 mL de clorofórmio. Em seguida filtrou-se a solução clorofórmica gota a gota em um funil com algodão coberto com 0.5 g de sulfato de sódio (Na_2SO_4) anidro. De seguida, adicionou-se 1 mL de anidrido acético e agitou-se suavemente, e adicionou-se pelas paredes do tubo três gotas de H_2SO_4 concentrado e agitou-se suavemente.

Coloração azul evanescente seguida de verde, indicou a presença de esteróides ou triterpenóides respectivamente.

6.3.5 Teste de reconhecimento dos alcalóides livres

Os alcalóides foram testados em todos os extractos, usando reagente de Meyer (Tetraiodomercurato de potássio, $\text{K}_2 [\text{HgI}_4]$), Wagner (iodo/iodeto de potássio, $[\text{I}_2/\text{KI}]$) e Dragendorff (Tetraiodobismutato de potássio, $\text{K}[\text{BiI}_4]$).

Dissolveu-se cada um dos extractos em 2.5 mL de HCl a 2% e aqueceu-se por 10 minutos. Após o resfriamento, filtrou-se em algodão. Em seguida, dividiu-se a solução obtida em volumes iguais, por 4 tubos de ensaio e posteriormente adicionou-se em cada tubo os seguintes reagentes:

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

Tubo 2 – Adicionou-se 3 gotas de reagente de Dragendorff;

Tubo 3 – Adicionou-se 3 gotas de reagente de Wagner

Tubo 4 – Testemunha.

Uma leve turbidez ou precipitado respectivamente roxo a laranja, branco a creme e marrom evidencia a possível presença dos alcalóides.

6.3.6 Testes de Borntrager para reconhecimento de antraquinonas

Deitou-se em um tubo de ensaio 2,0 mL do extracto ligeiramente concentrado, adicionou-se 5,0 mL de clorofórmio e agitou-se. Deixou-se em repouso por 15 minutos. Recolheu-se a fase clorofórmica e dividiu-a em dois tubos de ensaio. No primeiro tubo, adicionou-se 1,0 mL de solução de NaOH a 5%.

A coloração roxa em fase aquosa indica a presença de antraquinonas (Reacção de Borntraeger).

No segundo tubo, adicionou-se 1,0 mL de solução de acetato de magnésio a 5 %.

A coloração roxa sugere a provável presença de antraquinonas livres.

b) Reacção com NH₄OH a 10 %.

Deitou-se 1 mL de extracto ligeiramente concentrado num tubo de ensaio e adicionou-se 3 mL de NH₄OH a 10 %. A coloração rósea, vermelha ou violeta sugere a provável presença das antraquinonas.

6.4 Análise cromatográfica

Os extractos brutos das raízes e cascas de caule de *Trichilia emetica*, *Kigelia africana* e fracções de *Combretum molle* obtidos por maceração foram dissolvidos em metanol. Em todos os ensaios cromatográficos usou-se placas de sílica gel (60 F₂₅₄ Merck®) pré activadas como fase estacionária, e um sistema de hexano:acetato de etilo (9:1) para *Kigelia africana*, hexano:acetato de etilo (8:2) para *Combretum molle* e hexano:acetato de etilo (4:6) para *Trichilia emetica*.

6.4.1 Aplicação da amostra

Os extractos depois de dissolvidos em metanol foram aplicados em placas cromatográficas a uma distância de 1.0 cm da extremidade inferior da placa usando tubos capilares de 2µl de capacidade, mantendo uma separação mínima de 1.0 cm entre os pontos de aplicação.

6.4.2 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.

6.4.3 Sistema de detecção

Os componentes separados foram visualizados numa lâmpada de luz UV a 230 nm e as placas foram depois pulverizadas com o ácido sulfúrico 10% para extractos de *Trichilia emetica*, hidróxido de potássio a 5% para extractos de *Kigelia africana* e vanilina/ácido sulfúrico para fracções de *Combretum molle*. Todas as placas foram aquecidas a 100 °C durante 5-10 minutos.

6.5 Testes de actividade antifúngica

Os testes antifúngicos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia da Faculdade de Agronomia e Engenharia Florestal (FAEF) Departamento de Produção e Protecção Vegetal, nos meses de Agosto a Novembro de 2011. O ensaio consistiu em seis tratamentos, sendo um controlo negativo e outro controlo positivo, usando os métodos de perfuração em agar e difusão em disco. Cada tratamento teve três repetições.

6.5.1 Cultivo do patógeno

O fungo *Aspergillus niger* foi isolado a partir do material vegetal (milho) usando a câmara húmida que consiste na incubação do material vegetal em placas de Petri recobertas por papel de filtro embebido em água esterilizada.

Com material vegetal infestado (milho) colhido e seleccionado colocou-se o material vegetal na placa de Petri inicialmente recoberta com papel de filtro humedecido com água estéril; deixou-se a placa à temperatura ambiente durante três dias.

6.5.2 Identificação do patógeno

A identificação dos fungos fitopatogénicos nas culturas pesquisadas foi feita utilizando-se as características macrofisiológicas (sinais e sintomas desenvolvidos no material vegetal *in locu*) e características microscópicas, onde se efectuou uma pequena preparação numa lâmina e se visualizou no microscópio, as estruturas fúngicas vegetativas (hifas) e de reprodução (conídios e esporos), confrontando-se as imagens obtidas com as descritas na literatura micológica e fitopatológica especializada.

6.5.3 Isolamento e obtenção de cultura pura

Após o isolamento, identificação e confirmação das características morfológicas (cor, forma de crescimento da colónia) do patógeno e, respeitando todos os princípios de assépsia recomendados, esterilizou-se a ança usando a chama da lamparina e esperou-se até arrefecer; abriu-se cuidadosamente a placa contendo o isolado fúngico; tirou-se uma pequena porção da colónia com a ança esterilizada; abriu-se a cobertura da nova placa de Petri contendo o meio de cultivo (PDA), o suficiente para inserir a ança e fez-se uma estria no centro de área da placa e cobriu-se; selou-se a placa com parafilm e rotulou-se. Incubou-se a placa na câmara de crescimento por cerca de sete dias a uma temperatura de 28°C. Da colónia obtida, repetiu-se este procedimento até à obtenção da cultura pura do isolado fúngico (Figura 26B). Efectuou-se a repicagem da cultura de *Colletotrichum gloeosporioides* com a finalidade de obter a quantidade suficiente do microrganismo para a análise (Figura 26A).

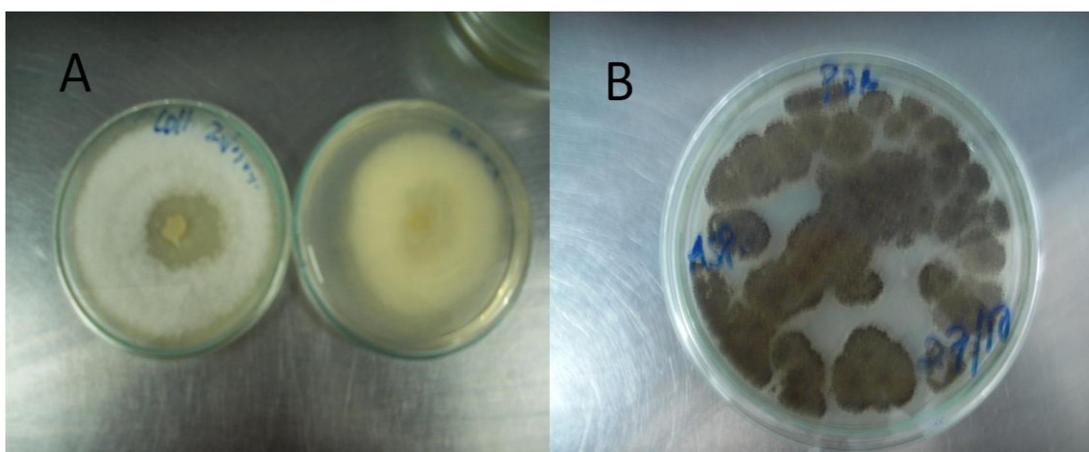


Figura 26. Obtenção de cultura pura de *Colletotrichum gloeosporioides* com micélio após 7 dias (figura A) e *Aspergillus niger* com esporos após 7 dias (figura B)

6.5.4 Preparação das soluções de extractos vegetais

Para preparação das soluções dos extractos vegetais as concentrações de 200, 100, 50 e 25 mg/mL, pesou-se 300, 150, 75 e 37.5 mg do extracto seco, e adicionou-se 1.5 mL da mistura de DMSO e CH₃OH a 70% respectivamente. Agitou-se os microtubos no Vórtex (VM-300) até à dissolução do extracto.

