



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TRABALHO DE LICENCIATURA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE
ANTIMICROBIANA E ANTIPARASITÁRIA DOS EXTRACTOS
METANÓLICOS DE *Zanthoxylum capense* e *Strychnos henningsii***



Autor: Satar Ângelo Assuate

Maputo, 2014



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TRABALHO DE LICENCIATURA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE
ANTIMICROBIANA E ANTIPARASITÁRIA DOS EXTRACTOS
METANÓLICOS DE *Zanthoxylum capense* e *Strychnos henningsii***



Autor: Satar Ângelo Assuate

Supervisor: Prof. Doutor Victor Sevastyanov

Maputo, 2014

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Ângelo Assuate e Maria Fernando Manjate e aos meus irmãos pelo amor, carinho, atenção que demonstraram ao longo da minha formação compartilhando meus sucessos e insucessos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, misericordioso e bom, sempre me acenando que é possível melhorar.

A imensa compreensão do meu supervisor Professor Doutor Victor Sevastyanov permitindo que eu aspirasse um pouco do seu conhecimento, durante a realização deste trabalho.

Agradeço às autoridades da DCA - Direcção de Ciências Animais pela permissão para a realização do trabalho inerente a actividade antimicrobiana e antiparasitária.

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

Aprecio também a imensa contribuição da dra. Aida Cala pela sua incansável paciência e assistência técnica.

Os meus agradecimentos são extensivos ao corpo docente do departamento de Química da Faculdade de Ciências da UEM pela paciência e vontade de ensinar, demonstrada ao longo deste período.

Á senhora Madalena e dra Amélia Furvela, pela dedicação, paciência e disponibilização de materiais e reagentes ao longo da execução do trabalho experimental.

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

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

DECLARAÇÃO SOB O COMPROMISSO DE HONRA

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

O autor

(Satar Ângelo Assuate)

ÍNDICE

DEDICATÓRIA.....	II
AGRADECIMENTOS	III
DECLARAÇÃO SOB O COMPROMISSO DE HONRA	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABELAS	X
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	XI
ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XII
ÍNDICE DE ANEXOS	XIV
RESUMO	XV
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	2
2.1. Objectivo Geral.....	2
2.2. Objectivos Específicos.....	2
3. METODOLOGIA	3
3.1. Revisão Bibliográfica	3
3.2. Parte Experimental.....	3
3.3. Análise e discussão dos resultados	3
3.4. Elaboração do Relatório Final	3
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
4.1. Zanthoxylum capense	4
4.1.1. Descrição botânica	4
4.1.2. Distribuição geográfica	4
4.1.3. Uso Medicinal	4
4.1.4. Composição fitoquímica	5
4.1.5. Efeito farmacológico	5

4.2.	Strychnos henningsii	6
4.2.1.	Descrição botânica	6
4.2.2.	Distribuição geográfica	6
4.2.3.	Uso Medicinal	6
4.2.4.	Composição fitoquímica	7
4.3.	Alcalóides	7
4.3.1.	Definição dos alcalóides.....	7
4.3.2.	Classificação dos alcalóides	8
4.3.2.1.	Classificação de acordo com a sua origem biossintética.....	8
4.3.3.	Nomenclatura e Propriedades gerais	9
4.3.4.	Aspectos de distribuição.....	9
4.3.5.	Extracção dos alcalóides	9
4.3.6.	Alcalóides de grupo de Berberina e seus análogos	10
4.3.7.	Actividade Biológica.....	12
4.3.8.	Interacção com bio - moléculas.....	13
4.3.9.	Actividade citotóxica e apoptosis.....	13
4.3.10.	Actividade antimicrobiana.....	13
4.3.11.	Actividade antiinflamatória	14
4.3.12.	Actividade antimalárica.....	14
4.3.13.	Ouros efeitos.....	14
4.4.	Técnicas e Métodos de Análise de plantas	15
4.4.1.	Extracção.....	15
4.4.2.	Métodos de Extracção	15
4.4.2.1.	Maceração	15
4.4.2.2.	Infusão	16
4.4.2.3.	Decocção	16
4.4.2.4.	Soxhlet.....	16

4.5.	Métodos Cromatográficos.....	16
4.5.1.	Cromatografia em Camada Fina (TLC)	17
4.5.1.1.	Técnica da cromatografia em camada fina.....	18
4.5.1.1.1.	Preparação da placa	18
4.5.1.1.2.	Preparação do eluente.....	18
4.5.1.1.3.	Aplicação da amostra	18
4.5.1.1.4.	Desenvolvimento da placa.....	18
4.5.1.1.5.	Métodos de revelação.....	19
4.5.1.1.6.	Medida e identificação de solutos	19
4.5.1.1.7.	Vantagens e Desvantagem da TLC	20
4.5.2.	Cromatografia em coluna normal (CC).....	21
4.6.	Métodos espectroscópicos	21
4.6.1.	Espectroscopia Visível e Ultravioleta (UV-Vis).....	22
4.6.1.1.	Procedimentos Analíticos em Espectrofotometria UV-Vis	22
4.6.2.	Espectroscopia no Infravermelho (IV).....	23
4.6.3.	Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	23
4.6.4.	Espectroscopia de Massa (MS)	24
4.7.	Métodos de identificação qualitativa das classes dos metabólitos secundários.....	24
4.7.1.	Detecção de Alcalóides	24
4.7.2.	Detecção de Glicósidos	25
4.7.3.	Detecção de Saponinas.....	25
4.7.4.	Detecção de Fitosteróis	25
4.7.5.	Detecção de Fenóis.....	26
4.7.6.	Detecção de Taninos	26
4.7.7.	Detecção de Flavonóides.....	26
5.	PARTE EXPERIMENTAL.....	27
5.1.	Colheita e identificação botânica da planta	28

5.2.	Secagem e moagem das amostras	28
5.3.	Preparação dos extractos	28
5.3.1.	Extracção por Soxhlet	28
5.3.2.	Evaporação do solvente	29
5.4.	Procedimento usado para extracção de Alcalóides Totais (AT)	30
5.4.1.	Extracção dos alcalóides totais	31
5.4.2.	Teste fitoquímico para identificação qualitativa de Alcalóides	32
5.4.3.	Preparação da Amostra – Padrão de Berberina	32
5.4.4.	Análise por TLC do extracto clorofórmico de <i>Z. capense</i>	32
5.4.5.	Fraccionamento dos extractos por CC	33
5.4.5.1.	Preparação da amostra	33
5.4.5.2.	Montagem e Enchimento da coluna	33
5.4.5.3.	Eluição	33
5.4.6.	Análise por TLC das fracções de <i>Z. capense</i> obtidos por CC	34
5.4.7.	Testes de actividade biológica	34
5.4.7.1.	Testes antimicrobianos	34
5.4.7.1.1.	Preparação dos meios de cultura	35
5.4.7.1.2.	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	36
5.4.7.2.	Testes antiparasitários	36
5.4.7.2.1.	Recuperação de ovos nematóides gastrointestinais	37
5.4.7.2.2.	Teste de eclodibilidade larvar	37
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
7.	CONCLUSÕES E RECOMENDACÕES	45
7.1.	Conclusões	45
7.2.	Recomendações	47
	BIBLIOGRAFIA	48
	ANEXOS	i

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>Zanthoxylum capense</i>	4
Figura 2: Estruturas de sanguinarina 2a e de Berberina 2b	5
Figura 3: <i>Strychnos henningsii</i>	6
Figura 4: Estruturas de Estrictina 4a e Henningsina 4b.....	7
Figura 5: Estruturas de alcalóides de grupo de Berberina 5b e Benzofenatridina 5c.....	11
Figura 6: Determinação prática do R_f	19
Figura 7: Espectro electromagnético envolvendo uma faixa contínua de comprimentos de onda e frequência, desde ondas de rádio até os raios gama (γ) na região de alta frequência.....	21
Figura 8: Cromatograma do extracto clorofórmico de <i>Zanthoxylum capense</i> no sistema eluente $\text{CHCl}_3 - \text{MeOH}$ (3:1).....	38
Figura 9: Cromatogramas das 24 fracções de <i>Zanthoxylum capense</i> obtidas por CC.....	39

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Alcalóides com dados teóricos de R_f , cor das manchas e sistemas de solvente.....	12
Tabela 2: Nome científico com dados da extração e concentração do extracto bruto.....	29
Tabela 3: Sistema de solventes (% v/v) usado na CC.....	33
Tabela 4: Microrganismos e suas características.....	35
Tabela 5: Resultado de TLC das 24 fracções de <i>Zanthoxylum capense</i> obtidas por CC.....	40
Tabela 6: Resultado de TLC das 6 fracções de <i>Zanthoxylum capense</i> obtidas por CC.....	41
Tabela 7: Resultados da actividade antimicrobiana dos extractos de <i>Z. capense</i> e <i>S. henningsii</i>	42
Tabela 8: Determinação da CIM na <i>Salmonella sp</i>	42
Tabela 9: Determinação da CIM na <i>Staphylacoccus sp</i>	42
Tabela 10: Determinação da CIM na <i>Candida sp</i>	42
Tabela 11: Determinação da CIM na <i>Streptococcus sp</i>	43
Tabela 12: Actividade dos extractos de <i>Z. capense</i> e <i>S. henningsii</i> em função da concentração para o número de ovos, larvas e a percentagem de inibição para eclosão dos ovos.....	44

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1: Tipos de cromatografia	17
Esquema 2: Esquema geral seguido no trabalho	27
Esquema 3: Extração dos alcalóides totais	30

ABREVIATURAS E SIGLAS

¹H - Protão

AcOH – Ácido acético

AT- Alcalóides Totais

C.tropicalis – *Candida tropicalis*

CC – Cromatografia em coluna

CIM - Concentração Inibitória Mínima

DCA – Direcção de Ciências Animais

DGR - Reagente de Dragendorff

DNA – Ácido desoxiribonucleico

EtOH – Etanol

F.E - Fase estacionária

Fig - Figura

GC – Cromatografia gasosa

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IC₅₀ – Concentração de inibição média

in vitro - Refere-se ao que está fora de um organismo ou aos fenômenos que são observados no laboratório em tubo de ensaio

IV - Espectroscopia no Infravermelho

M - Concentração molar

MPLC - Cromatografia Líquida de Média Pressão

Mr – Massa molecular

MS - Espectroscopia de Massa

N – Concentração Normal

n-BuOH – n-Butanol

OPG – Ovos por grama

P.falciparum – *Plasmodium falciparum*

P.vivax - *Plasmodium vivax*

Rf - Factor de retenção

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

S. henningsii - *Strychnos henningsii*

TLC - Cromatografia em Camada Fina

UEM - Universidade Eduardo Mondlane

UV-Vis - Ultravioleta e Visível

Z. capense - *Zanthoxylum capense*

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO I: Fluxogramas de Isolamento de Berberina como alcalóide principal	i
ANEXO II: Cromatogramas	ii
TLC – I: Cromatogramas dos extractos clorofórmicos de <i>Zanthoxylum capense</i>	ii
TLC - II: Cromatogramas dos extractos clorofórmicos de <i>Strychnos henningsii</i>	iii
TLC – III: Cromatogramas das 24 fracções obtidas por CC	iii
TLC – IV: Cromatogramas das 6 fracções resultantes da análise das 24 fracções obtidas por CC.	iv
ANEXO III: Fotos dos resultados dos testes de actividade antimicrobiana.....	v
Fig. 1: Halos de inibição observados para <i>Candida sp.</i>	v
Fig. 2: Halos de inibição observados para <i>Staphylacoccus sp</i>	v
Fig. 3: Halos de inibição observados para <i>Salmonella sp.</i>	v
Fig. 4: Halos de inibição observados para <i>Streptococcus sp.</i>	v
ANEXOIV: Equipamentos.....	v
Fig. 1: Rota vapor usado para concentrar o extracto metanólico.....	vi
Fig. 3: Ampola de decantação usada para extrair alcalóides totais.....	vi
Fig. 2: Extraccao por Soxhlet.....	vi
Fig. 4: Ampola de decantação usada para fraccionamento do extracto clorofórmico de <i>Z. capense</i>	vi
Fig. 5 – Fracções obtidas do extracto clorofórmico de <i>Z. capense</i> por CC.....	vii
Fig. 6: Autoclave usada para incubar as placas de petri.....	vii

RESUMO

A planta *Zanthoxylum capense* pertence à família Rutaceae da qual fazem parte cerca de 549 espécies distribuídas em todo o mundo, principalmente em regiões tropicais e temperadas. Esta planta é amplamente usada na medicina tradicional para o tratamento de cólicas, dor de estômago, febre, dor de dente, amebíase, tuberculose e também como um anti-séptico bucal.

A planta *Strychnos henningsii* pertence à família Strychnaceae. É usada para tratamento de náuseas e queixas estomacais. É tida como remédio cólico e purgativo e, possivelmente, também de valor na febre reumática e dismenorreia. É também usada como remédio contra mordeduras de cobra por toda região Austral e África.

Neste trabalho, foi feito o estudo fitoquímico das plantas, e a partir dos extractos brutos extraíram-se os alcalóides de grupo de Berberina e fez-se o fraccionamento de modo a isolar a Berberina, tendo se confirmado a sua presença em *Zanthoxylum capense*.

Para a obtenção do extracto bruto, a amostra foi secada, moída e submetida a extracção por Soxhlet usando como solvente metanol a 85%.

O extracto metanólico bruto obtido por Soxhlet foi submetido a procedimentos químicos de extracção de alcalóides totais e seus análogos.

A identificação dos alcalóides foi realizada usando os reagentes de precipitação dos alcalóides e a presença de Berberina por cromatografia em camada fina TLC, sendo que a amostra Padrão foi preparado a partir de Cloreto de Berberina.

Para a avaliação da actividade antimicrobiana e a determinação da concentração inibitória mínima dos extractos foram usados o método de difusão em agar e o de diluição respectivamente. Os microorganismos utilizados foram: *Candida sp*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Staphylacoccus e Streptococcus sp*, onde a fracção clorofórmica do extracto metanólico de *Zanthoxylum capense* apresentou uma actividade significativa sobre a *Candida sp*, *Salmonella sp*, *Staphylacoccus e Streptococcus sp* respectivamente e o extracto metanólico de *Strychnos henningsii* apresentou uma actividade significativa sobre a *Salmonella sp e Staphylacoccus* respectivamente.

E para a avaliação da actividade antiparasitária, os extractos apresentaram uma actividade significativa sobre a eclosão dos ovos nematóides gastrointestinais de animais infectados.

1. INTRODUÇÃO

O estudo químico de espécies vegetais tem sido contínuo tema de pesquisas devido à grande aplicação de substâncias naturais em diversas áreas, podendo-se destacar a utilização destas no campo farmacêutico e agrícola.

