



**FACULDADE DE ENGENHARIA**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**CURSO DE LICENCIATURA EM ENGENHARIA QUÍMICA**  
**Trabalho de Licenciatura**

**Desenvolvimento de um antisséptico bucal a partir *da euclea natalensis* (Mulala)**

**Autor:** Aléx David Canze

**Supervisor:** Prof. Lucrecio Duarte Biquiza, Eng<sup>o</sup>

Maputo, Julho de 2024



**FACULDADE DE ENGENHARIA**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**CURSO DE LICENCIATURA EM ENGENHARIA QUÍMICA**  
**Trabalho de Licenciatura**

**Desenvolvimento de um antisséptico bucal a partir da *euclea natalensis*  
(Mulala)**

**Autor:** Aléx David Canze

**Supervisor:** Prof. Lucrecio Duarte Biquiza, Eng<sup>o</sup>

Maputo, Julho de 2024

**TERMO DE ENTREGA DO RELATÓRIO DO TRABALHO DE LICENCIATURA**

Declaro que o estudante Aléx David Canze entregou no dia \_\_\_/\_\_\_/2024 as 4 cópias do seu trabalho de Licenciatura com referência: \_\_\_\_\_, intitulado:

**Desenvolvimento de um antisséptico bucal a partir da *Euclea natalensis* (Mulala).**

Maputo, \_\_\_ de Julho de 2024

A chefe da Secretaria

---

## **DECLARAÇÃO DE HONRA**

Eu, Aléx David Canze, declaro por minha honra que este relatório de trabalho de licenciatura não foi aceite em nenhum outro lugar como trabalho de culminação do curso. Estudos de outras pessoas foram usados no presente trabalho e devidamente referenciados.

**Assinatura** \_\_\_\_\_

**Data:** \_\_/\_\_/\_\_\_\_\_

(Aléx David Canze)

**DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho:

À minha família e em especial à minha mãe Flora

Gabriel Nhangumbe, ao meu pai David

David Canze e a minha filha Flora Aléx Canze.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me ter dado saúde, e a todos aqueles que, directa ou indirectamente, contribuíram para o desenvolvimento do trabalho descrito neste relatório, em particular ao meu supervisor, Prof. Eng<sup>o</sup>. Lucrécio Biquiza, por ter dado o devido apoio neste desafio e que tornou possível a realização deste trabalho.

Agradeço a todos colegas do curso, em particular ao Paulino Zacarias, Fidel, Zacarias Lucas, Belisário, Fauzia Juma, Walter Grachane, Francisco Salmina, Cristiano Mbulo, Victor Magaia e Henriques Jonas Tsinine.

Agradeço a minha filha Flora Aléx Canze e a minha esposa Wanderley Jorge Munhame, aos meus irmãos e amigos: Arnaldo David Canze, Euclides David Canze, Nelton David Canze, Silvestre Fernando Sumbana, Samuel Adriano Canze, Dr. António Taimo Supeia, o meu segundo pai, Paulo Mazanga e dr. Celso.

Agradeço aos técnicos dos laboratórios do DEQUI pela assistência e apoio dados durante a execução do trabalho laboratorial, a minha família em especial para minha mãe Flora Gabriel Nhangumbe e ao meu pai David Canze pelo apoio incansável que deram e tem dado.

Agradeço também aos coordenadores da disciplina de laboratórios II, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eng<sup>a</sup>. Maria Eduardo, Prof. Dr. Estevão Pondja, Eng. e Prof. Dr. Eng. João Chidamoio, pelas críticas e sugestões dadas ao longo deste trabalho.

A todos que aqui não foram citados, mas que directa ou indirectamente contribuíram na minha formação e na realização deste trabalho.

Agradeço imenso!

## RESUMO

Neste trabalho, desenvolveu-se e testou-se um antisséptico bucal a partir da *euclea natalensis*, porém antes disso, realizou-se experiências laboratoriais com o objectivo de identificar se a *euclea natalensis* pudesse ser aplicada nesse processo sem prejudicar a saúde oral e tendo o efeito desejado. Fez-se a caracterização físico-químico da raiz desta planta assim como do seu extracto aquoso. A metodologia empregue, consistiu numa busca bibliográfica onde fez-se pesquisas e sistematização de informações relativas ao tema, parte experimental, onde fez-se a caracterização da raiz da *euclea natalensis*, análise espectrofotométrica no infravermelho para identificar a presença ou não de naftoquinonas, a redução dos pigmentos que dão cor pela adsorção com bentonite e os testes antimicrobiano do extracto aquoso bruto e limpo da *euclea natalensis* para avaliar a sua actividade antimicrobiana e determinar CIM. Dos resultados da caracterização constatou-se que a *euclea natalensis* apresenta na sua estrutura naftoquinonas, pela IV, portanto justifica-se a utilização desta raiz na produção de antisséptico bucal, pois as naftoquinonas são substâncias com acção antibacteriana, anti-fúngica, antimicrobiana e anti-inflamatório. Determinou-se a densidade e viscosidade do extracto aquoso da *euclea natalensis* tendo-se como base a densidade e viscosidade padrão média dos antissépticos bucais comerciais, portanto ajustou-se a densidade para  $1,2071\text{g/ml}$  contra  $1,1425 \pm 0,0200\text{g/ml}$  de antissépticos bucais comerciais, e viscosidade de  $12,6100\text{cP}$  contra  $12,4000 \pm 0,0200\text{cP}$  de antissépticos bucais comerciais. Para melhorar o aspecto da cor do antisséptico, fez-se a adsorção do extracto aquoso da *euclea natalensis* usando bentonite, onde reduziu-se os pigmentos responsáveis pela cor em aproximadamente 20% e na análise antimicrobiana verificou-se que os dois extractos aquosos (bruto e limpo) possuem actividade antimicrobiana contra os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus muntans* e *Porphyromonas gingivalis*, microrganismos estes, que podem ser encontrados na cavidade oral.

**Palavras-chave:** *Euclea natalensis* (mulala), antisséptico, naftoquinonas.

## ÍNDICE

DEDICATÓRIA.....	i
AGRADECIMENTOS .....	ii
RESUMO.....	iii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Objectivos.....	2
1.2. Justificativa.....	2
1.3. Metodologia.....	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. <i>Euclea natalensis</i> (Mulala) .....	4
2.2. Distribuição geográfica e comercialização da <i>euclea natalensis</i> ( <i>Mulala</i> ).....	5
2.3. Caracterização química da <i>euclea natalensis</i> .....	6
2.4. Importância farmacológica da <i>Euclea natalensis</i> .....	7
2.5. Apresentação dos antissépticos comerciais e a <i>euclea natalensis</i> .....	8
2.5.1. Clorexidina (Perio Gard “Colgate”).....	8
2.5.2. Cloreto de cetilpiridino.....	10
2.5.3. Óleos essenciais (Listerine) .....	11
2.5.4. Triclosan (citrato de zinco, polivinilmetil éter e ácido maléico).....	12
2.5.5. Antisséptico da <i>euclea natalensis</i> ( <i>mulala</i> ) .....	13
2.5.6. Toxicológico nos antissépticos de <i>euclea natalensis</i> .....	14
2.5.7. Comparação com os antissépticos comerciais .....	14
2.6. Características de um antisséptico ideal .....	15
2.7. A espectroscopia no infravermelho .....	17
2.8. Adsorção .....	19
2.8.1. Isotermas de Adsorção .....	20
2.8.2. Modelos de Isotermas de adsorcao .....	21
2.8.2.1. Modelo de Isoterma de Freundlich .....	21

2.8.2.2.	Modelo de Isotherma de Langmuir .....	22
2.8.2.3.	Classificação das isothermas segundo Brunauer, Deming, Deming e Teller (BDDT). 23	
2.9.	Densidade e viscosidade cinemática .....	25
2.10.	Teste de sensibilidade antimicrobiana .....	27
2.10.1.	Determinação da concentração de inibição mínima (CIM) .....	28
2.10.2.	Método de determinação da concentração de inibição mínima (CIM) .....	28
2.10.2.1.	Método de diluição .....	28
2.10.2.2.	Método de teste epsilométrico.....	29
2.10.2.3.	Método de Automação Walk away plus 96.....	29
3.	PARTE EXPERIMENTAL .....	30
3.1.	Preparação da matéria-prima (mulala).....	30
3.2.	Extracção aquosa da substancia activa (naftoquinonas) .....	31
3.3.	Caracterização física do extracto aquoso da <i>euclea natalensis</i> .....	32
3.3.1.	Procedimentos para a determinação da densidade e viscosidade .....	32
3.3.2.	Operação de adsorção.....	33
3.3.3.	Procedimentos da determinação da actividade antimicrobiana .....	35
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	37
4.1.	Caracterização da amostra .....	37
4.2.	Identificação da existência de Naftoquinonas .....	38
4.3.	Determinação da densidade.....	40
4.4.	Determinação da viscosidade. ....	40
4.5.	Remoção das substâncias responsáveis pela cor.....	41
4.6.	Actividade antimicrobiana.....	45
5.	CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES .....	49
5.1.	Conclusões.....	49
5.2.	Recomendações .....	50
6.	BIBLIOGRAFIA.....	51
	ANEXOS .....	I

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

<b>Símbolo</b>	<b>Significado</b>	<b>Unidade</b>
C	Concentração	mol/l
CCP	Cloreto de cetilpiridino	–
CIM	Concentração Inibitória Mínima	–
cP	Centipoise	–
CP <sub>x</sub>	Constante capilar do viscosímetro	–
DEQUI	Departamento de Engenharia Química	–
FAVET	Faculdade de Veterinária	–
FENG	Faculdade de Engenharia	–
IV	Infravermelho	–
K	Constante adimensional de Freundlich	–
<i>m</i>	Massa	g
<i>m<sub>s</sub></i>	Massa da raiz da mulala seca	g
<i>m<sub>t</sub></i>	Massa da raiz da mulala húmida	g
N	Constante adimensional de Freundlich	–
<i>q</i>	Concentração de equilíbrio do adsorvato na fase sólida	g de solução/g de Bentonite
T	Temperatura	°C
<i>t</i>	Tempo	s
TM	Transferência de massa	–
TSA	Teste de sensibilidade antimicrobiana	–
UEM	Universidade Eduardo Mondlane	–
UFC	Unidade formadora de colónias	–
V	Volume	ml

### **Gregas**

<b>Símbolo</b>	<b>Significado</b>	<b>Unidade</b>
$\rho$	Densidade	g/ml
$\nu$	Viscosidade cinemática	mm <sup>2</sup> /s
$\omega$	Humidade absoluta	–

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1:</b> absorção de ligações em moléculas orgânicas (naftoquinonas).....	<b>ERRO!</b>
<b>MARCADOR NÃO DEFINIDO.</b>	
<b>Tabela 2.2:</b> valores das constantes capilares do viscosímetro de redwood .....	27
<b>Tabela 4.1:</b> determinação da humidade absoluta da amostra (mulala).....	37
<b>Tabela 4.2:</b> determinação da densidade da solução da <i>euclea natalensis</i> .....	40
<b>Tabela 4.3:</b> determinação da viscosidade cinemática.....	40
<b>Tabela 4.4:</b> resultados da medição da cor da solução aquosa da <i>euclea natalensis</i> ....	42
<b>Tabela 4.5:</b> resultados da variação, remoção de cor e remoção dos pigmentos da solução aquosa da <i>euclea natalensis</i> , antes e após a adsorção.....	42
<b>Tabela 4.6:</b> concentração inibitória mínima do extracto aquoso bruto e limpo da <i>euclea natalensis</i> .....	45