6.5.5 Preparação dos discos de papel

O papel de filtro (Whatman[®] 113) foi picotado com uma furadeira de papel de escritório, e esterilizado na estufa a 180 °C e deixou-se arrefecer à temperatura ambiente.

6.5.6 Preparação da suspensão fúngica

Para avaliar a inibição da germinação dos esporos, utilizou-se isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Aspergillus niger* incubados, por 14 dias, obtendo-se uma densa massa micelial e conidial. Foi obtida previamente uma suspensão de conídios mediante a deposição de 20 mL de água destilada esterilizada, seguido de fricção das colónias com auxílio de bastão de vidro de Drigalski.

Após a remoção da massa micélica mais conidial, procedeu-se à filtração com papel de filtro estéril e deitou-se o filtrado num erlenmeyer de 100 mL. Adicionou-se duas gotas de espalhante adesivo (tween) e barra magnética. Agitou-se com agitador magnético (MAVARIS) por 5 minutos. Pipetou-se 2 mL da suspensão para um tubo de ensaio e adicionou-se 8 mL de água estéril e homogenizou-se a mistura em vórtex (VM-300).

Com auxílio de uma micropipeta, deitou-se duas gotas da suspensão no hematócimo e contou-se esporos na câmara de Neubauer. Em seguida, ajustou-se a suspensão do *inóculo* de modo a ser semelhante à solução padrão de 0,5 na escala de McFarland, correspondente a 1.5×10^8 esporos/mL (Nyenje & Ndip, 2011).

6.5.7 Inoculação da suspensão do fungo

Espalhou-se alíquotas de 20 µL da suspensão fúngica na placa com um bastão de vidro de Drigalski sobre a superfície do meio de cultivo sólido (PDA) e com auxílio de um marcador dividiu-se a placa em quatro campos devidamente enumerados de 1-4.

6.5.8 Aplicação dos discos de sensibilidade

Com o auxílio de uma pinça estéril, depositou-se nos campos equidistantemente, quatro discos de papel de 6 mm de diâmetro, previamente impregnado com 10 μ L de extractos a diferentes concentrações sobre a superfície do meio inoculado, exercendo uma leve pressão com a ponta da pinça para uma boa adesão dos discos e incubados na câmara de crescimento por 48 horas. Após o período de incubação, com uma régua de 30 cm, mediu-se o diâmetro de inibição (halo de inibição). Usou-se mistura de dimetil sulfóxido (DMSO) e CH₃OH a 70% (solvente) como controlo negativo e solução de oxiclreto de cobre (dissolveu-se 0.5 g em 100 mL de água) como controlo positivo.

Com ajuda de um perfurador, perfurou-se no meio de cultura (criar poços de 6 mm de diâmetro) contendo o microrganismo já espalhado no meio de PDA. Deitou-se nos poços 10 μ L da solução de cada extracto. Deixou-se as placas de Petri em estufa microbiológica durante 48 horas. Com uma régua de 30 cm, efectuou-se a medição dos diâmetros (halos) de inibição para os dois métodos.

VII. RESULTADOS

Tabela 1. Massa em gramas das fracções do pó das folhas de *Combretum molle*

Extractos	FHX	FBL	FAq	FCL	FHM
Peso (g)	1.02 (%)	0.99 (%)	1.12(%)	1.32(%)	1.78(%)

Tabela 2. Massa em gramas dos extractos de *Kigelia africana* e *Trichilia emetica*.

Extracto	<i>Kigelia africana</i>		<i>Trichilia emetica</i>	
	Raíz	Casca do Caule	Raíz	Casca de Caule
n-hexano	0.98(%)	1.23(%)	1.14(%)	0.94(%)
DCM	1.05(%)	0.84(%)	1.33(%)	1.51(%)
EtOAc	1.56(%)	1.43(%)	0.92(%)	0.88(%)
MeOH	1.22(%)	0.97(%)	0.97(%)	1.01(%)

DCM – diclorometano; EtOAc – acetato de etilo; MeOH – metanol

7.1 Resultados de testes fitoquímicos

Tabela 3. Resultados dos testes fitoquímicos das fracções de *Combretum molle*

Testes	Fracções				
	FHX	FBL	FCL	FAq	FHM
Saponinas	-	+	-	+	+
Flavonóides	-	+	+	+	+
Alcalóides	-	-	-	-	-
Taninos	-	+	-	+	+
Esteróides e triterpenóides	+	-	-	-	-
Antraquinonas	-	-	-	-	-

(+): presente (-): ausente

Tabela 4: Resultados de testes de identificação de metabólitos secundários dos extractos de *Kigelia africana*

Testes	Raíz				Casca de Caule			
	Hexano	DCM	EtOAc	MeOH	Hexano	DCM	EtOAc	MeOH
Saponinas	-	+	+	-	-	+	+	-
Flavonóides	-	-	+	+	-	-	+	+
Alcalóides	-	-	-	-	-	-	-	-
Taninos	-	-	-	-	-	-	-	-
Esteróides e triterpenóides	+	+	-	-	+	+	-	-
Antraquinonas	-	+	+	-	-	+	+	-

(+) – presente; (-) – ausente

Tabela 5. Resultados de testes de identificação de metabólitos secundários dos extractos de *Trichilia emetica*.

Testes	Raíz				Casca de Caule			
	Hexano	DCM	EtOAc	MeOH	Hexano	DCM	EtOAc	MeOH
Saponinas	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavonóides	-	-	-	+	-	-	-	+
Alcalóides	-	-	-	-	-	-	-	-
Taninos	-	-	+	+	-	-	+	+
Esteróides Triterpenóides	+	+	+	-	+	+	+	-
Antraquinonas	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) - presente; (-) – ausente

7.2 Resultados dos Testes de Actividade antifúngica

Tabela 6. Diâmetros em milimetro (mm) de inibição das fracções de *Combretum molle* com os respectivos desvios padrão pelo método de perfuração em agar.