Na área de fármacos, esse estudo teve grande desenvolvimento e, até hoje, muitas substâncias naturais são ainda utilizadas como medicamentos, na forma pura ou após transformações químicas.

Embora o número de pesquisas na área de fitoquímica tenha aumentado significativamente, um levantamento mostra que somente de 15 a 17% das plantas foram estudadas do ponto de vista medicinal. Assim, o estudo químico e farmacológico de plantas medicinais, visando a obtenção de novos compostos bioactivos, constitui uma linha de pesquisa de interesse na área de Produtos Naturais, e grandes esforços têm sido envidados no sentido de isolamento e da aplicação prática de produtos naturais activos.

No entanto, para que este objectivo seja atingido, o trabalho deve envolver pesquisadores de várias áreas, caracterizando-se assim como uma pesquisa de carácter multidisciplinar (Jorge, 2005).

A utilização indiscriminada de defensivos agrícolas no controle de doenças fitopatológicas tem provocado aumento da resistência de diversos patógenos de plantas e conseqüentemente, o aumento da dose dos produtos utilizados. Desta maneira, devido à preocupação eminente com relação aos prejuízos causados na saúde do ambiente e dos seres humanos, substâncias de origem natural que ofereçam baixo impacto ambiental são fundamentais em programas integrados de controlo pragas (Martins *et al.*, 2012).

Assim, o uso de extractos vegetais vem sendo uma prática cada vez mais constante para os agricultores, principalmente da linha de produção orgânica e agricultura familiar, uma vez que é uma alternativa mais segura, mais económica para pequenos agricultores e mais facilmente biodegradável em relação aos produtos sintéticos (Diniz *et al.*, 2006).

2. OBJETIVOS

2.1. Objectivo Geral

- ✓ Avaliar a actividade antimicrobiana e antiparasitária dos extractos metanólicos de *Zanthoxylum capense* e *Strychnos henningsii*.

2.2. Objectivos Específicos

- ✓ Fazer testes fitoquímicos para identificação qualitativa de alcalóides.
- ✓ Realizar a extracção dos alcalóides totais presentes nas raízes das plantas.
- ✓ Identificar a Berberina nos extractos metanólicos das plantas por métodos cromatográficos.
- ✓ Fazer testes antimicrobianos e antiparasitários dos extractos das raízes das plantas.

3. METODOLOGIA

O presente trabalho obedeceu à seguinte sequência:

3.1. Revisão Bibliográfica

Consistiu na colecta de informações relativas às plantas *Zanthoxylum capense* e *Strychnos henningsii*, sua descrição taxonómica, composição fitoquímica, uso medicinal e seu efeito farmacológico.

Foram também colectadas informações referentes aos alcalóides de grupo de Berberina, sua ocorrência, propriedades, actividade biológica e farmacológica, métodos de extracção e identificação qualitativa de forma a assegurar a compreensão da parte experimental e os resultados obtidos.

3.2. Parte Experimental

Para a realização da parte experimental deste trabalho se adoptou a seguinte sequência metodológica:

1. Colecta da amostra
2. Preparação da amostra (secagem e moagem).
3. Extracção dos princípios activos presentes nas raízes da planta.
4. Extracção dos alcalóides totais.
5. Testes fitoquímicos para identificação qualitativa de alcalóides.
6. Identificação de Berberina.
7. Fraccionamento e Análise cromatográfica.
8. Testes de actividade antimicrobiana e antiparasitária.

3.3. Análise e discussão dos resultados

3.4. Elaboração do Relatório Final

O relatório final foi elaborado em função das informações obtidas durante a pesquisa bibliográfica e em função da análise dos resultados experimentais.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. *Zanthoxylum capense*

4.1.1. Descrição botânica

Zanthoxylum capense (Thumb.) Harv. É uma árvore com diversas pequenas ramificações, de crescimento até 10m, de espessura com espinho na casca e no caule. As folhas contêm vários pares de folhetos e as flores são de cor verde-branco (Van Wyk *et al.*, 1997). O fruto é azedo com sabor forte de limão, deixando uma sensação de queimadura na boca (Palgrave, 1977).



Família: Rutaceae

Gênero: *Zanthoxylum*

Espécie: *Zanthoxylum capense*

Nomes Vernaculares :

- Manungwani (Changana)

- Umungamabele (Zulu)

- Small Knobwood (English)

Figura 1 - *Zanthoxylum capense*

4.1.2. Distribuição geográfica

Zanthoxylum capense (Thumb.) Harv. Está amplamente distribuída nas partes oriental e do norte da África do Sul (Van Wyk *et al.*, 1997) e nas zonas costeiras do Sul de Moçambique (Santiago, 2007).

4.1.3. Uso Medicinal

É amplamente usada na medicina tradicional para o tratamento de cólicas, dor de estômago, febre, dor de dente, e também como um anti-séptico bucal. É um remédio para

epilepsia e inúmeras outras doenças (Van Wyk *et al.*, 1997). É também usada no tratamento de Amebíase e Tuberculose (Palgrave, 1977).

4.1.4. Composição fitoquímica

Estudos fitoquímicos realizados em espécies do género *Zanthoxylum*, demonstraram existência de vários tipos de alcalóides como os lignanos e cumarinas que são comuns entre metabólitos secundários relatados e têm importância quimiotaxonômica para o género. Além disso, outros metabolitos têm sido isolados, tais como os flavonóides e terpenos, esteróis, entre outros (L. Oscar J.P. *et al.*, 2012).

A maior parte das espécies de *Zanthoxylum* estudados contêm alcalóides Benzofenantridínicos biologicamente activos. De particular importância são os alcalóides *Sanguinarina 2a* e *Berberina 2b* que estão presentes em *Z. capense* (Van Wyk *et al.*, 1997; Santiago, 2007).

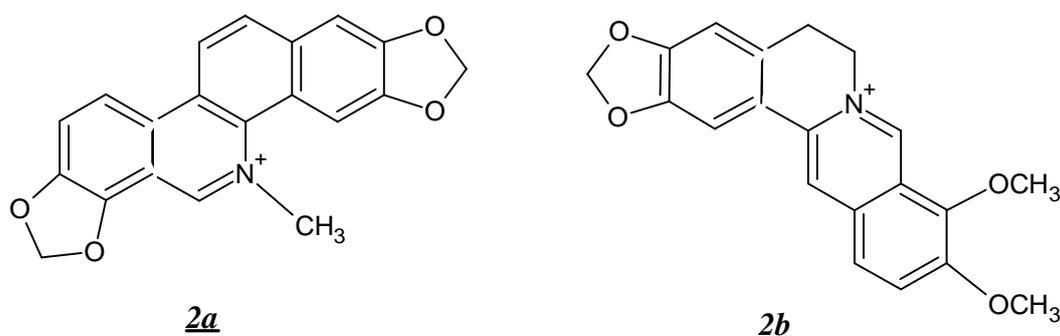


Figura 2 – Estruturas de sanguinarina **2a** e de Berberina **2b**

4.1.5. Efeito farmacológico

As actividades biológicas de determinadas espécies do género *Zanthoxylum* estão principalmente associados com a avaliação de antimicrobianos, insecticidas, anti-inflamatória, antioxidante, anti-parasitário, antitumoral, actividades antihelmiticas, antinociceptiva e antivirais, bem como estudos de inibição enzimática e os efeitos sobre o sistema nervoso central e os componentes celulares do sangue (L. Oscar, *et al.*, 2012).

4.2. *Strychnos henningsii*

4.2.1. Descrição botânica

A unidade varia em tamanho atingindo mais de três metros de altura. As cascas são de cor cinza clara e liso em árvores jovens, mas torna-se marrom mais escuro em espécimes mais velhos. As folhas são brilhantes, de cor verde-claro e com três veias principais a partir da base (Van Wyk *et al.*, 1997).



Família: Strychnaceae

Gênero: *Strychnos*

Espécie: *Strychnos henningsii*

Nomes Vernaculares :

- Manono (Changana)

- Umqalothi (Zulu)

- Red Bitterberry (English)

Figura 3 - *Strychnos henningsii*

4.2.2. Distribuição geográfica

A planta ocorre ao longo da costa leste da África do Sul e norte em Kruger National Park (Van Wyk *et al.*, 1997) e nas zonas costeiras de Moçambique (Santiago, 2007).

4.2.3. Uso Medicinal

A casca é usada para o tratamento de náuseas e queixas estomacais e foi tomada como tônica de mordidas. É tida como remédio cólico e purgativo e possivelmente com valor na febre reumática e dismenorreia.

plantas superiores e inferiores e ainda em animais, apesar de nestes últimos ocorrerem com menor frequência (Morrison, 2005).

Os átomos de nitrogénio de muitos alcalóides estão presentes nos anéis heterocíclicos e em poucos casos, o nitrogénio pode estar presente na forma de uma amina primária ou em forma de aminogruppo quaternário (Boligon, 2008).

4.3.2. Classificação dos alcalóides

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

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

4.3.2.1. Classificação de acordo com a sua origem biossintética

- Alcalóides verdadeiros
- Protoalcalóides
- Pseudoalcalóides

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

Protoalcalóides são aminas simples com nitrogénio extracíclico, de carácter básico e são produtos de metabolismo dos aminoácidos (ex. Efedrina, Hordenina).

Pseudoalcalóides apresentam todas as características da definição dos alcalóides mas não são derivados de aminoácidos (ex. Aconitina).

4.3.3. Nomenclatura e Propriedades gerais

Os alcalóides apresentam uma característica comum que é a terminação – *ina*, que reflecte o facto de estes serem aminas. Geralmente os alcalóides são especificados de acordo com a família ou plantas onde se encontram, tipo de anel heterocíclico a que pertencem (Harbone, 1998).

- Os alcalóides têm um ou mais átomos de nitrogénio endocíclicos no estado terciário. São em geral cristalinos, incolores, não voláteis, e não solúveis em água.
- A maioria dos alcalóides é opticamente activa e possui um sabor amargo.
- Ocorrem na natureza em forma de sais, todos são fisiologicamente extremamente activos, têm efeitos tóxicos, afectam o sistema nervoso central e respiratório.
- Formam precipitados insolúveis com ácidos: pícrico, fosfomolibdénico, fosfotungsténico, tânico e também com o tetraiodomercurato de potássio (reagente de Mayer).

4.3.4. Aspectos de distribuição

Existe uma diferença qualitativa e quantitativa dos alcalóides nos tecidos das plantas, isto pode ser devido a factores como: clima, meio ambiente e a composição (química) do solo. O teor de cada alcalóide também pode ser influenciado pela estação do ano. A ocorrência (presença significativa) de diferentes alcalóides pode ser especificamente restrito a determinadas partes de plantas, enquanto outros compostos são distribuídos em todas as partes das plantas, variando simplesmente o teor nos diferentes tecidos, como folhas, caules e raízes (Dana *et al.*, 1991).

4.3.5. Extracção dos alcalóides

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

Método A- Extracção com solventes orgânicos em meio alcalino:

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

Solventes: solventes clorados, éter dietílico, etc.

1. *Processo de Extracção:* da maceração à extracção contínua em Soxhlet.

2. *Concentração do extracto orgânico: destilação com ou sem vácuo.*
3. *Tratamento com solução aquosa ácida.*
4. *Alcalinização da solução aquosa e re-extracção com solvente apolar.*
5. *Eliminação do solvente.*

Método B- Extracção em meio aquoso ácido:

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

4.3.6. Alcalóides de grupo de Berberina e seus análogos

Alcalóides de grupo de Berberina (Palmatina, Columbamina, Jatrorrhizina) junto com alcalóides Benzofenantridínicos (Sanguinarina, Nitidina, Fagaridina), apresentam um verdadeiro interesse científico e prático devido a sua vasta ocorrência nas plantas superiores e alta actividade antiprotozoária (Santiago, 2007).

Os alcalóides do grupo Berberina derivam do sistema isoquinolínico (anel A e B) da estrutura **5a**. O anel isoquinolínico é também a base estrutural de vários tipos de alcalóides com nitrogénio quaternário, incluindo os grupos de Benzilisoquinilínicos e Benzofenantridínicos. As fórmulas estruturais de alcalóides de grupo de Berberina e Benzofenantridina estão representadas nas estruturas **5b** e **5c** respectivamente:

Tabela 1: Alcalóides com dados teóricos de R_f , cor das manchas e sistemas de solventes

Alcalóides	R_f	Cor das Manchas	
		UV a 366 nm	DRG Luz Visível
CHCl ₃ – MeOH (3:1) (Furaya et al., 1972)			
Berberina	0.46	Amarelo limão	Castanho
Tolueno-EtilAcetato-DimetilAmina (70:20:10) (Wagner et al., 1996)			
Berberina	0.60	Amarelo limão
Sanguinarina	0.94	Amarelo laranja
Hydrastina	0.71-0.90	Branco fluorescente
n-PrOH-HCOOH-H ₂ O (90:1:9) (Wagner et al., 1996)			
Hydrastina	0.90	Branco fluorescente	Castanho ou castanho amarelo á Castanho vermelho
Coptisina	0.15	Amarelo carregado	
Jatrorrhizina/ Palmatina	0.15	Amarelo carregado	
Berberina	0.21	Amarelo limão	Castanho ou castanho amarelo á Castanho vermelho
Coptisina	0.15	Amarelo laranja	
Sanguinarina	0.30 – 0.40	Amarelo laranja	
n-BuOH-EtilAcetato-HCOOH-H ₂ O (30:50:10:10) (Wagner et al., 1996)			
Berbamina	0.05-0.10	Fluorescência Azul	Castanho ou castanho amarelo á Castanho vermelho
Oxyacantina	0.10	Fluorescência Azul	
Palmatina	0.38	Verde fluorescente	
Columbamina	0.40	Verde amarelado	
Jatrorrhizina	0.44	Verde acastanhado	
Berberina	0.46	Amarelo esverdeado	
Ciclohexano-Et ₂ NH (90:10) (Govindana et al., 2000)			
Hydrastina	0.09	Branco fluorescente	Castanho
Berberina	0.30	Amarelo esverdeado	

4.3.7. Actividade Biológica

Berberina é um alcalóide conhecido como um fármaco com actividade poderosa antiamebiana, antileishmaniótica e antineoplástica e é actualmente empregue na prática médica. Berberina é altamente usada como um fármaco ameibidal na Ásia (Santiago, 2007).

Foi descoberto que Berberina e seus análogos possuem efeitos farmacológicos tais como, inibição de WEHI Leucemia (Yu FS. *et al.*, 2007), redução do teor de Colesterol (Cicero *et al.*, 2007), actividade anti-tumor, citostática/citotóxica (Issat *et al.*, 2006), actividade antiviral contra Cytomegalovirus (Hayashi *et al.*, 2007), pode amiliorar a memória espacial (doença de Alzheimer) (Zhu, F. *et al.*, 2006), indução de "cell cycle arrest" em carcinoma gástrica humana (Lin JP. *et al.*, 2006).