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1:</b> <i>Euclea natalensis</i> , planta (a) e raiz (b) .....	4
<b>Figura 3.1:</b> <i>Euclea natalensis</i> (mulala) sem casca, após a secagem .....	30
<b>Figura 3.2:</b> Moinho de disco (a) e <i>euclea natalensis</i> (mulala) moída (b) .....	31
<b>Figura 3.3:</b> Operação de filtração da <i>euclea natalensis</i> no filtro büncher .....	32
<b>Figura 3.4:</b> Solução da <i>euclea natalensis</i> antes da adição do adsorvente .....	33
<b>Figura 3.5:</b> Mistura da solução da <i>euclea natalensis</i> e adsorvente (bentonite) .....	34
<b>Figura 3.6:</b> Soluções aquosa da <i>euclea natalensis</i> após o processo de adsorção com bentonite a 2, 4, 6, 8, 10 e 12 gramas respectivamente .....	34
<b>Figura 3.7:</b> Esquema da determinação do cim para extracto aquoso bruto e limpo da <i>euclea natalensis</i> .....	36
<b>Figura 4.1:</b> Análise espectrofotométrica (i-v) da <i>euclea natalensis</i> (mulala) .....	38
<b>Figura 4.2:</b> Análise espectrofotométrica (i-v) da <i>euclea natalensis</i> (mulala) padrão (segundo lall e meyer 2000) .....	39
<b>Figura 4.3:</b> Relação entre a quantidade de adsorvente e a remoção de cor na solução aquosa da <i>euclea natalensis</i> .....	43
<b>Figura 4.4:</b> Isoterma de freundlich na remoção da cor da solução aquosa de <i>euclea natalensis</i> .....	44
<b>Figura 4.5:</b> Resultado da cim do extracto aquoso bruto da <i>euclea natalensis</i> frente aos microrganismos <i>staphylococcus aureus</i> , <i>porphyromanas gingivalis</i> e <i>streptococcus muntans</i> respectivamente.....	47
<b>Figura 4.6:</b> Resultado da cim do extracto aquoso bruto da <i>euclea natalensis</i> frente aos microrganismos <i>staphylococcus aureus</i> , <i>porphyromanas gingivalis</i> e <i>streptococcus muntans</i> respectivamente.....	48
<b>Figura A2.1:</b> Picnómetro (a), balança de densidade (b) e densímetro (c) .....	68
<b>Figura A2.2:</b> Viscosímetro de redwood .....	68
<b>Figura A2.3:</b> Leitura do halo de inibição realizada na placa com auxílio de uma régua. ....	69
<b>Figura A2.4:</b> Determinação de cim, pelo método de diluição .....	69
<b>Figura A2.5:</b> Determinação da concentração mínima (cim), por teste epsilométrico....	70
<b>Figura A2.6:</b> Microplacas (a) e aparelho (b) usadas na determinação de cim, pelo método de automação walk away plus 96.....	70
<b>Figura 2.7:</b> Operação de filtração da mistura da <i>euclea natalensis</i> e adsorvente (bentonite) .....	VI
<b>Figura 2.8:</b> Colorímetro cr-10 (konica minolta) .....	VI

## 1. INTRODUÇÃO

Os povos africanos, desde antigamente, utilizam a raiz da *euclea natalensis* (mulala) para a lavagem dos dentes. Esta prática continua a ser utilizada também pelo povo de Moçambique, porque acredita que a raiz é mais eficiente do que a pasta de dentes, acreditando ainda, que a mesma chega a manter os dentes intactos até à velhice. Este facto despertou-nos a atenção em analisar a raiz da Mulala para aferir que tipos de substâncias activas fornecem essas propriedades tão interessantes a esta raiz.

A higienização dos dentes com raízes de plantas vem sendo avaliada em alguns estudos (Korn 1965; Emslie 1966; Enwonwu 1974; Manley, Limongelli e Williams 1975; Attar 1979 e Lodhia 1986). Tem sido proposto, que esse costume é benéfico para a saúde oral, porque nessas raízes é possível encontrar compostos com propriedades antibacterianas, antifúngicas e antimicrobianas.

Em Moçambique a raiz da planta *euclea natalensis* é a principal planta usada para a higiene oral (Filipe *et al* 2008). A disponibilidade desta planta em quase todo país, sendo a província de Maputo, distrito de Matituine onde ocorre com maior abundância, contribui para que até hoje a raiz desta planta seja a principal na higienização oral do povo moçambicano e portanto tornou possível a elaboração deste trabalho.

Considerando a cárie dentária e as periodontopatias como uma das principais preocupações na odontologia, é notório que o desenvolvimento e uso de antissépticos orais ou enxaguantes naturais é reduzida ou até quase inexistente no nosso país, daí o interesse em fazer uma pesquisa sobre o desenvolvimento de um antisséptico oral através da planta *euclea natalensis* (Mulala), muito conhecida em Moçambique e em alguns países da África Austral, foi também observado que há insuficiência de estudos da *euclea natalensis* voltados para a área da síntese química, principalmente no desenvolvimento de antisséptico bucal.

## 1.1. Objectivos

### Objectivo geral

O presente trabalho teve como objectivo desenvolver e testar um antisséptico bucal a partir da raiz da *euclea natalensis* (Mulala) para higienização oral.

### Objectivos específicos

Como objectivos específicos foram definidos os seguintes:

- Fazer a caracterização físico-química da raiz da *euclea natalensis* (Mulala);
- Obter um extracto aquoso das raízes de *euclea natalensis* e fazer a sua caracterização físico-química;
- Identificar a presença de naftoquinonas no extracto aquoso da raiz da *euclea natalensis*;

## 1.2. Justificativa

Este tema surge devido ao interesse que temos, em produzir um produto valioso a partir de um produto natural local de baixo valor, assim como o interesse em melhorar a forma do uso da raiz da *euclea natalensis*, portanto produzindo um antisséptico bucal (enxaguante bucal), como forma de aproveitar a substância activa (naftoquinona) com propriedades fungicidas, anti-bacterianas, insecticidas, fitotóxicas, citostáticas e anti-carcinogénicas desta planta no tratamento de doenças gengivais, cáries dentárias, através de uma solução aquosa preparada na base da raiz desta planta (antisséptico bucal).

A *euclea natalensis* é uma planta frequentemente usada para a manutenção da saúde oral e mesmo em algumas patologias respiratórias pela população de Moçambique. As raízes da *euclea natalensis* possuem substâncias activas como naftoquinona, que são usados para aliviar dores de dente, porém, esta raiz é aplicada de forma arcaica, pois eles (Moçambicanos) retiram a casca da raiz e mastigam o interior até ficar desfeito, sendo depois esfregado contra os dentes e a gengiva.

Ao final da limpeza dos dentes o pedaço desfeito é cortado e o remanescente é armazenado para posterior uso (Stander 1991).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que aproximadamente 80% dos habitantes do mundo utilizam principalmente os medicamentos tradicionais para o tratamento de doenças, incluindo as orais (Newman 2000).

### **1.3. Metodologia**

A execução deste trabalho seguiu a metodologia apresentada a seguir:

#### **Pesquisa bibliográfica**

A pesquisa bibliográfica consistiu na busca e sistematização de informações (livros, artigos, trabalhos de licenciatura, dissertações de mestrado e doutoramento), visando conceber o trabalho e a familiarizar-se com os seguintes conceitos:

- Caracterização físico-química de raiz de *euclea natalensis*;
- Extração físico-química de substâncias químicas na raiz de *euclea natalensis*;
- Processo de produção de antisséptico bucais.

#### **Aquisição da matéria-prima (raiz da *euclea natalensis*)**

A raiz da *euclea natalensis* em grande escala, poderá ser adquirida em Maputo no distrito de Matituine, uma vez que este é o distrito da zona sul do país com maior concentração desta planta. Para efeitos de experiências laboratoriais deste trabalho, a raiz da *euclea natalensis* foi adquirida no mercado do Xipamanine e os reagentes necessários foram fornecidos pelo Departamento de Engenharia Química da UEM.

#### **Parte experimental**

A parte experimental do trabalho, consistiu na realização de experiências laboratoriais, com vista à determinar as propriedades físico-químicas da raiz e extracto aquoso da *euclea natalensis*.

#### **Elaboração do relatório**

A elaboração do relatório do trabalho, consistiu na sistematização de informações adquiridas na pesquisa bibliográfica e experiências laboratoriais e emprego destas como base na análise e discussão de resultados obtidos na parte experimental.

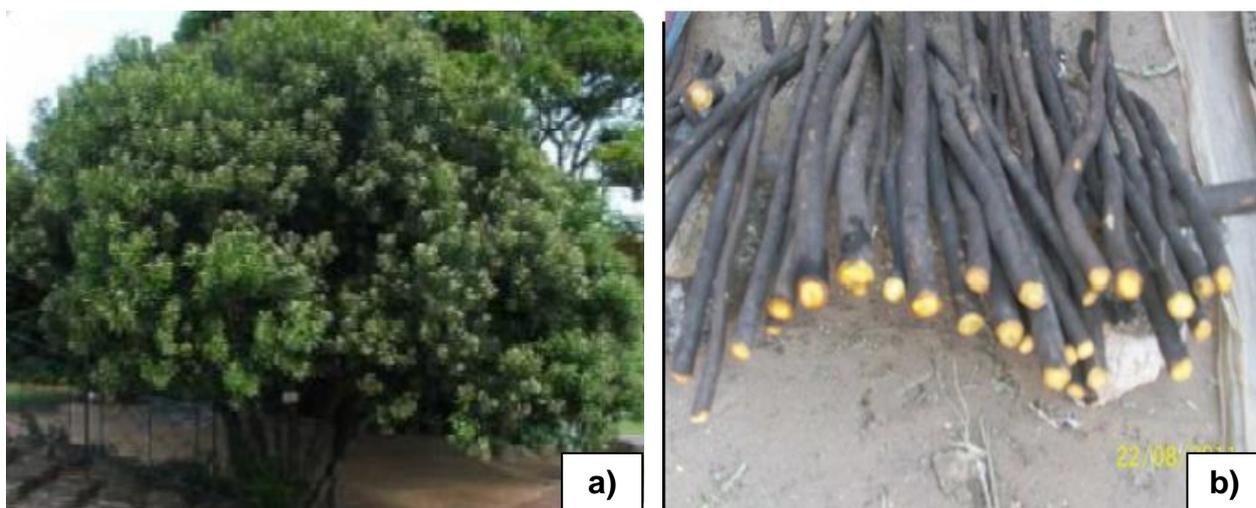
## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. *Euclea natalensis* (Mulala)

A *euclea natalensis* é um arbusto ou uma pequena árvore da família *Ebenaceae*, pertencente ao género *euclea*. Em Moçambique é conhecida como *Mulala* e em algumas regiões de Angola é conhecida pelo nome de pau-preto em outras de *Mukonki*. Os arbustos ou pequenas árvores tem de 0,5 – 1,8 metros de altura, com folhagem verde-escura, onduladas, longas e direitas. As plantas da *euclea natalensis* crescem em regiões até 1525 metros de altitude acima do nível do mar (Xavier 2011). O seu caule tem uma cor castanha clara a escuro, altura entre 0,5 – 1,2 metros e diâmetro entre 12 – 22 milímetros.

A sua raiz, que é a parte de interesse para este trabalho, pois nela está contida a substância activa, tem uma cor castanha escura a preta, com diâmetro entre 8 – 16 milímetros, com uma medula castanha clara a alaranjada contendo a substância activa (naftoquinonas), tem uma textura fibrosa, odor, sabor amargo e adstringente.