Microrganismo	Conc (mg/mL)	Co	Cu ₂ Cl (OH) ₃	FHX	FBL	FAq	FCL	FHM
	200	-	18.0±0.0	-	11.5 ±0.2	12.5±0.6	11.6±0.6	15.5±0.5
<i>A. niger</i>	100	-	18.0±0.0	-	8.0 ±0.0	9.3±0.5	8.0±0.0	11.6±0.6
	50	-	18.0±0.0	-	-	8.0±0.0	-	8.3±0.5
	25	-	18.0±0.0	-	-	-	-	-
	200	-	20.0±0.1	-	13.3 ±0.6	15.3±0.6	11.3±0.6	16.3±0.6
<i>C.gloeosporiodes</i>	100	-	20.0±0.1	-	10.3 ±0.6	13.6±0.6	8.6±0.5	12.0±0.0
	50	-	20.0±0.1	-	-	8.7±0.5	-	9.6±0.5
	25	-	20.0±0.1	-	-	-	-	8.0±0.0

Tabela 7. Diâmetros em milimetro (mm) de inibição das fracções de *Combretum molle* com os respectivos desvios padrão pelo método de difusão em disco

Microrganismo	Conc (mg/mL)	Co	Cu ₂ Cl (OH) ₃	FHX	FBL	FAq	FCL	FHM
	200	-	17.6±0.4	-	9.5 ±0.5	13.6±0.5	9.0 ±0.0	12.5±0.5
<i>A. niger</i>	100	-	17.6±0.4	-	8.3±0.5	8.5±0.5	-	11.6±0.4
	50	-	17.6±0.4	-	-	-	-	8.0±0.0
	25	-	17.0±0.4	-	-	-	-	-
	200	-	18.0±0.0	-	10.3 ±0.6	12.3±0.5	8.0 ±0.0	14.3±0.6
<i>C.gloeosporiodes</i>	100	-	18.0±0.0	-	7.5 ±0.2	10.3±0.6	-	10.7±0.2
	50	-	18.0±0.0	-	-	8.0±0.0	-	8.6±0.1
	25	-	18.0±0.0	-	-	-	-	-

Tabela 8. Médias dos halos em milimetro (mm) de inibição dos extractos de *Kigelia africana* contra *A. niger* e *Colletotrichum gloeosporioides* e intervalos de confiança, pelo método de difusão em disco

Raízes							
	Conc (mg/mL)	Co	Cu ₂ Cl(OH) ₃	Hexano	DCM	EtOAc	MeOH
	200	-	17.6±0.4	-	10.0±0.1	14.0±0.0	12.0±0.0
<i>A.niger</i>	100	-	17.6±0.4	-	7.0 ±0.0	8.3±0.5	9.0±0.0
	50		17.6±0.4	-	-	-	-
	25	-	17.6±0.4	-	-	-	-
	200	-	18.0±0.0	-	9.0±0.0	12.0±0.0	10.6±0.1
<i>C.gloeosporioides</i>	100	-	18.0±0.0	-	7.0±0.0	7.2±0.1	8.3±0.5
	50		18.0±0.0	-	-	-	-
	25	-	18.0±0.0	-	-	-	-
Casca do Caule							
	200	-	17.6±0.43	-	11.0±0.0	14.6±0.5	14.0±0.0
<i>A.niger</i>	100	-	17.6±0.43	-	7.6±0.2	12.3±0.5	11.5±0.5
	50	-	17.6±0.43	-	-	7.0±0.0	8.6±1.0
	25	-	17.6±0.43	-	-	-	-
	200	-	18.0±0.0	-	10.0±0.0	13.3±0.2	13.3±0.5
<i>C. gloeosporioides</i>	100	-	18.0±0.0	-	7.0±0.0	7.3±0.57	9.3±0.5
	50	-	18.0±0.0	-	-	-	7.0±0.0
	25	-	18.0±0.0	-	-	-	-

Co – Mistura de DMSO e Metanol a 70% ; Cu₂Cl(OH)₃ – controlo positivo; DCM- extracto diclorometanólico; EtOAc- extracto de acetato de etilo; MeOH – extracto metanólico.

Tabela 9. Médias dos halos em milimetro (mm) de inibição dos extractos de *Kigelia africana* contra *A. niger* e *C. gloeosporioides* e intervalos de confiança, pelo método de perfuração em agar

Raízes							
	Conc (mg/mL)	Co	Cu ₂ Cl(OH) ₃	Hexano	DCM	EtOAc	MeOH
	200	-	18.0±0.01	-	11.6±0.6	12.0±0.0	13.5±0.5
<i>A.niger</i>	100	-	18.0±0.01	-	7.3±0.5	8.6±0.5	11.6±1.1
	50	-	18.0±0.01	-	-	-	7.0±0.0
	25	-	18.0±0.01	-	-	-	-
	200	-	20.0±0.1	-	10.6±0.5	13.2±0.2	12.5±0.5
<i>C. gloeosporioides</i>	100	-	20.0±0.1	-	7.0±0.0	10.0±0.0	10.3±0.5
	50	-	20.0±0.1	-	-	7.0±0.0	7.3±0.5
	25	-	20.0±0.1	-	-	-	-
Casca do Caule							
	200	-	18.0±0.01	-	13.5±0.5	16.0±0.0	15.5±0.6
<i>A.niger</i>	100	-	18.0±0.01	-	8.7±0.57	14.2±0.5	12.3±0.5
	50	-	18.0±0.01	-	-	8.3±0.57	8.3±0.5
	25	-	18.0±0.01	-	-	-	-
	200	-	20.0±0.1	-	12.3±0.5	17.3±0.6	16.7±0.6
<i>C. gloeosporioides</i>	100	-	20.0±0.1	-	9.0±0.0	14.0±0.5	13.7±0.6
	50	-	20.0±0.1	-	-	8.3±0.57	8.3±0.5
	25	-	20.0±0.1	-	-	-	-

Co – Mistura de DMSO e Metanol a 70% ; Cu₂Cl(OH)₃ – controlo positivo; DCM- extracto diclorometanólico; EtOAc- extracto de acetato de etilo; MeOH – extracto metanólico.

Tabela 10. Médias e intervalos de confiança dos diâmetros em milimetro (mm) de inibição dos extractos de *Trichilia emetica* contra *A. niger* e *Colletotrichum gloeosporioidese* pelo método de difusão em disco

Raízes							
	Conc (mg/mL)	Co	Cu ₂ Cl(OH) ₃	Hexano	DCM	EtOAc	MeOH
	200	-	17.6±0.43	-	11.3±0.6	12.5±0.5	-
<i>A.niger</i>	100	-	17.6±0.43	-	9.5±0.5	10.3±0.5	-
	50		17.6±0.43	-	7.0±0.0	8.3±0.57	-
	25	-	17.6±0.43	-	-	-	-
	200	-	18.0±0.0	-	-	-	-
<i>C. gloeosporioides</i>	100	-	18.0±0.0	-	-	-	-
	50		18.0±0.0	-	-	-	-
	25	-	18.0±0.0	-	-	-	-
Casca do Caule							
	200	-	17.6±0.43	-	11.0±0.0	10.6±0.5	-
<i>A.niger</i>	100	-	17.6±0.43	-	8.3±0.5	8.0±0.0	-
	50	-	17.6±0.43	-	-	7.0±0.0	-
	25	-	17.6±0.43	-	-	-	-
	200	-	18.0±0.0	-	-	-	-
<i>C.gloeosporioides</i>	100	-	18.0±0.0	-	-	-	-
	50	-	18.0±0.0	-	-	-	-
	25	-	18.0±0.0	-	-	-	-

Co – Mistura de DMSO e Metanol a 70% ; Cu₂Cl(OH)₃ – controlo positivo; DCM- extracto diclorometanólico; EtOAc- extracto de acetato de etilo; MeOH – extracto metanólico.