4.3.8. Interação com bio - moléculas

Alcalóides de grupo de Berberina possuem acção inibidora contra enzima Topoisomerase-I (Tpo-I) e Topoisomerase-II (Tpo-II), actuando com actividade anti tumor (Grycova, *et al.*, 2007).

4.3.9. Actividade citotóxica e apoptosis

Berberina tem um potencial efeito inibidor contra actividade telomerase em células de leucemia humana, actuando como inibidor (50% de inibição) a concentração de 35 μM .

A concentração de 30 – 300 μM inibe a telomerase de *P. falciparum*. A alta concentração (75 $\mu\text{g/mL}$), Berberina tem uma grande actividade citotóxica. Derivados de Berberina apresentam uma actividade potencial inibidora contra caspase 3, possuindo um efeito apoptosis grande; este efeito observa-se á concentração de 20 μM .

Estudos comparativos de inibição e actividade anti-leucemia, de alguns alcalóides de grupo de Berberina demonstram que estes têm menor actividade do que os alcalóides de grupo Benzofenantridina (Grycova, *et al.*, 2007).

4.3.10. Actividade antimicrobiana

Berberina e Jatrorrhizina em pequenas concentrações demonstram grande actividade de inibição contra bactérias de acne *Propionibacterium*. Berberina apresenta maior actividade do que Jatrorrhizina contra *Staphylococcus coagulase-negativa*. Teste de actividade antifúngico

contra *Cândida* demonstrou que somente *C. tropicalis* (resistente a niasitina, miconazole, e econazole) foi fortemente inibido por Berberina (Grycova, *et al.*, 2007).

4.3.11. Actividade antiinflamatória

Extracto etanólico contendo Berberina possui elevado efeito anti-inflamatório. Em estudos *in vitro* utilizando células humanas, Berberina demonstrou actividade inibidora de activador de proteína, um factor de transcrição fundamental em inflamação e carcinogénese. Berberina exerce um efeito inibidor significativo em transformação de linfócito, e sua acção anti-inflamatória pode ser devido a inibição de síntese de DNA do linfócito (Grycova, *et al.*, 2007).

4.3.12. Actividade antimalárica

Berberina *in vitro* possui forte efeito inibidor de síntese de ácidos nucleicos e proteínas de *P. falciparum*, sob forma de cloreto pode bloquear as sínteses de proteínas em *P. falciparum* na concentração 50 μM .

Berberina, Palmatina, Jatrorrhizina e Columbamina manifestam *in vitro* actividade contra três espécies de *Plasmodium*, isolados de pacientes. Os valores de IC_{50} são, Cloreto de Berberina 0.14 – 0.36 $\mu\text{g mL}^{-1}$; Palmatina 0.16 – 0.28 $\mu\text{g mL}^{-1}$; Jatrorrhizina 0.42 – 1.61 $\mu\text{g mL}^{-1}$; e Columbamina 0.72 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A malária pode ser rapidamente diagnosticada de forma efectiva. Berberina foi usada como marcador de cromossoma Y de parasitas de malária de forma fluorescente em sangue de pacientes com sintomas clínicos de malária, tornando o DNA de *P. vivax* e *P. falciparum* fluorescentes (Santiago, 2007).

4.3.13. Outros efeitos

Berberina possui efeito antidiabético que está relacionado com propriedade estimulante de secreção de insulina e modulação dos lípidos. Alguns derivados de Berberina apresentam actividade antiarritmica (Grycova, *et al.*, 2007).

4.4. Técnicas e Métodos de Análise de plantas

4.4.1. Extracção

O termo *extracção* significa retirar, da forma mais selectiva e completa possível, as substâncias ou fracção activa contida na droga vegetal, utilizando, para isso, um líquido ou mistura de líquidos tecnologicamente apropriados e toxicologicamente seguros (Simões, C. *et al.*, 2003).

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 à separação nítida das duas camadas. Os diferentes solutos presentes distribuem-se entre as fases de acordo com as solubilidades relativas (Zunguze, 2010).

4.4.2. Métodos de Extracção

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

- Maceração
- Infusão
- Decocção e
- Soxhlet

4.4.2.1. Maceração

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

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

4.4.2.2. Infusão

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

4.4.2.3. Decocção

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

4.4.2.4. Soxhlet

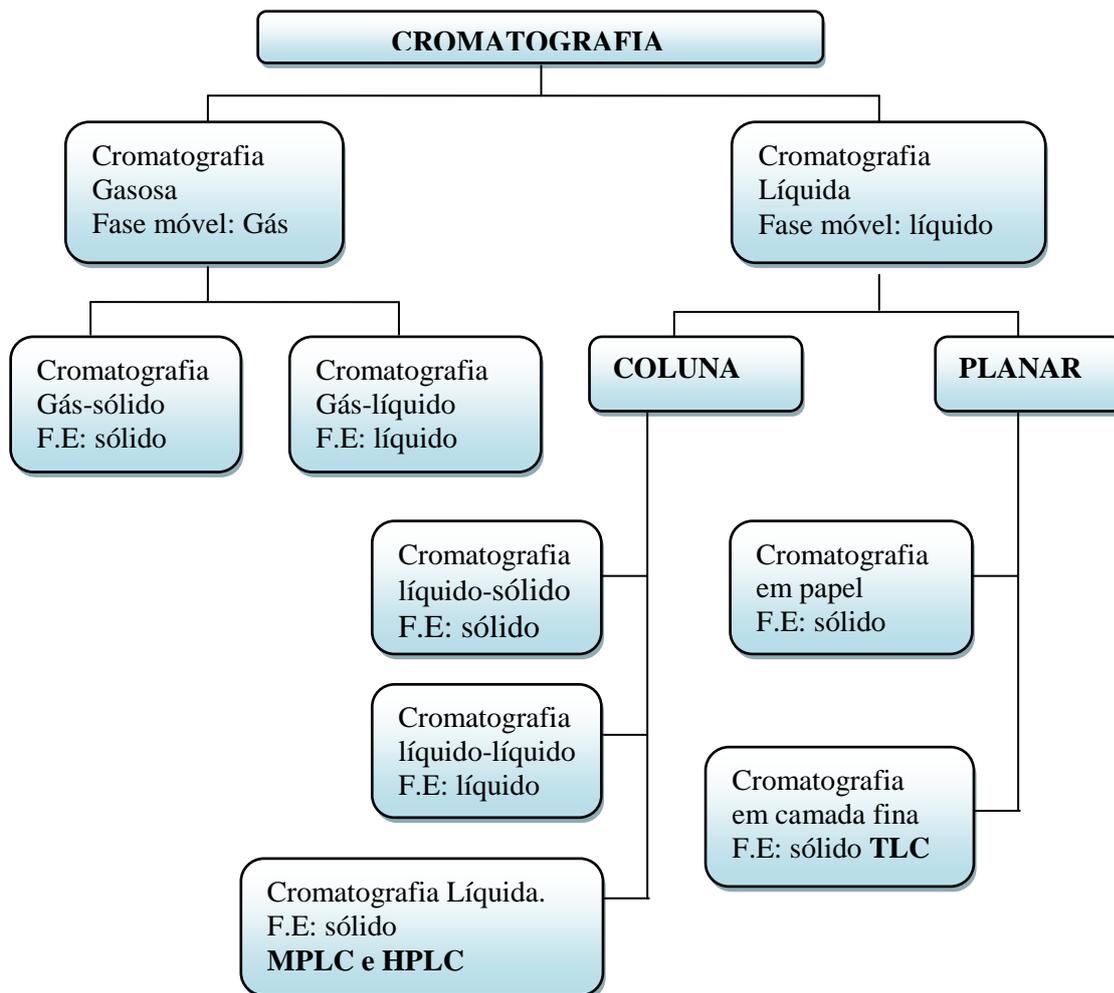
A extracção por Soxhlet consiste num processo de extracção exaustiva de um sólido (amostra) previamente moído por meio de um líquido: faz-se um refluxo contínuo durante um certo tempo até à descoloração completa do material em extracção contido no interior de um cartucho de material poroso.

4.5. Métodos Cromatográficos

A cromatografia, em todas as suas formas e variações, constitui hoje um dos mais importantes métodos de separação, se não o mais importante (Constantino *et al.*, 2004).

Sendo a cromatografia um método físico-químico, ela fundamenta-se na migração diferencial dos componentes de uma mistura, o que ocorre devido a diferentes interacções entre duas fases imiscíveis, sendo uma fase fixa que tem uma grande área superficial chamada fase estacionária, e a outra um fluido que se move através da fase estacionária sendo chamada de fase móvel (Rutz, 2009).

No esquema que se segue faz-se a classificação da cromatografia com base no estado físico das fases móvel e estacionárias.



Esquema 1 - *Tipos de cromatografia*

Para o presente trabalho foram usadas as seguintes técnicas cromatográficas:

- Cromatografia em camada fina (TLC);
- Cromatografia em coluna (CC).

4.5.1. Cromatografia em Camada Fina (TLC)

A separação consiste no deslocamento diferencial sobre uma camada fina de adsorvente retido sobre uma superfície plana. O processo de separação fundamenta-se na adsorção, mas quando são utilizadas fases estacionárias tratadas pode ocorrer partição ou troca iónica, podendo então ser utilizada tanto na separação de substâncias hidrofóbicas como hidrofílicas (Vogel, 2002).

4.5.1.1. Técnica da cromatografia em camada fina

4.5.1.1.1. Preparação da placa

Vários adsorventes podem ser usados em TLC porém sílica gel é o mais comum. Uma suspensão do adsorvente é depositada uniformemente sobre a placa, com o auxílio de um dispositivo próprio. A espessura de adsorvente recomendada é de 150-250 μ m. Após secagem em estufa a 80-90⁰C por cerca de 30 minutos, a placa está pronta para o uso (Vogel, 2002).

4.5.1.1.2. Preparação do eluente

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

Deve-se preparar a mistura eluente e mantê-la fechada e evitar a evaporação da mistura eluente para não se alterar a composição desta (Zunguze, 2010).

4.5.1.1.3. Aplicação da amostra

A linha de origem, na qual se aplica a amostra, está usualmente 2.0 a 2.5 cm da extremidade inferior da placa. As amostras são aplicadas com auxílio de uma seringa ou um tubo capilar calibrado usando-se volumes de 1, 2 ou 5 μ l (Vogel, 2002).

4.5.1.1.4. Desenvolvimento da placa

A cromatografia é usualmente desenvolvida com a técnica ascendente, na qual a placa é imersa 0.5cm no solvente de desenvolvimento. Colocam-se fitas de papel de filtro nas paredes da cuba, mergulhados no solvente para garantir que a cuba fique saturada com vapor de solvente. Permite-se o desenvolvimento até que a frente de solvente atinja a distância necessária (usualmente 10 a 15 cm), remove-se a placa e marca-se a posição da frente do solvente com um objecto pontudo. Seca-se a placa ao ar ou em estufa, mas deve-se considerar a sensibilidade da amostra ao calor e à luz. Os diversos solutos separados podem ser localizados por diferentes métodos (Vogel, 2002).

4.5.1.1.5. Métodos de revelação

Substâncias coloridas podem ser vistas directamente sobre a fase estacionária. Substâncias incolores podem ser detectadas através de um reagente apropriado que colore as regiões ocupadas pelas manchas. Os métodos de revelação podem ser:

Métodos não-destrutivos

- Radiação visível e UV (254 nm e 366 nm)
- Vapor de iodo
- Água
- Indicadores de pH (bromocresol / bromofenol)

Métodos destrutivos

- 50% H₂SO₄ / 110 °C
- 5% Dicromato de potássio ou 5% ácido nítrico em 40% H₂SO₄ seguido de aquecimento a 110 °C, UV (vitaminas) / água (hidrólise - ésteres) / iodo (ácidos gordos poliinsaturados)
- Reagentes específicos são conhecidos para quase todas as classes de compostos (Vogel, 2002).

4.5.1.1.6. Medida e identificação de solutos

Sob condições constantes de temperatura qualquer soluto move-se com uma razão constante em relação à frente do solvente.

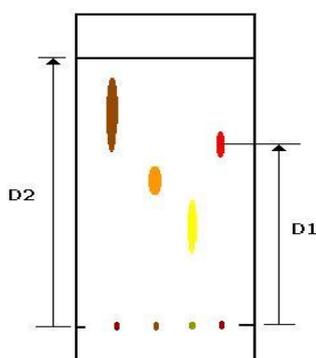


Figura 6 - *Determinação prática do Rf*

Esta razão é conhecida como valor R_f (frente relativa ou factor de retenção), onde:

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

Para efectuar a análise qualitativa em TLC é necessário empregar soluções padrão para a comparação dos índices de retenção (R_f) destes com os do analito. Caso sejam coincidentes e as manchas apresentarem a mesma aparência (côr) pode-se concluir tratar-se do mesmo composto mas, todavia carece de confirmação a partir de outros métodos analíticos (por exemplo: espectrometria de massa, espectrometria de infravermelho entre outros) (Degani *et al*, 1998).

4.5.1.1.7. Vantagens e Desvantagem da TLC

Vantagens

- Técnica simples e versátil: aplica-se a quase todas as classes de compostos.
- Usa-se pequenas quantidades de amostra.
- A separação pode ser obtida com custos razoáveis: bom adsorvente e solventes puros.
- As separações podem ser obtidas em tempos relativamente curtos.
- O processo de separação é visível e pode ser melhorado alterando adsorventes ou a fase móvel ao contrário de GC e HPLC.
- Permite que se analisem na mesma placa varias amostras ao mesmo tempo. Numa placa de 20x20 cm, podem se analisar simultaneamente cerca de vinte amostras (Vogel, 2002).

Desvantagem

É muito lento, maior tempo de análise que implica grande perda de água e maior consumo de corrente eléctrica. A substância a ser extraída é aquecida durante muito tempo, correndo o risco de sofrer transformações como oxidação, hidrólise, entre outros (Zunguze, 2010).

4.5.2. Cromatografia em coluna normal (CC)

Este processo baseia-se nas interações do soluto com os centros activos de um adsorvente sólido finamente dividido que é a fase estacionária. Esta técnica pode ser usada para o fraccionamento dos compostos da mistura de acordo com a sua polaridade, podendo também ser usada como uma técnica de pré-purificação (Vogel, 2002).

4.6. Métodos espectroscópicos

Quando uma molécula absorve energia de uma radiação electromagnética, pode ocorrer vários tipos de excitação, como, por exemplo, excitação electrónica, excitação rotacional, excitação que induz a trocas de spin electrónicos, etc; inclusive pode produzir-se ionização se a energia disponível é de ordem do potencial de ionização da molécula e consegue expulsar um electrão. Todas estas absorções aparecem em regiões diferentes do espectro electromagnético posto que cada modo de excitação requer uma quantidade específica de energia (Allinger, *et al* 1991).