A figura 2.1, mostra duas imagens, a planta (à esquerda) e a raiz (à direita), da *euclea natalensis*.



**Figura 2.1:** *Euclea natalensis*, planta (a) e raiz (b)

## 2.2. Distribuição geográfica e comercialização da *euclea natalensis* (*Mulala*)

A *euclea natalensis* encontra-se distribuída em regiões da África subtropical e é comum na costa leste da África do Sul. A *euclea natalensis* esta também presente e é utilizada em Angola, Zâmbia, Zimbabwe e em outros países da zona leste da África, além da madeira muito apreciada algumas regiões de África utilizam a raiz como medicamento.

A comercialização da raiz desta planta é realizada, por vários povos de África, em mercados informais ou em zonas rurais, medidos em molhos de 4 a 5 raízes de 20 a 50 cm de comprimento (Retief *et al* 2008).

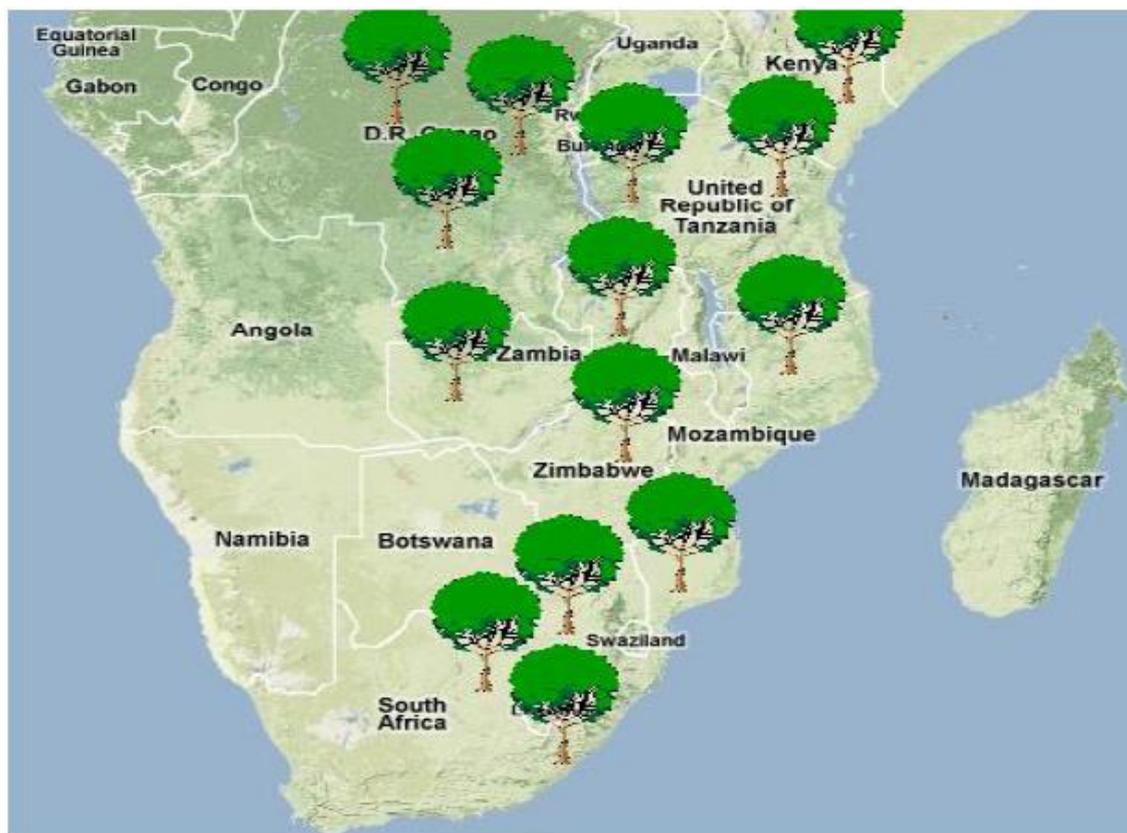
Dependendo da zona geográfica, a *euclea natalensis* pode receber vários nomes. Em Moçambique é conhecida pelo nome popular de *mulala*, *kitana*, *mcriparipa*, *uchangula* (Silva *et al* 2004). Apesar de a sua utilização não ser muito frequente nas zonas urbanas, em algumas zonas rurais de Moçambique a *mulala* é amplamente utilizada sobretudo pelos terapeutas tradicionais que utilizam a raiz de *euclea natalensis* no tratamento de algumas doenças, como: febre, dores de cabeça, hemorragias e malária (Matope 2012).

Em Angola, os povos que as utilizam, em particular os da zona rural, têm designações diferentes conforme cada grupo étnico. Assim, o povo *Umbundu*, habitantes da província de Benguela e Namibe, denomina-a de *Mumboto*, *Jimbotu*, *Mbotu*. Já no povo *Ganguela*, a raiz é designada por *Antinum*, ou *Otinu*. O povo *Lunyaneka* chama-lhe *Omokunia* ou *Omuhime*, *Omonyime*, *Otyntiko*; por último o povo *Mukunhantu* denominam-a *Omundineou* *Otyime* (Lopes 1972).

Na comunidade Zulu (África do Sul) é apelidada de *ichitamuzi*, *isinzimane*, *umshekisane*, *ilizimane*. Na língua inglesa tem os nomes de *Hairy guarri*, *Natal guarri*, *Natal ebony*, *largeleaved guarri* (Loffler 2005). Em Afrikanos chama-lhe *Natalghwarrie*, *bergghwarrie*, *swartbashoom* (Xavier 2010). Na África do sul, esta planta é mais conhecida como *hairy guari* e é usada como purgativo e como remédio para bronquite, asma crónica, pleurite, tratamento de infecções urinária e ondotológicas (Lall *et al* 2000).

A figura 2.2 mostra a distribuição geográfica da *euclea natalensis* em África, como podemos ver, em Moçambique a *euclea natalensis* esta distribuída em quase todo o

seu território, sendo a zona sul em maior abundância, quase certa de 70% desta planta encontra-se na zona sul, com a província de Maputo (distrito de Matituine), a liderar.



**Figura 2.1:** Distribuição geográfica de *euclea natalensis* em África

### 2.3. Caracterização química da *euclea natalensis*

Alguns estudos (por exemplo, os estudos realizados por Homer 1990, Lessa 2011, Nkombo 2015, etc.), têm demonstrado e justificado cientificamente o uso de *euclea natalensis* pelos terapeutas tradicionais no tratamento de algumas doenças, devido ao seu potencial antimicrobiano sobre microrganismos na cavidade bucal (Filipe, 2008 e Xavier, 2011), relacionam as actividades antimicrobianas da *mulala* com a presença de compostos fitoquímicos tais como as naftoquinonas, em particular a 7 metiljuglona, diospirinas e isodiospirina. Outros compostos que também foram identificados nesta espécie vegetal são os triterpenos pentacíclicos.

Um estudo comparativo das naftoquinonas presentes em diversas espécies de *euclea* foi realizado para seleccionar a espécie com maior concentração de naftoquinonas para futuros estudos pré-clínicos (Joubert *et al* 2006). A quantificação foi realizada

através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e determinou a concentração de cada naftoquinona nas amostras. A *euclea natalensis* apresentou apenas duas naftoquinonas, nomeadamente a 7-metiljuglona e diospirina (Joubert *et al* 2006).

#### **2.4. Importância farmacológica da *Euclea natalensis***

A *euclea natalensis* é conhecida como fonte de naftoquinonas. Dentre essas naftoquinonas a 7-metiljuglona e diospirina apresenta actividade antibacteriana contra vários microrganismos: *staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoea p.*, *shigella disenteriae* e *shigella flexneri* (Khan *et al* 1978).

Os extractos aquosos e acetónico inibiram o crescimento de *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *micrococcus kristinae* e *staphylococcus aureus*, numa concentração que variou de 0,1 e 6,0 mg/mL (Lall e Meyer 2000). Em uma avaliação do potencial esquistossomicida, o extracto aquoso de *euclea natalensis*, apresentou letalidade *in vitro* para os esquistossomulos da espécie *schistosoma haematobium*, que causa a esquistossomos e urinária. Este extracto foi usado numa concentração de 200 mg/mL (Parg *et al* 2000).

A actividade antifúngica dessa espécie também foi investigada em um estudo onde foram isoladas duas naftoquinonas a partir do seu extracto etanólico as quais foram denominadas shinanolone e octahidroleucina. Estas naftoquinonas foram testadas contra os microrganismos: *phytophthora spp* e *A. Niger*, foram significativamente inibidos pela shinanolone numa concentração de 0,01 mg/mL (Lall *et a.* 2006)

Um estudo conduzido por (Homer 1990) teve por objectivo investigar a capacidade da *euclea natalensis* em inibir cepas de *porphyromonas gingivalis*, *prevotella intermedia* e *treponema denticula*. Os resultados demonstraram que o extracto aquoso a partir da planta *euclea natalensis* foi capaz de inibir em 50% a actividade microbiana.

## 2.5. Apresentação dos antissépticos comerciais e a *euclea natalensis*

Os principais antissépticos comerciais são:

1. Clorexidina (Perio Gard “Colgate”);
2. Cloreto de cetilpiridino;
3. Óleos essenciais (Listerine);
4. Triclosan (citrato de zinco, polivinilmetiléter e ácido maléico).

### 2.5.1. Clorexidina (Perio Gard “Colgate”)

#### Apresentação da clorexidina (Perio Gard “Colgate”)

A clorexidina é disponibilizada em 3 formas químicas: diglutamato, acetato e hidrocloreto. A forma mais comum comercialmente é de diglutamato, a qual apresenta maior actividade, devido à sua solubilidade que permite boa combinação com álcool (Lindhe 2003, González *et al* 2014).

Em antissépticos orais é usado a uma concentração de 0,12% e é principalmente preventiva, sendo mais eficaz na prevenção do que como agente terapêutico, 30% da dose é retido na cavidade bucal (González *et al* 2014).

No caso em que já existe uma situação patológica instalada, a sua eficácia é muito limitada, principalmente quando não acompanhada de tratamento clínico profissional. Desta forma, a sua aplicação mais comum é a manutenção da ausência de placa após um processo de higienização profissional, quer para prevenção do surgimento de gengivite primária quer para radicar em locais recentemente tratados para periodontite (González *et al* 2014)

#### Efeitos colaterais da clorexidina

Os efeitos colaterais resultantes do uso de clorexidina por um período de tempo longo na cavidade oral são:

1. Pigmentação de dentes, restaurações e mucosas;
2. Distúrbios reversíveis do paladar;
3. Aumento da formação de cálculo supra gengival;
4. Sensação de queimação, mucosa seca (temporárias);

## 5. Lesões descamativas e eritematosas.

Para reduzir estes efeitos colaterais, pode-se recomendar a redução da dosagem de substâncias responsáveis por cada efeito e a redução a exposição dos pacientes a este antisséptico por um período prolongado.

### Indicações de clorexidina

O uso do antisséptico oral clorexidina é indicado nos seguintes casos:

- Como alternativa aos procedimentos mecânicos de higiene oral quando estes não podem ser realizados (fractura, pós-operatório de procedimentos cirúrgicos);
- Como adjuvante temporário dos procedimentos regulares da higiene oral em pacientes incapazes de manter adequada remoção de placa;
- Como agente tópico de mucosa antes de procedimentos invasivos (anestesia, cirurgias);
- Como bochecho pré-operatório antes de procedimentos odontológicos para reduzir a carga bacteriana oral;
- Como bochecho pré-operatório antes de cirurgias electivas (reduz infecção hospitalar e pneumonia pós operatória), segundo González 2014.