Tabela 11. Médias dos diâmetros em milimetro (mm) de inibição dos extractos de *Trichilia emetica* contra *A. niger* e *Colletotrichum gloeosporioides* e os intervalos de confiança pelo método de perfuração em agar

Raízes							
	Conc (mg/mL)	Co	Cu ₂ Cl(OH) ₃	Hexano	DCM	EtOAc	MeOH
<i>A.niger</i>	200	-	18.0±0.01	-	13.6±0.5	13.3±0.5	-
	100	-	18.0±0.01	-	11.0±0.0	11.3±0.6	-
	50	-	18.0±0.01	-	8.0±0.0	9.0±0.0	-
	25	-	18.0±0.01	-	-	-	-
	200	-	20.0±0.1	-	-	-	-
<i>C. gloeosporioides</i>	100	-	20.0±0.1	-	-	-	-
	50	-	20.0±0.1	-	-	-	-
	25	-	20.0±0.1	-	-	-	-
	200	-	20.0±0.1	-	-	-	-
Casca do Caule							
<i>A.niger</i>	200	-	18.0±0.01	-	12.0±0.0	11.0±0.0	-
	100	-	18.0±0.01	-	10.0±0.0	9.0±0.0	-
	50	-	18.0±0.01	-	08.0±0.0	7.6±0.5	-
	25	-	18.0±0.01	-	-	-	-
	200	-	20.0±0.1	-	-	-	-
<i>C.gloeosporioides</i>	100	-	20.0±0.1	-	-	-	-
	50	-	20.0±0.1	-	-	-	-
	25	-	20.0±0.1	-	-	-	-
	200	-	20.0±0.1	-	-	-	-

Co – Mistura de DMSO e Metanol a 70% ; Cu₂Cl(OH)₃ – controlo positivo; DCM- extracto diclorometanólico; EtOAc- extracto de acetato de etilo; MeOH – extracto metanólico.

7.3 Resultados de Cromatografia em Camada fina (TLC)

As fracções de hexano, clorofórmica, aquosa, n-butanólica e hidrometanólica de *Combretum molle* foram analisadas por TLC utilizando sistema de solventes constituído por C₆H₁₄:EtOAc (9:1) e usando sílica gel 60 F254 Merck® sobre a placa de alumínio como fase estacionária e visualizadas usando uma lâmpada de UV-vis a 254 nm e posteriormente purverizadas com vanilina/ácido sulfúrico.

Na fracção hidrometanólica foram detectadas 7 manchas: (Rf 0.13) não visível na UV e cor roxa pálida quando revelada com vanilina/ácido sulfúrico, (Rf 0.20) cor escura e cor amarela quando revelada com vanilina/ácido sulfúrico, (Rf 0.32) cor escura e cor amarela quando revelada com vanilina/ácido sulfúrico, (Rf 0.40) não visível e cor amarela quando revelada com vanilina/ácido sulfúrico, (Rf 0.48) cor escura em UV e cor amarela quando revelada com vanilina/ácido sulfúrico, (Rf 0.53) escura e cor vermelha quando revelada com vanilina/ácido sulfúrico e (Rf 0.60) escura e cor vermelha quando revelada com vanilina/ácido sulfúrico.

Na fracção acetato de etilo foram detectadas 5 manchas com (Rf 0.13), (Rf 0.31), (Rf 0.40), (Rf 0.53) escura e cor vermelha quando revelada com vanilina/ácido sulfúrico e (Rf 0.61) escura e cor vermelha. Na fracção aquosa, foram detectadas 2 manchas com (Rf 0.12) não visível na UV e cor amarela quando revelada com vanilina/ácido sulfúrico e (Rf 0.09) escuras na UV e cor castanha avermelhada quando revelada com vanilina/ácido sulfúrico.

Para fracção butanólica foram detectadas 2 manchas com (Rf 0.09) de cor escura na UV e cor castanha avermelhada quando revelada com vanilina/ácido sulfúrico e (Rf 0.12) não visível na UV e cor amarela quando revelada com vanilina/ácido sulfúrico.

No extracto metanólico de cascas de caule de *Kigelia africana* foram visualizadas 6 manchas de cores castanha, verde, amarela pálida, amarela clara, amarela e vermelha e quando reveladas com hidróxido de potássio em 10% de etanol as cores passaram para castanha escura, azul, amarela pálida, amarela, alaranjada intensa que com o tempo passaram para violeta e castanha pálida com os seguintes valores de Rf 0.10, 0.14, 0.21, 0.27, 0.34 e 0.40 respectivamente.

No extracto de acetato de etilo foram visualizadas em UV 5 manchas com Rf 0.11, 0.20, 0.27, 0.31 e 0.40, de cores castanha, amarela pálida, amarela clara, amarela e vermelha e quando reveladas com hidróxido de potássio em 10% de etanol as cores passaram para castanha escura, amarela pálida, amarela, alaranjada intensa respectivamente.

No extracto diclorometanólico foram visualizadas em UV 3 manchas com Rf 0.10, 0.13 e 0.20 de cores castanha, verde e amarela pálida e quando reveladas com hidróxido de potássio em 10% de etanol as cores passaram para castanha escura, azul e amarela pálida respectivamente. No extracto hexânico não foi verificada nenhuma mancha usando os dois métodos de revelação.

Na análise dos extractos de hexano, diclorometano, acetato de etilo e metanólica de *Trichilia emetica* por TLC no sistema de solvente constituído por C₆H₁₄:EtOAc (4:6) e usando sílica gel 60 F254 Merck® sobre a placa de alumínio como fase estacionária, foram visualizadas numa lâmpada de UV a 224 nm 4 manchas do extracto de acetato de etilo com os seguintes valores de Rf 0.21, 0.23, 0.34 e 0.55. As manchas apresentam as seguintes cores: azul claro, castanho-escuro, azul claro e azul claro quando visualizadas na lâmpada e castanha esverdeado, castanho-escuro, castanha esverdeado e castanha esverdeado, quando pulverizadas com ácido sulfúrico a 10% respectivamente.

O extracto diclorometanólico apresentou manchas com valores de Rf 0.21, 0.23 e 0.35. Estas manchas, quando reveladas em lâmpada de UV e apresentaram as cores azul claro, castanho-escuro, azul claro castanha esverdeado, castanho-escuro, castanha esverdeada e castanho esverdeado, quando pulverizadas com ácido sulfúrico a 10% respectivamente.

VIII. DISCUSSÃO DE RESULTADOS

a) *Combretum molle*

A abordagem fitoquímica das fracções da planta *Combretum molle* revelou a presença de diferentes grupos de metabólitos secundários. Dentre os compostos encontrados destaca-se a presença de flavonóides, taninos, saponinas e terpenos mas com maior predominância para os flavonóides e taninos. Estes resultados corroboram parcialmente com os resultados obtidos por Simon *et al.*, (2008).

A fracção hidrometanólica apresentou maior halo de inibição de 16.3 ± 0.6 e 15.5 ± 0.5 no teste contra *Colletotrichum gloeosporioides* e *A. niger* respectivamente pelo método de poços. A mesma fracção usando método de difusão em disco exibiu maior halo de inibição (14.3 ± 0.6) para o *Colletotrichum gloeosporioides*. O destaque vai igualmente para a fracção aquosa que tem maior halo (13.6 ± 0.5) ao inibir o crescimento de *A. niger* pelo método de difusão em disco

A fracção clorofórmica apresentou menor halo de inibição (9.0 ± 0.0 e 8.0 ± 0.0) pelo método de difusão em disco para *Aspergillus niger* e *Colletotrichum gloeosporioides* respectivamente.

As fracções com maior halo de inibição contém principalmente os metabólitos secundários nomeadamente flavonóides, taninos e saponinas.

A concentração inibitória mínima (CIM) da fracção hidrometanólica foi de 25mg/mL para *Colletotrichum gloeosporioides* e para *A. niger* foi de 50 mg/mL usando o método de poços. Ainda usando o mesmo método as fracções butanólica e clorofórmica apresentaram a concentração inibitória mínima de 100 mg/mL.

Para o método de difusão em disco a concentração inibitória mínima para as fracções aquosa e hidrometanólica foi de 50 mg/mL para *Colletotrichum gloeosporioides* e a fracção clorofórmica apresentou a concentração inibitória mínima de 200 mg/mL para os dois microrganismos.

