



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA



TRABALHO DE LICENCIATURA

TEMA: ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ACTIVIDADE ANTIFÚNGICA DAS RAÍZES DE *Elephantorrhiza elephantina*, *Tabernaemontana elegans*, *Ximenia americana* e *Zanthoxylum capense*



AUTORA: Dércia Da Luísa Ernesto

Maputo; Julho de 2013



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA



TRABALHO DE LICENCIATURA

TEMA: ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ACTIVIDADE ANTIFÚNGICA DAS RAÍZES DE *Elephantorrhiza elephantina*, *Tabernaemontana elegans*, *Ximenia americana* e *Zanthoxylum capense*



AUTORA: Dércia Da Luísa Ernesto

SUPERVISOR: Prof. Doutor: Viktor Sevastyanov (Departamento de Química)

CO - SUPERVISOR: Engenheiro Amândio Muthambe (FAFE)

Maputo; Julho de 2013

DEDICATÓRIA

A DEUS,

Pela vida e oportunidade por estar sempre presente na minha vida.

AOS MEUS PAIS,

Que este triunfo seja a recompensa dos vossos múltiplos esforços, por inculcir em mim valores morais e espirituais; pelos vossos sábios conselhos; e a você mãe de modo especial por seres minha fortaleza nos momentos cruciais de minha vida, e por nunca perderem as esperanças por tudo que colhi e colherei; com amor, dedico – vos: *Matias e Luísa*

AOS MEUS IRMÃOS,

Edmilson, Miloca, Aires, Maria Luísa e Iyailane, por estarem sempre ao meu lado e por serem parte de minha vida. Na esperança de seguirem pelo mesmo caminho, dedico – vos.

AGRADECIMENTOS

A Vós meu Senhor

Pelo dom da vida, por iluminar meus passos e por dar sabedoria aos meus pais. O meu Muito Obrigado.

A minha família

Não há no mundo homem ou mulher capaz de amar – me como os meus pais, nem eu tenho palavras para expressar o quão grata sou, por fazerem de mim tudo o que sou hoje. A vós **Luísa e Matias** muito obrigada pelo vosso amor incondicional. Aos meus irmãos **Edmilson, Miloca, Aires, Maria Luísa e Iyailane**, muito obrigada pelo companheirismo e carinho.

- ♥ Estou e serei sempre, muito agradecida ao **Bernardo**, pelo amor, carinho, paciência, companheirismo e dedicação demonstrada nos vários momentos que marcaram este trabalho.

Ao Prof. Doutor **Viktor Sevastyanov** meu supervisor e mentor material desta obra, por confiar em mim e facultar todo material necessário para realização deste trabalho, o meu Muito Obrigado.

Ao Eng^o. **Amândio Muthambe**, meu co – supervisor, a quem sou muito grata pela disponibilidade, atenção, paciência e simpatia demonstrada durante a realização dos ensaios de actividade biológica e correcção do trabalho.

Ao **dr Bonifácio Maússe** vai o meu agradecimento pelos ensinamentos e paciência durante realização das extracções com sonda de Ultra - Som. Engenheira **Lorena** e Sr^a **Lucrecia** da FAEF vai o meu muito obrigado pela atenção dispensada.

A todos os docentes do Departamento de Química da UEM de modo especial ao Prof. Doutor **Victor Skripets**, ao Prof. Doutor **Nilo Castanhedo** pelas aulas de Produtos Naturais e a Prof. Doutora Fung Dai Kin vai o meu agradecimento.

Aos meus colegas e amigos Hercílio, Abdulgani, Lérgio, Terêncio Culpa, Condoeira, Maria Eliza, Odete, Chitaca, e meus amigos e companheiros de carteira, Muito Obrigada, pelo companheirismo e convivência.

Sem me esquecer de ti **Aninha**, a quem sou especialmente muito grata pela amizade e companheirismo, foram incríveis os momentos que passamos na faculdade.

E a todos aqueles que não mencionei e que de alguma forma, em algum momento, tornaram possível a realização deste trabalho.

Recebam todos, a minha eterna gratidão!

DECLARAÇÃO SOB O COMPROMISSO DE HONRA

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

Maputo, aos _____ de _____ de _____

(Dércia Da Luísa Ernesto)

...“A educação faz um povo fácil de ser liderado, mas difícil de ser dirigido;
fácil de ser governado, mas impossível de ser escravizado.”...

Henry Peter

RESUMO

Este trabalho é dedicado ao estudo fitoquímico e avaliação da actividade antifúngica, de plantas com propriedades medicinais, das espécies *Elephantorrhiza elephantina*, *Tabernaemontana elegans*, *Zanthoxylum capense* e *Ximenia americana*, em particular identificar as principais classes de metabólitos secundários biossintetizados pelas espécies. Estas plantas são usadas na região sul de Moçambique no tratamento de várias doenças (como malária, tuberculose, amebíase, infecções, dores de dentes, dermatites e doenças pulmonares). Foram obtidos por Soxhlet e Sonda de Ultra - Som os extractos brutos das raízes das plantas em estudo. Os testes de identificação dos principais metabólitos secundários foram realizados por reacções de reconhecimento correspondentes e indicaram a presença de alcalóides, flavonóides, saponinas, esteróides e triterpenóides. Os extractos brutos foram submetidos a cromatografia em camada fina eluída pelo sistema de solventes EtOAc: H₂CO₂: AcOH glacial: H₂O (50:5.5:5.5:13) e Hexano: EtOAc (8:2). Os estudos preliminares realizados com extractos aquosos e hidroalcoólicos das raízes de *Tabernaemontana elegans*, *Ximenia americana* e *Zanthoxylum capense* demonstraram actividade antifúngica sobre três microorganismos, (fungos do género *Asperigillus flavus*, *Asperigillus niger* e *Fusarium ssp*) que se atribui a presença de flavonóides, taninos e saponinas nas raízes de *Elephantorrhiza elephantina* e *Ximenia americana*, e alcalóides e saponinas nas raízes de *Tabernaemontana elegans* e *Zanthoxylum capense* este último ainda possui flavonóides na sua composição no extracto aquoso obtido por Sonda de Ultra – Som.

Palavras – Chave: *Elephantorrhiza elephantina*, *Tabernaemontana elegans*, *Zanthoxylum capense*, *Ximenia americana*, saponinas, alcalóides, flavonóides, actividade antimicrobiana.

ÍNDICE DE CONTEÚDO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Objectivos do trabalho.....	2
1.1.1. Objectivo Geral	2
1.1.2. Objectivos Específicos	2
1.2. Metodologia do trabalho	3
1.2.1. Pesquisa bibliográfica	3
1.2.2. Trabalho experimental	3
1.2.2.1. Colheita da amostra	3
1.2.2.2. Preparação das amostras para extracção.....	3
1.2.2.3. Realização de ensaios qualitativos.....	3
1.2.3. Discussão dos resultados.....	3
1.2.4. Elaboração do relatório final.....	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Descrição botânica, fitoquímica e aspectos farmacológicos das plantas em estudo	4
2.1.1. <i>Elephantorrhiza elephantina</i>	4
2.1.1.1. Classificação taxonómica	4
2.1.1.2. Descrição botânica.....	4
2.1.1.3. Efeitos farmacológicos de <i>Elephantorrhiza elephantina</i>	5
2.1.1.4. Compostos isolados da família Fabaceae e sua actividade biológica.....	5
2.1.2. <i>Tabernaemontana elegans</i>	6
2.1.2.1. Classificação taxonómica	6
2.1.2.2. Descrição botânica.....	6
2.1.2.3. Usos medicinais da <i>Tabernaemontana elegans</i>	7
2.1.2.4. Alguns compostos isolados de plantas da família Apocynaceae e sua actividade biológica	7
2.1.3. <i>Ximenia americana</i>	8
2.1.3.1. Classificação taxonómica	8
2.1.3.2. Descrição botânica.....	8
2.1.3.3. Actividade anti - fúngica dos extractos da <i>Ximenia americana</i>	9

2.1.4.	<i>Zanthoxylum capense</i>	10
2.1.4.1.	Classificação taxonómica	10
2.1.4.2.	Descrição botânica.....	10
2.1.4.3.	Usos medicinais de <i>Zanthoxylum capense</i>	11
2.1.4.4.	Alguns compostos isolados de plantas da família Rutaceae.....	11
2.1.4.5.	Composição fitoquímica de algumas espécies <i>Zanthoxylum</i> e actividade biológica 11	
2.2.	<i>Resposta das plantas frente ao ataque de fitopatógenos</i>	12
2.3.	<i>Algumas classes de compostos com actividade antifúngica</i>	14
2.3.1.	Alcalóides.....	14
2.3.2.	Flavonóides	15
2.3.2.1.	Classificação dos Flavonóides	15
2.3.2.2.	Propriedades biológicas dos Flavonóides	16
2.3.3.	Taninos.....	16
2.3.3.1.	Ensaio de reconhecimento de flavonóides e taninos	17
2.3.4.	Saponinas	18
2.3.4.1.	Classificação das saponinas	18
2.3.4.2.	Propriedades biológicas das saponinas	19
3.	MÉTODOS DE ANÁLISES DE PLANTAS	20
3.1.	Métodos de extracção e isolamento.....	20
3.1.1.	Extracção.....	20
3.1.2.	Extracção com Soxhlet.....	20
3.1.2.1.	Vantagens do uso de Soxhlet.....	21
3.1.2.2.	Desvantagens do uso de Soxhlet.....	21
3.1.3.	Extracção com Sonda de Ultra – Som	21
3.1.3.1.	Vantagens do uso da Sonda de Utra – Som	22
3.1.3.2.	Métodos de separação e purificação	23
3.1.4.	Cromatografia	23
3.1.5.	Cromatografia em camada fina (CCF).....	24
3.1.5.1.	Vantagens do uso de cromatografia em camada fina	25
3.1.6.	Cromatografia em Coluna Normal.....	26

4. PARTE EXPERIMENTAL	27
4.1. Esquema geral do trabalho experimental	27
4.2. Colheita das amostras	28
4.3. Tratamento das amostras	28
4.3.1. Secagem e moagem das amostras	28
4.4. Extracção	29
4.4.1. Extracção por Soxhlet	29
4.4.2. Extracção com sonda de Ultra – Som	29
4.4.3. Preparação dos extractos hidroalcoólicos	29
4.4.4. Concentração dos extractos.....	29
4.5. Ensaio qualitativos.....	30
4.5.1. Ensaio de reconhecimento de alcalóides.....	30
4.5.1.1. Análise de alcalóides	30
4.5.2. Ensaio de reconhecimento de flavonóides e taninos	30
4.5.3. Ensaio de reconhecimento de saponinas e esteróides – triterpenóides.....	31
4.5.4. Ensaio de reconhecimento de Antraquinonas	32
4.5.5. Cromatografia em camada fina	32
4.5.5.1. Aplicação da amostra.....	33
4.5.5.2. Desenvolvimento das placas.....	33
4.5.5.3. Sistema de detecção	33
4.5.6. Ensaio de actividade antifúngica	33
4.5.6.1. Testes de actividade antifúngica.....	33
4.5.6.2. Preparação dos meios de cultivo.....	34
4.5.6.3. Cultivo de fungos.....	34
Preparação da câmara húmida	34
a. Preparação das soluções dos extractos vegetais	35
b. Aplicação dos extractos	35
5. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS	36
5.1. Resultados da extracção	36

5.2.	Resultados dos ensaios fitoquímicos.....	37
5.3.	Resultados das análises cromatográficas (CCF)	39
5.4.	Resultados dos ensaios de actividade antifúngica.....	40
6.	INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS	45
6.1.	Extracção.....	45
6.2.	Ensaio fitoquímico e de actividade antifúngica	46
7.	CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	49
7.1.	Conclusões.....	49
7.2.	Recomendações	50
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
	ANEXOS	A

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Testes gerais de reconhecimento de alcalóides.....	14
Tabela 2. Alguns ensaios químicos de reconhecimento de taninos e flavonóides.....	17
Tabela 3. Plantas em estudo	28
Tabela 4. Materiais e reagentes	34
Tabela 5. Resultados da extracção por Soxhlet e Sonda Ultra – Som usando água como solvente	36
Tabela 6. Resultados da extracção por Sonda Ultra – Som com solvente hidroalcoólico.....	36
Tabela 7. Resultados dos ensaios fitoquímicos	37
Tabela 8. Resumo dos resultados dos testes fitoquímicos	38
Tabela 9. Resultados CCF dos extractos aquosos.....	39
Tabela 10. Resultado dos resultados dos ensaios de actividade antifúngica	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Elephantorrhiza elephantina</i>	4
Figura 2. <i>Tabernaemontana elegans</i>	6
Figura 3. <i>Ximenia americana</i>	8
Figura 4. Folhas de <i>Zanthoxylum capense</i>	10
Figura 5. Fórmula estrutural da Sanguinarina (IV)	11
Figura 6. Fórmula estrutural da Berberina (V).....	12
Figura 7. Fórmula estrutural do esqueleto básico dos flavonóides (VI).....	15
Figura 8. Estrutura geral dos flavonóides com mesmo precursor biossintético	15
Figura 9. Representação estrutural das saponinas esteroidais a) e triterpénicas b).....	18
Figura 10. Representação estrutural das saponinas monodesmosídicas a) e saponina bidesmosídicas b).....	19
Figura 11. Esquema do extractor de Soxhlet.....	21
Figura 12. Exemplo de uma extracção usando a Sonda de Ultra – Som.....	22
Figura 13. Esquema de classificação da cromatografia com base no estado físico das fases móvel e estacionária.....	24
Figura 14. Determinação prática do R _f	25
Figura 15. Esquema geral do trabalho experimental.....	27
Figura 16. Placa de Petri com sementes de amendoim contaminadas com <i>Aspergillus flavus</i>	40
Figura 17. Placa de Petri ilustrando acção do extracto aquoso de <i>Ximenia americana</i> (B) sobre fungo do género <i>Aspergillus flavus</i> (A).....	42
Figura 18. Acção do extracto aquoso de <i>Tabernaemontana elegans</i> sobre fungo do género <i>Aspergillus niger</i>	43
Figura 19. Acção dos extractos aquosos e hidroalcoólicos de <i>Tabernaemontana elegans</i> sobre o fungo género <i>Fusarium</i> ssp em meio de cultura PDA.....	44

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Preparação do extracto aquoso e hidroalcoólico usando Sonda de Ultra – Som.....	A
Anexo 2. Esquema de extracção dos metabólitos secundários.....	B
Anexo 3. Esquema utilizado para realização do ensaio de reconhecimento de esteróides – triterpenóides.....	C
Anexo 4. Foto cultura de <i>Asperigillus niger</i> depois da aplicação de extracto aquoso obtido por Soxhlet de <i>Elephantorrhiza elephantina</i>	D
Anexo 5. Esporos de <i>Asperigillus flavus</i> (os pontos amarelados), mortos (pontos castanhos) com extracto hidroalcoólico de <i>Ximenia americana</i> 100 mg/mL	D
Anexo 6. Esporos de <i>Fusarium</i> mortos com extractos aquosos de raízes de <i>Ximenia americana</i> , <i>Tabernaemontana elegans</i> , <i>Zanthoxylum capense</i> e <i>Elephantorrhiza elephantina</i>	E
Anexo 7. Esporos de <i>Asperigillus niger</i> mortos com extracto aquoso de <i>Tabernaemontana elegans</i> obtido por <i>Soxhlet</i>	E

LISTA DE ABREVIATURAS E FÓRMULAS QUÍMICAS

EtOAc	Acetato de etilo
MeOH	Metanol
EtOH	Etanol
ArOH	Fenol
K₂HgI₄	Reagente de Mayer
(BiO)₂CO₃	Carbonato de bismutato
p. eb	Ponto de ebulição
p. f.	Ponto de fusão
TLC	Cromatografia de camada fina
GC	Cromatografia gasosa
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
R_f	Factor de retenção
UV – Vis	Ultravioleta e visível
<i>E. elephantina</i>	<i>Elephantorrhiza elephantina</i>
<i>T. elegans</i>	<i>Tabernaemontana elegans</i>
<i>X. americana</i>	<i>Ximenia americana</i>
<i>Z. capense</i>	<i>Zanthoxylum capense</i>

1. INTRODUÇÃO

O uso de produtos derivados da indústria química no controlo de doenças na agricultura moderna tem sido alvo de constantes questionamentos pela sociedade. A intensificação do uso de produtos químicos no controlo de fitopatógenos 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 (Vigo-Schultz, 2008).

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 fungicida para o controlo de doenças traz um completo desequilíbrio do sistema de produção convencional (Bettiol e Morandi, 2009).

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 que 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, ligninas, flavonóides, cumarinas, quinonas, xantonas, lactonas, esteróides, e saponinas entre outras (Lyon *et al*, 1995; Schwan – Estrada *et al*, 2000).

Desta forma, e diante da necessidade de encontrar formas mais eficazes para controlar a acção de microorganismos, torna – se indispensável o estudo de espécies vegetais com actividade biológica sendo neste caso objecto de estudo de interesse as raízes de *Elephantorrhiza elephantina*, *Tabernaemontana elegans*, *Ximenia americana* e *Zanthoxylum capense*, no que concerne actividade antifúngica; sendo importante identificar e qualificar os marcadores químicos destas espécies pelo seu interesse na etnofarmacologia.