A figura 2.3. mostra uma imagem de um recipiente comercial de um antisséptico oral produzido com base na Clorexidina (Perio Gard “Colgate”), um antisséptico considerado padrão e é um dos compostos mais estudados em medicina dentária.



**Figura 2.2:** Antisséptico oral com base na clorexidina (Simionato 2018)

## 2.5.2. Cloreto de cetilpiridino

### Apresentação do cloreto de cetilpiridino

O cloreto de cetilpiridino, em antissépticos orais é usado a uma concentração de 0,5%, liga-se com facilidade às superfícies orais, tem efeito anti-placa e anti-gengivite, porém apresenta menor substantividade quando comparado com o antisséptico oral da clorexidina (Lindhe 2003).

### Efeitos colaterais de cloreto de cetilpiridino

Os efeitos colaterais resultantes do uso de cloreto de cetilpiridino por um período de tempo longo na cavidade oral são:

1. Pigmentação de dentes e mucosas;
2. Aumento da formação de cálculo;
3. Descamação da mucosa.

Para reduzir alguns destes efeitos colaterais, pode-se recomendar a redução das doses de cloreto de cetilpiridino nos antissépticos orais

A figura 2.4. mostra uma imagem de um recipiente comercial de um antisséptico oral produzido com base no Cloreto de cetilpiridino (Cepacol).



**Figura2.3:** Antisséptico oral produzido com base no Cloreto de Cetilpiridino (Simionato 2018)

### 2.5.3. Óleos essenciais (Listerine)

#### Apresentação de óleos essenciais (Listerine)

Os óleos essenciais podem ser disponibilizados na forma de Eucaliptol, Mentol, Timol e Metil salicilato, tem a função de reduzir a placa dental e a gengivite, penetra no biofilme, exercendo actividade anti-microbiana, previne agregação com bactérias reduzindo o efeito da sua multiplicação e da patogenicidade da placa, porém também apresenta menor eficiência quando comparado com o antisséptico oral de clorexidina (Gunsolley 2010).

Tem como efeito colateral, a criação de uma sensação de queimadura.

Este antisséptico bucal, apesar de ser também muito usado, quando comparado com o da euclea natalensis perde pelo facto de criar sensação de queimadura após o seu uso, enquanto o da euclea natalensis não cria esta sensação pois as substâncias antimicrobianas estão bem doseadas de tal forma que só penetram no biofilme dentário e da gengiva sem causar lesões.

A figura 2.5. mostra uma imagem de recipiente comercial de um antisséptico oral produzido com base em óleos essenciais (Listerine).



**Figura 2.4:** Antisséptico oral de óleos essenciais (Listerine), (Simionato 2018)

#### 2.5.4. Triclosan (citrato de zinco, polivinilmetil éter e ácido maléico)

##### Apresentação de triclosan (citrato de zinco, polivinilmetil éter e ácido maléico)

O triclosan (2,4,4 – tricloro – 2 – hidroxidifenil éter) é um composto bifenólico, não iónico, lipossolúvel, com largo espectro de acção biocida que actua como inibidor do crescimento de fungos, vírus e sobretudo bactérias, e apresenta ligeiro efeito anti-inflamatório (Schweizer 2001, Manivanann 2008, Food *et al* 2008, Marsh 2010, Riley e Lamont 2013, Sharma *et al* 2012).

Apesar de não apresentar um perfil terapêutico tão atractivo quanto a clorexidina, a popularidade do triclosan enquanto antisséptico oral é alta, devido à maior facilidade de formulação do químico em pastas dentífricas e elixires, devido à sua menor interacção com outros compostos, o seu sabor menos desagradável e, principalmente, a ausência de efeitos secundários locais com implicações estéticas (manchas e colorações) (Rautemaa *et al* 2007, Riley e Lamont 2013).

Em soluções bucais com concentrações de 0,2% v/v, ou 20mg duas vezes por dia, o triclosan tem um efeito inibidor de formação de placa bacteriana relativamente moderado e uma acção anti-microbiana que ronda as 8-12 horas após a sua utilização, podendo ser encontrado na mucosa oral durante 3 horas. Para além do efeito anti-microbiano, o triclosan demonstra efeitos anti-inflamatórios na mucosa oral. De acordo com (Mustafa *et al* 2005), este exerce acção por inibição da formação de prostanóides em fibroblastos gengivais humanos, provocados por interleucina-1 $\beta$  ou necrose tumoral (TNF $\alpha$ ), (Mustafa *et al* 2005).

Estudos anteriores indicam que este composto tem poder anti-inflamatório devido à redução da biossíntese da formação da PGE2 através da inibição da expressão do mRNA (Mustafa *et al* 2005).

A figura 2.6. mostra o recipiente comercial de um antisséptico oral produzido com base no triclosan da Colgate, misturada com citrato de zinco, polivinilmetil éter e ácido maléico.



**Figura 2.5:** Antisséptico com base no Triclosan (citrato de zinco, polivinilmetil éter e ácido maléico), (Simionato 2018)

Como pode notar-se, todos antissépticos orais comerciais arrolados acima, apresentam efeitos colaterais como consequência de uso por um período longo de tempo, portanto, podemos propor a redução da dosagem das substâncias responsáveis por esses efeitos colaterais, para os minimizar, pois reduzir a exposição dos utentes a estes produtos nem sempre é recomendável, devido ao estado clínico dos pacientes, que requerem o uso permanente dos mesmos, assim como para manter a saúde oral e a estética facial de qualquer pessoa, saudável e atraente.

### 2.5.5. Antisséptico da *euclea natalensis* (mulala)

#### 2.5.5.1. Apresentação do antisséptico da *euclea natalensis*

O antisséptico da *euclea natalensis* é um extracto aquoso da raiz da mulala, muito rica em compostos fitoquímicos tais como as naftoquinonas, em particular a 7 metiljuglona, diospirinas e isodiospirina. Outros compostos que também foram identificados nesta espécie vegetal são os triterpenos pentacíclicos (Xavier 2011).

O antisséptico da *euclea natalensis* cria na cavidade bucal, efeito anti-microbiano, anti-bacteriano e anti-fúgica, o que ajuda a reduzir as espécies causadoras das cáries, doenças como gengivite, erosão e abrasão do esmalte e da dentina (Xavier 2011).

É indicado no controle químico da placa bacteriana, estrutura caracterizada como sendo uma massa densa, não calcificada, que serve como um depósito bacteriano, e que se encontra aderida ao dente, à película adquirida, aos cálculos dentais e às outras estruturas presentes na cavidade oral (Xavier 2011).

### 2.5.6. Toxicológico nos antissépticos de *euclea natalensis*

Geralmente, os medicamentos a base de plantas são considerados menos tóxicos comparando com os medicamentos sintéticos por exemplo. Apesar da incidência de efeitos colaterais serem menores entre os fitoterápicos a verdade é que alguns constituintes das plantas apresentam elevada toxicidade como digitálicos e alcalóides (Dimech 2003; e Drew et al 1977).

Para comprovar que a *euclea natalensis* pode ser utilizada na preparação de antissépticos orais, foram feitas pesquisas bibliográficas sobre o grau de toxicidade do extracto aquoso desta planta, onde segundo a experiencia realizada por Neves e Carla de Sousa (2010), em ratos wistar (*Rattus norvegicus*). Os animais receberam água e ração e foram mantidos em condições de controlo de iluminação (ciclo 12h claro/escuro) e temperatura (20 °C à 24°C).

O extracto aquoso na dose de 5 g/kg administrado por via oral em ratos wistar não produziu morte em nenhum grupo por um período de 14 dias de observação. Os animais não mostraram sinais clínicos de toxidade ou alteração comportamental, dessa forma de acordo com os parâmetros avaliados, indicam que o extracto aquoso da *euclea natalensis* não apresenta efeitos tóxicos gerais (Neves 2010).

### 2.5.7. Comparação com os antissépticos comerciais

O antisséptico da *euclea natalensis* comparado com a **clorexidina**, a clorexidina tem desvantagem, porque a sua eficiência é limitada, principalmente quando o usuário ou paciente não tem acompanhamento clínico profissional. Desta forma, a sua aplicação mais comum é a manutenção da ausência da placa após um processo de higienização profissional, enquanto o da *euclea natalensis* pode ser aplicado em qualquer caso e mesmo sem acompanhamento clínico profissional, porque é um produto natural sem efeitos colaterais notáveis pela sua exposição prolongada.

Comparando os antissépticos do cloreto de cetilperidino, óleos essenciais e triclosan com o antisséptico da *euclea natalensis*, a *euclea natalensis* leva vantagem porque não tem efeitos colaterais severos, nomeadamente: sensação de queimação, manchar os

dentes, inibição de microrganismos benéficos na cavidade oral e a perda de olfacto devido a exposição prolongada como são os casos dos antisséptico supracitados.

A exposição do antisséptico da *euclea natalensis* na cavidade oral apenas mancha os dentes e a gengiva por um período curto de tempo, isto é, 5 minutos a 10 minutos, portanto não há efeitos colaterais devido a exposição prolongada deste antisséptico.

## 2.6. Características de um antisséptico ideal

Diversas substâncias químicas tais como antissépticos de amplo espectro, antibióticos específicos, tem sido utilizados para prevenir ou limitar o acumulo da placa bacteriana e outras doenças orais. Um antisséptico oral ideal deve conter as seguintes características (González *et al* 2014):

- **Efectividade** – ser um germicida potente e letal em baixas concentrações, ter uma acção rápida e possuir um amplo espectro bacteriano;
- **Substantividade** – é a capacidade que o antisséptico tem de se ligar a hidroxiapatita do esmalte ou da dentina e a grupos aniónicos ácidos de glicoproteínas, sendo lentamente liberada a medida em que a sua concentração no meio decresce, permitindo desse modo um prolongado tempo de actuação;
- **Penetrabilidade** – deve apresentar uma baixa tensão superficial afim de que penetre quando for aplicado topicamente;
- **Selectividade** – não agir sobre células do hospedeiro, isto é, deve atacar apenas os microrganismos que contribuem para as doenças periodontais e cáries, portanto as bactérias e microrganismos benéficos não devem ser destruídas pelo Antisséptico oral;
- **Não favorecer o crescimento de oportunistas** – ora, um antisséptico não pode dar lugar a proliferação de outros microrganismos não combatidos pelo antisséptico, isto é, o antisséptico não deve ser um catalisador para acelerar o crescimento de outras bactérias, etc.

- **Não induzir mutações** – deve inibir a formação de microrganismos geneticamente modificados, isto é, microrganismos com diferença no DNA ou material genético que lhes proporcione maior resistência ao antisséptico administrado pelo paciente;
- **Não seleccionar microrganismos resistentes** – deve destruir todos microrganismos que afectam a saúde oral ou reduzi-los significativamente;
- **Não produzir efeitos colaterais** – não deve ser absorvido pelos tecidos a ponto de causar uma toxicidade sistémica e não deve induzir a hipersensibilidade quando for aplicado repetidas vezes (González *et al* 2014).

Para além destas características, um antisséptico bucal ideal deve ter um aspecto físico atraente e um sabor menos desagradável possível.

Todavia, não existe ainda um antisséptico disponível no mercado que reúna todas as propriedades mencionadas acima. Vários antissépticos orais foram já introduzidos na clínica no sentido de interromper a formação da placa bacteriana ou de eliminar completamente a existente, por acção bactericida ou disruptiva da organização do biofilme bacteriano (Krayner *et al* 2010).