O efeito de inibição verificado nas fracções hidrometanólica, butanólica e aquosa está associado à presença de flavonóides, taninos e saponinas. A actividade antifúngica evidenciada pela fracção clorofórmica está relacionada com a presença de flavonóides.

a) *Kigelia africana*

A triagem fitoquímica preliminar realizada nos extractos de hexano, diclorometano, acetato de etilo e metanol da planta *Kigelia africana* revelou a presença de flavonóides, saponinas, antraquinonas e terpenos. Estes resultados são consubstanciados por Saini *et al.*, (2009) e Azu *et al.* (2010) que fizeram um estudo fitoquímico na Índia e evidenciaram a presença de carboidratos, compostos voláteis, isocumarinas, ácidos gordos, glicósidos e derivados de cumarinas, lignanas, flavonóides, monoterpénos (principalmente irridóides), triterpénos, ácidos cinâmicos e benzóicos (Oliveira *et al.*, 1990).

O extracto metanólico e o de acetato de etilo das cascas de caule, apresentaram maiores halos de inibição de 16.7 ± 0.6 e 17.3 ± 0.5 no teste contra *Colletotrichum gloeosporioides* respectivamente pelo método de poços. Os mesmos extractos apresentaram maiores halos de inibição 16.0 ± 0.0 e 15.5 ± 0.6 para o *A. niger* usando o método de perfuração em agar (poços).

O destaque vai o extracto de hexano que não apresentou nenhuma actividade contra os microrganismos testados em ambos os métodos.

O menor halo de inibição (7.0 ± 0.0) verificou-se nos extractos DCM, EtOAc da raiz contra *Colletotrichum gloeosporioides* e MeOH contra o *A. niger* usando o método de poços.

A concentração inibitória mínima foi de 50 mg/mL para os extractos de metanol e acetato de etilo das cascas do caule e 100 mg/mL para os extractos de DCM e EtOAc das raízes.

No método de difusão em disco o extracto de acetato de etilo das cascas de caule apresentou maior diâmetro de inibição (14.6 ± 0.5) contra *A. niger*. No mesmo método o menor diâmetro de inibição (7.0 ± 0.0) foi verificado no extracto de DCM para as raízes e EtOAc para cascas do caule.

Pelo método de difusão em disco a CIM é maior que 50 mg/mL para *Colletotrichum gloeosporioides* dos extractos EtOAc e MeOH

O efeito de inibição verificado nos extractos diclorometanólicos das raízes e das cascas do caule está associado à presença de saponinas, terpenos e antraquinonas. Nos extractos de acetato de etilo das raízes e cascas de caule a inibição deve-se à presença de saponinas, flavonóides e antraquinonas. O efeito inibitório exibido pelo extracto metanólico das cascas do caule e das

raízes está associado à presença de flavonóides. O extracto acetato de etilo apresentou maior inibição contra os microrganismos testados.

a) *Trichilia emetica*

Da análise qualitativa realizada sobre os extractos de *Trichilia emetica* constatou-se a presença de terpenos e compostos fenólicos nomeadamente flavonóides e taninos. O destaque vai para os terpenos que se apresentam em maiores quantidades no extracto de diclorometano, facto que é consubstanciado por Cortez *et al.* (1999) citado por Faiela (2007).

Os extractos brutos de diclorometano e acetato de etilo exibiram actividade antifúngica contra os microrganismos testados, isto é, inibiram o crescimento dos micélios. Esta inibição deve-se principalmente à presença de terpenóides.

Os extractos hexânico e metanólico não apresentaram actividade contra os microrganismos testados. O maior valor de halo de inibição (13.6 ± 0.5) foi verificado no extracto de diclorometano das raízes pelo método de poços.

A concentração inibitória mínima verificada foi de 50mg/mL para o método de perfuração em agar para os dois extractos e 100mg/mL para os extractos DCM de cascas de caule quando testados contra *A.niger* pelo método de difusão em disco.

O maior destaque vai para o *C. gloeosporioides* que não foi inibido pelos extractos de *Trichilia emetica*.

Na literatura está bem relatada a actividade antifúngica dos diferentes metabólitos secundários encontrados nos diferentes extractos das três plantas em estudo: terpenóides, saponinas, flavonóides, taninos e antraquinonas.

IX. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

9.1 Conclusões

Através do estudo fitoquímico preliminar dos extractos brutos de *Kigelia africana*, *Trichilia emetica* e fracções de *Combretum molle* e dos testes de actividade antifúngica contra *Aspergillus niger* e *Colletotrichum gloeosporioides*, pode-se concluir o seguinte:

A análise fitoquímica preliminar realizada sobre as fracções do pó das folhas de *Combretum molle* revelou a presença de flavonóides, taninos, terpenos e saponinas.

Os testes fitoquímicos realizados sobre os extractos das raízes e cascas de caule de *Trichilia emetica* revelaram a presença de terpenos, flavonóides e taninos.

Para *Kigelia africana* os testes fitoquímicos revelaram a presença de flavonóides, saponinas, quinonas (antraquinonas) e terpenos.

Os testes antimicrobianos realizados sobre os extractos das raízes e cascas do caule de *Kigelia africana* revelaram que os extractos de metanol, o extracto de acetato de etilo e o extracto de diclorometano de casca do caule, possuem uma actividade antifúngica significativa especialmente contra *C. gloeosporioides* como mostram as tabelas 8 e 9.

Em relação aos fungos testados, os halos de inibição obtidos com os extractos vegetais e fracções mostram que a concentração inibitória mínima compreende valores maiores que 25 mg/mL e em alguns casos maiores que 50 mg/ mL para os fungos testados.

A actividade antimicrobiana das plantas em estudo está associada à presença de flavonóides, taninos, antraquinonas e terpenos.

Desta forma, os resultados obtidos no presente trabalho sobre as actividades antifúngica, evidenciaram a possível utilização dos extractos destas plantas no controlo de fitopatógenos, determinando a importância das mesmas na agricultura como fungicidas naturais.

O método de perfuração em agar mostrou-se mais eficaz relativamente ao método de difusão em disco.

9.2 Recomendações

Recomenda-se incentivar a aplicação de extractos vegetais como fungicidas pois são constituídos por compostos responsáveis pelos efeitos de inibição no desenvolvimento de patógenos e que são menos agressivos ao homem e ao meio ambiente.

Recomenda-se também uma melhor coordenação entre as instituições ou órgãos responsáveis pela pesquisa e estudo das diferentes espécies Moçambicanas com propriedades antifúngicas e os praticantes da agricultura, para uma melhor administração dos extractos das plantas.

Para completar o estudo recomenda-se a realização de estudos *in vivo* para verificar a ocorrência de inibição ou indução de resistência através do monitoramento da expressão dos sintomas da doença, bem como de outros mecanismos de defesa da planta hospedeira, como a formação de papilas ou a síntese de proteínas relacionadas à patogénese.