A luz visível, os raios X, os microondas, as ondas de rádio, e assim por diante, todas são diferentes tipos de radiação electromagnética. Colectivamente, esses tipos compõem o espectro electromagnético (McMurry, 2006).

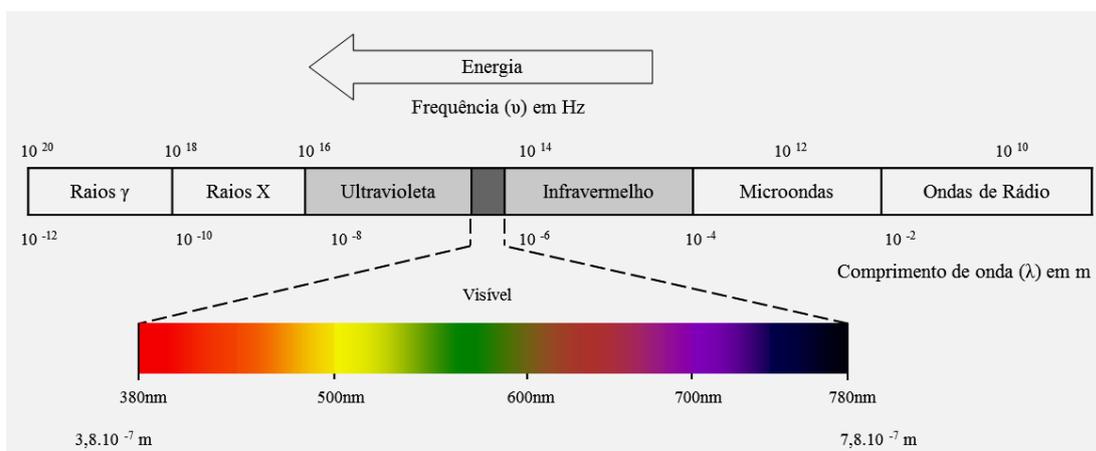


Figura 7 - Espectro electromagnético envolvendo uma faixa contínua de comprimentos de onda e frequência, desde ondas de rádio até os raios gama (γ) na região de alta frequência.

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, ultravioleta (UV), visível, infravermelha (IV), microondas e radiofrequência (RF) (SKOOG, *et al* (2006).

4.6.1. Espectroscopia Visível e Ultravioleta (UV-Vis)

A espectrofotometria visível e ultravioleta é um dos métodos analíticos mais usados nas determinações analíticas em diversas áreas. É aplicada para determinações de compostos orgânicos e inorgânicos, como, por exemplo, na identificação do princípio activo de fármacos.

A espectroscopia de absorção molecular é valiosa para a identificação dos grupos funcionais na molécula. Mais importante, entretanto, são as aplicações da espectroscopia de absorção visível/ ultravioleta para a determinação quantitativa de compostos contendo grupos absorventes.

A região ultravioleta do espectro é geralmente considerada na faixa de 200 a 400 nm, e a região do visível entre 400 a 800 nm. As energias correspondentes a essas regiões são ao redor de 150 a 72 k.cal.mol⁻¹ na região ultravioleta, e 72 a 36 k.cal.mol⁻¹ para a região visível (Lemos, *et al*. 2009).

4.6.1.1. Procedimentos Analíticos em Espectrofotometria UV-Vis

Análise qualitativa: pela análise da absorvância é possível determinar qual espécie química esta presente na amostra. Também é possível detectar contaminações ou processos de decomposição de matérias-primas pela comparação dos espectros de absorção da matéria e do padrão da mesma (Lemos, *et al*. 2009).

Análise quantitativa: a condição essencial para qualquer determinação por espectrofotometria no visível e ultravioleta é a observação da lei de Beer.

Outras condições como pH, técnicas de extracção por solventes, ajuste do estado de oxidação, remoção prévia dos interferentes, controle da força iónica do meio, e as variações das temperaturas também são observadas (Lemos, *et al*. 2009).

4.6.2. Espectroscopia no Infravermelho (IV)

A radiação infravermelha corresponde à parte do espectro electromagnético situada entre as regiões do visível e dos microondas (Silverstein *et al.*, (2006).

A espectroscopia de infravermelho é um tipo de espectroscopia de absorção e usa a região do infravermelho do espectro electromagnético. Baseia-se no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula (chamados nesse caso de níveis vibracionais). A radiação no infravermelho faz com que os átomos ou grupos de átomos de compostos orgânicos vibrem com amplitude aumentada ao redor das ligações covalentes que os ligam. Uma vez que os grupos funcionais das moléculas orgânicas incluem arranjos específicos de átomos ligados, a absorção da energia no IV por uma molécula orgânica ocorrerá de uma maneira características dos tipos de ligações e átomos presentes nos grupos funcionais específicos daquela molécula. Essas vibrações são quantizadas e, à medida que elas ocorrem, os compostos absorvem energia no IV em regiões específicas da parte IV do espectro. Por espectrometria IV podem-se analisar amostras gasosas, líquidas e sólidas (Barbetta, *et al.*).

4.6.3. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os núcleos de certos átomos, na espectroscopia de ressonância magnética nuclear consideram-se, como os electrões, animados de *spin*. A rotação destas partículas carregadas – rotação de carga – gera um *momento magnético* orientado segundo o eixo do spin, o que significa que estes núcleos funcionam como minúsculas barras magnéticas.

Um desses núcleos, precisamente aquele em que estaremos interessados, é o do átomo do hidrogénio ordinário, ^1H , ou seja, o *protão*. Segundo a Mecânica Quântica, se colocar um protão num campo magnético externo, o respectivo momento magnético pode orientar-se de uma das duas maneiras seguintes: *com* ou *contra* o campo externo. O alinhamento segundo o sentido do campo é o mais estável e terá de haver absorção de energia para fazer saltar o minúsculo magnete protónico para o alinhamento menos estável, contra o campo.

A energia mínima necessária para operar esta inversão do protão depende, como se poderia esperar, da intensidade do campo externo: quanto mais forte for o campo, tanto maior será a tendência para se manter o alinhamento, e mais alta será a frequência da radiação necessária para efectuar a inversão (Solomons, *et al.* 2006).

4.6.4. Espectroscopia de Massa (MS)

Na espectroscopia de massa, as moléculas são bombardeadas com um feixe de electrões de alta energia. As moléculas ionizam-se e cindem-se em muitos fragmentos, algumas das quais são iões positivos. Cada espécie de iões possui determinado valor da razão da massa para a carga, ou valor m/z . Como na maioria dos iões, a carga é 1, m/z é simplesmente a massa do ião (Solomons, *et al.* 2006).

4.7. Métodos de identificação qualitativa das classes dos metabólitos secundários

Embora uma planta possa conter centenas de metabólitos secundários, apenas os compostos presentes em maior concentração são geralmente isolados e estudados pela fitoquímica clássica.

4.7.1. Detecção de Alcalóides

Extractos secos são dissolvidos individualmente em ácido clorídrico diluído e em seguida filtrados.

Teste de Mayer

Os filtrados são tratados com reagente de Mayer (Tetraiodomercurato de potássio $K_2[HgI_4]$). A formação de um precipitado de cor amarelo indica a presença de alcalóides.

Teste de Wagner

Os filtrados são tratados com reagente de Wagner (Iodo em Iodato de Potássio I_2/KI). A formação de um precipitado de cor marrón- vermelho indica a presença de alcalóides.

Teste de Dragendorff

Os filtrados são tratados com reagente de Dragendorff (Tetraiodobismutato de potássio $K[HgI_4]$). A formação de um precipitado de cor vermelho ou castanho indica a presença de alcalóides.

Teste de Hager

Os filtrados são tratados com reagente de Hager (solução saturada de ácido pícrico). Presença de alcalóides é confirmada pela formação de um precipitado de cor amarelo.

4.7.2. Detecção de Glicósidos

Os extractos são hidrolisados com ácido clorídrico diluído e depois são submetidos ao teste de glicósidos.

Teste de Borntragers modificado

Os extractos hidrolisados são tratados com solução de cloreto férrico e imersos em água em ebulição cerca de 5 minutos. A mistura é arrefecida e é extraída com iguais volumes de benzeno. A camada de benzeno é separada e tratada com solução de amónia. Formação de cor-de-rosa na porção amoniacal indica a presença de antranol glicósidos.

4.7.3. Detecção de Saponinas***Teste de espuma***

Os extractos são diluídos com água destilada para 20 mL e são agitados num cilindro graduado até 15 minutos. Formação de 1 cm de camada de espuma indica a presença de saponinas. Ou, 0,5 mg de extracto são agitados em 2 mL de água. Se for produzido uma espuma persistente durante 10 minutos indica a presença de saponinas.

4.7.4. Detecção de Fitosteróis***Teste de Salkowski***

Os extractos são tratados com clorofórmio e filtrados se necessário. Os filtrados são tratados com gotas de ácido sulfúrico concentrado, agitar e deixar em repouso. O aparecimento de cor amarelo dourado indica a presença de Triterpenos.

Teste de Libermann-Burchard

Os extractos são tratados com clorofórmio e filtrados se necessário. O filtrado é tratado com gotas de anidrido acético, aquece-se e arrefece-se. Adiciona-se o ácido sulfúrico concentrado. Formação de anel castanho na junção indica a presença de fitoesteróis.

4.7.5. Detecção de Fenóis***Teste de cloreto férrico***

Extractos secos são tratados com algumas gotas da solução de cloreto férrico. A formação de cor preta azulada indica a presença de fenóis.

4.7.6. Detecção de Taninos***Teste de gelatina***

Para o extracto, é adicionado uma solução de gelatina a 1% contendo cloreto de sódio. A presença de taninos é confirmada pela formação de um precipitado branco.

4.7.7. Detecção de Flavonóides***Teste do reagente alcalino***

Os extractos são tratados com algumas gotas da solução de hidróxido de sódio. A formação de uma cor amarela intensa que poderá desaparecer depois de adição de um ácido diluído, indica a presença de flavonóides.

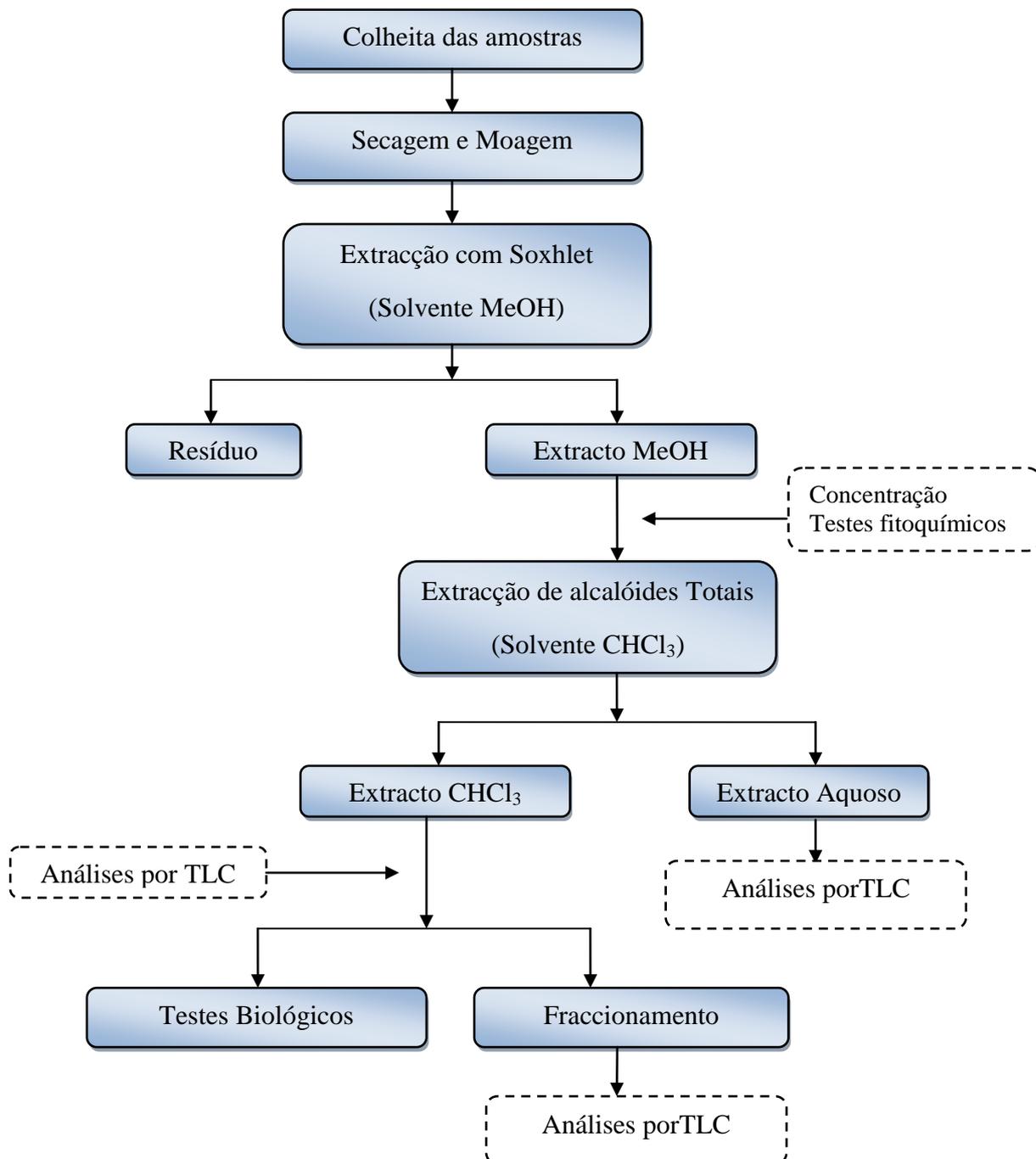
Teste de acetato de chumbo

Os extractos são tratados com poucas gotas de solução de acetato de chumbo. A presença de flavonóides é confirmada pela formação de precipitado de cor amarelo.

5. PARTE EXPERIMENTAL

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

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



Esquema 2 - Esquema geral seguido no trabalho

5.1. Colheita e identificação botânica da planta

As raízes das plantas em estudo foram colhidas nas províncias de Gaza (*S. henningsii*) e Maputo (*Z. capense*) e identificadas segundo nomenclatura científica e vernacular, no Herbário do Departamento das Ciências Biológicas da UEM.

5.2. Secagem e moagem das amostras

Amostras: *Z. capense* (cascas das raízes) e *S. henningsii* (parte lenhosa das raízes).

A secagem da amostra procedeu-se em duas fases sendo que a primeira fase de secagem foi realizada à temperatura ambiente durante 45 dias no laboratório dos produtos naturais do Departamento de Química da UEM, enquanto a segunda fase de secagem decorreu durante cerca de 10 dias, secagem esta que foi realizada na estufa (Scientific – series 2000) a uma temperatura regulada de 50° C.