Para além da perspectiva de prevenção de patologias orais, para uma utilização no domicílio, os antissépticos orais desempenham um papel importante no tratamento clínico da doença periodontal instalada. Diversos estudos, como o desenvolvido por Marsh (2010), demonstram que os métodos de eliminação mecânica e cirúrgica de placa bacteriana e tecidos mucosos afectados apresentam limitações significativas, existe uma diminuição significativa e imediata das espécies bacterianas patológicas após o tratamento periodontal mecânico, mas que tem uma curta duração, particularmente se não for acompanhada com uma melhoria consistente dos métodos de auto-higienização em casa (Ankola *et al* 2008), isso é explicado pela impossibilidade de desbridamento da totalidade dos tecidos contaminados e da placa bacteriana, principalmente em estados avançados da doença periodontal, e pela persistência de reservas bacterianas em vários locais da cavidade oral para além das superfícies das

mucosas orais afectadas, incluindo em profundidade no próprio epitélio ou na estrutura dentária, mas também na língua (Quirynen *et al* 2002).

A utilização prolongada de antissépticos orais após o tratamento periodontal de suporte, diminui a capacidade de recolonização bacteriana por espécies virulentas e a consequente recidiva do processo patológico (Quirynen *et al* 2002).

## 2.7. A espectroscopia no infravermelho

Para identificar a existência de naftoquinonas no extracto aquoso da raiz da euclea natalensis, aplicou-se a espectroscopia no infravermelho, onde através do espectro obtido identifica-se os grupos funcionais presentes na amostra.

A espectroscopia no infravermelho é um tipo de espectroscopia de absorção, em que a energia absorvida se encontra na região do infravermelho do espectro electromagnético. Como as demais técnicas espectroscópicas, ela pode ser usada para identificar um composto ou investigar a composição de uma amostra (Lall *et al* 2006).

A espectroscopia no infravermelho se baseia no facto de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula (chamados nesse caso de **níveis vibracionais**). Tais frequências dependem da forma da superfície de energia potencial da molécula, da geometria molecular, das massas dos átomos e eventualmente do Acoplamento vibrónico (Weigenand *et al* 2004).

Se a molécula receber radiação electromagnética com “exactamente” a mesma energia de uma dessas vibrações, então a luz será absorvida, desde que sejam atendidas determinadas condições. Para que ocorra a vibração da ligação química e esta apareça no espectro Infravermelho, a molécula precisa sofrer uma variação no seu momento dipolar devido a essa vibração (Lall *et al* 2006).

Em particular, na aproximação de Born-Oppenheimer e aproximações harmónicas, isto é, quando o hamiltoniano molecular correspondente ao estado padrão electrónico, ele pode ser aproximado por um oscilador harmónico quântico nas vizinhanças da geometria molecular de equilíbrio, e as frequências vibracionais de ressonância são

determinadas pelos modos normais correspondentes à superfície de energia potencial do estado electrónico padrão (Weigenand *et al* 2004).

Os espectros no infravermelho são, pois, de grande utilidade na identificação dos compostos orgânicos, em geral. Para as observações dos grupos característicos mais importantes e mais frequentes interessa, sobretudo, o exame da região 3650  $\text{cm}^{-1}$  a 1500  $\text{cm}^{-1}$ .

Dado que a interpretação dos espectros é, por vezes, difícil quando se trata de uma substância desconhecida, as informações por eles fornecidas terão de ser completadas com outras técnicas analíticas.

Podendo dispor de uma amostra de substância para comparação ou se já estiver publicado o respectivo espectro, desde que haja igualdade na posição e na forma das bandas de absorção poderemos garantir também a identidade da substância com o padrão. Compreende-se que havendo  $3n - 6$  possibilidades de vibração para cada molécula de átomos, não linear, seria difícil encontrar duas substâncias diferentes que pudessem apresentar iguais modos de vibração (Lopes 2004).

A tabela 2.1, mostra a faixa de absorção e intensidade de diferentes moléculas orgânicas e das Naftoquinonas, quando a amostra é colocada na porta amostra de brometo de potássio (KBr).

**Tabela 2.1:** Absorção de ligações em moléculas orgânicas (Naftoquinonas), (Lopes 2004).

Naftoquinonas	Faixa de absorção (KBr) do grupo carbonilo em $\text{cm}^{-1}$	Faixa de absorção (KBr) do grupo hidroxilo $\text{cm}^{-1}$
1,4 naftoquinona	1675	-
7 metiljuglona	1663, 1635, 1585	1585
Etermetílico da droserona	3380, 1653, 1645	1582
Diospirina (bis 7 metiljuglona)	1664, 1634, 1590	-
Dibenzantrona	1638	-

Na tabela 2.1. acima, temos as faixas de absorção das principais naftoquinonas que podem ser isoladas da planta da *euclea natalensis* e outras substâncias orgânicas com presença de grupos carbonilo e hidroxilo, que será aplicada na identificação das Naftoquinonas no extracto aquoso usado neste trabalho, através da espectroscopia infra-vermelho.

## 2.8. Adsorção

Quando se mistura um sólido finamente dividido a uma solução diluída de um corante, observamos que a intensidade da coloração decresce pronunciadamente. Expondo um sólido finamente dividido a um gás a baixa pressão, esta pressão decresce. Nestas situações o corante ou o gás são adsorvidos sobre a superfície do sólido (Pretto 2005).

A intensidade do efeito depende da temperatura, da natureza da substância adsorvida (o adsorvato), da natureza e estado de agregação do adsorvente (o sólido finamente dividido) e da concentração do corante ou da pressão do gás. Assim adsorção é um fenómeno de transferência de massa, em que partículas suspensas num fluido aderem por forças de coesão a superfície de um sólido ou um líquido, podem ser físicas ou químicas (Treybal 1981).

### Adsorção física

Ocorre quando uma substância adere a uma superfície por forças de coesão, Vander Walls ou electrostáticas e com liberação de baixa quantidade de energia, é reversível e é aplicado em processos de separação e purificação (Treybal 1981).

### Adsorção química

Ocorre quando as moléculas adsorvidas reagem quimicamente com a superfície. Como na adsorção química ligações são rompidas e formadas, o calor de adsorção é da mesma ordem dos calores de reacção química, variando de alguns quilojoules até, aproximadamente, 400 kJ. A adsorção química não prossegue além da formação de uma única camada sobre a superfície do adsorvente (Treybal 1981).

A diferença entre as adsorções física e química é exemplificada pelo comportamento do nitrogénio sobre o ferro. Na temperatura do nitrogénio líquido, - 190°C, o nitrogénio é adsorvido fisicamente sobre o ferro na forma de moléculas de nitrogénio, N<sub>2</sub>.

A quantidade de  $N_2$ , adsorvida decresce rapidamente com o aumento da temperatura. Em temperatura ambiente, o ferro não adsorve o nitrogénio. As temperaturas altas, aproximadamente igual a  $500^\circ\text{C}$ , o nitrogénio atómico é adsorvido quimicamente na superfície do ferro (Treybal 1981).

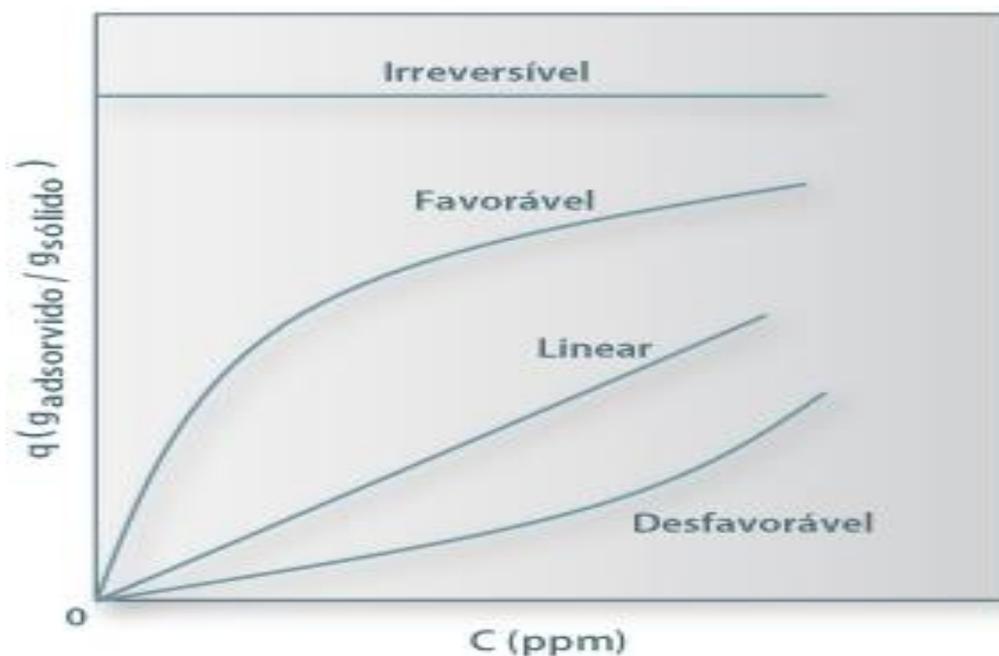
**Adsorvato** é a substância adsorvida e geralmente fica suspensa num fluido (Treybal 1981).

**Adsorvente** é a substância que adsorve, conhecem-se várias substâncias dentre elas o carvão activado, bentonite, sílica gel e terras activadas (Treybal 1981).

### 2.8.1. Isotermas de Adsorção

A isotérma é uma função ou linha que relaciona a quantidade de soluto adsorvida por unidade de massa de sólido ( $q$ ) com a concentração de soluto em solução ( $c$ ), numa situação de equilíbrio a temperatura constante.

As Isotermas de adsorção podem ser de 4 tipos, nomeadamente: isotérma irreversível, favorável, linear e desfavorável, a figura 2.4, mostra os perfis dessas isotermas.



**Figura 2.6:** Tipos de Isotermas de Adsorção

- **Irreversível** – quantidade adsorvida não depende da concentração do fluido;
- **Favorável** – carga de sólidos pode ser obtida a concentrações de fluido baixas;
- **Linear** – quantidade adsorvida é proporcional à concentrações do fluido;
- **Desfavorável** (não favorável) – a carga de sólidos obtidos é pequena sendo necessárias grandes zonas de transferência de massa no leito (caso raro).

### 2.8.2. Modelos de Isotermas de adsorcao

#### 2.8.3. Modelo de Isoterma de Freundlich

Modelo de Freundlich é uma equação empírica (resultado da interpretação de dados experimentais).

Equação de Freundlich – bastante utilizado para cálculos complexos, pela sua simplicidade de manipulação matemática. Ao contrário do modelo de Langmuir, a isotérmica de Freundlich é utilizado em sistemas com adsorção não-ideal (superfícies heterogêneas) e com adsorção em multi-camada (Viera 2004).

A Isotérmica de Freundlich é um modelo que melhor correlaciona os resultados de adsorção em fase líquida.

A equação empírica de Freundlich é apresentada abaixo.

$$q = KC^n \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

- K** Constante adimensional de Freundlich, está relacionado com a capacidade adsorção do adsorvato pelo adsorvente e depende da temperatura;
- n** Constante adimensional de Freundlich, depende das características de adsorção e da temperatura;
- q** Concentrações de equilíbrio do adsorvato na fase sólida e na fase fluida, respectivamente;

- C** Concentrações de equilíbrio do adsorvato na fase sólida e na fase fluida, respectivamente.

Para determinar as constantes adimensionais ( $K$  e  $n$ ), logaritmicamente a equação 1 e traça-se o gráfico de  $\text{Log}(q)$  em função de  $\text{Log}(C)$ . Se o gráfico for uma linha recta então o seu declive será a constante  $n$  e o anti-logaritmo da ordenada na origem será a constante  $K$ .