1.1. Objectivos do trabalho

1.1.1. Objectivo Geral

- ✓ É objectivo deste realizar um estudo fitoquímico e avaliar a actividade antifúngica dos extractos aquosos e hidroalcoólicos das plantas medicinais *Elephantorrhiza elephantina*, *Tabernaemontana elegans*, *Zanthoxylum capense* e *Ximenia americana*.

1.1.2. Objectivos Específicos

Com o desenvolvimento deste trabalho pretende-se:

- ✓ Obter os extractos brutos aquosos e hidroalcoólicos por extracção por Soxhlet e Sonda de Ultra – Som a partir das raízes de *Elephantorrhiza elephantina*, *Tabernaemontana elegans*, *Zanthoxylum capense* e *Ximenia americana*;
- ✓ Realizar testes de triagem fitoquímica para identificar as classes dos fitoconstituintes nos extractos brutos aquosos e hidroalcoólicos;
- ✓ Estudar as relações entre os extractos brutos, a composição fitoquímica das plantas em estudo e suas propriedades biológicas nomeadamente propriedades antifúngicas
- ✓ Comparar os resultados obtidos pelos diferentes métodos de extracção Soxhlet e Sonda de Ultra – Som;
- ✓ Avaliar *in vitro* a actividade antifúngica dos extractos brutos aquosos e hidroalcoólicos obtidos.

1.2. Metodologia do trabalho

O presente trabalho compreende a seguinte sequência:

1.2.1. Pesquisa bibliográfica

Consistiu na recolha de informação sobre a composição química de *Elephantorrhiza elephantina*, *Tabernaemontana elegans*, *Ximenia americana* e *Zanthoxylum capense*, os métodos de extracção dos metabólitos neles presentes, métodos de avaliação de actividade antifúngica *in vitro* dos extractos vegetais em fontes tais como: artigos científicos, livros de produtos naturais, química analítica e publicações da internet.

1.2.2. Trabalho experimental

1.2.2.1. Colheita da amostra

A colheita da amostra foi realizada na província de Gaza e Maputo, identificou-se segundo a nomenclatura científica e vernacular no Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Eduardo Mondlane; depois foram levadas para o Laboratório de produtos naturais do Departamento de Química da Universidade Eduardo Mondlane.

1.2.2.2. Preparação das amostras para extracção

1.2.2.3. Realização de ensaios qualitativos

Testes de triagem fitoquímica foram realizado segundo as metodologias de Raamam, (2006), Harborne, (1988) e Matos, (1988). As Análises cromatográficas foram realizadas segundo Wagner, (1996). Os ensaios de actividade antifúngica foram realizados usando a técnica de incorporação de substrato.

1.2.3. Discussão dos resultados

1.2.4. Elaboração do relatório final

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Descrição botânica, fitoquímica e aspectos farmacológicos das plantas em estudo

2.1.1. *Elephantorrhiza elephantina*

2.1.1.1. Classificação taxonómica

Nome científico: *Elephantorrhiza elephantina* (Burch.) Skeels

Nome vernacular: Xivurai

Reino: Plantae

Divisão: Tracheophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Fabales

Família: Fabaceae

Género: *Elephantorrhiza*

Espécie: *E. elephantina*



Figura 1. *Elephantorrhiza elephantina*

2.1.1.2. Descrição botânica

Arbusto às vezes com menos de 30 cm, ocorre em declives das regiões rochosas (Palgrave, 2002).

A casca é acinzentada carregada a avermelhada; folhas são iguais das acácias com 4 e 8 pares de folíolos e cada um suportando muitos folíolos finos, achatadas no ápice, variedades em tamanho, 7 à 15x1,5 à 4 mm; base quase simétrica (Palgrave, 2002).

Flores pequenas cremes – brancas tendendo a amarelas, em espigas pouco dispersas acima de 10 cm de comprimento, fragrantes aparecendo juntamente com as folhas em outubro a novembro (Palgrave, 2002).

Fruto é vagem, acima de 19x2.5 a 4 cm, mas pode ir até 30 cm de comprimento, lenhoso; avermelhado acastanhado. O ápice da planta cresce em forma de rizoma e as partes aéreas morrem anualmente (Palgrave, 2002).

Segundo estudos levados a cabo por Maueia, (2007) a *Elephantorrhiza elephantina* foi identificada na província de Gaza nos distritos de Chókwè e Macia.

2.1.1.3. Efeitos farmacológicos de *Elephantorrhiza elephantina*

Não é clara sua actividade na medicina, também não foram encontrados relatos do seu uso de *Elephantorrhiza elephantina* como antifúngico; no entanto Oliver-Bever, (1986) relata o uso de taninos com actividade antidiarreica e antisséptica no tratamento de infecções diarreicas.

2.1.1.4. Compostos isolados da família Fabaceae e sua actividade biológica

Segundo Wyk *et al*, (2004) a cor vermelha brilhante dos rizomas de *Elephantorrhiza elephantina* é indicadora da presença de taninos ou de compostos fenólicos.

Santiago, (2007) investigou a presença do alcalóide Berberina nas raízes de *Elephantorrhiza elephantina* levando a extracção com Soxhlet usando como solvente Etanol, tendo observado ausência de Berberina nas raízes de *E. elephantina*.

Não há relatos sobre a actividade antifúngica, porém é conhecida actividade anti – malária atribuída aos compostos antracénicos em especial 1,8 – dihidroxi – antraquinona isolada das folhas da planta *Cassia Fistula* (Mendes, 2009).

2.1.2. *Tabernaemontana elegans*

2.1.2.1. Classificação taxonómica

Nome científico: *Tabernaemontana elegans*
Stapf

Nome vernacular: Cahlu

Reino: Plantae

Divisão: Tracheophyta

Classe: Spermatopsida

Ordem: Gentianales

Género: *Tabernaemontana*

Família: Apocynaceae

Espécie: *T. elegans*



Figura 2. *Tabernaemontana elegans*

2.1.2.2. Descrição botânica

A *Tabernaemontana elegans* é um arbusto ou pequena árvore de 3 a 5 m de altura, podendo atingir os 10 m, sempre verde com casca pouco fendida, laticífera. As folhas são elípticas a quase redondas, grossas verdes escuras na parte superior, verde-claro na parte inferior, sem pêlos. As flores são brancas, perfumadas agrupadas no final dos ramos.

A fruta é constituída por dois mericarpos patentes em ângulo raso, cada um ovoide a quase esférico com uma das pontas em bico, verde - escuras com pintas cinzentas claras, abrindo-se quando maduras expondo a polpa laranja viva, com numerosas sementes castanhas. A floração ocorre no período Fevereiro a Março, e a frutificação entre Maio e Junho (Jansen e Mendes, 1984).

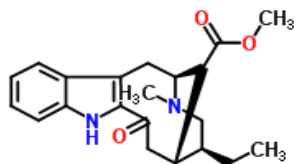
2.1.2.3. Usos medicinais da *Tabernaemontana elegans*

As partes da planta usadas são frutos e raízes. Os frutos são comestíveis e procurados principalmente por crianças. Faz-se uma infusão com a parte interior da raiz, que serve para tratar vômitos diarreias fortes e tosses. O látex é usado como adstringente; as raízes são usadas como remédio para tratar doenças pulmonares.¹ Não há no entanto relatos sobre seu uso como antifúngico.

2.1.2.4. Alguns compostos isolados de plantas da família Apocynaceae e sua actividade biológica

Tabernaemontana elegans contém muitos alcalóides indólicos farmacologicamente interessantes e merecem uma pesquisa mais atenciosa. Os compostos fitoquimicamente importantes da raiz da *Tabernaemontana elegans* são os alcalóides monoméricos indólicos (dregamina e tabernaemontanina e os alcalóides bisindólicos (conoduramina e tabernaelegantinas).²

Os alcalóides bisindólicos tabernaelegantinas são raros em outras espécies e portanto marcadores importante quimiotaxonomicos confiável para *Tabernaemontana elegans*.

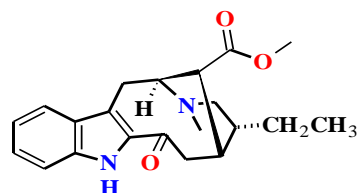


(II)

TABERNEAMONTANINA

Fórmula Molecular: C₂₁H₂₆N₂O₃

Nome sistemático: Metil (16R,20β) - 3 - oxo - 19,20-dihidrovobasan-17-metanoato



DREGAMINA

(III)

Fórmula Molecular: C₂₁H₂₆N₂O₃

Nome sistemático: Metil 3-oxo-19,20-dihidrovobasan-17-metanoato

¹ http://www.cde.unibe.ch/CDE/pdf/E501_Relat%C3%B3rio.pdf, 04.02.2012

² Bull. Misc. Inform. Kew 1894: 24 (1894).

2.1.3. *Ximenia americana*

2.1.3.1. Classificação taxonómica

Nome científico: *Ximenia americana* L

Sinónimo: *Ximenia aculeata* Crantz,

Nome vernacular: Nthunguluka

Reino: Plantae

Divisão: Tracheophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Santalales

Género: *Ximenia*

Família: Olacaceae

Espécie: *X. americana*

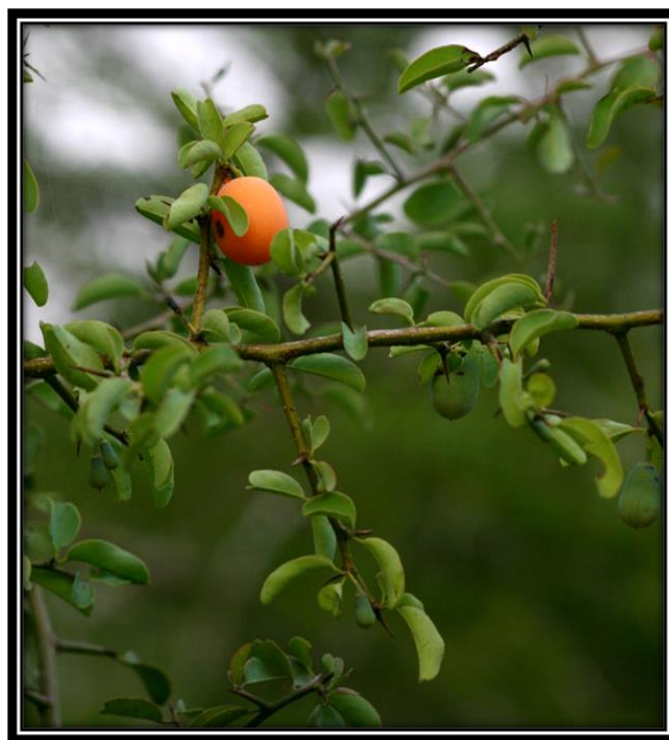


Figura 3. *Ximenia americana*

2.1.3.2. Descrição botânica

A *Ximenia americana* é um arbusto ou pequena árvore com a coluna de ponta branchlets. As flores agrupadas nas axilas dos espinhos, pequenas, verde - branco com uma "barba" anca na garganta. O fruto elipsoide, com 2,5 cm de comprimento, amarelo e vermelho quando maduros. A fruta é comestível, mas muito azeda. (Hutchings, 1996).

2.1.3.3. Actividade anti - fúngica dos extractos da *Ximenia americana*

De acordo com James *et al* (2007), os extractos aquosos e metanólico das folhas, das cascas, e das raízes da *Ximenia americana* indicaram presença de carboidratos, na forma de açúcares e amido solúveis excepto o extracto aquoso das folhas. Foi indicada presença de saponinas, glicosídeos cardíacos e antraquinonas em todos os extractos, excepto as antraquinonas que não foram detectadas nas folhas.

Observações semelhantes foram obtidas nos extractos das folhas por Ogunley & Ibitoye (2003) que também detectaram a presença de flavonóides e taninos em todos os extractos enquanto os alcalóides estiveram sempre ausentes.

A actividade antifúngica e antibacteriana dos extractos clorofórmicos, metanólico e aquosos das folhas e raízes da *Ximenia americana* foi testada e concluiu-se que o extracto metanólico foi mais activo e o extracto aquoso também mostrou elevada actividade (Ogunleye e Ibitoye, 2003).

Segundo Brasileiro *et al* (2007) a presença de polifenóis pode ser um forte indicativo da actividade antifúngica e anti - inflamatória.

2.1.4. *Zanthoxylum capense*

2.1.4.1. Classificação taxonómica

Nome científico: *Zanthoxylum capense*
(Thunb.) Harvey

Sinónimo: *Fagara capensis*

Nome vernacular: Manungwani

Reino: Plantae

Divisão: Tracheophyta

Classe: Spermatopsida

Ordem: Sapindales

Família: Rutaceae

Género: *Zanthoxylum*

Espécie: *Z. capense*



Figura 4. Folhas de *Zanthoxylum capense*

2.1.4.2. Descrição botânica

É usualmente uma árvore multi – ramificada de cerca de 5 metros de altura, mas pode alcançar 10 metros em condições favoráveis. A presença de espinhos sobre a casca verde é uma característica desta árvore. As folhas são divididas por vários pares de folhas, cada um com cerca de 20 mm em largura, com pontos translúcidos (glândula de óleo) ao longo das bordas.

As flores são brancas - esverdeadas; as frutas com cerca de 5 mm em diâmetro, racham quando maduras mostrando um brilho preto das sementes (Hutchings, 1996 e Palgrave, 2002).

2.1.4.3. Usos medicinais de *Zanthoxylum capense*

Não há registo sobre a actividade antifúngica porém, é conhecida actividade anti - plaque e anti - inflamatória da sanguinarina e é comercialmente usada em pastas de dentes e enxaguadores orais (Wyk *et al*, 1997).

2.1.4.4. Alguns compostos isolados de plantas da família Rutaceae

Não há um estudo detalhado da *Zanthoxylum capense*, quimicamente a planta é pouco conhecida; no entanto um largo número de espécies *Zanthoxylum* têm sido estudadas e muitas destas contém actividade biológica atribuída aos alcalóides benzofenatridinas, com particular significância para sanguinarina e alcalóides relacionados os quais acredita-se estarem presentes também na *Zanthoxylum capense* (Wyk *et al*, 1997).

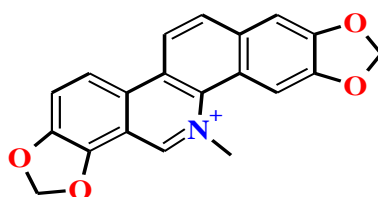


Figura 5. Fórmula estrutural da Sanguinarina (IV)

O extracto de diclorometano de *Zanthoxylum capense*, contém muitos constituintes complexos (maioritariamente compostos fenólicos).

2.1.4.5. Composição fitoquímica de algumas espécies *Zanthoxylum* e actividade biológica

As cascas da *Zanthoxylum davyi* da família Rutaceae têm produzido cinco alcalóides benzofenantridina, cheleritrina, dihidrocheleritrina, 6-hidroxi-dihidrocheleritrina e 6-metoxi-7-demetil-dihidrocheleritrina, juntamente com 4 - metoxi - 1 - metil - 2 (1H) - quinolinona e o incomum lignano meso - sesamina (Tarus *et al*, 2006).

As cascas de *Zanthoxylum americanum* Mill contém alcalóides: nitidina, lauriflorina, candicina, cheleritrina, magnoflorina, tembetarina, berberina, N-metil – socoridina, cumarinas: aloxantoxiletina, xantiletina, xanthoxiletina, aloxanthowiletina, 8- (3, 3-dimetilalil) aloxantoxiletina, imperatorina, isoimperatorina, psoraleina, dipetalina, lignanos: sesamina e asarinina (Tarus *et al*, 2006)

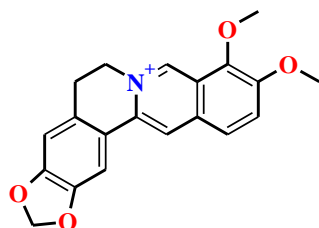


Figura 6. Fórmula estrutural da Berberina (V)

Santiago (2007) comprovou a presença do alcalóide berberina nas raízes de *Zanthoxylum capense* por análise cromatográfica das suas raízes.

2.2. Resposta das plantas frente ao ataque de fitopatógenos

Embora aparentemente indefesa frente ao ataque de agressores ou até mesmo em condições adversas, as plantas apresentam estratégias de defesa que permitem o retardamento ou até mesmo a inibição dos agentes fitopatógenos, tais como fungos, bactérias vírus, nematóides e insectos. As plantas reagem ainda sob estresse abiótico, como por exemplo, variações de temperatura, ausência de água ou tratamento com agentes químicos. Esta defesa é composta de resposta constitutiva a qual encontra-se presente nas plantas, e a resposta induzida que ocorre após o ataque de fitopatógenos ou início de estresse abiótico (Fernandes *et al*, 2009).

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 ou colonização. Em ambas as categorias, os factores, envolvidos na resistência podem ser subdivididos em estruturais ou bioquímicos (Vigo-Schultz, 2008).

A activação do mecanismo de defesa da planta ocorre por meio de sucessivos eventos e sinais que se iniciam no reconhecimento pela planta do agente agressor e culmina com activação das barreiras físicas e químicas envolvidas no processo (Fernandes *et al*, 2009).