A moagem das raízes foi feita no laboratório dos produtos naturais do Departamento de Química da UEM.

5.3. Preparação dos extractos

Método de extracção sólido-líquido usado para a realização deste trabalho, foi a extracção por Soxhlet. O solvente usado foi o MeOH a 85%.

5.3.1. Extracção por Soxhlet

21.61g do pó das cascas das raízes de *Z. capense* foram submetidos a um refluxo contínuo com o MeOH a 85% durante 24h horas, isto é, até a descoloração completa da solução no soxhlet.

Seguiu-se o mesmo procedimento para 80.52g do pó das raízes (parte lenhosa) de *S. henningsii*, durante 36h.

5.3.2. Evaporação do solvente

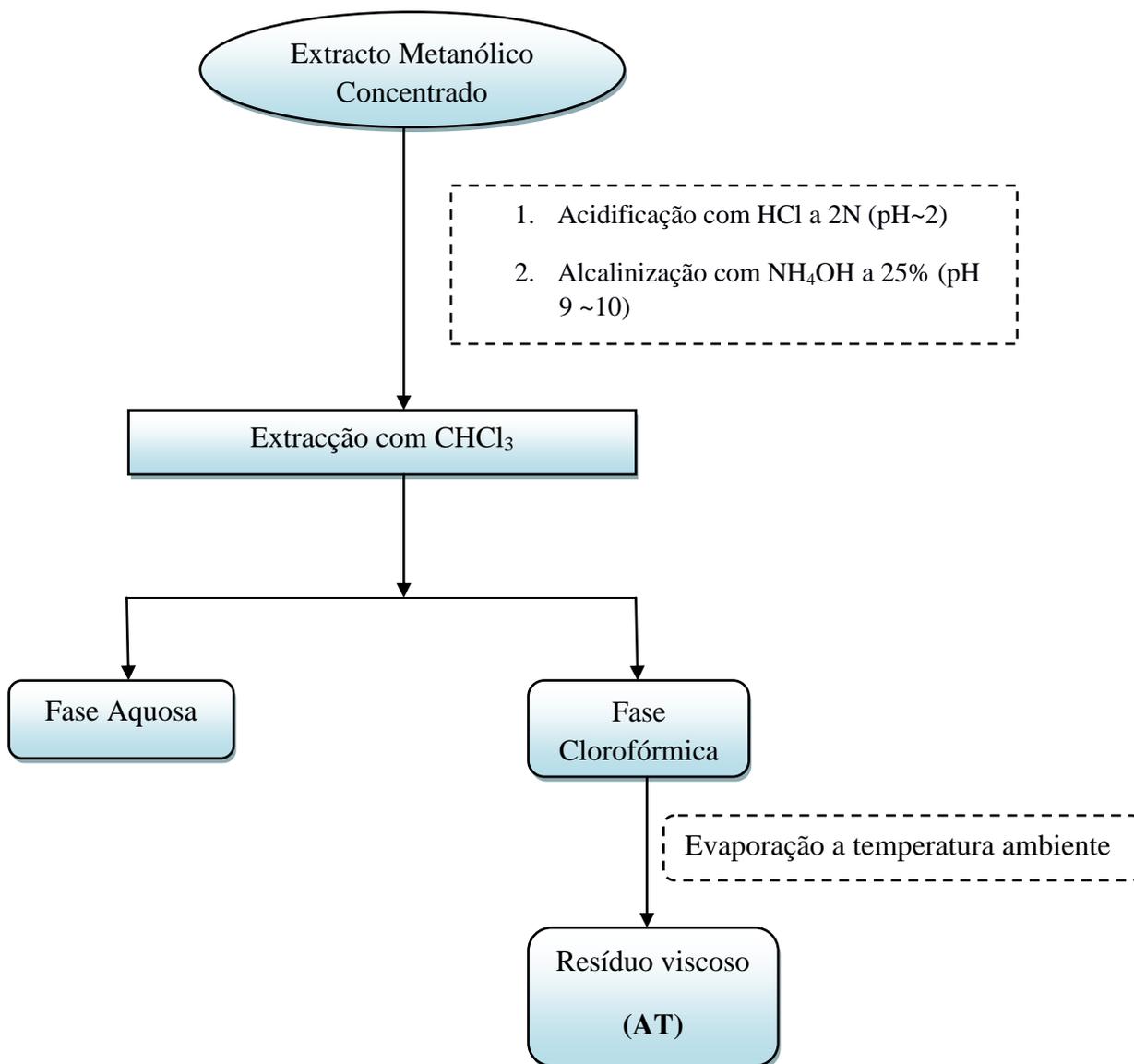
Os extractos (com princípios activos) obtidos a partir das raízes das plantas foram concentrados no rotavapor da marca Büchi R-250/215 (fig. 1 anexo IV) acoplado com bomba de vácuo e temperatura de banho-maria de 60 °C, e rotação do balão a 100, e depois submetidos a procedimentos químicos de isolamento de alcalóides. Os dados relativos ao processo de extracção e concentração dos extractos estão apresentados na tabela que se segue.

Tabela 2: Nome científico com dados da extracção e concentração do extracto bruto

Material Vegetal	Massa da amostra (g)	Volume do MeOH (mL)	Extracto concentrado (g)	Percentagem (p/p)
<i>Z. capense</i>	21.61	200	3,034	14%
<i>S. henningsii</i>	80.52	200	18,332	22,8%

Para atingir os objectivos traçados neste trabalho, foram realizados alguns ensaios preliminares, análises de diferentes procedimentos químicos de isolamento e identificação de Berberina e seus análogos, usando a amostra de *Z. capense*, como se pode ver no fluxograma do anexo I. Deste conjunto de experimento, um método foi adoptado devido a sua simplicidade, e por outro lado facilidade de se poder analisar o número grandioso das amostras, como se descreve no Esquema 3.

5.4.Procedimento usado para extracção de Alcalóides Totais (AT)



Esquema 3 – *Extracção dos alcalóides totais*

Este método é baseado na propriedade de Berberina e seus análogos (alcalóides com nitrogénio quaternário) terem um comportamento distinto em diferentes condições de pH (Furaya, et al.1972), como se pode ver na equação da reacção abaixo.

Com acidificação da solução, Berberina passa para forma de sal (forma II) que é solúvel em H₂O, e agitação com Éter dietílico vai solubilizar os outros compostos (não solúveis em H₂O).

Tornando a solução alcalina (pH 9~10), a forma de sal é convertida em base livre (forma I), que é solúvel em CHCl_3 (fase orgânica).



5.4.1. Extração dos alcalóides totais

Zanthoxylum capense

15 mL de extracto metanólico concentrado teve o seguinte procedimento:

- ✓ Foi acidificado com 6 mL de HCl a 2N e houve aparecimento de turvação da solução;
- ✓ Com adição de 15 mL de Éter dietílico e agitação enérgica, a turvação desapareceu e a solução adquiriu a cor castanho-claro;
- ✓ Alcalinizou-se com 2 mL de NH_4OH a 25%, e a solução adquiriu a cor castanho-escuro;
- ✓ Foi agitado energeticamente com 20 mL de CHCl_3 e deixado em repouso durante 24h, onde houve separação de duas fases, clorofórmica e aquosa, que posteriormente foram separados e usadas para TLC.

Strychnos henningsii

4 mL de extracto metanólico concentrado teve o seguinte procedimento:

- ✓ Foi acidificado com 1,5 mL de HCl a 2N e houve aparecimento de turvação de cor amarela que com agitação a solução adquiriu a cor castanha;
- ✓ Com a adição de Éter dietílico a solução dividiu-se em duas camadas, nomeadamente, castanha escura em baixo e castanha clara em cima;

- ✓ Alcalinizou-se a solução de duas camadas com 0,10 mL de NH_4OH , e a solução adquiriu uma cor vermelha, que com agitação passou a ter duas camadas, escura em baixo e clara em cima;
- ✓ De seguida foi agitado energeticamente com 10 mL de CHCl_3 e deixado em repouso durante 24h, onde houve separação de duas fases, clorofórmica (castanha clara) e aquosa (escura), que posteriormente foram separados e usadas para TLC.

5.4.2. Teste fitoquímico para identificação qualitativa de Alcalóides

Dividiram-se os extractos obtidos em volumes iguais, por 2 tubos de ensaio:

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

Tubo 2 – Adicionou-se 3 gotas de DGR

5.4.3. Preparação da Amostra – Padrão de Berberina

0.0526g de cristais amarelo de Cloreto de Berberina (Fluka: $(\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{ClONO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$ [5956-60-5] $\text{Mr}=407.86$ g/ml, pureza assay $\geq 90\%$ (AT), m.p 204-206 dec.), foi dissolvido em 50 mL de H_2O destilada (solução amarela pH 6) e alcalinizada com 30 gotas de NH_4OH a 25% até pH 10 (solução de cor alaranjada). De seguida procedeu-se a extracção com CHCl_3 , separando-se a fracção aquosa (cor amarela acastanhado) da fracção clorofórmica (30 mL de solução castanha), contendo Berberina em forma de base livre, que foi usado como padrão de referência nas análises.

5.4.4. Análise por TLC do extracto clorofórmico de *Z. capense*

O extracto clorofórmico obtido foi submetido à análise por TLC junto com a amostra padrão usando como fase estacionária sílica gel 60 F_{254} (Merck) sobre as placas comerciais de alumínio (20 x10 cm) e em dois sistemas de eluição [$n\text{-BuOH}$ -Acetato de etilo-AcOH- H_2O (30:50:10:10) e $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (3:1)]

5.4.5. Fraccionamento dos extractos por CC

5.4.5.1. Preparação da amostra

20 mL do extracto clorofórmico de *Z. capense* foram evaporados a temperatura ambiente obtendo-se alcalóides em forma de cristais.

5.4.5.2. Montagem e Enchimento da coluna

Enche-se a coluna de vidro com sílica gel 60 até uma altura de 10 cm, comprimindo-se muito bem com ajuda de uma vareta de vidro.

A amostra é introduzida do mesmo modo, separando-a da sílica gel por meio de um filtro (algodão). Compacta-se a amostra sobre a sílica gel e coloca-se novamente o algodão na extremidade superior (fig.4 anexo IV).

5.4.5.3. Eluição

Para a separação dos compostos em análise usou-se as seguintes fases:

- ✓ **Fase estacionária:** Silica gel 60 F₂₅₄;
- ✓ **Fase móvel (eluente):** Solução de CHCl₃ (75mL), seguido de misturas de CHCl₃ – MeOH (75mL cada) e finalmente MeOH (75mL), de menos polar para mais polar como se indica na tabela no sentido de solução de 1 à 6.

Tabela 3: Sistema de solventes (% v/v) usado na CC

<i>Solução 75 mL</i>	<i>% de CHCl₃</i>	<i>% de MeOH</i>
1	100	0
2	90	10
3	85	15
4	80	20
5	50	50
6	0	100

5.4.6. Análise por TLC das fracções de *Z. capense* obtidos por CC

As 24 fracções obtidas por CC foram submetidas a análise por TLC em placas de Sílica gel 60 F₂₅₄ e foram depois pulverizadas com DRG e aquecidas a 100 °C.

Os sistemas de eluição usados para esta análise são: n-BuOH-Acetato de etilo-AcOH-H₂O (30:50:10:10) e CHCl₃-MeOH (3:1).

5.4.7. Testes de actividade biológica

5.4.7.1. Testes antimicrobianos

Com vista a avaliar a actividade antimicrobiana e determinar as respectivas CIMs (Concentrações Inibitória Mínimas) nos extractos das raízes contra alguns microrganismos, foram utilizados dois métodos principais:

- Método de difusão em agar e
- Método de diluição.

a) Equipamentos para testes antimicrobianos

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

b) Material de vidro

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

c) Reagentes

- Água destilada
- Solução de metanol a 50%

d) Meios de cultura

- Agar sangue
- Agar sabouraud
- Agar McConkey

e) MicrorganismosTabela 4: *Microrganismos e suas características*

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

5.4.7.1.1. Preparação dos meios de cultura

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

8. Esterilizar em autoclave a 121°C (1 atmosfera de pressão) por 20 minutos e já estão prontas para os ensaios.

Após a preparação das placas com meios de cultura e espalhados os microrganismos, foram colocados em cada placa 4µL das amostras em concentrações mais elevadas de 200 mg/mL sobre os microrganismos e posteriormente incubadas por 24 h a 37 °C. Este procedimento preliminar tinha como objectivo apurar se os extractos eram ou não activos contra os microrganismos. Os resultados estão apresentados na tabela 7.

5.4.7.1.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os extractos à concentração máxima de 200 mg/mL que exibiram actividade antibacteriana foram diluídos para 150, 100, 50 e 25 mg/mL. Foram tomados 4µL de cada concentração, os quais foram impregnados nas placas de Petri contendo os respectivos meios de cultura. Após a incubação a 37 °C durante 24 h as concentrações mais baixas que não permitem a visualização dos halos de inibição foram consideradas como sendo as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs). Os resultados alcançados estão ilustrados nas tabelas 8, 9, 10, e 11 respectivamente.

5.4.7.2. Testes antiparasitários

O teste in vitro de inibição de eclosão de ovos é realizado para verificar o efeito inibitório de um composto (natural ou não) na eclosão dos ovos.

Neste teste, podem ser utilizados controlos positivos, com drogas padrões conhecidas, para comparar o percentual de eficácia do produto natural em relação ao sintético.

a) Equipamentos para testes

antiparasitários

- BOD
- Balança analítica
- Peneiras de 1mm, 105µL, 55µL e 25µL
- Tubos de Falcon
- Centrífuga
- Vórtex
- Microscópio

b) Material de vidro

- Copos de Becker
- Erlenmeyers
- Proveta graduada
- Placas de 24 poços
- Pipeta

c) Reagentes

- Água destilada
- Solução salina saturada
- Tween 80

5.4.7.2.1. Recuperação de ovos nematóides gastrointestinais

- Colectar fezes do reto de animais infectados que apresentam OPG acima de 2000 ovos.
- Pegar uma porção das fezes, macerar e acrescentar água aquecida.
- Filtrar o material fecal em quatro peneiras com as seguintes reticulações: 1mm, 105µm, 55µm e 25µm.
- Lavar a peneira de 25µm com água destilada, com auxílio de pisseta, para retirar os ovos que ficaram retidos.
- Colocar este conteúdo em um Béquer e posteriormente transferi-lo para tubos Falcon.
- Colocar os tubos Falcon em centrífuga por 5 min a 3000 rpm.
- Após a centrifugação, descartar o sobrenadante, completar com solução salina saturada para a ressuspensão do sedimento.
- Centrifugar por 5 min a 300 rpm
- Após a centrifugação, despejar o sobrenadante na peneira de 25µm e lavar com água destilada (caso suspensão fique suja, repetir a centrifugação com solução salina saturada).
- Despejar o conteúdo da peneira em um cálice de decantação (1h); deixar a temperatura ambiente.