#### 2.8.4. Modelo de Isoterma de Langmuir

O modelo de Langmuir é uma equação empírica (resultado da interpretação de dados experimentais).

A isoterma de Langmuir está restrita a apenas uma mono camada de espessura e tem aplicação na adsorção de gases facilmente adsorvidos, por exemplo o Benzeno, (regra geral, vapores e gases de maior peso molecular e menor temperatura crítica são os mais facilmente adsorvidos) (Brunauer *et al* 1938).

##### Pressupostos

Para a aplicação do modelo de Langmuir é necessário a verificação dos seguintes pressupostos (Brunauer *et al* 1938).

- O sistema ideal;
- A superfície do sólido é uniforme e contém um nº de sítios (pontos activos) equivalentes, cada qual pode ser ocupado por uma única molécula do adsorvato;
- O equilíbrio dinâmico existe entre o gás, a Pressão, e a camada de adsorção a uma determinada Temperatura;
- As moléculas de adsorvato de uma fase gasosa estão continuamente colidindo com a superfície;
- Se o impacto for num sítio de adsorção livre então haverá formação de uma ligação;
- Se o impacto for com um sítio ocupado então as moléculas serão reflectidas de volta para a fase gasosa;
- Não há interacção entre as moléculas adsorvidas.

A equação empírica do modelo de Langmuir é apresentada abaixo:

$$\frac{q}{q_{\text{máx}}} = \frac{Kc}{1 + Kc} \text{ ou } q = \frac{q_{\text{máx}} \cdot c}{K + c} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

- $q_{\text{máx}}$**  Concentração máxima de soluto adsorvido ao sólido (constante empírica que indica a capacidade de adsorção), kg adsorvato/kg sólido;
  - $q$**  Concentração de equilíbrio do adsorvato na fase sólida, kg adsorvato (soluto) /kg adsorvente;
  - $c$**  Concentração final de equilíbrio (na fase fluida), kg adsorvato/m<sup>3</sup> fluido;
  - $K_c$**  Constante de equilíbrio de adsorção (determinada experimentalmente), kg/m<sup>3</sup> (está relacionada com as forças de interacção adsorvente-adsorvato e também com a energia livre de adsorção);
- Se  **$Kc \gg 1$** ; tem-se uma isoterma extremamente favorável;
  - Se  **$Kc < 1$** ; tem-se uma isoterma linear.

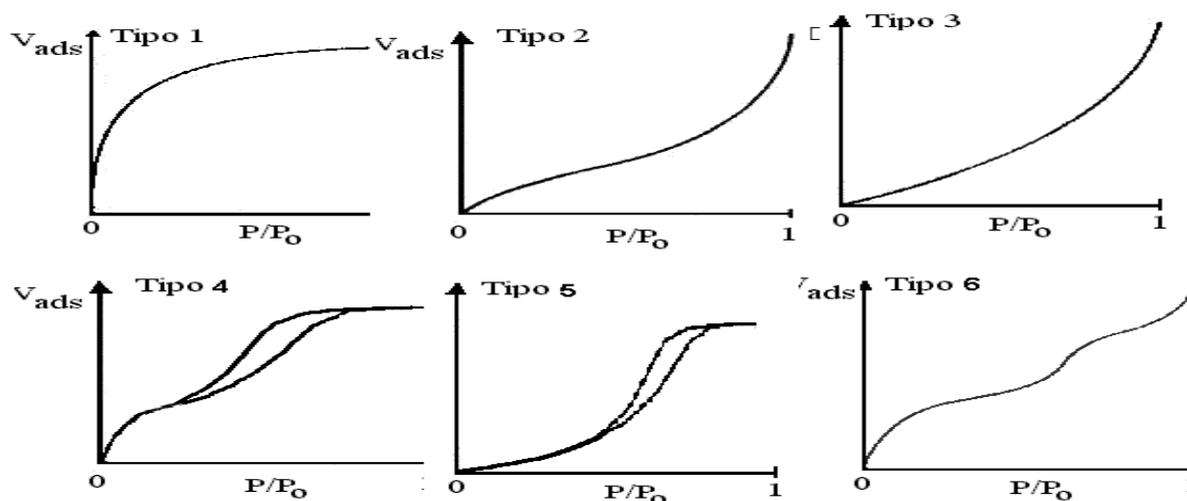
Representando  $\frac{1}{q}$  em função de  $\frac{1}{c}$ , obtém-se um gráfico em linha recta, cujo o declive é

$$\frac{k}{q_{\text{max}}} \text{ e a sua ordenada na origem é } \frac{1}{q_{\text{max}}}.$$

### 2.8.5. Classificação das isotermas segundo Brunauer, Deming, Deming e Teller (BDDT).

No contexto das isotermas de adsorção, (Brunauer *et al* 1940) propuseram um modelo de classificação para as mesmas, por meio do qual todas as isotermas poderiam ser classificadas em seis tipos diferentes de curvas. A figura 2.8 abaixo mostra os seis tipos de curvas propostas por eles. O volume da substância adsorvida é representado no eixo das abcissas enquanto o eixo das ordenadas indica a razão  $P/P_0$ , em que  $p$  é a pressão parcial do adsorvato e  $P_0$ , a pressão no equilíbrio.

A figura 2.8, mostra a classificação das isotermas segundo Brunauer, Deming, Deming e Teller (BDDT).



**Figura 2.7:**Classificação das isotermas de adsorção segundo BDDT ( Seader 2011)

- **Isotermas do tipo 1** – são Isotermas de tipo Langmuir e são caracterizadas por uma quimissorção, isto é, uma adsorção referente a cobertura completa de uma mono camada;
- **Isotermas do tipo 2** – são Isotermas de tipo BET, possuem o comportamento típico de uma fisissorção, neste tipo de curva, a parte côncava em relação ao eixo das abcissas, é atribuído à conclusão de uma mono camada;
- **Isotermas do tipo 3** – são isotermas tipo rara e ocorre com adsorção de água em polietileno;
- **Isotermas do tipo 4** – são tipo de isotermas que indicam a presença muitos de poros nos materiais;
- **Isotermas do tipo 5** – são isotermas que ocorrem raramente, elas são peculiares de casos em que as forças que dão origem à adsorção em mono camada são relativamente fracas;
- **Isotermas do tipo 6** – são isotermas obtidas na adsorção de gases nobres em sólidos uniformes;

**Nota:** Considerar-se-á somente as Isotermas lineares e as do tipo 1

## 2.9. Densidade e viscosidade cinemática

### Densidade

Massa volumétrica ou densidade é a razão entre a massa de um corpo e seu volume (Resnick 2009).

A densidade,  $\rho$  é representada matematicamente pela fórmula:

$$\rho = \frac{m}{V} \quad (\text{equação 3})$$

E a sua unidade no Sistema Internacional (SI) é  $\text{kgm}^{-3}$ , embora comumente sejam empregadas  $\text{gml}^{-1}$  ou  $\text{gcm}^{-3}$ .

As densidades dos líquidos puros, ou em soluções, podem ser determinadas pelas medidas das suas massas que ocupam volumes conhecidos. Os aparelhos mais comuns utilizados em medidas de densidade são: picnómetro, balança de densidade e densímetro, conforme a Figura A2.1 em anexo.

Os **Picnómetros** são frascos de gargalo capilar nos quais um volume de líquido é pesado.

A medida da densidade de um líquido pelo método do picnómetro é de grande precisão, uma vez que o cálculo do volume é feito pela medida da massa. Nesse método é necessário tomar algumas precauções para evitar erros como, por exemplo, os causados por bolhas de ar formadas dentro do líquido (Young, 2003).

A equação 4, apresentada abaixo permite determinar a densidade pelo método de picnómetro.

$$\rho = \frac{P_1 - P_2}{V} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:

- $\rho$**  Densidade,  $\text{g/cm}^3$ ;
- $P_1$**  Massa do picnómetro com amostra, g;
- $P_2$**  Massa do picnómetro vazio, g;
- $V$**  Volume do picnómetro, ml.

Na **balança de densidades** a massa volumétrica é obtida pela medida do empuxo que um corpo, de densidade conhecida e suspenso por um fio, sofre quando mergulhado em um líquido. Esse método é baseado no princípio de Arquimedes.

Os **densímetros** são aparelhos que permitem a determinação da densidade dos líquidos onde são mergulhados, com a leitura directa numa escala, sem a necessidade de cálculo ou aferição em uma balança. Esses aparelhos apresentam pesos constantes e constituem-se, em geral, de um cilindro fechado contendo, na parte inferior, um lastro de chumbo ou mercúrio. Os densímetros servem para determinar a densidade ou, de modo indirecto, as concentrações de soluções.

### **Viscosidade cinemática**

A viscosidade cinemática é a razão entre a viscosidade dinâmica ou simplesmente o coeficiente de atrito interno entre várias camadas de um fluido em movimento relativo e a sua massa específica.

A viscosidade é a propriedade pela qual um fluido oferece resistência ao corte, ou seja, exprime a resistência oposta pelas camadas do fluido ao escoamento relativo entre si ou relativo à parede sólida, quando submetido à acção de uma força cisalhante externa, ou é a medida da resistência do fluido à fluência quando sobre ele actua uma força exterior como por exemplo, um diferencial de pressão ou gravidade.

Existem vários aparelhos que permitem a determinação da viscosidade de um fluido, nomeadamente, Viscosímetro primário de Brookfield, Viscosímetro de tubo capilar tipo Cannon-Fenske, Viscosímetro Copo Ford, Viscosímetro de Stokes e Viscosímetro de Redwood.

### **Viscosímetro de Redwood**

O viscosímetro de Redwood é composto basicamente por um tubo de secção cilíndrica, com um estreitamento na parte inferior, conforme mostra a figura A2.2 em anexo, uma determinada quantidade de fluido é contida no tubo que, por sua vez, fica mergulhada em banho de água ou óleo de temperatura controlada por termóstato. Uma vez atingida e mantida a temperatura escolhida, deixa-se escoar o líquido através de orifício inferior, ao mesmo tempo em que se começa a contagem de tempo. Recolhe-se o fluido em

frasco graduado e, no momento em que o nível atingir o traço de referência do gargalo, faz-se parar o cronómetro.

Para determinar a viscosidade cinemática do extracto aquoso da *euclea natalensis* pelo viscosímetro de Redwood, introduz-se os dados experimentais na equação 5, apresentada a baixo.

$$\nu = CP_1 * t - \frac{CP_2}{t} \quad (\text{Equação 5})$$

Onde:

- $\nu$  Viscosidade cinemática (mm<sup>2</sup>/s);
- $t$  Tempo (s);
- $CP_x$  Constante capilar do viscosímetro.

Os valores das constantes capilares do viscosímetro de Redwood, encontram-se registadas na tabela 2.2, a baixo.

**Tabela 2.1:**Valores das constantes capilares do viscosímetro de Redwood

Tempo (s)	Cp1: constante de capilar de viscosímetro 1 [mm <sup>2</sup> /s]	Cp2: constante de capilar de viscosímetro 2 [mm <sup>2</sup> /s]
t = [30—100]	0,26	179
t >100	0,247	50

### 2.10. Teste de sensibilidade antimicrobiana

De acordo com a (Laborclin2011) o teste de sensibilidade antimicrobiano (TSA) é um exame laboratorial “*in vitro*” realizado em Microbiologia Clínica para avaliar a capacidade de um antimicrobiano inibir o crescimento de bactérias em cultura. O resultado do teste informa especificamente qual ou quais antimicrobianos inibem o crescimento de um determinado agente causador da enfermidade, em ensaio laboratorial.