Os estruturais actuam como barreiras físicas, enquanto os bioquímicos actuam através da produção de substâncias tóxicas ou repelentes ao patogénico ou criando condições adversas ao estabelecimento deste na planta (Vigo-Schultz, 2008).

Os factores de resistência pré – formados são aqueles presentes na planta antes do contacto com o patogénico e são denominados defesas constitutivas sendo representados por estruturas tais como: ceras, cutícula, parede celular espessa, tricomas, fibras vasculares, bem como substâncias químicas pré – formadas, como fenóis alcaloides, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos e cianogénicos, fitoxinas, inibidores proteicos e enzimas hidrolíticas (Vigo-Schultz, 2008).

2.3. Algumas classes de compostos com actividade antifúngica

As principais classes de compostos com actividade antifúngica são alcalóides, flavonóides, taninos cumarinas, lignanos, esteróides e saponinas.

2.3.1. Alcalóides

A definição mais aceite para os alcalóides é a de Pelletier (1883) segundo a qual os alcalóides são compostos orgânicos nitrogenados (geralmente de origem vegetal), derivados de aminoácidos possuem propriedades básicas de distribuição restrita, com propriedades farmacológicas importantes a dose baixa e que respondem a reacções comuns de precipitação e são encontrados predominantemente em angiospermas (Henriques et al 2002 citado por Bezerra, 2008).

Essa classe de compostos é conhecida pela presença de substâncias que possuem acentuado efeito no sistema nervoso, sendo muitas delas largamente usadas como venenos ou alucinógenos (Bezerra, 2008).

Tabela 1. Testes gerais de reconhecimento de alcalóides

Reactivo	Resultados esperado	Referências
Reagente de Dragendorff	Aparecimento de um precipitado laranja avermelhado indica teste positivo	Raaman, 2006,
Reagente Mayer	Formação de precipitado branco ou creme indica presença de alcalóides.	Raama,n 2006,
Reagente de Wagner	O aparecimento de um precipitado castanho - avermelhado confirma teste positivo	Raaman, 2006,
Reagente de Hager	Aparecimento de um precipitado amarelo cristalino indica presença de alcalóides. Precipita a maioria dos alcalóides e os picratos podem cristalizar	Raaman, 2006,
(Reactivo de Ehrlich)	Forma - se uma coloração amarela.	Raaman, 2006,
Reacção do Vitali – Morin	Observa-se uma coloração violeta	Raaman, 2006,

2.3.2. Flavonóides

Os flavonóides são compostos fenólicos que possuem na sua estrutura dois anéis benzeno separados por uma unidade de propano. Os flavonóides apresentam a seguinte cadeia carbónica C₆–C₃–C₆, mais especificamente compostos com funcionalidade fenilbenzopirano (Grotewold, 2007 & Mann, 1998).

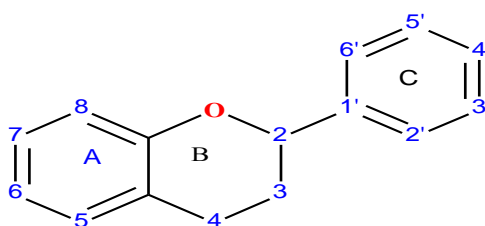


Figura 7. Fórmula estrutural do esqueleto básico dos flavonóides (VI)

2.3.2.1. Classificação dos Flavonóides

Dependendo da posição do sistema de ligação do anel aromático metade deste grupo de produtos naturais podem ser divididos em três (3) classes a citar (Grotewold, 2007):

- Flavonóides derivados de 2- Fenilbenzopiranos (VII)
- Flavonóides derivados de 3 – Fenilbenzopiranos (Isoflavonóides) (VIII)
- Flavonóides derivados de 4-Fenilbenzopiranos (neoflavonóides) (IX)

Estes grupos possuem o mesmo precursor biossintético - a Chalcona, são biogénicamente e estruturalmente relacionados:

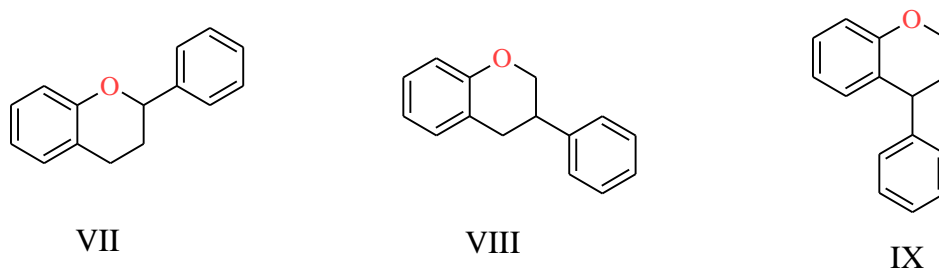


Figura 8. Estrutura geral dos flavonóides com mesmo precursor biossintético

2.3.2.2. Propriedades biológicas dos Flavonóides

Os Flavonóides são compostos fenólicos, sintetizados pelas plantas em resposta à infecção antimicrobiana justificando assim a sua acção antimicrobiana frente a vários microorganismos. Agem como potentes antioxidantes, possuem actividade contra bactérias e fungos; esta actividade dá-se provavelmente devido habilidade de complexação com a parede bacteriana. Os flavonóides lipofílicos podem perturbar a integridade estrutural da membrana celular (Sartori, 2005).

Os flavonóides têm grupos hidroxilo sobre seu anel B o que aumenta mais a sua actividade contra microorganismos, do que as flavonas com grupos – OH não ligados ao anel. Este facto pode levantar a hipótese de que o mecanismo de acção seja em alvos na membrana plasmática. Compostos lipofílicos podem interromper a estrutura da membrana microbiana e a maior hidroxilação do composto pode levar a maior actividade antimicrobiana por aumento de toxicidade aos microorganismos (Cowan, 1999).

Os compostos fenólicos hidroxilados actuam possivelmente por inibição de enzimas através de reacções com grupos sulfidrilos e por interações inespecíficas com proteínas, embora não tenha sido comprovada uma relação entre o grau de hidroxilação e actividade tóxica (Sartori, 2008).

Outras actividades biológicas são citadas como, actividade antialérgica, anti - inflamatória, anti - viral, anti - cancerígena, vasoprotectora, anti - hepatotóxica e insecticida (Mendes, 2009).

2.3.3. Taninos

São grupos de substâncias fenólicas poliméricas que precipitam com solução de gelatina, uma propriedade conhecida como adstringente. Os taninos estão divididos em dois grupos: taninos hidrossolúveis têm como unidade básica o ácido gálico, usualmente como ésteres de múltiplos de D-glucose, e taninos condensados (Mann, 1998; Kokate, 2008).

A maioria dos taninos condensados mas importantes são chamados proantocianidinas e são derivados de flavonóides monoméricos. Nas plantas, os taninos têm uma acção inibitória do crescimento de insectos e perturbam a digestão de ruminantes. Acredita-se que actividade antimicrobiana deste composto se deve a sua interacção sobre as adesinas, proteínas da parede celular e sua capacidade de unir-se a polissacarídeos (Sartori, 2005).

2.3.3.1. Ensaio de reconhecimento de flavonóides e taninos

Os ensaios cromáticos apresentam importância como estágio preliminar de análise e, em alguns casos é possível distinguir as diversas classes de flavonóides.

As cores obtidas variam conforme o núcleo, o número e a disposição dos grupos hidroxilos substituintes. Dessa forma, os hidroxí - flavonóides reagem a frio com soluções alcalinas, resultando em fenolatos geralmente corados, solúveis em água, mas decomponíveis por ácidos. Os vapores de amónia mudam a coloração das antocianinas de vermelho para azul e de calconas e auronas, de laranja para vermelho. Alguns exemplos de ensaios cromáticos estão apresentados a seguir na tabela 2.

Tabela 2. Alguns ensaios químicos de reconhecimento de taninos e flavonóides

Reactivo	Resultado esperado para teste positivo	Referência
Teste de Shinoda ou de cianidrina	Aparecimento de coloração com tonalidade avermelhada (laranja, rosa, vermelho)	Raaman, 2006
Cloreto de ferro (III)	Desenvolvimento de coloração azul indica reacção positiva para taninos, verde para flavonóides e castanho para polifenóis	Raaman, 2006 & Grotewol, 2007
Gelatina	Desenvolvimento de precipitado indica reacção positiva	Raaman, 2006 ; Kokate et al, 2008
Acetato de chumbo	O precipitado branco volumoso indicada presença de compostos fenólicos.	Raaman, 2006
Reagente alcalino	A solução amarela fluorescente indica a presença de flavonóides	Raaman, 2006
Reagente da Prússia	A presença de taninos é indicada pelo aparecimento de uma cor azul.	Raaman, 2006
Ácido sulfúrico concentrado	As flavonas e flavonóis formam soluções fortemente amareladas e as calconas e as auronas formam coloração vermelha e carmim	Mendes, 2009

2.3.4. Saponinas

As saponinas são glicosídeos de terpenos policíclicos ou de esteróides. Possuem uma estrutura anfipática, com características lipofílicas (triterpeno ou esteróide) e outra parte hidrofílica (açúcares), que determina a propriedade de redução da tensão superficial da água e suas acções detergentes e emulsificantes (De Lima, 2009).

2.3.4.1. Classificação das saponinas

As saponinas podem ser classificadas de acordo com o núcleo fundamental da aglicona ou, ainda, pelo seu carácter ácido, básico ou neutro.

Quanto aglicona denominam-se saponinas esteróidais e triterpénicas. O carácter ácido pode ser devido à presença de um agrupamento carboxilo na aglicona ou na cadeia de açúcares ou em ambos. O carácter básico decorre da presença de nitrogénio (De Lima, 2009). Outros grupos oxigenados que podem ser encontrados em saponinas são $-\text{CH}_2\text{OH}$ ou $-\text{CHO}$.

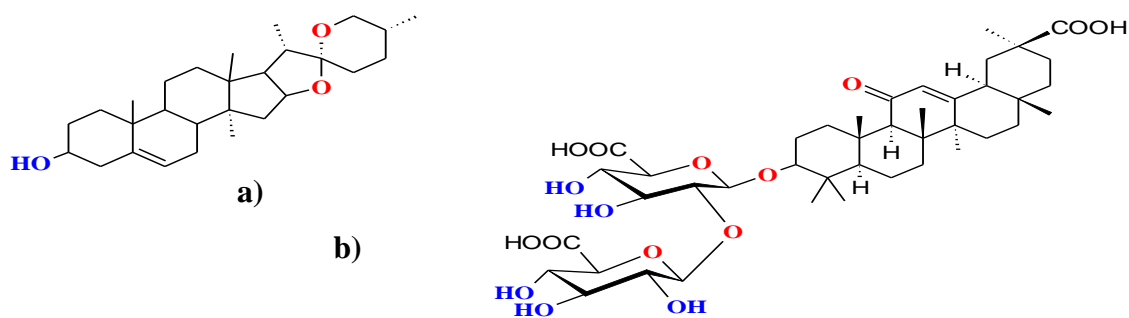


Figura 9. Representação estrutural das saponinas esteróidais **a)** e triterpénicas **b)**.

Outra classificação é referente ao número de cadeias de açúcares ligadas na aglicona. Assim, as saponinas monodesmosídicas (Figura 10, a)) possuem uma cadeia de açúcares, enquanto as bidesmosídicas (Figura 10 b)) apresentam duas cadeias de açúcares, uma ligada ao grupo hidroxilo em C-3 e a outra em C-22 (Wina *et al*, 2005); que confere alto peso molecular e difícil identificação destas substâncias pelas técnicas actuais (De Lima, 2009).

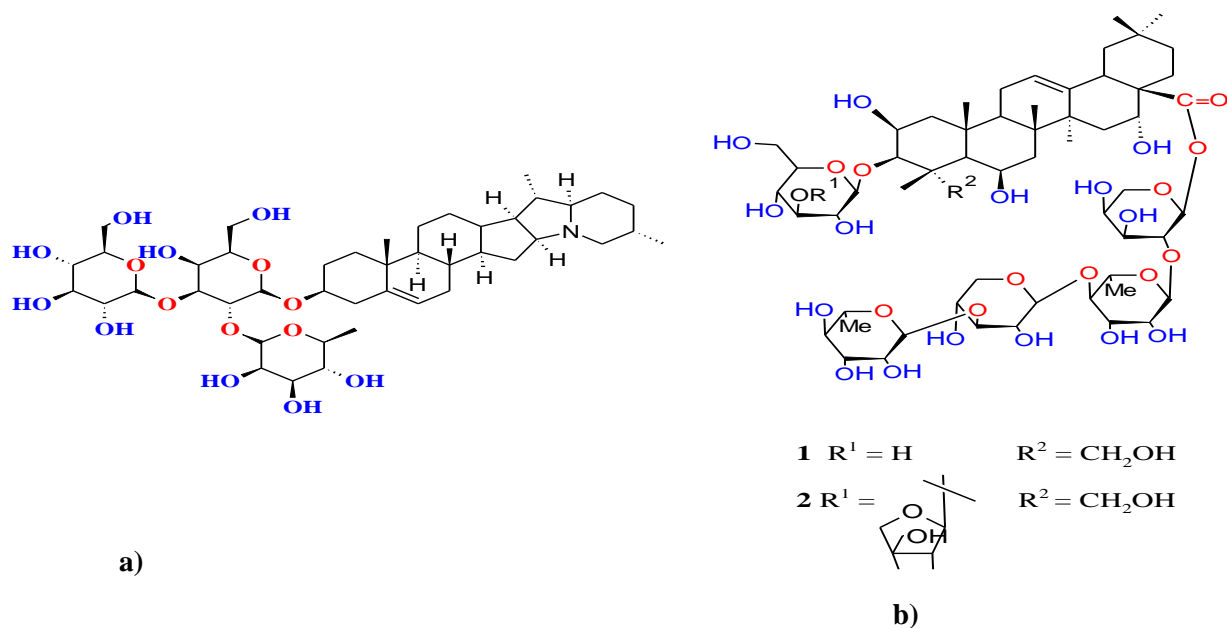


Figura 10. Representação estrutural das saponinas monodesmosídicas a) e saponina bidesmosídicas b)

2.3.4.2. Propriedades biológicas das saponinas

As saponinas são substâncias derivadas do metabolismo secundário das plantas, relacionados com o sistema de defesa. São encontradas nos tecidos que são mais vulneráveis ao ataque fúngico, bacteriano ou predatório dos insectos (Wina *et al*, 2005; De Lima, 2009)

As saponinas têm acção antimicrobiana, prevenindo o crescimento de fungos, podendo ser consideradas uma parte do sistema de defesa das plantas e indicadas como “fitoprotectoras” (Pizarro, 1999 citado por De Lima, 2009). Possuem acção antifúngica e o mecanismo principal sugerido para esta actividade é a interacção com os esteróides da membrana (Alvares, 2006).

3. MÉTODOS DE ANÁLISES DE PLANTAS

Nos métodos de análise das plantas começamos por mencionar os métodos de isolamento e purificação das diferentes classes de metabólitos secundários que podem ser encontrados nas plantas.

3.1. Métodos de extracção e isolamento

3.1.1. Extracção

A extracção baseia-se no princípio de que o polar dissolve polar e apolar dissolve apolar e, portanto, a utilização de um solvente para a separação do componente desejado não é específica, podendo extrair também alguns componentes não desejados solúveis ao solvente de extracção nas condições de análise (Luthria, 2004).

Os métodos são escolhidos com base nas várias propriedades físico-químicas dos compostos de interesse. Estas incluem o coeficiente de partição solvente água ou orgânico, polaridade relativa da molécula, estabilidade da molécula na luz e escuridão, bem como as temperaturas empregadas durante o processo de extracção (Cseke *et al*, 2006).

Baseada nestas propriedades a extracção é uma técnica usada para separar substâncias de soluções, suspensões líquidas extracção líquido-líquido ou para separar uma substância de um sólido por meio de um solvente, extracção sólido-líquido (Mendes, 2009).

São apresentados os métodos de extracção sólido-líquido como decocção, Infusão maceração, Soxhlet e Sonda de Ultra-Som, dos quais a extracção por Soxhlet e Ultra -Som foram empregues no presente trabalho.

3.1.2. Extracção com Soxhlet

O método de Soxhlet foi descrito por Franz Von Soxhlet em 1879 é um exemplo de um processo contínuo de extracção sólido – líquido. Neste método a amostra é seca, moída em pequenas partículas colocadas em um filtro de celulose ou papel; o filtro é colocado na câmara de extracção que está suspenso acima de um balão contendo solvente e abaixo de um condensador.

3.1.2.1. Vantagens do uso de Soxhlet

A extracção por Soxhlet é uma técnica que requer menos quantidades de solvente e por outro lado é um processo contínuo que pode ser interrompido (Santiago, 2007).

3.1.2.2. Desvantagens do uso de Soxhlet

É muito lento, maior tempo de análise que implica grande perda de água (uma vez que o Soxhlet tem um sistema de arrefecimento à base de água) e maior consumo de corrente eléctrica. A substância a ser extraída é aquecida durante muito tempo correndo o risco de sofrer transformações, oxidações, hidrólise entre outros (Santiago, 2007).