5.4.7.2.2. Teste de eclodibilidade larvar

Foram colectados aproximadamente 100 ovos/poço em placas de 24 poços e adicionados os tratamentos fitoterápicos, controlo positivo e controlo negativo. O extracto vegetal foi adicionado em 4 concentrações diferentes. Como controlo positivo utilizou-se o tiabendazole a 5%.

O controlo negativo é composto água destilada e Tween 80 na mesma concentração utilizada nos extractos. Para cada tratamento e controlo foram preparadas 3 repetições.

E por último foram identificadas as placas e acondicionadas em BOD de 27^oC por 24h. E após 24h foram feitas as leituras e calculadas as percentagens da inibição da eclosão do ovos. Os resultados estão apresentados nas tabelas 12.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Testes fitoquímicos

➤ *Teste fitoquímico para identificação qualitativa de Alcalóides*

Precipitados brancos com o reagente de Mayer e amarelos com o de Dragendorff são indicativos da provável presença dos alcalóides em *Zanthoxylum capense* e *Strychnos henningsii*, respectivamente.

➤ *Análise cromatográfica por TLC do extracto clorofórmico*

Zanthoxylum capense

No cromatograma C.1 do anexo II (TLC-I), do extracto clorofórmico, há uma mancha pouco visível que após ser revelada com a solução de DRG a luz visível obteve uma coloração castanha com R_f igual a 0.46 que é igual ao R_f teórico de Berberina neste sistema.

No cromatograma C.2 do anexo II (TLC-I), do extracto clorofórmico, apresenta uma mancha pouco visível que após ser revelada com a solução de DRG a luz visível obteve uma coloração amarela com R_f igual a 0.46 que confirma a presença de Berberina.

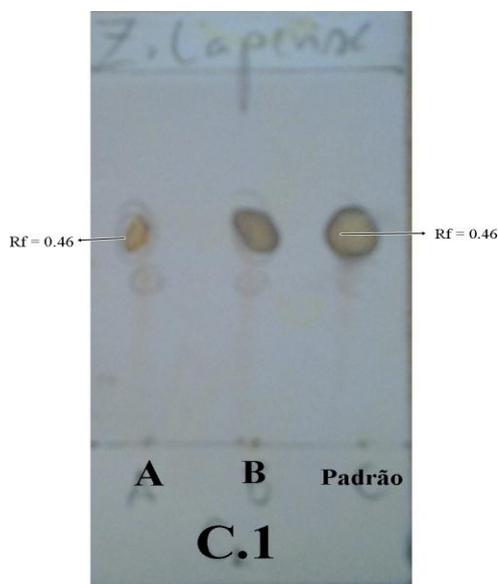


Figura 8: Cromatograma do extracto clorofórmico de *Zanthoxylum capense* no sistema eluente $CHCl_3 - MeOH$ (3:1)

Strychnos Henningsii

No cromatograma C.1 do anexo II (TLC-II), do extracto clorofórmico, há uma mancha pouco visível que após ser revelada com a solução de DRG a luz visível obteve uma coloração castanha com R_f igual a 0.02.

Cromatograma C.2 do anexo II (TLC-II), do extracto clorofórmico, apresenta uma mancha pouco visível que após ser revelada com a solução de DRG a luz visível obteve uma coloração amarela com R_f igual a 0.01.

➤ *Análise por TLC das 24 fracções de Z. capense obtidas por CC*

- Sistema eluente $\text{CHCl}_3 - \text{MeOH}$ (3:1)

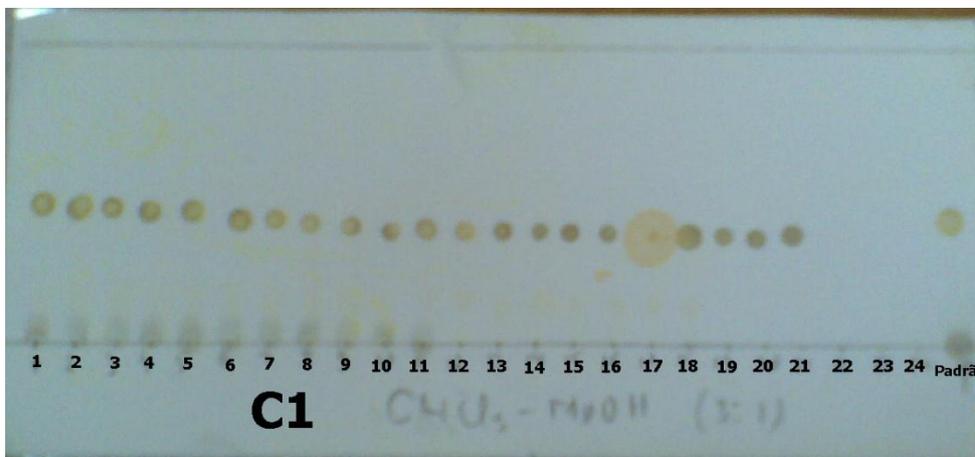


Figura 9: Cromatogramas das 24 fracções de *Zanthoxylum capense* obtidas por CC

Tabela 5: Resultado de TLC das 24 fracções de *Zanthoxylum capense* obtidas por CC

N ^o	Fracção	Dados experimentais	
		R _f	Cores das manchas após revelação com DRG
	Amostra-Padrão	0.46	Castanho claro
I	1 - 3	0.45-0.47	Castanho claro
II	4 - 6	0.44-0.45	Castanho
III	7 - 10	0.42-0.44	Castanho fraco
IV	11 - 14	0.41-0.42	Castanho fraco
V	15 - 20	0.40-0.42	Castanho muito fraco
VI	21 - 24	-----	Não visível

As 24 fracções foram depois agrupadas em 6 fracções segundo o seu perfil cromatográfico como ilustram os cromatogramas C.1 e C.2 no anexo II (**TLC-III**).

- As fracções de 1 a 3 (agrupadas na **fracção I**) apresentaram manchas bem visíveis com R_f no intervalo 0.45-0.47, todas com cor castanho claro. Os valores de R_f estão muito próximos de 0,46 da amostra padrão com uma pequena diferença de ± 0.01 unidades.

- As fracções 4 a 6 (agrupadas na **fracção II**) apresentaram manchas bem visíveis com R_f no intervalo 0.44-0.45, todas com cor castanha. Os valores de R_f estão próximos de 0,46 da amostra padrão com uma diferença máxima de 0.02 unidades.

- As fracções de 7 a 10 (agrupadas na **fracção III**) apresentaram manchas bem visíveis com R_f no intervalo 0.42-0.44, todas com cor castanha. Os valores de R_f estão um pouco abaixo de 0,46 da amostra padrão.

- As fracções de 11 a 14 (agrupadas na **fracção IV**) apresentaram manchas bem visíveis com R_f no intervalo 0.40-0.42, todas com cor castanho fraco. Os valores de R_f estão um pouco abaixo de 0,46 da amostra padrão.

- As fracções 15 a 20 (agrupadas na **fracção V**) apresentaram manchas bem visíveis com R_f no intervalo 0.44-0.45, todas com cor castanho fraco. Os valores de R_f estão pouco abaixo de 0,46 da amostra padrão.

- As fracções de 21 a 24 (agrupadas na **fracção VI**), não revelaram nenhuma mancha.

De acordo com os dados obtidos, e as características semelhantes existentes entre as manchas da amostra padrão e as fracções em análise agrupadas em I e em II, podemos afirmar que o composto presente nessas fracções é a Berberina.

E para as fracções agrupadas em III, IV e V que apresentam características pouco próximas da amostra padrão podem se tratar de compostos análogos da Berberina.

➤ **Análise por TLC das 6 fracções de *Z. capense* resultantes da análise das 24 fracções obtidas por CC**

- Sistema eluente $\text{CHCl}_3 - \text{MeOH}$ (3:1)

Tabela 6: Resultado de TLC das 6 fracções de *Zanthoxylum capense* obtidas por CC

N ^o	Fracção	Dados experimentais	
		R _f	Cores das manchas após revelação com DRG
	Amostra-Padrão	0.46	Castanho claro
I	1 - 3	0.46-0.47	Castanho claro
II	4 - 6	0.45-0.46	Castanho claro

Em seguida as 6 fracções foram submetidas a análise por TLC e agrupadas em 2 fracções, segundo o seu perfil cromatográfico como ilustram os cromatogramas C1 e C2 no anexo II (**TLC-IV**).

- As fracções de 1 a 3 (agrupadas na **fracção I**) apresentaram manchas bem visíveis com R_f no intervalo 0.46-0.47, todas com cor castanha. Os valores de R_f estão próximos de 0,46 da amostra padrão com uma diferença de 0.01 unidades.

- As fracções 4 a 6 (agrupadas na **fracção II**) apresentaram manchas bem visíveis com R_f no intervalo 0.45-0.46, todas com cor castanha. Os valores de R_f estão próximos de 0,46 da amostra padrão com uma diferença de 0.01 unidades.

De acordo estas características semelhantes existentes entre as manchas da amostra padrão e as fracções em análise agrupadas em I e em II, conclui-se que o composto presente nessas fracções é a Berberina.

➤ *Testes antimicrobianos*

Tabela 7: Resultados da actividade antimicrobiana dos extractos de *Z. capense* e de *S. henningsii*

Microrganismos	Zona de inibição (mm) para a concentração de 200mg/ml	
	<i>Z. capense</i> (Fracção CHCl ₃)	<i>S. henningsii</i> (Extracto MeOH)
<i>Candida sp</i>	2	---
<i>Salmonella sp</i>	3	2
<i>Staphylacoccus sp</i>	3	2
<i>Streptococcus sp</i>	2	---
<i>E. Coli</i>	---	---

--- Sem inibição

➤ *Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)*

Tabela 8: Determinação da CIM na *Salmonella sp*

<i>Z. capense</i> (Fracção CHCl ₃)						<i>S. henningsii</i> (Extracto MeOH)				
Conc. (mg/mL)	200	150	100	50	25	200	150	100	50	25
Halo (mm)	3	2	1	---	---	2	1	---	---	---

Tabela 9: Determinação da CIM na *Staphylacoccus sp*

<i>Z. capense</i> (Fracção CHCl ₃)						<i>S. henningsii</i> (Extracto MeOH)				
Conc. (mg/mL)	200	150	100	50	25	200	150	100	50	25
Halo (mm)	3	3	2	1	---	2	2	1	---	---

Tabela 10: Determinação da CIM na *Candida sp*

<i>Z. capense</i> (Fracção CHCl ₃)					
Conc. (mg/mL)	200	150	100	50	25
Halo (mm)	2	1	---	---	---

Tabela 11: Determinação da CIM na *Streptococcus sp*

<i>Z. capense</i> (Fracção CHCl ₃)					
Conc. (mg/mL)	200	150	100	50	25
Halo (mm)	2	1	---	---	---

Os testes antimicrobianos realizados sobre a fracção clorofórmica de *Z. capense* e do extracto metanólico *S. henningsii* usando os microrganismos: *E.coli*, *Candida sp*, *Salmonella sp*, *Staphylacoccus sp* e *Streptococcus sp*, mostraram que:

- ✓ A fracção clorofórmica de *Z. capense* inibe o crescimento da *Candida sp*, *Salmonella sp*, *Staphylacoccus sp* e *Streptococcus sp* respectivamente.
- ✓ O extracto metanólico de *S. henningsii* inibe o crescimento da *Salmonella sp* e *Staphylacoccus sp* respectivamente.
- ✓ Os extractos previamente testados (a uma concentração máxima de 200 mg/mL) e que inibiram o crescimento dos microrganismos, foram diluídos para 150, 100, 50 e 25 mg/mL a fim de se determinar as respectivas Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) pelo método de diluição, donde foi constatado que para a fracção clorofórmica de *Z. capense* podem ser usadas as concentrações inibitórias mínimas de 100 mg/mL contra a *Salmonella sp*, 50 mg/mL contra a *Staphylacoccus sp*, 150 mg/mL contra a *Candida sp* e 150 mg/mL contra a *Streptococcus sp*, e, para o extracto metanólico de *S. henningsii* podem ser usadas as concentrações inibitórias mínimas de 150 mg/mL contra a *Salmonella sp* e 100 mg/mL contra a *Staphylacoccus sp* conforme mostram os resultados nas tabelas 8, 9, 10 e 11 respectivamente.

➤ *Testes antiparasitários*

Tabela 12: Actividade dos extractos de *Z. capense* e *S. henningsii* em função da concentração para o número de ovos, larvas e a percentagem de inibição para eclosão dos ovos.

Concentração (%)	<i>Z. capense</i> (Fracção CHCl ₃)			<i>S. henningsii</i> (Extracto MeOH)		
	Ovos	Larvas	% Inibição	Ovos	Larvas	% Inibição
0.62	98	2	98	96	4	96
1.25	100	0	100	97	3	97
2.5	100	0	100	99	1	99
5	100	0	100	100	0	100
Controlo (+)	100	0	100	100	0	100
Controlo (-)	0	100	0	0	100	0

- ✓ A tabela 12 revela que a percentagem de inibição para eclosão dos ovos observada após 24h foi de 100,0%; 100,0%; 100,0%; e 98,0%, respectivamente nas concentrações de 5; 2,5; 1,25; e 0,62% para a fracção clorofórmico de *Z. capense*, e, 100,0%; 99,0%; 97,0%; e 96,0%, respectivamente nas concentrações de 5; 2,5; 1,25; e 0,62% para o extracto metanólico de *S. henningsii*.
- ✓ A percentagem de inibição para eclosão dos ovos submetidas à fracção clorofórmico de *Z. capense* e extracto metanólico de *S. henningsii* apresentaram eficiência de 100,0% na concentração máxima de 5% quando comparados ao controle positivo que também apresentou eficiência de 100% após 24h. Resultados esses que confirmam a maior eficácia dos extractos na inibição da eclosão dos ovos.
- ✓ A percentagem de inibição para eclosão dos ovos começa a decrescer a partir da concentração 0,62% para a fracção clorofórmico de *Z. capense* e 1,25% para o extracto metanólico de *S. henningsii*.
- ✓ As substâncias utilizadas como “controle negativo” tanto a água destilada quanto o Tween 80 não influenciaram na eclosão dos ovos.

7. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

7.1. Conclusões

Da pesquisa bibliográfica feita acerca da composição fitoquímica dos extractos das raízes das plantas estudadas justificam cientificamente o seu amplo uso na medicina tradicional para o tratamento de Malária, Tuberculose, Febre, Amebíase, etc.