BIBLIOGRAFIA

- ✚ Agrios, G.N. (2005). *Plant Pathology*, 5^a ed. San Diego: Elsevier Academic Press. p922.
- ✚ Anónimo (2010). Extractos Vegetais. *Food ingredients*. **11**. obtido em <http://www.revista-fi.com/materias/120.pdf> acessado no dia 10/09/11
- ✚ Araújo, M.G.F., Cunha, W.R.& Veneziani, R.C.S.(2010). Estudo fitoquímico preliminar e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de extrato obtido de frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill (*Solanaceae*). *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. **31**(2): 205-209.
- ✚ Araújo, S.A.C. de, Teixeira, M.F.S., Dantas, T.V.M., Melo, V.S.P., Lima, F.E.S., Ricarte, A.R.F., Costa, E.C. & Miranda, A.M. (2009). Usos Potenciais de *Melia Azedarach* L. (Meliaceae): Um Levantamento. *Arquivos do Instituto Biológico*. **76**(1):141-148.
- ✚ Azu, O. O.; Duru, F. I; Osinubi, A.A.; Noronha, C. C.; Elesha, S. O.; Okanlawon, A. O. (2010). Protective Agent, *Kigelia africana* Fruit Extract, Against Cisplatininduced Kidney Oxidant Injury In Spraguedawley Rats. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. **3** (2):_35-37
- ✚ Azu, O. O., Duru, F. I. O., Osinubi, A. A., Oremosu, A. A., Norohna, C. C., Okanlawon, A. O. & Elesha S. O. (2011). Long-term treatment with *Kigelia africana* fruit extract ameliorates the testicular toxicity following cisplatin administration in male Sprague-Dawley rats. *Journal of Medicinal Plants Research*. **5**(3): 388-397.
- ✚ Baba-Moussa, F., Akpagana, K. & Bouchet, P. (1999). Antifungal activities of seven West African Combretaceae used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* **66**: 335-338.
- ✚ Becker, Heinz; Berger, Werner; et al. (1975); Química Orgânica Experimental. 5^a Edição; Fundação Colouste Gulbenkian; Lisboa; pp. 81-82, 108-109.
- ✚ Berger, L. R. R., Stamford, T. C. M. & Stamford, N. P. (2011). Perspectivas para o uso da Quitosana na Agricultura. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. **12**(4): 195-215.
- ✚ Bettiol, W., & Morandi, M.A.B., (2009). *Biocontrolo de doenças de plantas: uso e perspectivas*. 1^a edição, Embrapa Meio Ambiente, São Paulo. p.7.

- ✚ Camatti-Sartori, V., Magrini, F. E., Crippa, L. B., Marchett, C., Venturin, L. & Silva-Ribeiro, R. T. (2011). Avaliação *in vitro* de extractos vegetais para o controlo de fungos patogénicos de flores. *Revista Brasileira de Agroecologia*. **6**(2): 117- 122.
- ✚ Carvalho, C.P. (2006). Actividade de β -1,3-glucanase após a eliciação das defesas do tomateiro contra murcha bacteriana. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. **41**:1721-1730.
- ✚ Carvalho, E. B. de (2007). *Estudos da interacção entre proteínas e taninos: Influência da presença de polissacarídeos*. Tese de Doutoramento em Química, Departamento de Química, Faculdade de Ciências - Universidade do Porto. 193pp
- ✚ Comé, M. J. (2009). *Efeito de um isolado bacteriano desconhecido no controlo biológico de Colletotrichum gloeosporioides Penz., agente causador da antracnose no cajueiro*. Trabalho de Licenciatura, Departamento de produção e Protecção Vegetal, Faculdade de Agronomia e Engenharia Florestal, Universidade Eduardo Mondlane, Maputo.71pp
- ✚ Dada, A.A., Adeparusi, E.O and Alale, O.V (2010). Dietary dried *Kigelia africana* fruits meal as fertility enhancer in female *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Agriculture and biology journal of north America*. **1** (5): 791-795.
- ✚ David, V.; Yinong, Y.; Casiana, V.C.; Monica, H.O. (2010). Abscisic Acid-Induced Resistance against the Brown Spot Pathogen *Cochliobolus miyabeanus* in Rice Involves MAP Kinase-Mediated Repression of Ethylene Signaling. *Plant Physiology*. **152**: 2036–2052.
- ✚ Dixon, R. A. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature*: **411**:843–847.
- ✚ Faiela, B. G. E. (2007). *Isolamento e Caracterização dos Limonóides nas Raízes e Cascas de Caule da Planta Trichilia emetica (Meliaceae)*. Trabalho de Licenciatura, Departamento de Química, Faculdade de Ciências-Universidade Eduardo Mondlane.81pp
- ✚ Gabriel, O. A. & Olubunmi, A. (2009). Comprehensive scientific demystification of *Kigelia africana*: A review. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*. **3** (9): 158-164.
- ✚ Gonçalves, M. de L. S. S. (1996). *Métodos Instrumentais Para Análise de Soluções. Análise Quantitativa*. 2ª Edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa p 553-556

- ✚ Govindachari, T.R.; Suresh, G.; Gopalakrishnan, G.; Banumathy, B.; Masilamani, S. (1998). Identification of antifungal compounds from the seed oil of *Azadirachta indica*. *Phytoparasitica, Bet Dagan*. **26** (2): 109-116.
- ✚ Khan, M. N., Ngassapa, O. & Matee, M. I. N. (2000). Antimicrobial activity of Tanzanian chewing sticks against oral pathogenic microbes. *Pharmaceutical Biology*. **38**: 235-240.
- ✚ Kiyinlma, C., Noël, Z. G., Koffi, N. & Joseph, D. A. (2010). Botanical study and evaluation of antifungal activity of *Terminalia ivorensis* and *Terminalia superba* (Combretaceae) on the growth in vitro of *Aspergillus fumigates*. *International Journal of Pharmaceutical Science*. **2**(3): 904-912.
- ✚ Komane, B. M., Olivier, E. I. & Viljoen A. M. (2011). *Trichilia emetica* (Meliaceae)-A review of traditional uses, biological activities and phytochemistry. *Phytochemistry Letters*. **4**:1-9.
- ✚ Lyon, G.D., Reglinski, T. & Newton, A.C. (1995) Novel disease control compounds: the potential to immunize plants against infection. *Plant Pathology*. **44**(3): 407-427
- ✚ Macedo, J.A.B. (2002). Introdução a Química Ambiental. Química & Meio Ambiente & Sociedade. 1ª Edição, p. 191-259,.
- ✚ Machado, H.; Nagem, T. J.; Peters, V. M.; Fonseca, C. S.; Oliveira, T. T. (2008). Flavonóides e seu potencial terapêutico. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução, Juiz de Fora*. **27**(1/2): 33-39
- ✚ Masoko, P., Picard, J. & Eloff, J.N. (2007). The antifungal activity of twenty-four South African Combretum species (Combretaceae). *South African Journal of Botany* **73**:173-183.
- ✚ Mavie, C. G. (2007). *Isolamento e Caracterização dos Flavonóides nas folhas da planta Combretum molle*. Trabalho de Licenciatura, Departamento de Química, Faculdade de Ciências, Universidade Eduardo Mondlane. 99 pp
- ✚ McMurry, J. (2006). Química Orgânica; Volume 1; 6ª Edição; Pioneira Thomson Learning; São Paulo; p. 389.

- ✚ Mouco, G., Bernardino, M.J., & Cornélio, M.L. (2003). Controlo de qualidade de ervas medicinais. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento-edição*. (31)
- ✚ Msanga, H.P. & Maghembe, J.A. (1993). Germination of Woodland Mahogany (*Trichilia emetica*) Following Manual Seed Coat Scarification and Potassium Nitrate Treatments. *Journal of Tropical Forest Science*. **5**(4): 518-527
- ✚ Mujanje, T.S. (2007). *Isolamento e Caracterização das Naftoquinonas nas Raízes e Cascas de Caule da Planta Kigelia africana*. Trabalho de Licenciatura, Departamento de Química, Faculdade de Ciências, Universidade Eduardo Mondlane, Maputo.67pp
- ✚ Nicholson, R. L., Hammerschmidt (1992). R. Phenolic compounds and their role in disease resistance of the plants. *Plant disease*. **37**:260-280
- ✚ Nyenje M. & Ndip R. N. (2011). In-vitro antimicrobial activity of crude acetone extract of the stem bark of *Combretum molle* against selected bacterial pathogens. *Journal of Medicinal Plants Research*. **5**(21):5315-5320
- ✚ Ojewole, J.A. O. (2008). Analgesic and Antiinflammatory Effects of Mollic Acid Glucoside, a 1 α -Hydroxycycloartenoid Saponin Extractive from *Combretum molle* R. Br. ex G. Don (Combretaceae) Leaf. *Phytother. Res*. **22**: 30–35
- ✚ Olatunji, A. & Olubunmi, A. (2009) Comprehensive scientific demystification of *Kigelia africana*: A review. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*. **3** (9):158-164.
- ✚ Oliveira, A. B. de, Raslan, D. S., Miraglia, M do C.M. & Mesquita, A. A.L. (1990). Estrutura Química e actividade Biológica de Naftoquinonas de Bignaniaceae Brasileiras. *Química Nova*. **13**(4).
- ✚ Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R. , Jamnadass, R., Simons, A., (2009). *Combretum molle*. *Agroforestry Database:a tree reference and selection guide version 4.0* <http://www.worldagroforestry.org/af/treedb/>
- ✚ Owolabi, O. J., Omogbai, E. K. I. & Obasuyi, O. (2007). Antifungal and antibacterial activities of the ethanolic and aqueous extract of *Kigelia africana* (Bignoniaceae) stem bark. *African Journal of Biotechnology*. **6** (14):1677-1680
- ✚ axton, J. D., (1981). A working redefinition. *Phytopathologische Zeitschrift*. **101**:106-109