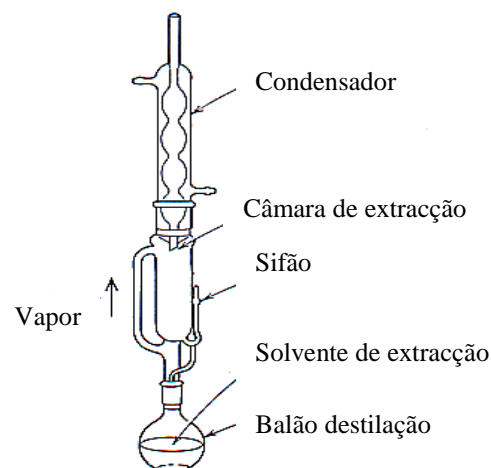


Figura 11. Esquema do extractor de Soxhlet

3.1.3. Extracção com Sonda de Ultra – Som

O Ultra - Som é uma técnica de extracção que utiliza a energia de ondas sonoras geradas em frequências superiores a capacidade auditiva do ser humano. Estas ondas sonoras criam uma variação na pressão do líquido empregado no processo, gerando cavitação (Melecchi, 2005).

A utilização de ondas ultra - sónicas de alta frequência (20-10 kHz) causa mudanças físicas e químicas permanentes por produzirem cavitação e microfluxos nos líquidos, aquecimento e ruptura nos sólidos e instabilidade na interface de sistemas líquido – líquido e líquido – gás (Melecchi, 2005).

Os principais efeitos do Ultra – Som quando empregado como técnica de extracção são (Melecchi, 2005):

- Aumento da permeabilidade da parede celular;
- A produção da cavitação (formação espontânea de bolhas num liquido abaixo do seu ponto de ebulição resultantes do esforço dinâmico);

- Aumento de tensão mecânica das células (também denominado interface de fricção);



Figura 12. Exemplo de uma extracção usando a Sonda de Ultra – Som

O Ultra – Som tem sido empregado como método de extracção alternativo ao Soxhlet aplicado na extracção de diferentes compostos orgânicos. O efeito do Ultra – Som no processo de extracção depende da frequência e capacidade do equipamento e do tempo empregado para a extracção alguns autores têm informado a ocorrência de transformações químicas nos extractos resultantes da utilização de longo tempo de extracção (Melecchi, 2005).

Ainda que a eficiência desta técnica tenha sido citada como igual ou melhor, que a obtida com o extractor de Soxhlet, são muito escassos os trabalhos que referenciam seu uso para a extracção de produtos naturais de plantas (Melecchi, 2005).

3.1.3.1. Vantagens do uso da Sonda de Utra – Som

Alta reprodutibilidade, possibilidade de utilização para uma ampla variedade de tamanhos de amostras, rapidez no processamento da amostra e baixo custo (Melecchi, 2005).

A **Decocção** consiste em ferver o material vegetal com solvente adequado de modo a extrair princípios activos; o material sólido é previamente moído, só então é adicionado o solvente e submetido a fervura (Mendes, 2009).

A **Infusão** tem como base impregnar um solvente em ebulição sobre o material sólido previamente moído, deixando ficar em contacto durante um determinado período (Mendes, 2009).

A extracção por **maceração** consiste em submeter amostra (material vegetal) sólido previamente moído acção de um solvente à temperatura ambiente (Cseke *et al*, 2006).

3.1.3.2. Métodos de separação e purificação

Os extractos obtidos pelas técnicas de extracção e isolamento são na sua maioria impuros, sendo necessária a sua separação e purificação. O nível de complexidade da técnica a aplicar dependerá dos interesses dos investigadores e em grande medida das propriedades de solubilidade e volatilidade dos compostos a serem separados. Assim sendo, a separação e purificação dos constituintes das plantas é feita aplicando uma, ou a combinação de técnicas cromatográficas.

3.1.4. Cromatografia

É uma técnica de separação e identificação dos componentes de uma mistura baseada na diferença de velocidade de arrastamento dos solutos por uma fase móvel líquida ou gasosa através de uma fase fixa estacionária (Skoog *et al*, 2006).

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

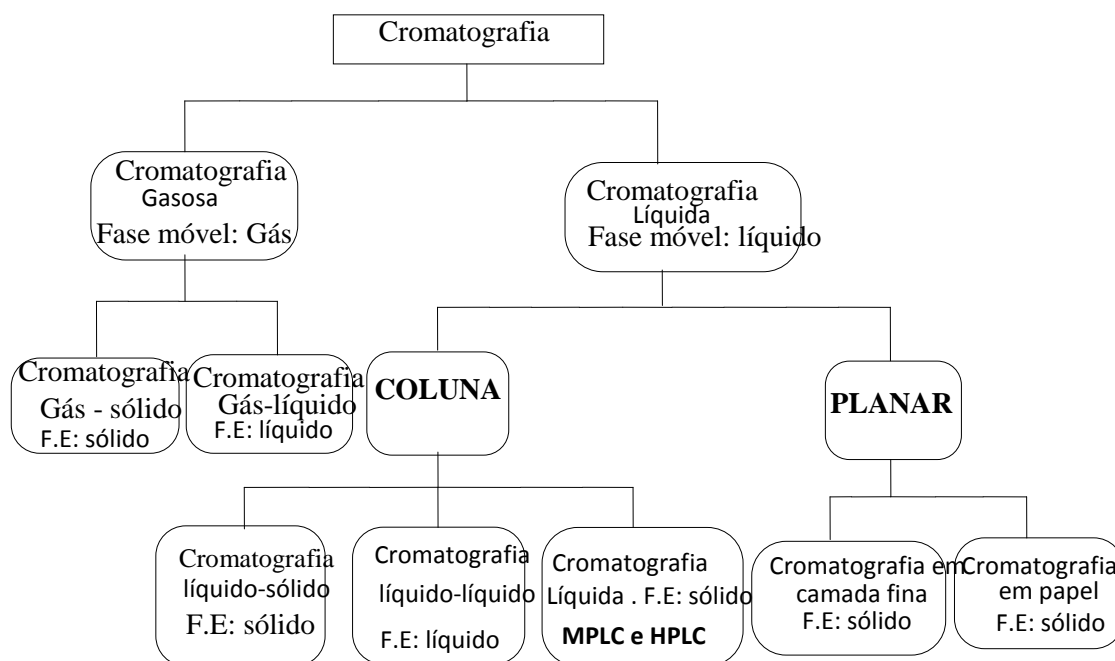


Figura 13. Esquema de classificação da cromatografia com base no estado físico das fases móvel e estacionária.

3.1.5. Cromatografia em camada fina (CCF)

Neste método a fase estacionária consiste de uma camada fina de adsorvente sólido (geralmente alumina ou sílica gel) impregnado numa superfície de alumínio ou de vidro e a fase móvel é um solvente ou mistura de solventes no estado líquido. A fase móvel percorre a fase estacionária por capilaridade e é durante este fenómeno que ocorre a separação dos componentes da amostra (Skoog *et al*; 2006).

Dependendo das propriedades físicas do (s) componente (s) a separar, várias combinações entre a fase móvel e estacionária podem ser feitas de modo a obter separações nítidas das manchas dos componentes da amostra.

A identificação dos compostos por este método é feita mediante a comparação dos valores dos índices de retenção (R_f) obtidos experimentalmente com os índices de retenção padrões, obtidos nas condições similares de análise. Tais valores são obtidos através da seguinte razão:

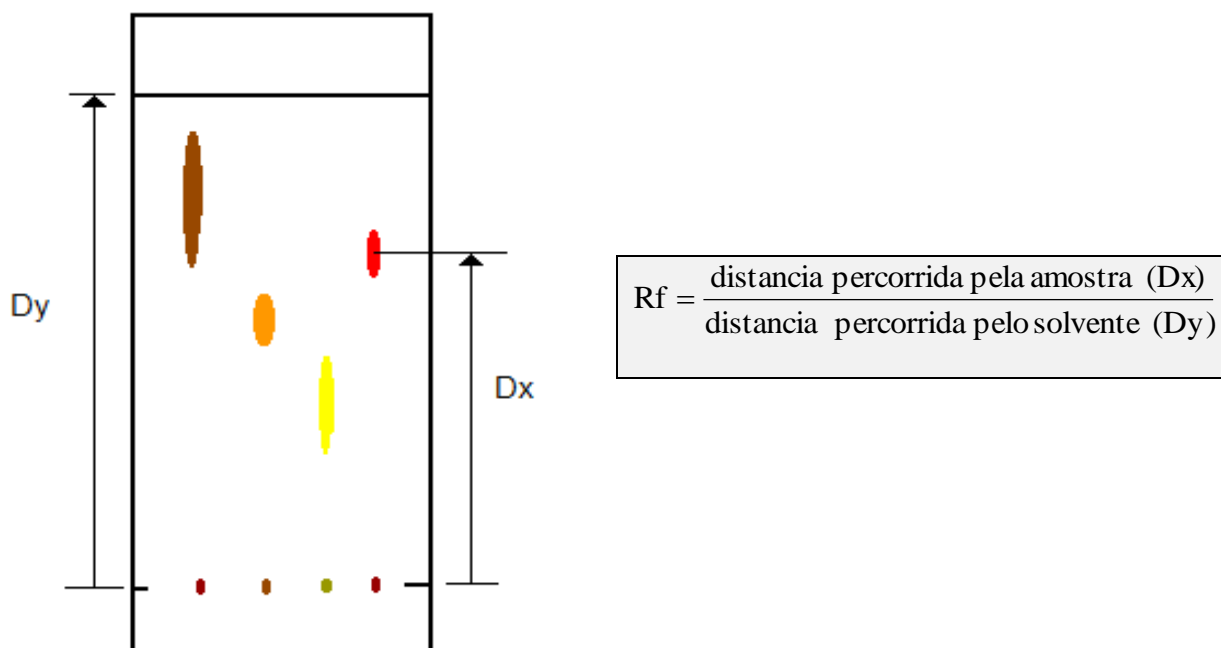


Figura 14. Determinação prática do R_f

Caso se obtenha apenas uma mancha na placa cromatográfica, significa que o composto em solução é puro, excepto situações de terem havido inconvenientes. Se as manchas dos componentes forem coloridas são marcadas directamente na placa e se não forem coloridas faz-se uma visualização por agentes físicos (luz ultravioleta) ou químicos (reagentes específicos para grupos funcionais).

3.1.5.1. Vantagens do uso de cromatografia em camada fina

- Uso de pequenas quantidades de solvente;
- A polaridade do solvente ou o tipo de mistura de solventes pode ser alterada em pouco tempo;
- Permite que se analisem na mesma placa várias amostras ao mesmo tempo. Numa placa de dimensão 20 x 20 cm podem-se analisar simultaneamente cerca de dezoito amostras.
- É uma técnica de baixo custo e com reprodutibilidade dos resultados.

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

3.1.6. Cromatografia em Coluna Normal

Este processo baseia-se nas interacções do soluto com os centros activos de um adsorvente sólido finamente dividido que é a fase estacionária. Esta técnica pode ser usada para o fracionamento dos compostos da mistura de acordo com a sua polaridade, podendo também ser usada como uma técnica de pré-purificação (Zugunza, 2010).

4. PARTE EXPERIMENTAL

Neste capítulo do trabalho são apresentados os equipamentos e as metodologias usadas para a realização dos ensaios experimentais com base nos objectivos definidos.

As análises químicas foram realizadas no Laboratório de Química dos Produtos Naturais, Faculdade de Ciências, Departamento de Química da Universidade Eduardo Mondlane e os testes de actividade antifúngica foram realizados no Laboratório de Fitopatologia da Faculdade de Agronomia e Engenharia Florestal da Universidade Eduardo Mondlane.

4.1. Esquema geral do trabalho experimental

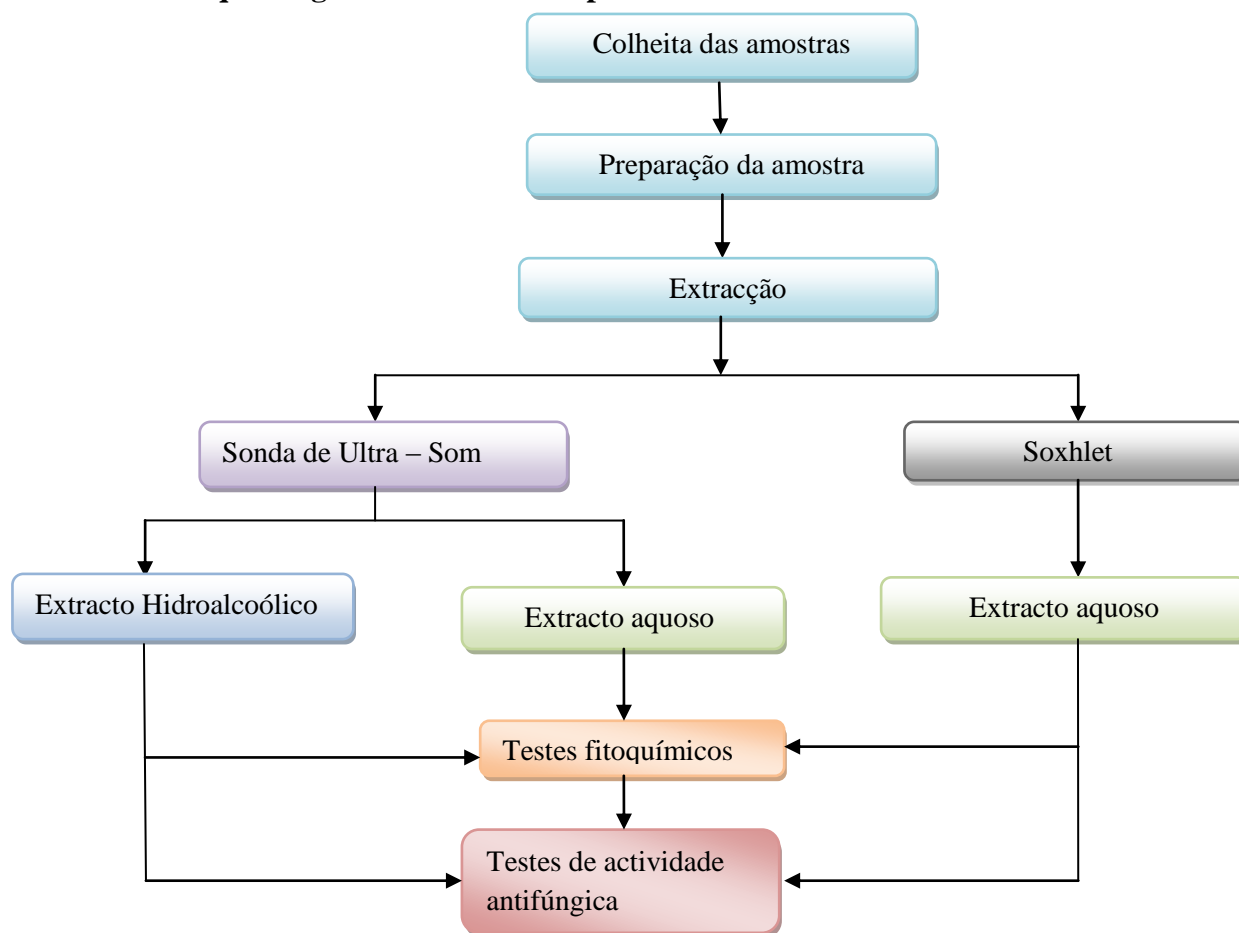


Figura 15. Esquema geral do trabalho *experimental*

A tabela 3 apresenta as plantas em estudo as nome científicos e as partes das plantas analisadas

Tabela 3. Plantas em estudo

Família	Nome científico	Nome vernacular	Partes da planta analisadas
Apocynaceae	<i>Tabernaemontana elegans</i>	Calhu	Raízes
Fabaceae	<i>Elephantorrhiza elephantina</i>	Xivurai	Raízes
Olaceae	<i>Ximenia americana</i>	Nthunguluka	Raízes
Rutaceae	<i>Zanthoxylum capense</i>	Manungwani	Raízes

4.2. Colheita das amostras

As amostras foram colhidas nas províncias de Gaza e Maputo, entre Janeiro a Maio e identificadas segundo a nomenclatura científica e vernacular, no Departamento de Ciências Biológicas, da Universidade Eduardo Mondlane, pelo estudante finalista Cremildo Maueia, supervisionado pela dr^a Filomena Barbosa docente da secção de Botânica, com a participação do estudante Etelvino Magan Santiago, com a supervisão do Prof. Doutor Viktor Sevastyanov em 2007. Mais informações podem ser encontradas no trabalho final do curso dos estudantes citados.

4.3. Tratamento das amostras

4.3.1. Secagem e moagem das amostras

As amostras das raízes foram fragmentadas em pequenos pedaços, secou -se primeiro à temperatura ambiente e posteriormente na estufa a 50°C, depois pesou-se até peso constante de modo a garantir a ausência da humidade que poderia influenciar na moagem. A moagem do material vegetal foi feita no Instituto de Investigação Agrária de Moçambique e conservou-se em garrafas esmeriladas previamente lavadas e submetidas a secagem na estufa à temperatura de 100°C (Santiago, 2007).

4.4. Extracção

Obs. é apresentado no anexo 2 o esquema de extracção dos metabolitos secundários.

4.4.1. Extracção por Soxhlet

Pesou-se 50.046, 50.067, 49.225 e 46.736 gramas do pó das raízes *Elephantorrhiza elephantina*, *Tabernaemontana elegans*, *Ximenia americana*, e *Zanthoxylum capense* respectivamente e foram colocados em cartuchos submetidos a extracção por Soxhlet durante 72 horas em média e/ou até descoloração do extracto, tendo usado 350 mL do solvente água destilada.