Os testes fitoquímicos realizados sobre os extractos metanólicos das raízes de *Zanthoxylum capense* e *Strychnos henningsii* revelaram a presença de alcalóides, um grupo principal de metabólitos secundários.

Foi identificado a presença da Berberina na fracção clorofórmica de *Zanthoxylum capense* obtida do extracto metanólico, através de análises cromatográficas, usando como referencia os valores de R_f tabelados e o da Amostra-Padrão.

Os testes antimicrobianos realizados sobre os extractos das raízes das plantas revelaram que:

- ✓ A fracção clorofórmica de *Zanthoxylum capense* possui uma actividade significativa sobre a *Candida sp*, *Salmonella sp*, *Staphylacoccus* e *Streptococcus sp* respectivamente. As concentrações inibitórias mínimas determinadas foram de 100 mg/mL contra a *Salmonella sp*, 50 mg/mL contra a *Staphylacoccus sp*, 150 mg/mL contra a *Candida sp* e 150 mg/mL contra a *Streptococcus sp* respectivamente..
- ✓ O extracto metanólico de *Strychnos henningsii* possui uma actividade significativa sobre a *Salmonella sp* e *Staphylacoccus* respectivamente. As concentrações inibitórias mínimas foram de 150 mg/mL contra a *Salmonella sp* e 100 mg/mL contra a *Staphylacoccus sp* respectivamente.

Os resultados dos testes antiparasitários realizados sobre os extractos das raízes das plantas *Zanthoxylum capense* e *Strychnos henningsii* mostram que as duas plantas possuem uma actividade significativa sobre a eclosão dos ovos nematóides gastrointestinais de animais infectados.

A percentagem de inibição para eclosão dos ovos observada após 24h foi de 100,0%; 100,0%; 100,0%; e 98,0%, respectivamente nas concentrações de 5; 2,5; 1,25; e 0,62% para a fracção clorofórmico de *Z. capense*, e, 100,0%; 99,0%; 97,0%; e 96,0%, respectivamente nas concentrações de 5; 2,5; 1,25; e 0,62% para o extracto metanólico de *S. henningsii*.

A actividade antimicrobiana e antiparasitária do extracto de *Zanthoxylum capense* pode estar associada à existência de Berberina, um alcalóide conhecido como um fármaco com actividade poderosa, e que é actualmente empregue na prática médica.

7.2. Recomendações

Recomenda-se a realização de um estudo aprofundado de outras variedades de plantas afim de se apurar convenientemente a existência ou não dos alcalóides de grupo de Berberina e a realização de testes biológicos com espécies de microrganismos conhecidas.

O estudo das plantas deve ser realizado até o isolamento e purificação de Berberina e analisado por técnicas espectroscópicas de análise, para a confirmação total.

Atendendo e considerando a importância das plantas medicinais, que têm sido amplamente usadas como fonte alternativa para a obtenção de medicamentos curativos, e que a elucidação dos compostos responsáveis pela sua actividade ainda é muito reduzida, recomenda-se ao Departamento de Química da U.E.M, o melhoramento acrescido das condições e aparelhos cruciais para um melhor estudo das mesmas.

Recomenda-se também uma melhor coordenação entre as instituições ou órgãos responsáveis pela pesquisa e estudo das diferentes espécies com propriedades curativas e os praticantes da medicina tradicional em Moçambique, para uma melhor administração das plantas.

BIBLIOGRAFIA

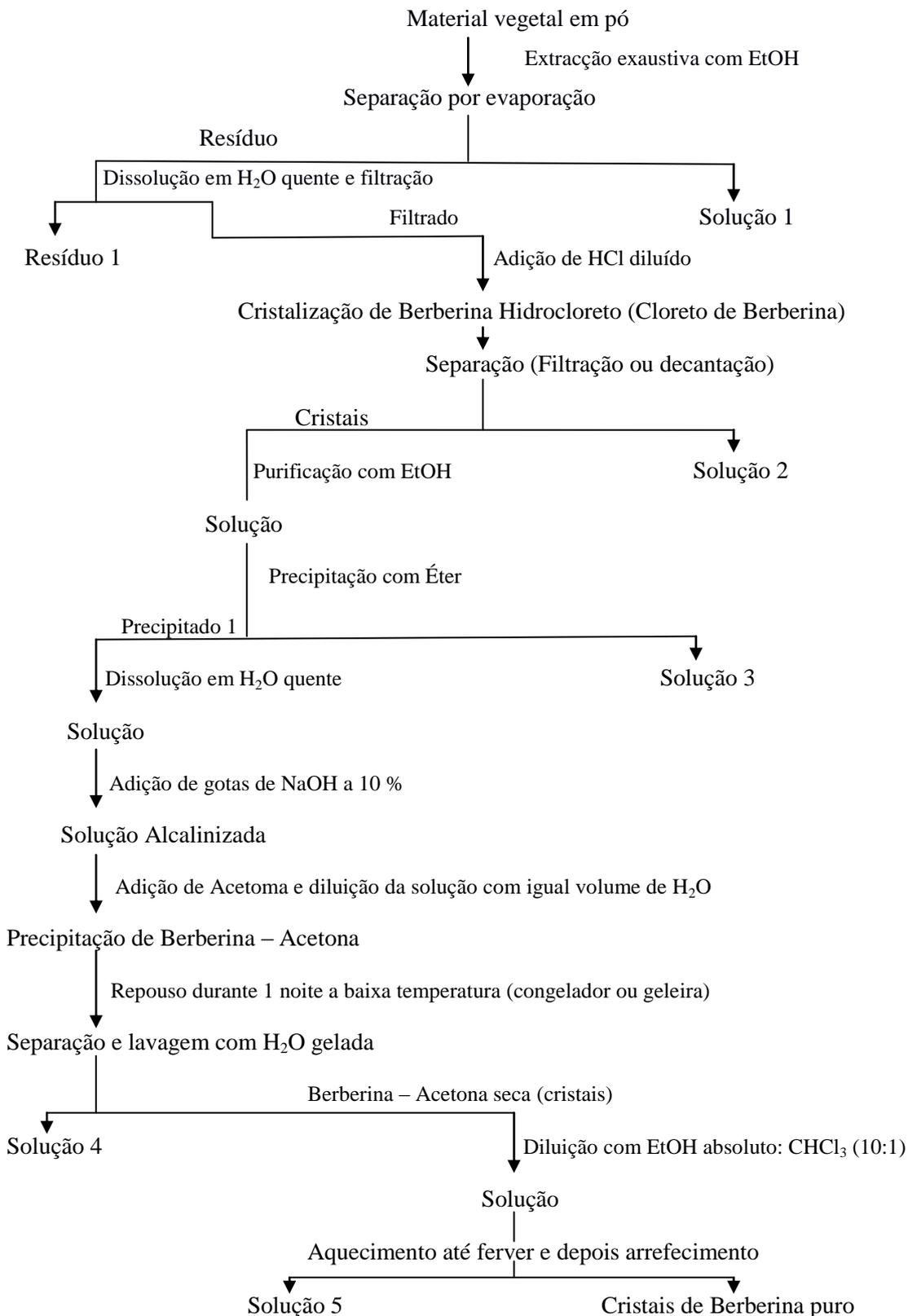
1. Allinger, Norman L. *et al* (1991); *Química Orgânica*; 2ª Edição; Editorial Reverté, S.A.; Barcelona; p. 287
2. Barbeta, Clarissa Magalhães; MAGINI, Máira Rodrigues, (2010). *Espectros Electromagnéticos na Região do Infravermelho: Utilização na Caracterização de Novos Materiais*; pp. 304-307
3. Barbosa, F.S.; Leite, G.L.D.; Alves, S.M.; Nascimento, A.F.; D'Ávila, V.A.; Costa, C.A. (2011). Insecticide effects of *Ruta graveolens*, *Copaifera langsdorffii* and *Chenopodium ambrosioides* against pests and natural enemies in commercial tomato plantation. *Acta Sci., Agron.*, 33(1): 37-43.
4. Boligon, A.A. (2008). *Estudo da Actividade Antimicrobiana de extractos e fracções obtidos a partir dos ramos de Scuma buxifolia Russk.* Tese de doutoramento. UFSM, p.13
5. Cicero AF; Rovati LC; Setnikar I., (2007). Eulipidemic effects of berberine administered alone or in combination with other natural cholesterol-lowering agents. A single-blind clinical investigation. *Arzneimittelforschung* 2007;57:26-30.
6. Constantino, M. G.; Da Silva, G. V. J.; Donate P. M., (2004). *Fundamentos de Química Experimental*. Vol. 53, Editora da Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, p.201
7. Dana, W Mayo. *et al.*, (1991). *Techniques for the Organic Laboratory*. p. 110. Jhon Willey & Sons Inc.
8. Degani, A.L.G.; Cass, Q.B.; Vieira, P.C., (1998). Cromatografia: um breve ensaio. *Actualidades em Química*, n.7, p.21-25
9. Diniz, L.P.; Maffia, L. A.; Dhingra, O.D.; Casali, V.W.D.; Santos, R.H.S.; Mizubuti, E.S.G. (2006) Avaliação de produtos alternativos para controle da requeima do Tomateiro. *Fitopatol. Bras.* 31(2): 171-179.
10. Furaya, Tsutomu; Syono, Kunihi and Akika, Ikuta. (1972). Isolation of Berberine from callus tissue of *Coptis Japonica*. *Phytochemistry*, Volume 11, Issue 1, January, p.175. School of Pharmaceutical Sciences, Kltasato Umverslty, Mmato-ku. Tokyo, japan.
11. Govindana, Meledath e Govindan, Geetha. (2000). A convenient method for the determination of the quality of goldenseal. *Fitoterapia* 7, pp. 232-235

12. Grycova, Lenka; Dostál, Jiri; Marek, Radek. (2007). *Quaternary protoberberine alkaloids*. *Phytochemistry* 68,153 disponível em www.sciencedirect.com, acesso em 30.11.2012
13. Harbone, J.B., (1998). *Phytochemical Methods. A guide to modern techniques of plant analysis*. p. 214, 3ª Edição Chapman & Hall, London.
14. Hayashi K, Minoda K, Nagaoka Y, Hayashi T, Uesat S., (2007). Antiviral activity of berberine and related compound against human cytomegalovirus. *Bioorg Med Chem Lett*. 2007 Mar 15; 17 (6): 1562-4.
15. Issat T, Jakóbsiak M; Golab J., (2006). Berberine, a natural cholesterol reducing product, exerts antitumor cytostatic/cytotoxic effects independently from the mevalonate pathway. *Oncol Rep*. 2006 Dec; 16(6): 1273-6.
16. Jorge, Tereza C.M., (2005). *Estudo químico e farmacológico de duas espécies da família rubiaceae: cephalanthus glabratus e palicourea crocea*. Tese de Doutorado. - Universidade Estadual de Maringá - Departamento de Química. Maringá-Brazil. p.1
17. L. Oscar Javier Patiño; R. Juliet Angélica Prieto and S. Luis Enrique Cuca, (2012). *Zanthoxylum Genus as Potential Source of Bioactive Compounds, Bioactive Compounds in Phytomedicine*, ISBN: 978-953-307-805-2, *InTech*
18. Lemos, A.M. *et al.*, (2009). *Espectroscopia visível e ultravioleta*. Centro de ciências naturais e exatas -Universidade Federal de Santa Maria. Santa maria, rs, brasil. Pp.1-6
19. Lin JP; Yang JS; Lee JH; Hsieh WT; Chung JG; (2006). Berberine induces cell cycle arrest and apoptosis in human gastric carcinoma SNU-5 cell line. *World J Gastroenterol*. 12 (1): 21-8.
20. Martins, Flávia M.M.; Da Silva M.B.; Silveira D.; Da Costa, A.S.V.; Jamal, C.M., (2012). Estudo fotoquímico e avaliação do potencial citotóxico e antifúngico de xylopiá sericea St. HIII frente à colletotrichum musa. *BioFar*, ISSN 1983-4209 - Volume 07 – Número 02, p.60
21. McMURRY, John., (2006). *Química Orgânica*; Volume 1; 6ª Edição; Pioneira Thomson Learning; São Paulo; pp. 389, 484.
22. Morrison, R. T; Boyd, R. N., (2005). *Química Orgânica*. 14ª edição, Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa, Portugal. pp. 674-689.
23. NUNES, Lília Granato, (2008). *Prospecção Fitoquímica e Avaliação da Mutagenicidade in vitro de três espécies vegetais: Strychnos pseudoquina A. St.-Hill., Coutarea hexandra*

- (Jacq.) *K. Schum e Bathysa cuspidata* (A. St.-Hill.) Hook . Tese de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais-Brasil. p46
24. Palgrave, K.C., (1977). *Trees of southern Africa*, 1st Edn, C. Struik Publishers, Cape Town, 959p
25. Rutz, Josiane Kuhn, (2009). *Avanços na cromatografia líquida*. 41f. Trabalho acadêmico (Seminário em Alimentos) - Bacharelado em Química de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
26. Santiago, E. M., (2007). *Estudo Fitoquímico das Plantas Medicinais Usadas no Tratamento de Doenças Causadas por Protozoários e Micobactérias, Avaliação dos Alcalóides de Grupo de Berberina nas Plantas Medicinais*. Tese de Licenciatura. UEM – Departamento de Química. Maputo. pp. 5-6
27. Silverstein, Robert Milton; *et al.*, (2006); *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*; 7^a Edição; TLC Editora; pp. 70.
28. Simões, C. *et al*, (2003) *Farmacognosia, da planta ao medicamento* 5^o ed UFSC pg 315, 221-224
29. Skoog, Douglas A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R., (2006); *Fundamentos de Química Analítica*; 8a edição; Editora Thomson Learning; São Paulo; pp. 678 e 680.
30. Solomons, T. W. Graham; FRYHLE, Craig B., (2006); *Química Orgânica I*; Volume 1; 8^a Edição; LTC Editora; Rio de Janeiro; pp. 75-76.
31. Van Wyk B.E.; B. Van Quadshoom; N. Gericke, (1997). *Medicinal Plants of South Africa*. 1st Edn, Briza Publication, Pretoria, South Africa, 536p
32. Vogel, Arthur, (2002). *Análise Química Quantitativa*. 6^a Ed. Rio de Janeiro. LTC-Livros técnicos e Científicos Eitora S.A, p. 462
33. Wagner, H; Bladt, S., (1996). *Plant Drug Analysis*. pp.10, 11, 12, 42. 2^a Edição.
34. Yu FS; Yang JS; Lin HJ; Yu CS; Tan TW; Lin YT; Lin YT, Lin CC; Lu HF, Chung JG, (2007). *Berberine inhibits WEHI-3 leukemia cells in vivo*. 21(2): 407-12.
35. Zhu, F; Quian C., (2006). Berberine chloride can ameliorate the spatial memory impairment and increase the expression of interleukin-1beta and inducible nitric oxide synthase in the rat model of Alzheimer's disease. *BMC Neurosci*. 7:78.
36. Zunguze, Domingos Manuel, (2010). *Estudo fitoquímico e avaliação da actividade antimicrobiana das raízes da tiliacora funifera*. Tese de Licenciatura. Universidade Eduardo Mondlane – Departamento de Química, p.2