Os métodos de difusão em ágar utilizando discos impregnados com antimicrobianos, é um dos métodos mais usados para determinar a sensibilidade microbiana *in vitro* frente

aos antimicrobianos. O procedimento consiste no preparo de uma suspensão de cultura pura de microrganismos de cultivo recente, e inoculação desta suspensão na superfície de uma placa de Petri com meio ágar Muller Hinton e colocação de discos de papel impregnados com antimicrobiano. Após a incubação em estufa, é analisado o padrão de crescimento ou inibição ao redor de cada disco, sendo medido então o tamanho de cada halo (Laborclin 2011), como mostra a figura A2.3, em anexo.

O método de difusão em ágar, informa se a bactéria é resistente, sensível ou se possui sensibilidade intermediária a um determinado antibiótico. Alguns factores como a composição do meio de cultura, isto é, algumas substâncias presentes no meio de cultura podem actuar na diminuição do halo de inibição, Timidina ou purinas antagonizam e alguns fármacos, esses factores influenciam o halo de inibição, portanto, deve-se utilizar a padronização do meio de cultura, utilizando-se para o antibiograma o meio **Mueller Hinton** (Santana *et al* 2007).

### **2.10.1. Determinação da concentração de inibição mínima (CIM)**

CIM é a menor concentração que inibe o crescimento de microrganismos na incubação (Santos *et al* 2011). Segundo (Santana *et al* 2007) a concentração inibitória mínima pode ser determinada directa ou indirectamente. Ainda, segundo o mesmo autor, a determinação directa é feita pelo método de diluição e a indirecta pelo método de difusão em placa com discos impregnados com as drogas.

### **2.10.2. Método de determinação da concentração de inibição mínima (CIM)**

#### **2.10.2.1. Método de diluição**

A determinação da CIM pode ser realizada por técnicas de diluição em caldo (macrodiluição e microdiluição), e actualmente, a técnica de microdiluição vem sendo amplamente utilizada por economizar meios de cultura, reagentes e, também, por utilizar pequenas quantidades dos compostos a serem testados. Outra vantagem do uso da microdiluição é a facilidade em adquirir, simultaneamente, grande quantidade de dados (Santana *et al* 2007).

Neste método o agente antimicrobiano é preparado em diluições seriadas, logarítmicas (*Log*) e incorporada no ágar, resultando em placas com concentrações diferentes do

agente. O inóculo é aplicado simultaneamente na superfície do ágar em todas as diluições (Santana *et al* 2007).

#### **2.10.2.2. Método de teste epsilométrico**

Consiste em uma fita de 5cm impregnada com antimicrobiano em diferentes concentrações ao longo da fita e aplicada em ágar Mueller Hinton. A fita apresenta uma concentração crescente de baixo para cima, facto que permite maior poder de inibição no topo, diminuindo até ao mínimo possível (CIM), isto é, na parte achatada da elipse, faz-se a leitura da CIM (Santana *et a l*2007). A figura A2.4, em anexo, mostra o esquema do teste epsilométrico, na determinação da concentração de inibição mínima.

#### **2.10.2.3. Método de Automação Walk away plus 96**

O método de automação Walk away plus 96, identifica bactérias Gram-Negativas fermentadoras e não-fermentadoras, Cocos Gram-Positivos e Listeria, Anaeróbicos, Leveduras e microrganismos fastidiosos como *Neisseria* e *Haemophilus*.

Este método, especifica a concentração inibitória mínima com a utilização de uma ampla variedade de antibióticos, pois utiliza microplacas (painéis) de 96 poços, impregnados com a série bioquímica (cerca de 30 substratos) para a simultânea identificação bacteriana (Santana *et al* 2007).

Agentes antimicrobianos com suas respectivas diluições para a susceptibilidade antimicrobiana com concentração inibitória mínima. Contém cerca de 20 ou mais antibióticos por painel, dependendo do tipo de painel (Santana *et al* 2007).

A figura A2.5, em anexo, mostra a imagem de microplacas (a) e aparelho (b) usadas na determinação da concentração de inibição mínima pelo método de automação Walk Away plus 96.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. Preparação da matéria-prima (mulala)

Primeiramente fez-se o descasque da raiz da *euclea natalensis*, pois a substância activa está concentrada na parte alaranjada, pesou-se a amostra fresca e depois colocou-se na estufa durante 72 horas de tempo à uma temperatura de 70°C, com o objectivo de concentrar a substância activa (naftoquinonas) e determinar a humidade absoluta da raiz da *euclea natalensis*.

Pilou-se a amostra seca (97,1034 g) num pilão, para reduzir o tamanho das partículas e com objectivo de facilitar a moagem no moinho de disco.

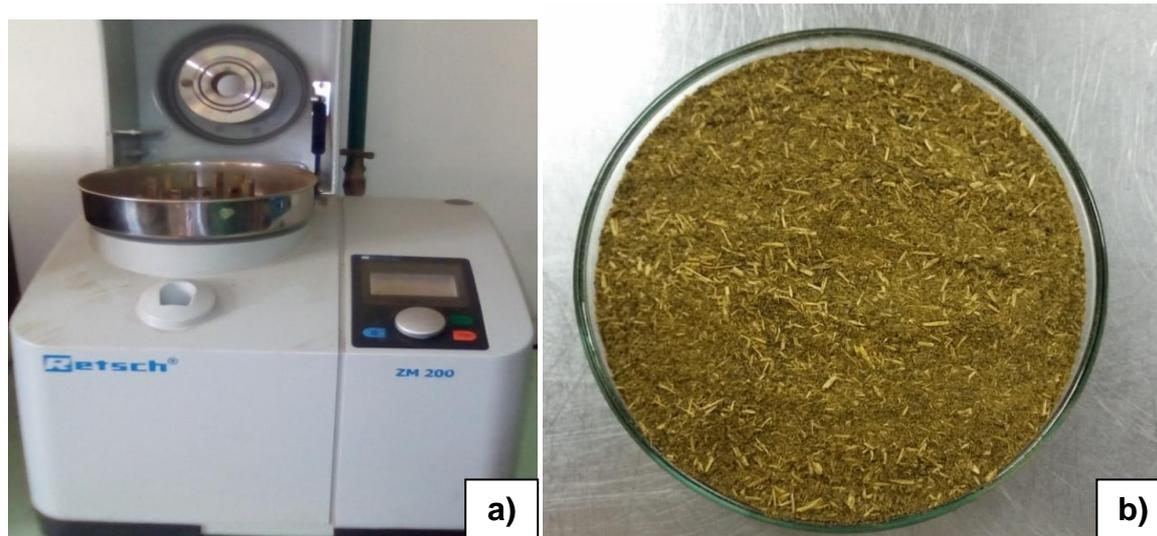
A figura 3.1, mostra uma amostra da *euclea natalensis* seca e cortada em pequenos pedaços.



**Figura 3.1:** *Euclea natalensis* (mulala) sem casca, após a secagem

Em seguida, moeu-se a amostra pilada, num moinho de disco, para aumentar a superfície de contacto entre o solvente e a amostra e do modo a facilitar a extracção aquosa da substância activa (naftoquinonas).

A figura 3.2, mostra o moinho de disco de marca **Retsch (ZM 200)** e a *euclea natalensis* moída, com o objectivo de reduzir o tamanho das partículas e facilitar a extracção aquosa da substancia activa.



**Figura 3.2:**Moinho de disco (a) e *euclea natalensis* (mulala) moída (b)

### 3.2. Extracção aquosa da substancia activa (naftoquinonas)

Fez-se a extracção usando 600 ml de água destilada como solvente a 70°C, portanto introduziu-se a água destilada à 70°C na amostra e para manter a temperatura constante mergulhou-se o copo contendo a solução no banho à uma temperatura de 70°C durante 40 minutos, agitando-a de 5 em 5 minutos e fazendo a monitoria da temperatura no termómetro acoplado ao copo.

A temperatura de extracção segundo Meyer (2000), deve ser constante a, 70°C porque a esta temperatura obtém-se maior rendimento neste processo e a substancia activa (naftoquinona) não se perde por vaporização pois a sua temperatura de ebulição é de 130°C.

Usando o filtro de Büncher com papel de filtro, filtrou-se a solução, durante 1 hora, com o objectivo de separar a solução contendo a substância activa do bagaço da raiz.

A figura 3.3, mostra a operação de filtração da solução aquosa da *euclea natalensis* no filtro Büncher, com o objectivo de separar as partículas sólidas grosseiras da solução e obter a substância activa sem impurezas.



**Figura 3.3:** Operação de filtração da *euclea natalensis* no filtro Büchner

Posteriormente colocou-se a solução na estufa a 70°C, durante 24h para concentrar a solução ate tornar-se quase sólida.

Usando o espectrofotómetro infra-vermelho determinou-se os picos para avaliar a presença de naftoquinonas na solução aquosa da *euclea natalensis*.

### **3.3. Caracterização física do extracto aquoso da *euclea natalensis***

#### **3.3.1. Procedimentos para a determinação da densidade e viscosidade**

A determinação da densidade foi feita usando o picnómetro (Figura 3.4), com auxílio dos seguintes materiais: proveta graduada, balança analítica e o picnómetro. O método do picnómetro consiste na medição da massa do picnómetro de volume conhecido com e sem a amostra.

Determinou-se a massa do picnómetro vazio limpo, seco e tampado. Encheu-se o picnómetro com a solução aquosa da *euclea natalensis*, colocou-se a tampa e cuidadosamente eliminou-se qualquer remanescente do líquido sobrenadante, assegurando-se que o capilar da tampa esteja preenchido de líquido e determinou-se a massa em gramas do picnómetro com a amostra. Com base na equação 4, determinou-se a densidade do extracto aquoso da *euclea natalensis*.

Usando o viscosímetro de Redwood determinou-se a viscosidade da solução. Usou-se ainda os seguintes materiais; balão de fundo redondo de 50 ml, crivo de malha de 75  $\mu\text{m}$ , 2 termómetros, copo de Becker de 250ml e cronómetro.

Para a determinação da viscosidade crivou-se a amostra e introduziu-se no viscosímetro imerso em um banho-maria a 25°C, usando um termómetro para o controlo da temperatura da amostra e outro para o controlo da água de aquecimento na temperatura de 25°C.

Deixou-se a amostra escoar livremente no viscosímetro através de um orifício existente no fundo do mesmo; e mediu-se o tempo de escoamento recorrendo a um cronómetro até o menisco do balão de fundo redondo. Com base na equação 5, calculou-se a viscosidade, repetindo-se o procedimento 3 vezes.

### 3.3.2. Operação de adsorção

Para reduzir as substâncias que dão cor ao extracto aquoso da *euclea natalensis* e melhorar o aspecto visual do antisséptico, fez-se a sua adsorção com bentonite. Em cada uma das 6 Erlenmeyers introduziu-se 50mL da solução da *euclea natalensis* (mulala), vide a figura 3.4.



**Figura 3.4:** Solução da *euclea natalensis* antes da adição do adsorvente

A bentonite (adsorvente), foi secado durante 3 horas na estufa a uma temperatura de 105°C, aos Erlenmeyers que tinham 50ml da solução da *euclea natalensis* cada, introduziu-se a bentonite em diferentes proporções, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 gramas respectivamente, vide a figura 3.5.