4.4.2. Extracção com sonda de Ultra – Som

Pesou-se 16.689, 16.408 e 15.577 gramas do pó das raízes de *Tabernaemontana elegans*, *Ximenia americana*, e *Zanthoxylum capense* respectivamente, foram submetidos a extracção com uso de Sonda de Ultra – Som, durante 30 minutos a 50 °C, com uma pulsação de 30’’ 30’’ e amplitude de 75%, com 120 mL de solvente H₂O destilada.

4.4.3. Preparação dos extractos hidroalcoólicos

Pesou-se 16,008g do pó das raízes de *Tabernaemontana elegans*, 16,061g de *Ximenia americana*, 16,221g de *Zanthoxylum capense*, foram submetidos a extracção por Sonda de Ultra – Som, durante 20 minutos a 40 °C com pulsação de 30’’ 30’’ e amplitude de 75%, com 150 mL de solvente, mistura hidroalcoólica na proporção (1:1) EtOH: H₂O destilada. É apresentado em anexo (Anexo 1) o esquema de extracção.

4.4.4. Concentração dos extractos

Os extractos aquosos obtidos por Soxhlet foram concentrados com rota – vapor, acoplado ao banho – maria, a 80 °C e rotação do balão de 80 RPM. Os extractos obtidos com Sonda de Ultra – Som foram filtrados duas vezes utilizando papel de filtro da marca Whatman n^o 113 por gravidade, depois concentrados em rota vapor.

4.5. Ensaios qualitativos

Com vista a apurar a composição fitoquímica das raízes das plantas em estudo foram realizados testes típicos em extractos brutos de 5 classes principais dos metabólitos secundários.

4.5.1. Ensaio de reconhecimento de alcalóides

4.5.1.1. Análise de alcalóides

Para realizar o ensaio de reconhecimento de alcalóides dissolveu-se em 20 mL de HCl diluído cerca de 50 mg dos extractos aquosos e hidroalcoólicos das raízes de *Elephantorrhiza elephantina*, *Tabernaemontana elegans*, *Ximenia americana* e *Zanthoxylum capense*, obtidos por Soxhlet e de sonda de ultra – som. Filtrou – se por gravidade.

As soluções ácidas obtidas dos extractos foram separadas em quatro (4) tubos de ensaio, para verificar a presença de alcalóides e em cada um dos tubos adicionou-se três gotas dos reagentes de identificação que seguem:

TUBO I.	Reagente de Hager
TUBO II.	Reagente Dragendorff
TUBO III.	Reagente Mayer
TUBO IV.	Reagente Wagner.

Em todos os ensaios foi preparado um branco, onde se colocou água destilada e acidificou-se com HCl 10%, adicionou - se o reagente de identificação qualitativa.

4.5.2. Ensaios de reconhecimento de flavonóides e taninos

a) Análise de flavonóides e taninos

Para realizar o ensaio de reconhecimento de flavonóides dissolveu-se em 20 mL de água cerca de 50 mg dos extractos aquosos e hidroalcoólicos das raízes de *Elephantorrhiza elephantina*, *Tabernaemontana elegans*, *Ximenia americana* e *Zanthoxylum capense*, obtidos por Soxhlet e de sonda de ultra – som. Filtrou – se por gravidade.

As soluções aquosas obtidas dos extractos foram submetidas aos testes de reconhecimento de flavonóides e taninos com os reagentes apresentados na tabela 2.

4.5.3. Ensaio de reconhecimento de saponinas e esteróides – triterpenóides

a) Teste de espuma

Tomou-se 50 mg do extracto diluiu-se em 20 mL de água destilada e filtrou, de seguida tomou-se 5 mL do extracto agitou energicamente durante 1 min observou-se a formação de espuma nos tubos contendo extractos aquosos obtidos por Soxhlet das raízes de *Elephantorrhiza elephantina*, *Ximenia americana* e *Zanthoxylum capense*. Para os extractos aquosos e hidroalcoólicos obtidos por Sonda de Ultra – Som observou-se a formação de espuma para o extracto hidroalcoólico de *Ximenia americana*.

b) Reacção Liebermann – Buchard

• Extracto obtido por Sonda de Ultra – som

Transferiu-se para tubos de ensaio 3 mL dos extractos aquosos e hidroalcoólico de *Zanthoxylum capense*, *Ximenia americana*, e *Tabernaemontana elegans* obtidos por Sonda de Ultra – Som, adicionou-se 5 mL de clorofórmio, agitou-se energicamente e observou-se a formação de uma emulsão, transferiu-se para um funil de separação, decantou-se a fase clorofórmica para um tubo de ensaio seco e adicionou-se 5 mL de clorofórmio agitou-se energicamente, decantou-se a fase clorofórmica para um tubo de ensaio seco.

Aos extractos clorofórmicos obtidos adicionou-se 1 mL de acetato de etilo e 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado agitou-se suavemente, observou-se a formação de uma cor verde para o extracto clorofórmico de *Zanthoxylum capense*; castanha para o extracto clorofórmico de *Tabernaemontana elegans*, e cor castanha - escura para o extracto clorofórmico de *Ximenia americana*. Todas as reacções são exotérmicas, observou-se uma efervescência com a adição do ácido sulfúrico concentrado.

- **Extracto obtido por Soxhlet**

Pesou-se cerca de 0,5 g dos extractos de *Elephantorrhiza elephantina*, *Zanthoxylum capense*, *Tabernaemontana elegans* e *Ximenia americana*, obtidos por Soxhlet foram dissolvidos em 5 mL de água destilada cada, fez-se extracção com clorofórmio e analisou-se usando o procedimento aplicado para os extractos obtidos por Sonda de Ultra – Som, tendo sido observada a formação de uma cor verde - escura para extracto clorofórmico de *Zanthoxylum capense* e nenhuma mudança nos extractos de *Tabernaemontana elegans* e para os extractos clorofórmico de *Elephantorrhiza elephantina* e *Ximenia americana* visualizou-se o aparecimento de uma coloração castanha - clara e escura respectivamente.

O desenvolvimento de coloração na zona de contacto e/ou coloração na fase acética indica presença de desoxi açúcares, sendo azul para esteróides e verde para triterpenos.

Obs. Em anexo (Anexo 3) apresenta-se o esquema de extracção dos metabolitos secundários.

4.5.4. Ensaio de reconhecimento de Antraquinonas

Dissolver alguns miligramas do extracto seco em 5 mL de tolueno. Filtrar se necessário. Adicionar 2 mL de solução de NH₄OH a 10%, agitar suavemente. O aparecimento de coloração rósea, vermelha ou violeta na fase aquosa, indica reacção positiva.

4.5.5. Cromatografia em camada fina

Neste trabalho é aplicada a técnica de cromatografia em camada fina (CCF) para análises dos extractos aquosos e hidroalcoólicos das raízes de *Elephantorrhiza elephantina*, *Tabernaemontana elegans*, *Ximenia americana* e *Zanthoxylum capense*.

Estes extractos foram submetidos à cromatografia em camada fina (CCF) usando como fase estacionária sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck) sobre as placas comerciais de alumínio (20 x10 cm) e como fase móvel:

- Acetato de etilo: ácido fórmico: ácido glacial acético: água 50:5.5:5.5:13 para flavonóides com revelação em UV-365nm. Revelador químico: solução alcoólica de cloreto de ferro a 1%.

- Hexano acetato de etilo (7:3) e (8:2)

4.5.5.1. Aplicação da amostra

Depois da dissolução dos extractos em metanol foram aplicados em placas cromatográficas a uma distância de 1.5 cm da extremidade inferior da placa usando tubos capilares de 2 µL de capilaridade, mantendo uma separação mínima de 1 cm entre os pontos de aplicação.

4.5.5.2. Desenvolvimento das placas

A eluição foi realizada de modo ascendente em tinas cromatográficas adequadas previamente saturadas com o eluente, tendo-se sempre o cuidado de controlar o nível do eluente de modo com que não atinja os pontos de aplicação da amostra durante o processo de imersão.

4.5.5.3. Sistema de detecção

Os componentes separados foram visualizados numa lâmpada de luz UV a 254nm e as placas foram pulverizadas com reagente Dragendorff para detecção de alcalóides para os extractos de *Tabernaemontana elegans* e *Zanthoxylum capense* e solução alcoólica de cloreto de ferro 1% para a detecção de flavonóides, para os extractos de *Elephantorrhiza elephantina* e *Ximenia americana*.

4.5.6. Ensaio de actividade antifúngica

4.5.6.1. Testes de actividade antifúngica

Com vista a avaliar a actividade antifúngica dos extractos das raízes foram cultivados fungos a partir de sementes de amendoim, milho e castanha de cajú depois inoculados em meio de cultura Potato dextrose agar (PDA), um nutriente que favorece o crescimento de fungos.

Tabela 4. Materiais e reagentes

Material	
<ul style="list-style-type: none">• Placas de Petri• Conta – gota, agulha, seringa• Parafilme	Meio de cultura <ul style="list-style-type: none">• PDA - Potato Dextrose Agar
Aparelhos <ul style="list-style-type: none">• Microscópio• Fluxo laminar	Microrganismo <ul style="list-style-type: none">• Fungo – <i>Aspergillus flavus</i>• Fungo – <i>Fusarium ssp</i>• Fungo – <i>Aspergillus niger</i>
Reagentes <ul style="list-style-type: none">• Água destilada• Álcool 96%	

4.5.6.2. Preparação dos meios de cultivo

O meio de cultura foi preparado segundo as prescrições apresentadas pelo fabricante.

- Pesar 39 g do pó e colocá-lo num copo de Becker;
- Dissolver em 1000 mL de água destilada, agitando continuamente com um bastão de vidro ou com um agitador eléctrico (uso de barra magnética) e levar à ebulição;
- Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos; depois arrefecer em banho- maria 50°C.
- Distribuir os meios nas placas de Petri previamente esterilizadas, em condições asséptica deixar secar à temperatura ambiente e incubar a 25 °C por 24 h para verificar a esterilidade das mesmas e comprovada a esterilidade conservar na geleira entre 2-8°C identificada com o nome do meio e data de preparação.

4.5.6.3. Cultivo de fungos

Preparação da câmara húmida

Para se preparar a camara húmida humedeceu -se com água destilada, papel de filtro recortado à medida das placas e previamente esterilizado, colocou-se em placas de Petri lavadas e esterilizadas. De forma ordenada colocou-se algumas sementes de amendoim, milho e castanha de caju, selou-se

com parafilme incubou-se à temperatura ambiente durante 7 dias as sementes de milhos foram depois incubadas em uma incubadora a $25\pm 5^{\circ}\text{C}$.

Depois de 7 dias com os microorganismos desenvolvidos na câmara húmida seguiu-se com o isolamento e inoculação destes em PDA, obedecendo condições assépticas, esterilizou-se o bisturi em chama de lamparina e arrefeceu-se, abriu-se a placa de Petri contendo o microorganismo tirou-se uma pequena porção da colónia e colocou-se em uma placa de Petri nova com meio de cultivo PDA; incubou-se à temperatura ambiente durante 3 a 7 dias.

a. Preparação das soluções dos extractos vegetais

Para obter as soluções dos extractos vegetais de 100 e 50mg/mL de concentração, pesou-se 500, 250 mg do extracto seco respectivamente e adicionou-se 5 mL de água destilada e agitou-se até dissolução do extracto.

b. Aplicação dos extractos

Depois de isolar e identificar os microorganismos requeridos *Asperigillus flavus*, *Asperigillus niger* e *Fusarium ssp*, seguiu-se a aplicação dos extractos onde foi utilizada a técnica de incorporação do substrato;

A técnica do disco de papel de filtro consistiu em colocar sobre o microorganismo disco de papel de filtro esterilizado picotado com tesoura e embebido com extracto em estudo, depois incubou - se por um período de 72 horas;

Técnica de adição de gotas que consiste em colocar algumas gotas sobre o microorganismo e incubar por 72 horas observou-se o tempo de acção dos extractos obedecendo sempre condições assépticas de modo a evitar a contaminação com microorganismos oportunistas.

5. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

5.1. Resultados da extracção

São apresentados nas tabelas 5 e 6 os resultados da extracção por Soxhlet (extracto aquoso) e Sonda de Ultra – Som (extracto aquoso e hidroalcoólico).

Tabela 5. Resultados da extracção por Soxhlet e Sonda Ultra – Som usando água como solvente

Espécie / Técnica	Peso da amostra em gramas		Peso do extracto seco em gramas		V(mL)	% (m/m) do extracto		Tempo de extracção	
	Soxhlet	Ultra-Som	Soxhlet	Ultra -Som		Soxhlet	Ultra-Som	Soxhlet	Ultra-Som
<i>.elephantina</i>	50,046	N/A	7,383	N/A	350	14,752	N/A	72h	N/A
<i>T. elegans</i>	50,067	16,689	6,752	5,097	350	13,485	10,18	72h	1h
<i>X. americana</i>	49,225	16,408	8,914	6,906	350	18,108	14,03	72h	1h
<i>Z. capense</i>	46,736	15,577	7,422	5,182	330	15,881	11,09	72h	1h

N/A= Não aplicável

Tabela 6. Resultados da extracção por Sonda Ultra – Som com solvente hidroalcoólico

Espécie	Peso da amostra (g)	Peso do extracto (g)	V (mL)	% Dos extractos hidroalcoólicos (obtidos por sonda de ultra – som)	Tempo de extracção
<i>T. elegans</i>	16.008	1.210	150	7.59 %	40 min
<i>X. americana</i>	16.061	0.854	150	5.31 %	40 min
<i>Z. capense</i>	16.221	2.917	150	5.26 %	40 min

Obs. Não foram realizados ensaios de extracções com solvente aquoso pela técnica de Sonda de Ultra – Som.

5.2. Resultados dos ensaios fitoquímicos

As análises fitoquímicas foram realizadas com base em testes cromáticos. Os testes fitoquímicos realizados sobre os extractos aquosos brutos obtidos por Soxhlet e Sonda de Ultra – Som indicaram a presença alcalóides nas raízes de *Tabernaemontana elegans* e *Zanthoxylum capense* e flavonóides e taninos nas raízes de *Elephantorrhiza elephantina*, *Ximenia americana* e *Zanthoxylum capense*. Os extractos de *Elephantorrhiza elephantina*, *Ximenia americana* e *Zanthoxylum capense*, indicaram presença de saponinas conforme ilustram as Tabelas 7 e 8

Tabela 7. Resultados dos ensaios fitoquímicos

Princípios activos	Técnica de identificação	<i>Elephantorrhiza elephantina</i>	<i>Tabernaemontana elegans</i>			<i>Ximenia americana</i>			<i>Zanthoxylum capense</i>		
		E1	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3
Alcalóides	Dragendorff	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
	Mayer	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
	Wagner	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
	Hager	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
Flavonóides	FeCl ₃ 1% alc.	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-
	H ₂ SO ₄ conc	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	(CH ₃ COO) ₂ Pb	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
	Shinoda	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	Gelatina	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	Reagente alcalino	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saponinas	Teste de espuma	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Esteroides – triterpenóides	Liebermann - Buchard	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-

Legenda

E 1 = Extracto aquoso obtido por Soxhlet

E 2 = Extracto aquoso obtido por Sonda de Ultra - Som

E 3 = Extracto hidroalcoólico obtido por Sonda de Ultra - Som

Obs.

- = Teste negativo

+ = Teste positivo

Tabela 8. Resumo dos resultados dos testes fitoquímicos

Princípios activos	Técnica / solvente extracção	<i>Elephantorrhiza elephantina</i>	<i>Tabernaemontana elegans</i>	<i>Ximenia americana</i>	<i>Zanthoxylum capense</i>
Alcalóides	Soxhlet/ H ₂ O	-	+	-	+
	Sonda de Ultra- Som/ H ₂ O	N/A	+	-	+
	Sonda de Ultra- Som/ EtOH: H ₂ O (1:1)	N/A	+	-	+
Flavonóides	Soxhlet/ H ₂ O	+	-	+	-
	Sonda de Ultra- Som/ H ₂ O	N/A	-	+	+
	Sonda de Ultra- Som/ EtOH: H ₂ O (1:1)	N/A	-	+	-
Taninos	Soxhlet/ H ₂ O	+	-	+	-
	Sonda de Ultra- Som/ H ₂ O	N/A	-	+	+
	Sonda de Ultra- Som/ EtOH: H ₂ O (1:1)	N/A	-	+	-
Esteróides – triterpenóides	Soxhlet/ H ₂ O	-	-	-	+
	Sonda de Ultra- Som/ H ₂ O	N/A	-	-	+
	Sonda de Ultra- Som/ EtOH: H ₂ O (1:1)	N/A	-	-	-
Saponinas	Soxhlet/ H ₂ O	+	+	+	+
	Sonda de Ultra- Som/ H ₂ O	N/A		+	+
	Sonda de Ultra- Som/ EtOH: H ₂ O (1:1)	N/A		+	
Antraquinonas	Soxhlet/ H ₂ O	-	-	-	-
	Sonda de Ultra- Som/ H ₂ O	N/A	-	-	-
	Sonda de Ultra- Som/ EtOH: H ₂ O (1:1)	N/A	-	-	-

Obs. N/A = Não Aplicável

5.3. Resultados das análises cromatográficas (CCF)

Os extractos brutos aquosos e hidroalcoólico de *Elephantorrhiza elephantina*, *Tabernaemontana elegans*, *Ximenia americana* e *Zanthoxylum capense* foram analisados por cromatografia em camada fina, utilizando como sistema de eluição EtOAc: Hexano (7:3) e EtOAc: H₂CO₂: AcOH glacial: H₂O (50:5.5:5.5:13), fase estacionaria sílica gel 60 F₂₅₄ Merck® sobre a placa de alumínio e visualizada usando lâmpadas de UV – Vis a 254nm e posteriormente pulverizada com reagente de Dragendorff e solução alcoólica de cloreto de ferro respectivamente.