ANEXOS

ANEXO I: Fluxogramas de Isolamento de Berberina como alcalóide principal



ANEXO II: Cromatogramas

Nos cromatogramas abaixo (TLC I e TLC II):

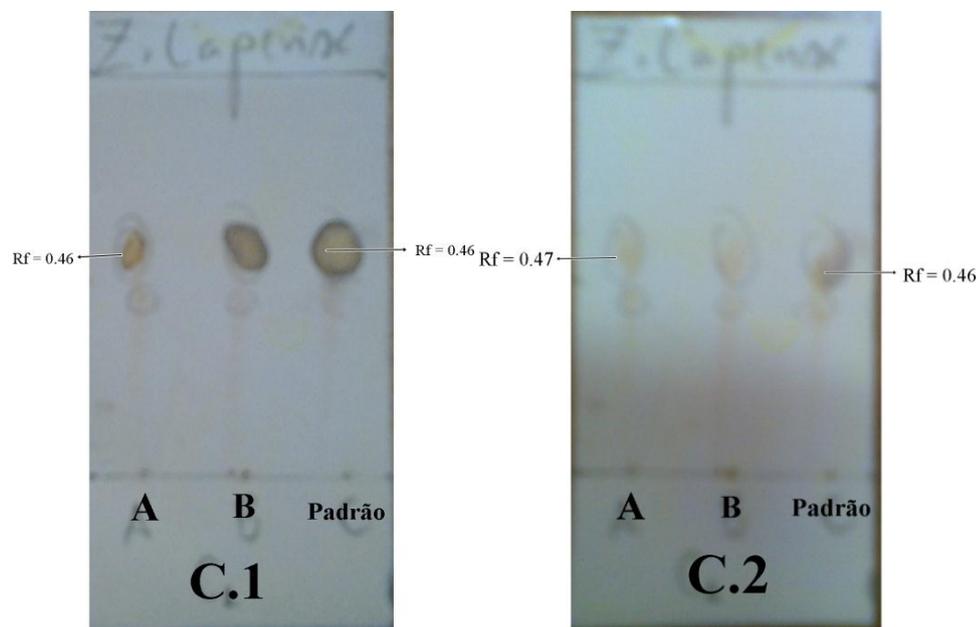
C.1 = Cromatograma do sistema de solvente $\text{CHCl}_3 - \text{MeOH}$ (3:1)

C.2 = Cromatograma do sistema de solvente n-BuOH-EtilAcetato-AcOH- H_2O (30:50:10:10)

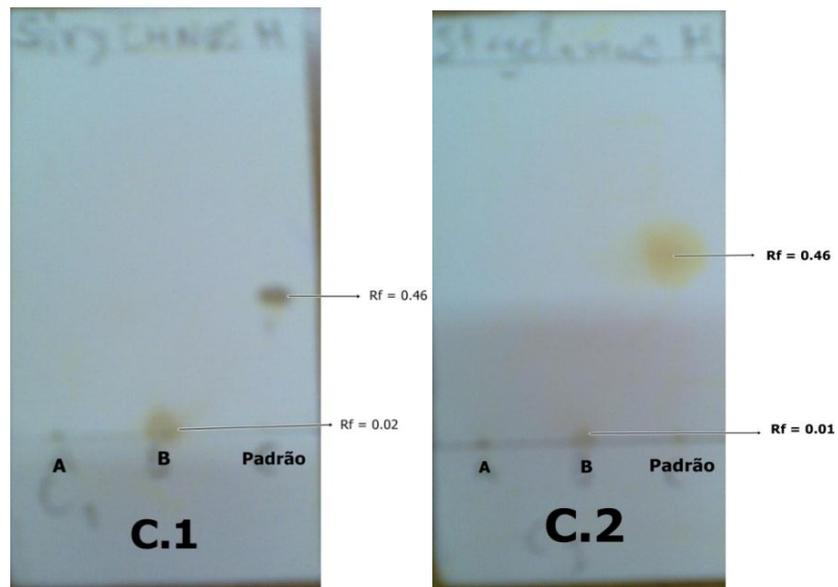
A = Fracção Clorofórmica

B = Fracção Aquosa

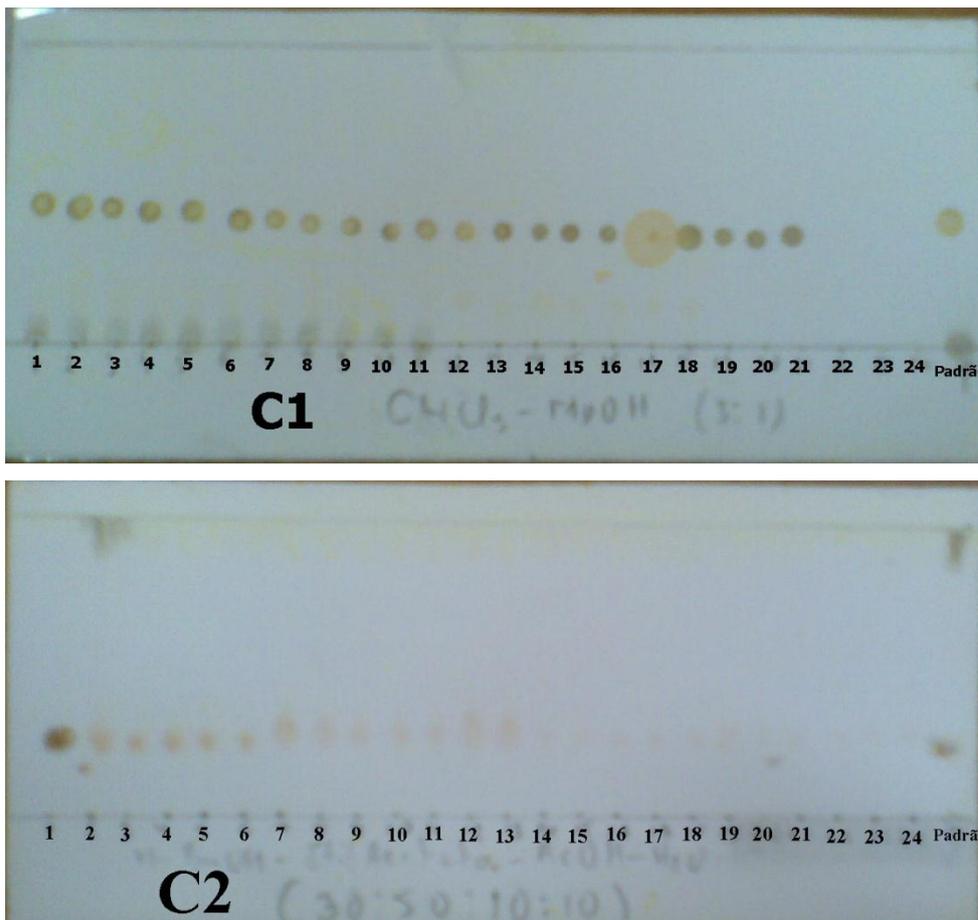
Padrão = Amostra-Padrão de Berberina

TLC – I: Cromatogramas dos extractos clorofórmicos de *Zanthoxylum capense*

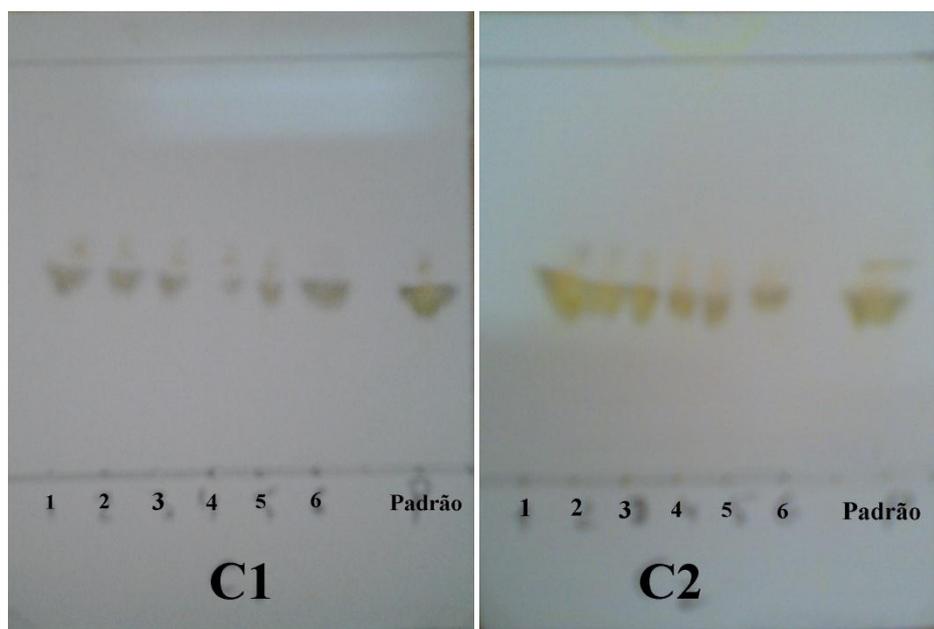
TLC - II: Cromatogramas dos extractos clorofórmicos de *Strychnos Henningsii*



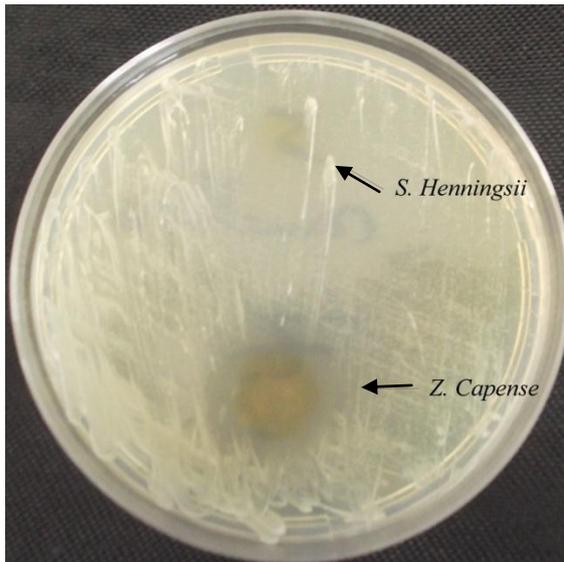
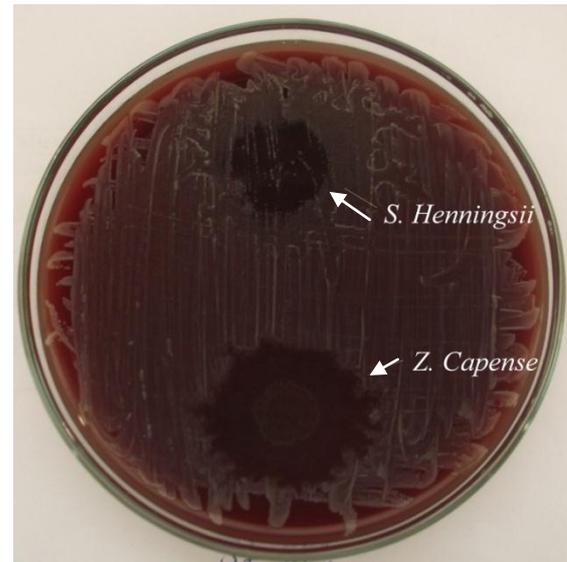
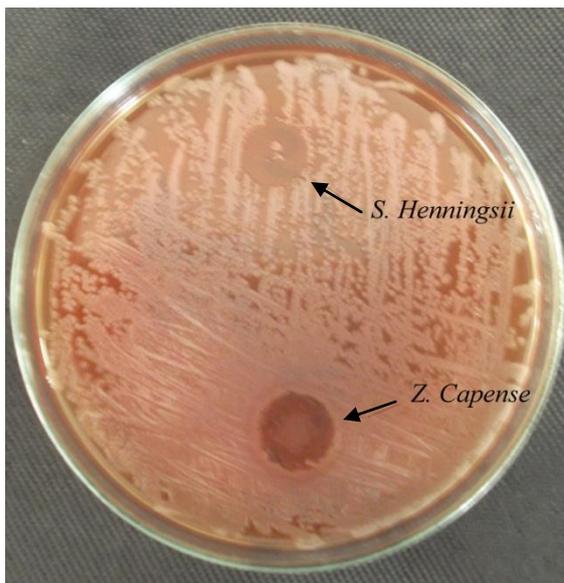
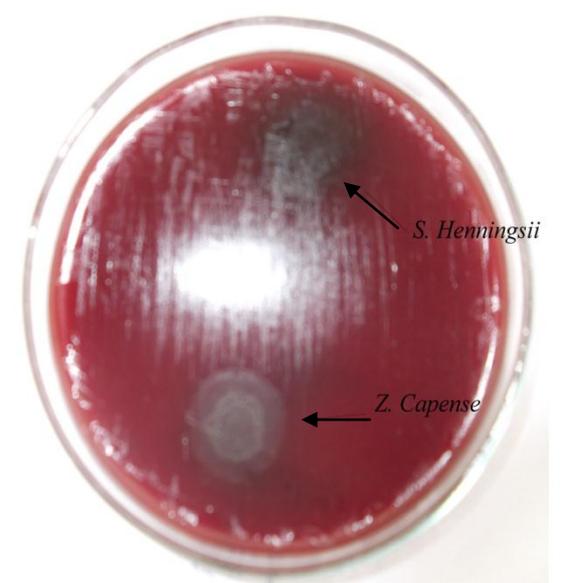
TLC - III: Cromatogramas das 24 fracções obtidas por CC



TLC – IV: Cromatogramas das 6 fracções resultantes da análise das 24 fracções obtidas por CC



ANEXO III: Fotos dos resultados dos testes de actividade antimicrobiana

Fig. 1 - Halos de inibição observados para *Candida sp*Fig. 2 - Halos de inibição observados para *Staphylococcus sp*Fig. 3 - Halos de inibição observados para *Salmonella sp*Fig. 4 - Halos de inibição observados para *Streptococcus sp*

ANEXO IV: Equipamentos

Fig. 1 - Rota vapor usado para concentrar o extracto metanólico



Fig. 2 – Extracção por Soxhlet



Fig. 3 - Ampola de decantação usada para extrair alcalóides totais



Fig. 4 – Ampola de decantação usada para fraccionamento do extracto clorofórmico de *Z. capense*



Fig. 5 – Frações obtidas do extracto clorofórmico de *Z. capense* por CC



Fig. 6 – Autoclave usada para incubar as placas de petri