- ✚ Peres, T., B., (2002).Noções Básicas de Cromatografia.*Biológico*. **64** (2):227-229
- ✚ Ponou, B. K., Barboni,L., Teponno,R. B., Mbiantcha, M., Nguelefack, T. B., Park, H.J., Lee, K., Tapondjou, L. A. (2008). Polyhydroxyoleanane-type triterpenoids from *Combretum molle* and their anti-inflammatory activity. [*Phytochemistry Letters*](#). **1**(4):183-187.
- ✚ Prado, G.P. do (2007). *Caracterização Química E Bioatividade do Óleo Essencial De Cunila Angustifolia Benth (Lamiaceae) Sobre Alphitobius Diaperinus (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae)*. Dissertação para obtenção do grau de Mestrado em Ciências Ambientais da Universidade Comunitária Regional de Chapecó.
- ✚ Queiroz, C. R. A. dos A., Morais, S. A. L. de & Nascimento, E. A. do (2002) Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*myracrodruon urundeuva*). *Revista Árvore, Viçosa-MG*. **26** (4):485-492
- ✚ Rezende, G. A. A., Terrones, M. G. H. & Rezende, D. M. L. C. (2011). Estudo do Potencial Alelopatico do Extrato Metanolico de Raiz e Caule de *Caryocar Brasiliense Camb.* (Pequi). *Bioscience Journal*. **27**(3):460-472
- ✚ Resende, M.L.V.; Costa, J,C.B.; Cavalcanti, F.R.;Ribeiro Júnior, P.M.; Camilo, F.R. (2007). Seleção de Extractos Vegetais para Indução de Resistência e Ativação de Respostas de Defesa em Cacaueiro contra a Vassoura-de-bruxa. *Fitopatologia Brasileira*. **32**(3):213-221
- ✚ Rønne, C. & Jøker, D. (2005). Seed Leaflet *Kigelia africana*(Lam.) Benth.*Phytotrade Africa*. **108**.
- ✚ Romeiro, R.S., Rodrigues, F.A., Jesus-Júnior, W.C. & Pereira, J.L.A. (2005). Fitotoxidez e activação de mecanismos de defesa de feijoeiro contra *X. axonopodis* pv. phaseolide um derivado benzotiodiazólico. *Fitopatologia Brasileira*. **24** :255.
- ✚ Saini, S., Kaur, H., Verma, B., Ripundaman & Singh,S.K.(2009). *Kigelia africana* (Lam.) Benth.-An overview. *Natural Product Radiance*. **8**(2):190-197
- ✚ Schwan-Estrada, K. R. F.; Stangarlin, J. R.; CRUZ, M. E. S. (2003). Uso de plantas medicinais no controlo de doenças de plantas. *Fitopatologia Brasileira, Brasília*. **28**:554-556.

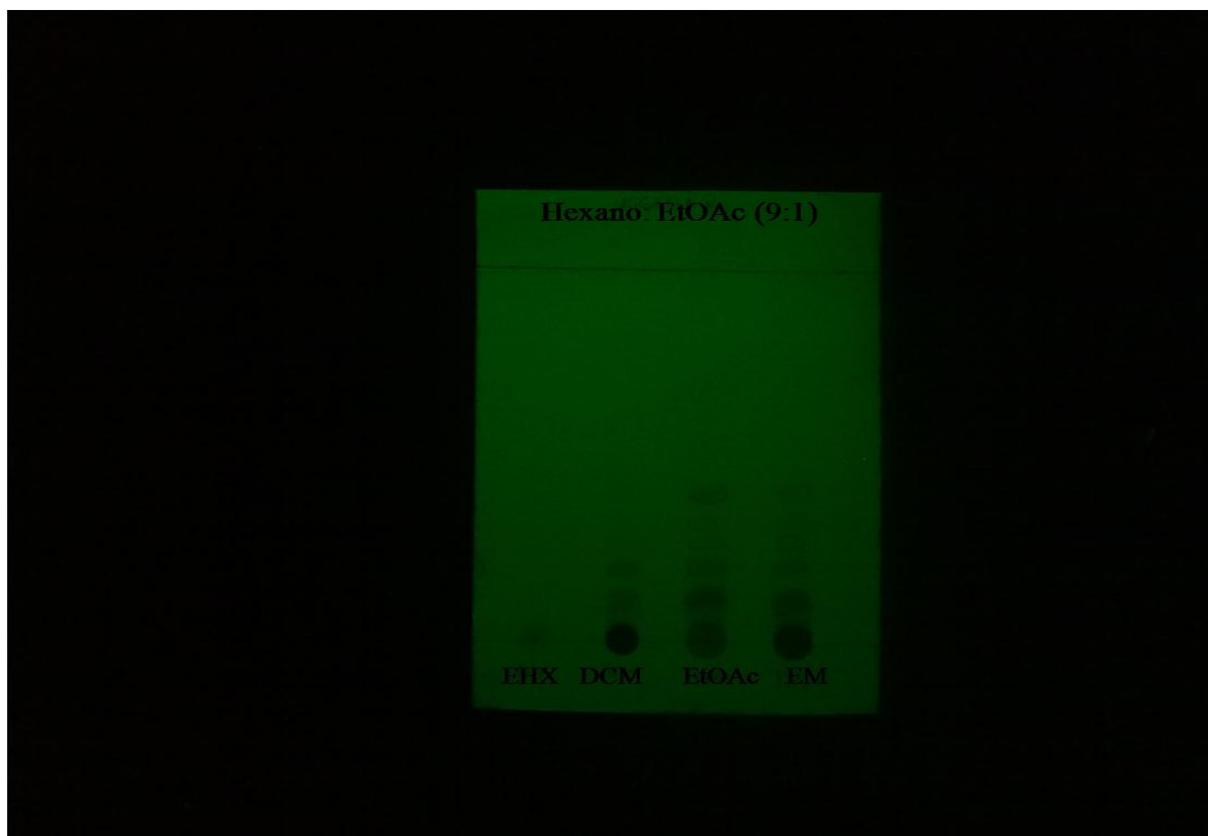
- # Schwan-Estrada, K.R.F., Stangarlin, J.R. & Cruz, M.E.S. (2000). Uso de extractos vegetais no controlo de fungos fitopatogênicos. *Revista Floresta*. **30**:129-137.
- # Sherma, J. (2004). Planar Chromatography. *Analytical Chemistry*. **76**(12): 3251-3262.
- # Silva, R. R. da & Coelho, G. D. (2006). Fungos: Principais Grupos e Aplicações Biotecnológicas. Instituto de Botânica. São Paulo.
- # Simon, M.K., Ajanusi, J.O., George, B.D., Abubakar, M.S. & Meduna, J.A (2008). In-Vivo Evaluations Of The Stem Bark Of *Combretum molle* “R.Br/G. Don” (Keay,1989) For Anthelmintic Properties. *Continental Journal of Veterinary Sciences* **2**: 1 – 11.
- # Skoog, D.A., West, D. M., Holler, F. J., Crouch, S. R. (2005). Fundamentos de Química Analítica. Brooks/Cole, 8ª edição Norte Americana, Pp 678-780
- # Silva, R.F.(2007). Indução de resistência em plantas de berinjela e tomate por *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra bactérias causadoras de murcha (*Ralstonia solanacearum*) e cancro (*Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*). Tese de Doutoramento em fitopatologia na Universidade de São Paulo. 109pp
- # Simon, M.K., Ajanusi, J.O., George, B.D., Abubakar, M.S. & Meduna, J.A (2008). In-Vivo Evaluations Of The Stem Bark Of *Combretum molle* “R.Br/G. Don” (Keay,1989) For Anthelmintic Properties. *Continental Journal of Veterinary Sciences*. **2**: 1 – 11.
- # Venturoso, L.R., Bacchi, L.M.A., Gavassoni, W.L., Conus, L. A., Pontim, B. C. A. & Bergamin, A. C. (2011). Atividade antifúngica de extractos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. *Summa Phytopathologica*. **37**(1):18-23
- # Vogel, A. (2002). Análise Química Quantitativa. 5ª Edição. Editora LTC. Rio de Janeiro. P.138
- # Whittaker, R.H.; Fenny, P.P. (1971). Allelochemicals: chemical interactions between species. *Science*. **171**: 757-770,
- # Xavier, M. O., Madrid, I. M., Cleff, M. B., Cabana, Â. L., Filho, R. P. da S., Meireles, M. C. A. (2008). Contaminação do ar por *Aspergillus* em ambiente de reabilitação de animais marinhos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. **45** (3):174-179
- # Yokozawa, T.; Dong, E.; Liu, Z.W. & Shimizu, M. (1997). Antioxidant activity of flavones and flavonols in vitro. *Phytotherapy Research*. **11**:446-450.