Os extractos aquosos brutos das raízes de *Elephantorrhiza elephantina*, *Tabernaemontana elegans*, *Ximenia americana* e *Zanthoxylum capense* foram submetidos a fracionamento por cromatografia em coluna obtendo fracções metanólicas, das quais duas foram posteriormente analisadas por CCF, cujos resultados são apresentados na tabela 9.

Tabela 9. Resultados CCF dos extractos aquosos

Espécie	Fracções (MeOH)	N de manchas	UV 254 nm	Cores das manchas após revelação de		R _f
				Dragendorff	FeCl ₃ alc 1%	
<i>E. elephantina</i>	1	5	Visíveis	Não revelou	Verde - escuro	0.43
	2	2	Não Visíveis	Não revelou	Verde - escuro	0.43
<i>T. elegans</i>	1	3	Não Visível	Laranja-acastanhado	Não revelou	0.41
	2	1	Não Visível	Não revelou	Não revelou	0,38
<i>X. americana</i>	1	5	Visíveis	Não revelou	Verde - escuro	0.15; 0.33; 0.41; 0.43 ; 0.50
	2	2	Visíveis	Não revelou	Verde - escuro	0,23 e 0,42
<i>Z. capense</i>	1	3	Visíveis	Não revelou	Não revelou	0, 22; 0,37; 0.43
	2	2	Visíveis	Não revelou	Não revelou	0,10; 0,37

5.4. Resultados dos ensaios de actividade antifúngica

Objectivando o estudo da actividade antifúngica foram isolados três microorganismos (fungos) do género de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Fusarium ssp* a partir da semente de amendoim e castanha de cajú e semente de milho respectivamente.



Figura 16. Placa de Petri com sementes de amendoim contaminadas com *Aspergillus flavus*

Testou - se qualitativamente *in vitro* de forma preliminar a actividade antifúngica dos extractos aquosos e hidroalcoólicos usando o método de difusão em disco e uma segunda técnica que consistia na adição de uma gota do extracto sobre o microorganismo constatou-se actividade em todos os extractos, apresentando maior actividade os extractos hidroalcoólicos.

A tabela 10 apresenta os resultados dos ensaios qualitativos de actividade antifúngica dos extractos brutos aquosos e hidroalcoólicos das plantas em estudo obtidos por Soxhlet e Sonda de Ultra – Som sobre três fungos do género *Asperigillus flavus*, *Asperigillus niger* e *Fusarium ssp* cujos efeitos são representados pelos sinais:

(-) **Negativo** onde não há inibição;

- (+) **Fraco** ocorre a inibição do crescimento dos microorganismos, mas quase que não observa;
- (++) **Moderado** apresenta um efeito apreciável;
- (+++) **Elevado** inibe de forma mais acentuada do crescimento dos microorganismos em estudo.

Algumas imagens culturas de fungos registadas durante os ensaios são apresentadas em anexos **4, 5, 6 e 7.**

Tabela 10. Resultado dos resultados dos ensaios de actividade antifúngica

Planta	Microorganismo / género	Efeito dos extractos					
		Extracto Aquoso Soxhlet		Extracto Aquoso Ultra -Som		Extracto Hidroalcoólico	
		100mg/L	50mg/L	100mg/L	50mg/L	100mg/L	50mg/L
<i>Elephantorrhiza elephantina</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	+++	++	—	—	—	—
	<i>Fusarium ssp</i>	+++	+	—	—	—	—
	<i>Aspergillus niger</i>	+++	+	—	—	—	—
<i>Tabernaemontana elegans</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	<i>Fusarium ssp</i>	++	+	+++	++	+++	+++
	<i>Aspergillus niger</i>	+++	++	+	+	+++	+
<i>Zanthoxylum capense</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	+++	++	+++	+++	+++	+++
	<i>Fusarium ssp</i>	+++	+++	+++	+++	+++	++
	<i>Aspergillus niger</i>	+++	++	—	—	+++	+
<i>Ximenia americana</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	<i>Fusarium ssp</i>	+++	+	+++	+++	+++	++
	<i>Aspergillus niger</i>	+++	+	+++	++	+++	+++

_Não foi realizado ensaio de actividade antifúngica.

O extracto hidroalcoólico de *Ximenia americana* possui efeito apreciável sobre *Aspergillus flavus*, tendo demonstrado actividade contra este microorganismo; a figura 17 apresenta uma cultura de *Aspergillus flavus* (as regiões de cor verde – amarelada), com alguns esporos mortos (regiões com manchas castanhas) pela acção do extracto hidroalcoólico de *Ximenia americana*.

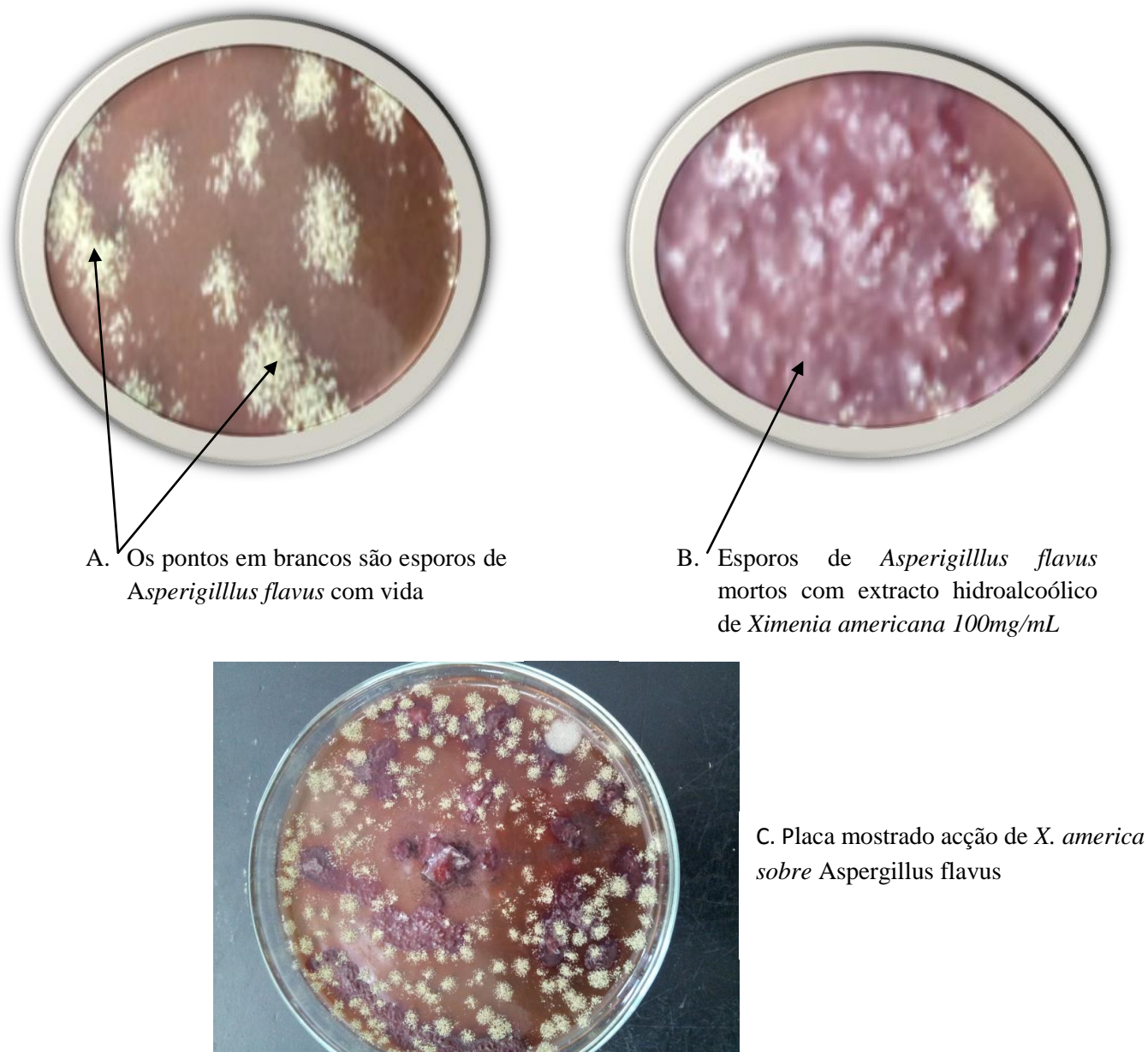
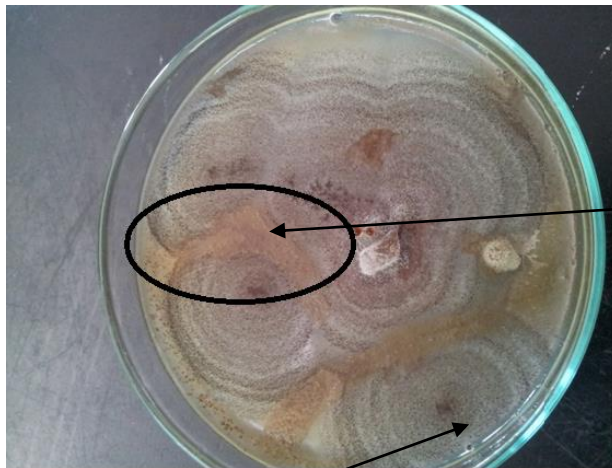
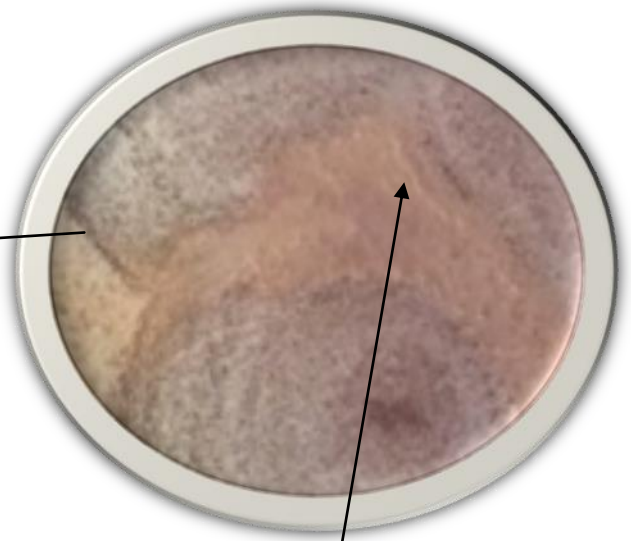


Figura 17. Placa de Petri ilustrando acção do extracto aquoso de *Ximenia americana* (B) sobre fungo do género *Aspergillus flavus* (A).

A figura 18 apresenta uma cultura de *Aspergillus niger* (as manchas pretas que se observam na placa), com esporos mortos nos pontos onde se aplicou o extracto aquoso de *Tabernaemontana elegans* (as regiões de cor castanha – clara que se observam na placa). O extracto aquoso de *Tabernaemontana elegans* inibe o crescimento deste microorganismo.



B. Os pontos cinza são os Esporos *Aspergillus niger*



A. A mancha castanha são os Esporos *Aspergillus niger* mortos

Figura 18. Acção do extracto aquoso de *Tabernaemontana elegans* sobre fungo do género *Aspergillus niger*.

A figura 19 expressa resultados obtidos pela incorporação dos extractos de *Tabernaemontana elegans*, demonstrando actividade sobre *Fusarium ssp*, com maior expressão para o extracto hidroalcoólico com 100mg/ml (onde a mancha amarela sobre os microorganismos representa a morte destes); é possível notar a diferença na acção dos extractos aquosos obtidos por Soxhlet e Sonda de Ultra – Som, notavelmente o extracto aquoso obtido por Sonda de Ultra – Som apesar de ter actividade é o menos activo, razão pela qual não é possível visualizar acção deste extracto na figura 19 (D) a olho nu, mas foi possível com ajuda do microscópio.

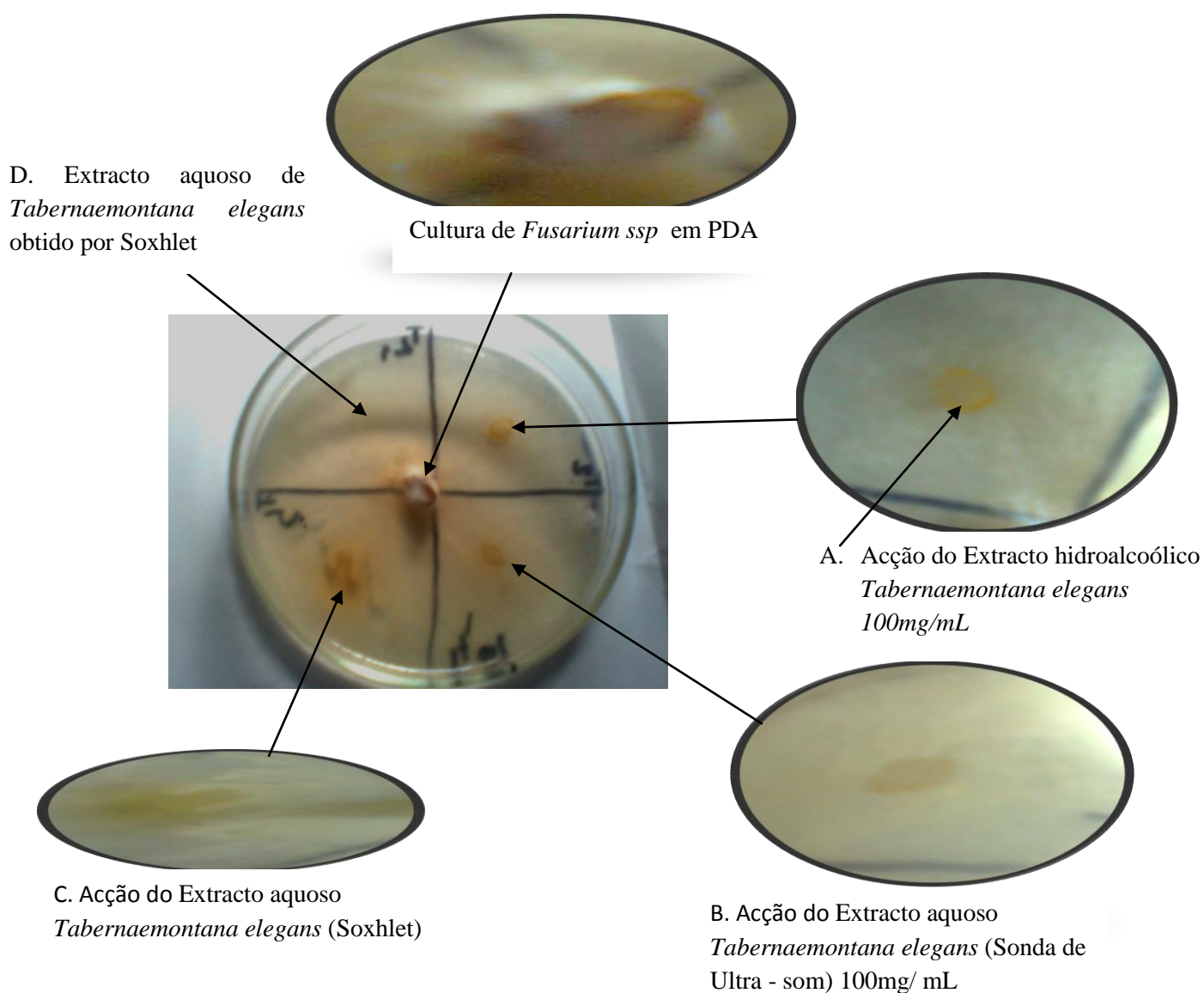


Figura 19. Acção dos extractos aquosos e hidroalcoólicos de *Tabernaemontana elegans* sobre o fungo género *Fusarium ssp* em meio de cultura PDA

6. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

6.1. Extracção

Foram realizadas extracções utilizando duas técnicas, Soxhlet e Sonda de Ultra – Som; a extracção por Soxhlet apresentou um rendimento ligeiramente superior em relação aos extractos obtidos por sonda de Ultra – Som.

- A percentagem do extracto aquoso seco das raízes de *Tabernaemontana elegans* obtido por Soxhlet é de **13,49%** e por Sonda de Ultra – Som é de **10,175%** com uma diferença de cerca de **3,315%**. A percentagem do extracto hidroalcoólico é de 7,56%.
- A percentagem do extracto aquoso seco das raízes de *Ximenia americana* obtido por Soxhlet é de **18,108%** e por Sonda de Ultra – Som é de **14,030%** com uma diferença de **4,078%**. A percentagem do extracto hidroalcoólico é de 5,31 %.
- A percentagem do extracto aquoso seco das raízes de *Zanthoxylum capense* obtido por Soxhlet é de **15,881%** e por Sonda de Ultra – Som é de **11,086%** com uma diferença de **4,795%**. A percentagem do extracto hidroalcoólico é de 5,26 %.

A razão mais provável para estes resultados é a diferença dos tempos de extracção entre as duas técnicas: a técnica de Soxhlet teve uma média de 72 horas de duração enquanto a extracção por Sonda de Ultra – Som durou apenas 1 hora, o que pode ter contribuído para o arrastamento de maior número de componentes hidrossolúveis pela técnica de Soxhlet

Desta forma, pode se dizer que quanto maior o tempo de exposição da amostra ao solvente, maior será o número de componentes extraídos.

Para as raízes de *Elephantorrhiza elephantina* realizou-se a extracção por Soxhlet usando água como solvente, obtendo cerca de **14,75%** do extracto aquoso seco.

6.2. Ensaios fitoquímicos e de actividade antifúngica

Baseando – se em testes cromáticos e de precipitação foram realizados testes fitoquímicos das raízes de *Elephantorrhiza elephantina*, *Tabernaemontana elegans*, *Ximenia americana* e *Zanthoxylum capense*.

a) *Elephantorrhiza elephantina*

Tendo revelado presença de flavonóides, taninos e saponinas no extracto aquoso das raízes de *Elephantorrhiza elephantina* obtidos por Soxhlet. A presença de saponinas e compostos fenólicos em *Elephantorrhiza elephantina* foi descrita por Wyk *et al*, 2004.

Os ensaios qualitativos de actividade antifúngica sugeriram que o extracto aquoso de *Elephantorrhiza elephantina* possui actividade antifúngica contra fungos do género *Asperigillus flavus*, *Asperigillus niger* e *Fusarium ssp*. Esta actividade antifúngica pode estar associada a presença de saponinas e compostos fenólicos no extracto aquoso das raízes de *Elephantorrhiza elephantina*.

b) *Tabernaemontana elegans*

Os testes fitoquímicos realizados sobre os extractos aquosos brutos obtidos por Soxhlet e Sonda de Ultra-Som indicaram a presença de alcalóides nas raízes de *Tabernaemontana elegans* ao responderem positivamente aos testes de reconhecimento de alcalóides precipitando com os reagentes de Dragendorff, Wagner e Mayer, formando precipitado amarelo – alaranjado, vermelho – tijolo e creme respectivamente.

O extracto hidroalcoólico das raízes de *Tabernaemontana elegans* indicou presença de alcalóides quando testado com os reagentes de Dragendorff, Wagner, Mayer e Hager, este último com formação de precipitado amarelo, facto que não se observou nos extractos aquosos obtidos por Soxhlet e Sonda de Ultra-Som. O teste de espuma sugeriu a presença de saponinas.

Os ensaios cromatográficos para o reconhecimento de alcalóides não revelaram nenhuma mancha visível em UV- vis a 254nm, porém observou-se algumas manchas quando reveladas com reagente de Dragendorff.

Os extractos aquosos e hidroalcoólicos de *Tabernaemontana elegans* manifestaram actividade antifúngica contra fungos do género *Asperigillus flavus*, *Asperigillus niger* e *Fusarium ssp*, sendo o extracto aquoso obtido por Sonda de Ultra – Som e hidroalcoólico mais activo contra *Asperigillus flavus* onde demonstrou elevado efeito em quase todos os extractos testados.

A acção do extracto aquoso de *Tabernaemontana elegans* contra o fungo do género *Asperigillus niger*, pode ser associada presença de alcalóides e saponinas nos extractos aquosos e hidroalcoólicos. Segundo Alvares, 2006 as saponinas possuem propriedades antifúngicas conhecidas e o mecanismo principal sugerido para esta actividade é a interacção com os esteróis da membrana.

c) *Zanthoxylum capense*

O extracto aquoso e hidroalcoólico das raízes de *Zanthoxylum capense* obtidos por Sonda de Ultra - Som revelaram a presença de alcalóides quando analisada com reagentes específicos para alcalóides com reagente de Dragendorff observou-se formação de precipitado laranja – acastanhado, creme com o reagente de Mayer e vermelho - tijolo com reagente de Wagner; o extracto aquoso de *Zanthoxylum capense* indicou também a presença de flavonóides quando testada com solução alcoólica de cloreto de ferro a 1%, com aparecimento de uma cor verde – escura e uma turvação de cor creme quando testado com solução aquosa de acetato de chumbo a 10% indicou presença de taninos.

O extracto aquoso das raízes de *Zanthoxylum capense* obtido por Soxhlet respondeu de forma positiva para presença de alcalóides quando testado com os reagentes específicos acima citados. Indicou ainda a presença de saponinas pelo teste de espuma e esteróides – triterpenóides pela reacção de Liebermann – Buchard com a formação da cor verde – escura, para o extracto obtido por Soxhlet. A presença de alcalóides nas plantas da família Rutaceae está bem referenciada na literatura (Wyk *et al*, 2004).

Os extractos aquosos e hidroalcoólicos das raízes de *Zanthoxylum capense* mostraram - se activos contra os três microorganismos em estudo apresentando maior efeito contra fungo do género *Asperigillus flavus*, em concentrações de 100 e 50 mg/mL, *Fusarium ssp* e *Asperigillus niger* em concentrações de 100 mg/mL.

Estudos realizados sobre diferentes espécies de *Zanthoxylum* demonstram actividade biológica atribuída aos alcalóides benzofenatridinas, com particular significância para sanguinarina e alcalóides relacionados os quais acredita-se estarem presentes também na *Zanthoxylum capense* (Wyk *et al*, 1997).

d) *Ximenia americana*

Os extractos aquosos das raízes de *Ximenia americana* obtidos por Soxhlet e Sonda de Ultra - Som, indicaram a presença de flavonóides pela reacção positiva com a solução alcoólica de cloreto de ferro (III) e solução aquosa de acetato de chumbo com formação de uma cor verde - escura e precipitado creme respectivamente.

O extracto hidroalcoólico indicou presença de flavonóides pela reacção de FeCl₃ 1% alcoólico com formação de uma cor de tonalidade azul e de taninos pela reacção com solução aquosa de gelatina com formação de precipitado de cor creme. A presença de taninos ou compostos fenólicos nas plantas da família Oleaceae é referenciada na literatura por Wyk *et al*, 2004.

O teste de espuma sugeriu a presença de saponinas para o extracto aquoso obtido por Soxhlet, observações semelhantes foram feitas por James *et al*, 2007.

Os extractos aquosos e hidroalcoólicos das raízes de *Ximenia americana* mostraram - se activos contra os microorganismos em estudo apresentando maior efeito contra fungo do género *Asperigillus flavus*, em concentrações de 100 e 50 mg/mL, *Asperigillus niger* e *Fusarium ssp* em concentrações de 100 mg/mL observações semelhantes sobre actividade antifúngica foram feitas por Ogunleye e Ibitoye (2003). Esta actividade é sustentada pela presença de polifenóis (Brasileiro *et al*, 2007).

7. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

7.1. Conclusões

Com base nos ensaios fitoquímicos preliminares dos extractos brutos das raízes de *Elephantorrhiza elephantina*, *Tabernaemontana elegans*, *Ximenia americana* e *Zanthoxylum capense* e da actividade antifúngica contra *Asperigillus flavus*, *Asperigillus niger* e *Fusarium ssp* conclui-se que os testes fitoquímicos preliminares revelaram a:

- ✓ Presença de flavonóides, taninos e saponinas nas raízes de *Elephantorrhiza elephantina* e *Ximenia americana*;
- ✓ Presença de alcalóides e saponinas nas raízes de *Tabernaemontana elegans*;
- ✓ Presença de alcalóides, saponinas, flavonóides e esteróides - triterpenóides nas raízes de *Zanthoxylum capense*;

A cromatografia em camada fina confirmou a presença de flavonóides nas raízes de *Elephantorrhiza elephantina*, *Ximenia americana* e *Zanthoxylum capense* com uma mancha comum R_f 0.43.

Conclui-se também que o tempo de exposição da amostra ao solvente é um factor preponderante na extracção porque quanto maior o tempo de contacto da amostra com o solvente maior será o número de componentes extractos.

Os ensaios preliminares *in vitro*, da actividade antifúngica dos extractos aquosos e hidroalcoólicos revelaram que:

- ✓ O extracto aquoso bruto de *Elephantorrhiza elephantina* possui actividade antifúngica significativa contra *Asperigillus flavus*, *Asperigillus niger* e *Fusarium*.
- ✓ Os extractos aquosos e hidroalcoólicos das raízes de *Tabernaemontana elegans* revelaram uma actividade antifúngica significativa contra *Asperigillus flavus* particularmente o extracto aquoso.

- ✓ Os extractos aquosos e hidroalcoólicos das raízes de *Ximenia americana* revelaram uma actividade antifúngica significativa especialmente contra *Asperigillus niger*, onde se mostrou mais activo comparado a outros extractos.
- ✓ Os extractos aquosos e hidroalcoólicos das raízes de *Zanthoxylum capense* revelaram uma actividade antifúngica significativa contra *Asperigillus flavus*, *Asperigillus niger* e *Fusarium*.

O extracto aquoso de *Tabernaemontana elegans* é mais activo contra *Asperigillus flavus* e o extracto aquoso de *Zanthoxylum capense* mostrou-se mais activo contra o fungo *Fusarium ssp*, a *Ximenia americana* apresenta maior actividade contra o *Asperigillus niger*.

A actividade antifúngica das plantas em estudo está associada presença de flavonóides, taninos, alcalóides, saponinas e esteróides – triterpenóides na sua composição de forma particular nas suas raízes.

Em suma, os resultados apresentados no presente trabalho sobre actividade antifúngica evidenciaram a importância de dar continuidade do estudo de extractos vegetais de *Elephantorrhiza elephantina*, *Tabernaemontana elegans*, *Ximenia americana* e *Zanthoxylum capense* no controlo de fitopatógenos, o que pode determinar a sua importância na agricultura como fungicidas naturais.

7.2. Recomendações

Com base nas conclusões tiradas deste trabalho recomenda-se:

- ✓ Que se dê continuidade a este trabalho, fazendo o isolamento, purificação e caracterização dos principais metabólitos encontrados nas plantas em estudo, de modo a determinar o composto, classe ou família de compostos responsáveis por esta actividade antifúngica.
- ✓ Recomenda-se ainda que se faça um levantamento estatístico sobre a população vegetal das espécies em estudo.
- ✓ Que se faça um estudo de modo a determinar a concentração mínima inibitória.
- ✓ Que se faça um estudo toxicológicos sobre das plantas em estudo.

- ✓ É também recomendação deste trabalho que haja uma melhor coordenação entre as instituições responsáveis pelo estudo das diferentes espécies de plantas com propriedades medicinais e os praticantes da medicina tradicional de modo a permitir melhor administração das mesmas.
- ✓ As plantas em estudo exibiram uma potencial actividade antifúngica desta feita, se recomenda a Faculdade de Ciências da U.E.M, o melhoramento substancial das condições e aparelhos cruciais para um melhor estudo das mesmas e posterior aproveitamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alvares, A.A.A. *Influência da adição do extracto de Yucca schidigera nos parâmetros bioquímicos e hematológicos de cães adultos consumindo duas rações comerciais*. (2006). Tese de Mestre em ciências Veterinárias – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná Curitiba
2. Anónimo. *Relatório sobre a disponibilidade ecologia e sistemas de uso actual das plantas indígenas de Matutuíne*. Acedido em: 04.02.2012 em: http://www.cde.unibe.ch/CDE/pdf/E501_Relat%C3%B3rio.pdf.
3. Bettiol, W. e Morandi, M. A. B. (2009). *Biocontrolo de doenças de plantas uso e perspectivas*. 1ª edição, Embrapa Meio Ambiente. São Paulo.
4. Bezerra, D. A. C. (2008). *Estudo Fitoquímico, Bromatológico E Microbiológico De Mimosa tenuiflora (Wild) Poiret e Piptadenia stipulacea (Benth) Ducke*. Tese de Doutoramento em Zootecnia – Sistemas Agrossilvopastoris, Centro de Saúde e Tecnologia Rural - Universidade Federal de Campina grande. Patos – PB. 63pp
5. Brasileiro M. T.; Egito A. A.; DE Lima, J. R; Randau, K.P; Pereira, G.C. e Neto, P.J.R. (2007). *Ximenia americana L: botânica química e farmacologia no interesse da tecnologia farmacêutica*. Rev. Bras. Farm, **89** (2): 164 – 167.
6. Cowan, M. (1999). *Plant products as antimicrobial agents*. Clinical Microbiological reviews **12** (4):564 – 582.
7. Cseke, L. J.; Kirakosyan, A.; Kaufman, P. B.; Warber, S. L.; Duke, J. A. e Brielman, H. L. (2006). *Natural products from plants*. Second edition. Taylor & Francis Group. 569 pp.
8. DE Lima, F. G. (2009). *Acções biológicas das Saponinas Esteróidais em ruminantes: revisão de literatura*. Universidade De Goiás Escola De Veterinária, Programa De Pós – Graduação Em Ciência Animal. Goiânia. 26 pp
9. Fernandes, C. F.; Da Silva, D. S. G.; Reis, N. D.; Junior, H.A.(2009). *Mecanismo de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogénicos*. 1ª edição, Porto Velho.18pp

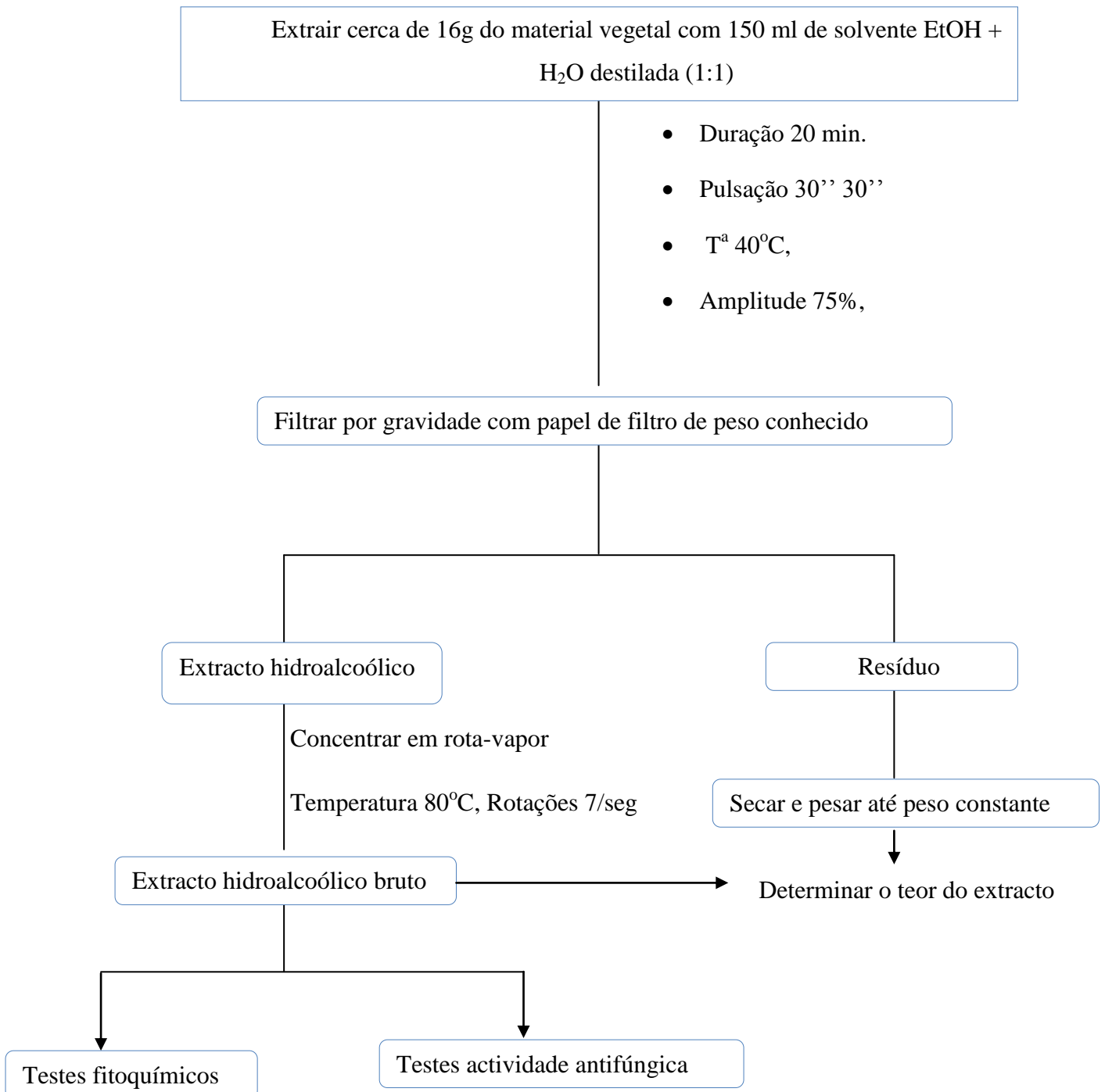
10. Hutchings, A. (1996). *Zulu Medicinal Plants: an Inventory*. University of Natal. 450 pp.
11. Harborne, J.B. (1988); *Phytochemical Methods: A guide for modern techniques of plant analysis*. Third edition, Chapman & Hall. 302 pp.
12. Grotewold, E. (2007). *The science of flavonóides*. Springer. 273 pp.
13. Jansen, P.C.M. e Mendes, O. (1984) *Plantas medicinais. Seu uso tradicional em Moçambique* (TOMO II). Imprensa Minerva central, Maputo. 259pp.
14. James, D. B.; Abu, E.A.; Wurochekke, A.U. e Oriji, G.N.; (2007). *Phytochemistry and Antimicrobial Investigation of the Aqueous and Metanolic Extracts of Ximenia Americana*. J. Med. Sci (2) 284 – 8.
15. Kokate, C. K.; Purohit, A. P. e Gokhale, S. B.; (2008). *Pharmacognosy*. 42nd edition, Editor Prakashan, Nirali.
16. Luthria, D. L., (2004). *Oil Extraction and Analysis: Critical Issues and Comparative Studies*. AOCS Press Publication. United States of America. 272 pp.
17. Lyon, G.D.; Reglinski, T. e Newton, A. C (1995). *Novel Disease control compounds: the potential to immunize plants against infection*. Plant pathology **44**(3):407-427
18. Mann, J.; Davidson R.S.; Hobbs, J. B.; Banthorpe, D .V. e Harbone, J. B (1998). *Natural Products Their Chemistry and Biological Significance*. Longman. First edition. 454pp.
19. Matos, F. J. A; (1988). *Introdução à Fitoquímica Experimental*. Edições UFC. Fortaleza 128 pp.
20. Maueia, C. G., (2007). Estudo etnobotânico das plantas Medicinais utilizadas no tratamento de Malária, Tuberculose e Amebíase na província de Gaza. Tese de licenciatura. Universidade Eduardo Mondlane. Departamento de Ciências biológicas 77pp.
21. Melecchi, M. I. S. (2005). *Caracterização Química de extractos de Hibiscus tiliaceus L: estudo comparativo de métodos de extracção*. Tese de Doutoramento Universidade Federal De Porto Alegre. Instituto de Química, Porto Alegre.