ANEXOS

Anexo 1. Recuperação do solvente em rotavapor



Anexo 2. Cromatograma de extractos brutos das cascas do caule de *Kigelia africana* TLC-I



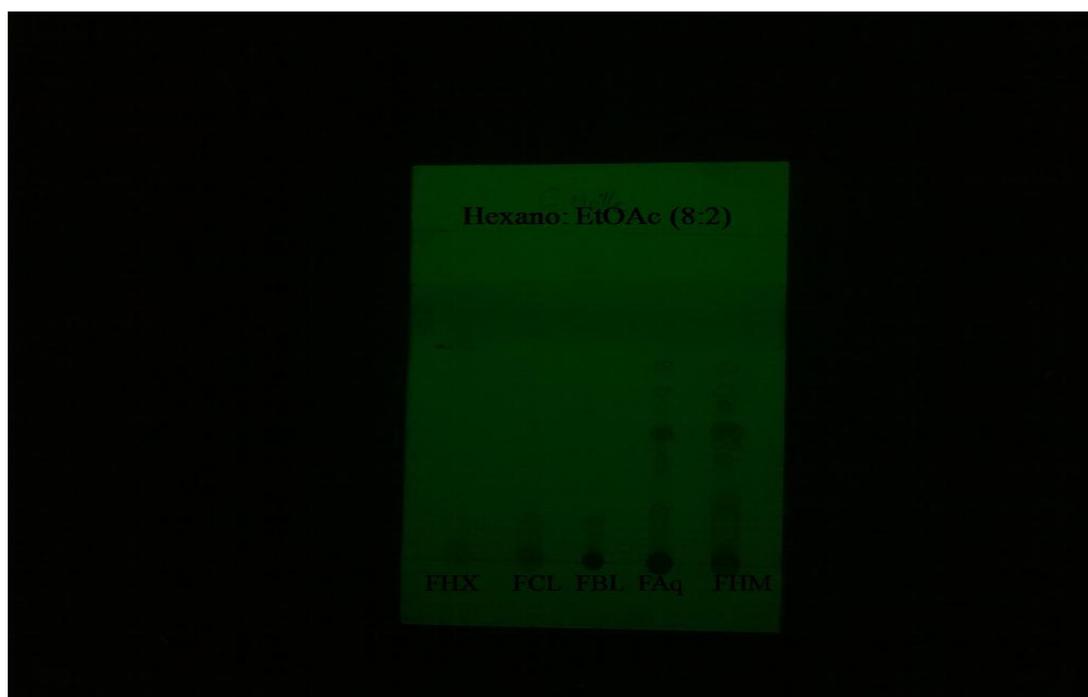
TLC extractos da casca do caule de *Kigelia Africana*

Anexo 3. Cromatograma de extractos brutos da raiz de *Kigelia africana* TLC-II



TLC de extractos da Raiz de *Combretum molle*

Anexo 4. Cromatograma de fracções do pó das folhas de *Combretum molle* TLC-III



TLC de Fracções do pó das folhas de *Combretum molle*

Anexo 5. Cromatograma dos extractos de *Trichilia emetica*

Hexano-EtOAc (4:6)



TLC de extractos da Raíz

Hexano-EtOAc (4:6)



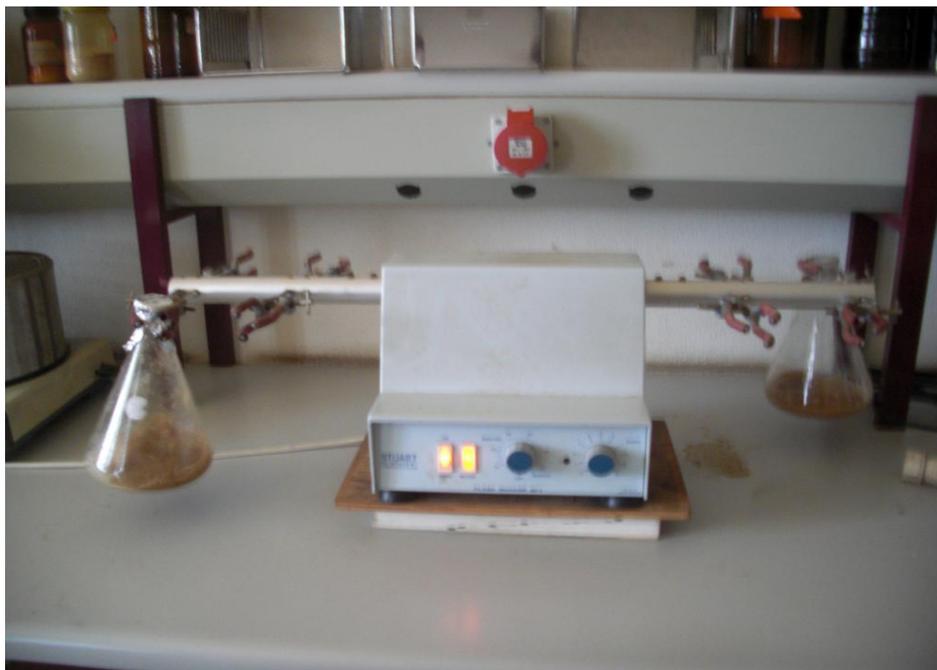
TLC de extractos de casca de caule

Anexo 6. Halos de inibição dos microrganismos testados

Halos de inibição pelo Método do disco



Anexo 7. Esquema de maceração sob agitação constante



Agitador