22. Mendes, H. A. R. (2009). *Estudo fitoquímico preliminar das plantas Acridocarpus natalitus, viscum obovatum e senna petersiana*. Tese de licenciatura Universidade Eduardo Mondlane. Departamento de Química, Maputo.
23. Morris, B. (1996). *Chewa Medical Botany: A Study of Herbalism in Southern Malawi*. Lit Verlag Munster. 557pp.
24. Ogunleye, D.S. e Ibitoye, SF. (2003). *Studies of Microbial Activity and Chemistry Constituents of Ximenia americana*. Trop J. Pharm Res.2: 239-241
25. Oliver-Bever, B. (1986). *Medicinal plants in tropical West Africa*. 375pp
26. Omer, M. E. F. A. e Elnima, E.I (2003). *Antimicrobial activity of Ximenia Americana*. Fitoterapia. **74**: 122-6
27. Palgrave, K. C. (2002). *Tree of Southern Africa*. New edition. Dr E. J. Moll. 1212 pp.
28. Pizarro, A. P.B.; Filho, A. M. o. ; Parente, J. P.; Melo, M. T. V.; Santos, C. E. e Lima, P.R. (1999). *O aproveitamento do resíduo da indústria do sisal no controle de larvas de mosquitos*. Rio de Janeiro. Rev. Soc. Bra. Med. Tropl.**32** (1): 23-29.
29. Santiago, E. M. (2007). *Estudo fitoquímico das plantas medicinais usadas no tratamento de doenças causadas por protozoários e microbactérias. Avaliação dos alcalóides de Grupo Berberina nas plantas medicinais*. Tese de licenciatura. Universidade Eduardo Mondlane. Departamento de Química. Maputo.
30. Sarker, S. D. e Nahar, L. (2007). *Chemistry for pharmacy students, genera organic and Natural product chemistry*. Editor John Wiley & sons, Ltd.
31. Sartori, M. R. K.; (2005). *Actividade antimicrobiana de fracções de extractos e compostos puros obtidos das flores Acmele brasiliensis Spreng (Wedelia paludosa) (Asteraceae)*. Dissertação de mestrado em ciências farmacêuticas. Universidade Do Vale de Itajaí Centro De Ciências De Saúde, Itajaí.
32. Schwan- Estrada, K.R.F., Stangarlin, J.R. e Cruz, M. E. S. (2000). *Uso de extractos vegetais no controlo de fungos fitopatogénicos*: Revista Floresta **30**: 129-137

33. Shanmugam, S., Sathish K. T. e Panneer S. K. (2010). *Laboratory Handbook On Biochemistry*. PHI Learning Private Limited. New Delhi.
34. Skoog, D. A.; West, D.M.; Holler, F.J. e Crouch, S.R. (2006). *Fundamentos de Química Analítica*; Tradução da 8ª edição Norte-Americana; Editora Thomson Learning. São Paulo. 1026 pp.
35. Tarus P.K.; Coombes P.H.; Crouch N.R. e Mulholland D.A. (2006). *Benzo[c]phenanthridine alkaloids from stem bark of the Forest Knobwood, Zanthoxylum davyi (Rutaceae)*: South African Journal of Botany, **72** (4): 555-558.
36. Raaman, N. (2006). *Phytochemical Techniques*. New India Publishing. 306 pp.
37. Venturoso, L. R.; Bacchi, L.M. A.; Gavassoni, W. L.; Conus, L.A; Pontim, B. C. A e Bergamin, A.C. (2011). *Actividade antifúngica extractos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos*: Summa Phytopathologia. **37** (1):18-23
38. Vigo – Schultz, S. C. (2008) *Avaliação da indução de Resistência no controle do crescimento bacteriano comum do feijão vagem*. Tese de Doutorado – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”- Botucatu – SP. 86pp.
39. Wagner, H. e Bladt, S. (1996). *Plant Drugs Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*; 2nd. Munich, Germany. 384 pp.
40. Wina, E.; Muetzel, S. e Becker, K. (2005). *The impact of saponins or saponin containing plant materials on ruminant productions: A review*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Washington **53**: 8093-8105.
41. Wyk, B. E.V.; Oudsthoorn, B. V. e Gericke, N. (1997). *Medicinal plants of South Africa*. Briza publications. First edition. Pretoria, South Africa. 304 pp.
42. Wyk, B. E. V. e Wink, M. (2004). *Medicinal Plants (Of the World)*. 1st Edition, Briza publications. Pretoria, South Africa. 480 pp
43. Zugunza, D., (2010). *Estudo fitoquímico e Avaliação da actividade antimicrobiana das raízes da Tiliacora funifera*. Tese de licenciatura. Universidade Eduardo Mondlane – Departamento de Química. 84 pp.

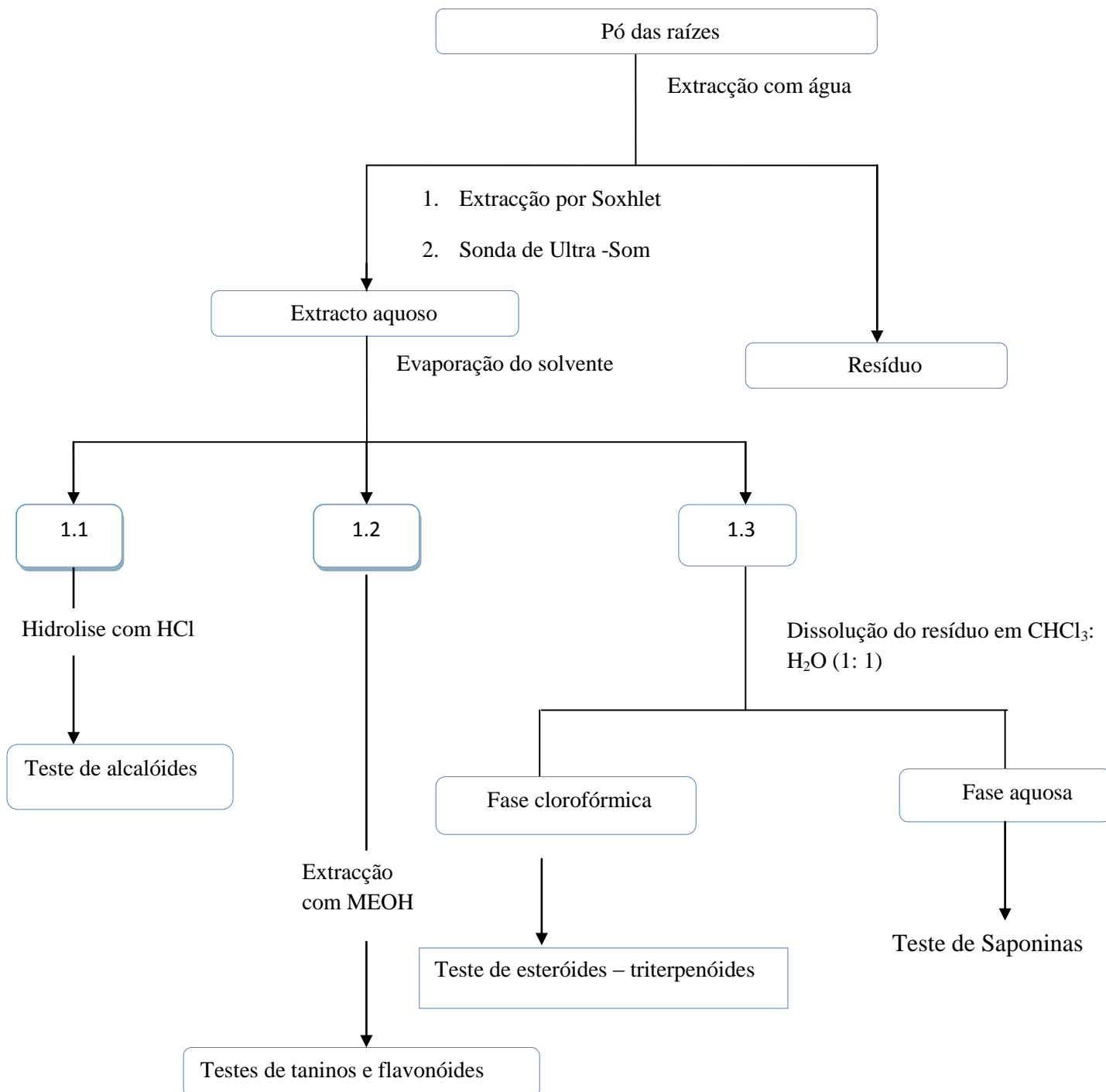
ANEXOS

Anexo 1 Preparação do extracto aquoso e hidroalcoólico usando Sonda de Ultra – Som

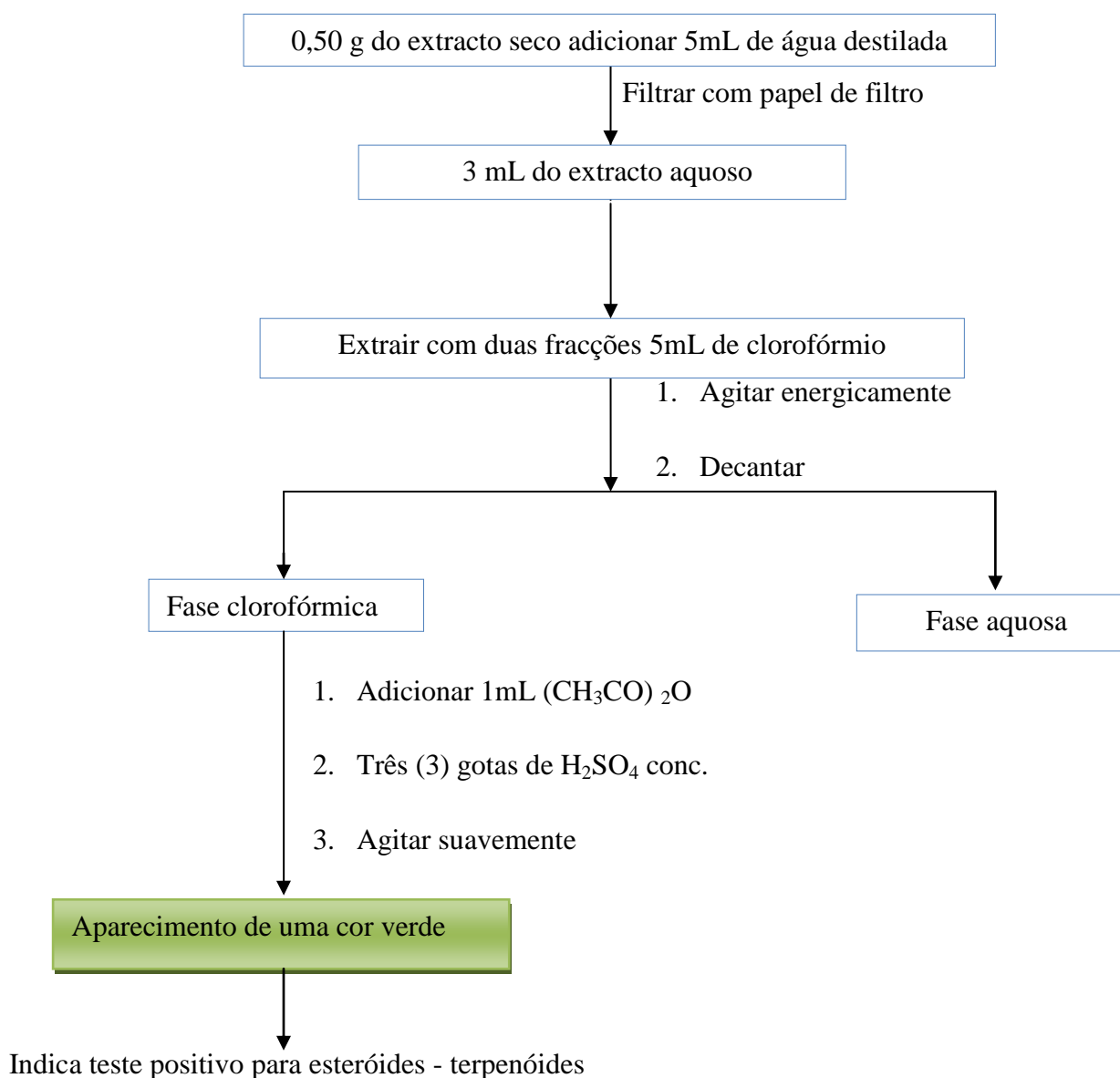


A extracção dos metabólitos secundários usando Soxhlet foi realizada segundo o esquema geral

Anexo 2. Esquema de extracção dos metabólitos secundários



Anexo 3. Esquema utilizado para realização do ensaio de reconhecimento de esteróides – triterpenóides



Anexo 4. Foto cultura de *Asperigillus niger* depois da aplicação de extracto aquoso obtido por Soxhlet de *Elephantorrhiza elephantina*.

- Os pontos pretos são os *Asperigillus niger* e as partes castanhas são os esporos mortos após aplicações dos extractos

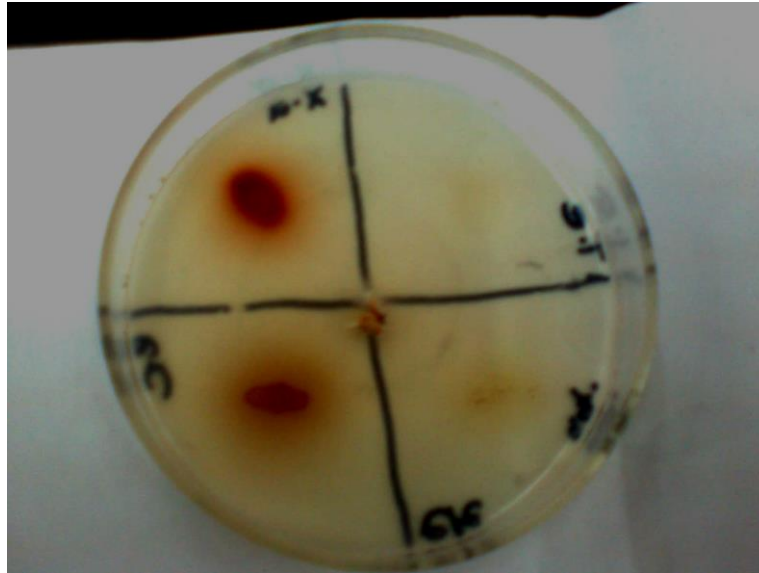


Anexo 5. Esporos de *Asperigillus flavus* (os pontos amarelados), mortos (pontos castanhos) com extracto hidroalcoólico de *Ximenia americana* 100 mg/mL

- Os pontos amarelos são esporos vivos de *Asperigillus flavus*, e as manchas castanhas são esporos mortos após a aplicação de extracto hidroalcoólico de *Ximenia americana*



Anexo 6. Esporos de *Fusarium* mortos com extractos aquosos de raízes de *Ximenia americana*, *Tabernaemontana elegans*, *Zanthoxylum capense* e *Elephantorrhiza elephantina*.



Anexo 7. Esporos de *Asperigillus niger* mortos com extracto aquoso de *Tabernaemontana elegans* obtido por Soxhlet