**Figura 3.5:** Mistura da solução da *euclea natalensis* e adsorvente (bentonite)

A solução da *euclea natalensis* foi misturada durante 30 minutos por meio de agitação magnética com o objectivo de homogeneizar a mistura e permitir uma perfeita interacção entre a solução e o adsorvente de modo a permitir, com que a adsorção das substâncias responsáveis pela cor seja máxima possível. A figura A2.7, em anexo, mostra o processo de filtração da solução da *euclea natalensis* misturada com o adsorvente em diferentes proporções, usando o papel de filtro e criando um vácuo de 3.5 atm (filtro Büncher). Após a operação de filtração, obteve-se as soluções aquosas apresentadas na figura 3.6.



**Figura 3.6:** Soluções aquosa da *euclea natalensis* após o processo de Adsorção com bentonite a 2, 4, 6, 8, 10 e 12 gramas respectivamente

Como pode-se notar, a partir da cor do antisséptico, a quantidade de adsorvente é directamente proporcional a remoção de substâncias que atribuem cor a solução aquosa da *euclea natalensis*, na tabela 4.4 e na tabela 4.5, apresentamos em termos quantitativos a remoção de cor assim como a massa de substâncias que dão cor.

Efectuaram-se as medições de cor, usando o colorímetro CR-10 (KONICA MINOLTA), o Colorímetro CR-10 (KONICA MINOLTA) é um instrumento utilizado na medição de cor. O colorímetro na figura em anexo (figura A2.8), é o colorímetro CR-10 (KONICA MINOLTA), projectado especialmente para comparação de cores.

Permite também conhecer o desvio da cor face a um padrão segundo o seu tom, luminosidade e cor, e estabelecer de forma objectiva, critérios de qualidade e aceitação de cores. Consiste em 3 sensores que captam a radiação nas faixas de frequência das três cores primárias, nomeadamente; vermelho, verde e azul. A medição efectuada em ambientes escuros para evitar interferências da luz e é feita junto a superfície, emitindo um feixe de luz constante.

### **3.3.3. Procedimentos da determinação da actividade antimicrobiana**

Após o processo de adsorção, segue-se a realização do teste antimicrobiano da solução aquosa bruta da *euclea natalensis* assim como da solução limpa (solução final, após adsorção). Os testes antimicrobianos foram realizados na Faculdade de Veterinária (FAVET) da Universidade Eduardo Mondlane (UEM), a preparação do meio de cultura empregado no cultivo de microrganismo para a determinação da actividade antimicrobiana frente aos extractos aquoso da raiz da *euclea natalensis* (*Mulala*) seguiu todas as indicações prescritas pelo fabricante. O meio utilizado para o teste de avaliação da sensibilidade foi o ágar Muller Hinton.

Em cabine de Biossegurança (com a seguinte referência; Purifier class II Biosafety cabinet de marca Labconco modelo 36204 type A) inoculou-se junto a chama, numa placa de petri as culturas puras a serem testadas na superfície do ágar Muller Hinton.

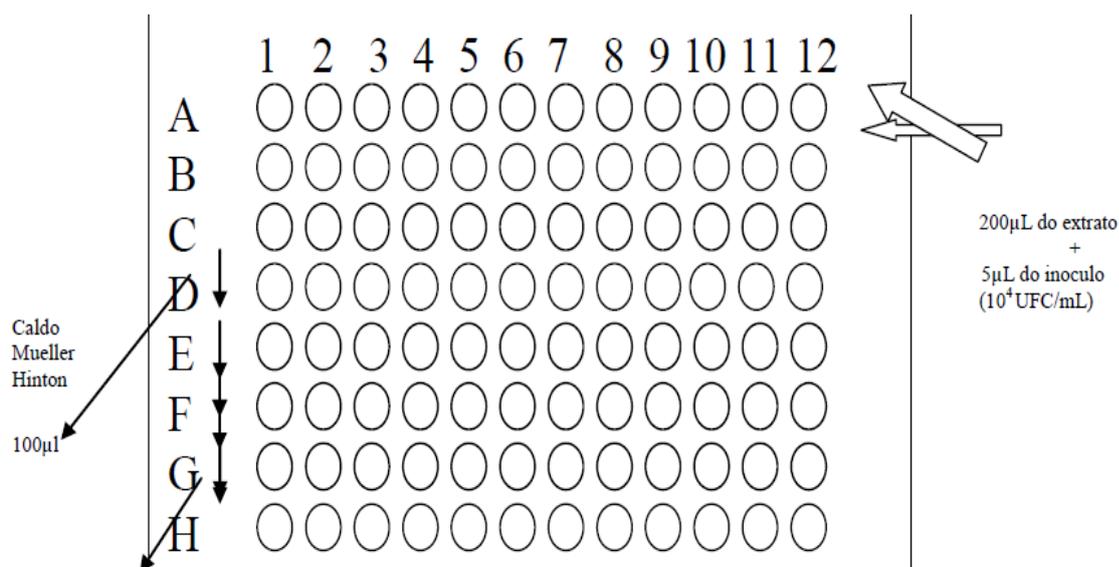
As culturas microbianas testadas foram disponibilizadas pela FAVET, nomeadamente, *streptococcus muntans* (é um microrganismo responsável pela carie dentária), *Staphylococcus aureus* (hospeda normalmente na mucosa da língua), *porphyromanas*

*gingivalis* (é uma bactéria Gram-negativa, presente em várias formas de doenças periodontais). A concentração inibitória mínima foi realizada segundo a metodologia de diluição em meio líquido, foram utilizadas microplacas estéreis (TRP-92096) de 96 orifícios. Para teste foram utilizadas placas distintas para extracto aquoso bruto e limpo da raiz da *euclea natalensis*. Um volume de 200µl de cada solução padronizada foi depositado em cada orifício às colunas de 1 a 8 da linha A.

As demais cavidades foram preenchidas com 100µL de caldo Mueller Hinton para os ensaios com as bactérias. Em seguida, uma alíquota de 100µl do conteúdo de cada orifício da linha A foi transferido para os orifícios da linha B, e após homogeneização, o mesmo volume foi transferido para linha C, sendo este procedimento repetido até a linha H. assim obteve-se as concentrações decrescentes dos produtos que variam de 2 mg/ml até 0.015 mg/ml da solução aquosa da *euclea natalensis* bruta e limpa.

Os inóculos microbianos na concentração de  $10^8$  UFC/ml (0,5 de Mc Farland) foram diluídos em água estéril 1/10 e desta diluição de 5 µl ( $10^4$ UFC/ml) foi transferido para os orifícios das linhas A-H, sendo que cada coluna 1 a 8 foi inoculada com microrganismo pré-escolhido. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

A figura 3.7, mostra o esquema da determinação da concentração inibidora mínima usando a diluição em 96 poços ou microplacas.



**Figura 3.7:**Esquema da determinação do CIM para extracto aquoso bruto e limpo da *euclea natalensis* (Neves 2010).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Caracterização da amostra

#### Determinação da humidade absoluta da raiz da *euclea natalensis*

Na tabela 4.1, encontram-se os dados obtidos durante a experiência para a determinação da humidade absoluta da raiz da *euclea natalensis*. Como pode-se observar, a amostra secou após 72 horas de tempo de secagem, durante o intervalo de 48 horas á 72 horas o peso da amostra é constante, portanto temos a certeza de que a amostra está completamente seca, isto é, perdeu toda humidade que continha.

**Tabela 4.1:**Determinação da humidade absoluta da amostra (mulala)

	Húmida ( $m_t$ ) [g]	Seca ( $m_s$ ) [g]	Tempo (h)	Temperatura(°C)
Massa da amostra	140,4503	-	0	25
	140,4504	-	0	
	140,4502	-	0	
	-	97,1035	24	70
	-	97,1033	48	
	-	97,1033	72	
Média	140,4503	97,1034	-	
Humidade absoluta ( $\omega$ )	0,447 g de água/g de m. seca			

$$\omega = \frac{m_t - m_s}{m_s} \quad (\text{Equação 6})$$

Onde:

$m_t$  Massa da raiz da mulala húmida;

$m_s$  Massa da raiz da mulala seca;

$\omega$  Humidade absoluta da *euclea natalensis*.

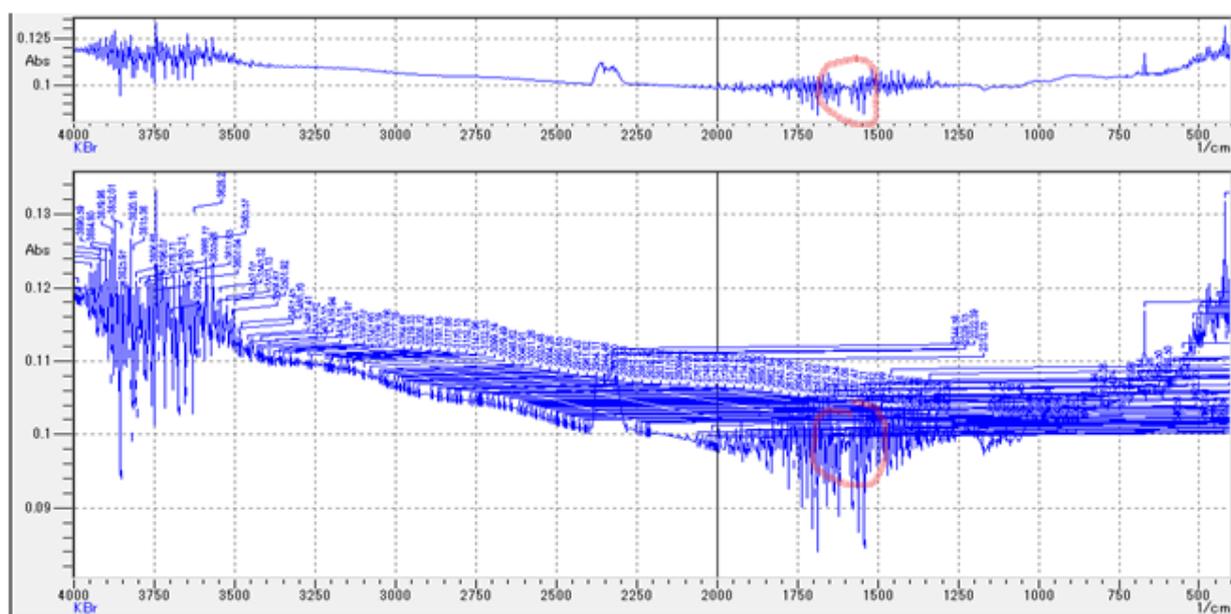
Este parâmetro justifica o porquê de algumas populações em África preferirem o uso da mulala em pó, porque neste estado ele apresenta maior tempo de prateleira e facilita o seu transporte, enquanto a húmida apresenta menos tempo de prateleira, requer mais cuidados para o seu armazenamento (ocupa maior espaço e necessita de temperaturas inferiores ou iguais a 25°C), segundo Lall (2006).

Dos resultados obtidos, constatou-se, na caracterização, que a *euclea natalensis* em estudo possui em média 0,4470 g<sub>de água</sub>/g<sub>de m.seca</sub> de humidade absoluta, um valor não muito diferente do padrão, isto é, a humidade absoluta para raiz da *euclea natalensis* fresca é de 0,4500 g<sub>de água</sub>/g<sub>de m.seca</sub> segundo (Lall e Meyer 2000), porque o erro relativo é inferior a 5%.

#### 4.2. Identificação da existência de Naftoquinonas

Os espectros obtidos por infra-vermelho permitem caracterizar os grupos funcionais que poderiam estar presentes na *euclea natalensis*, que ditam a existências ou não das naftoquinonas na sua solução.

A figura 4.1, mostra os resultados experimentais, obtidos na análise espectrofotométrica Infravermelho, para a identificação da existência ou não de naftoquinonas.



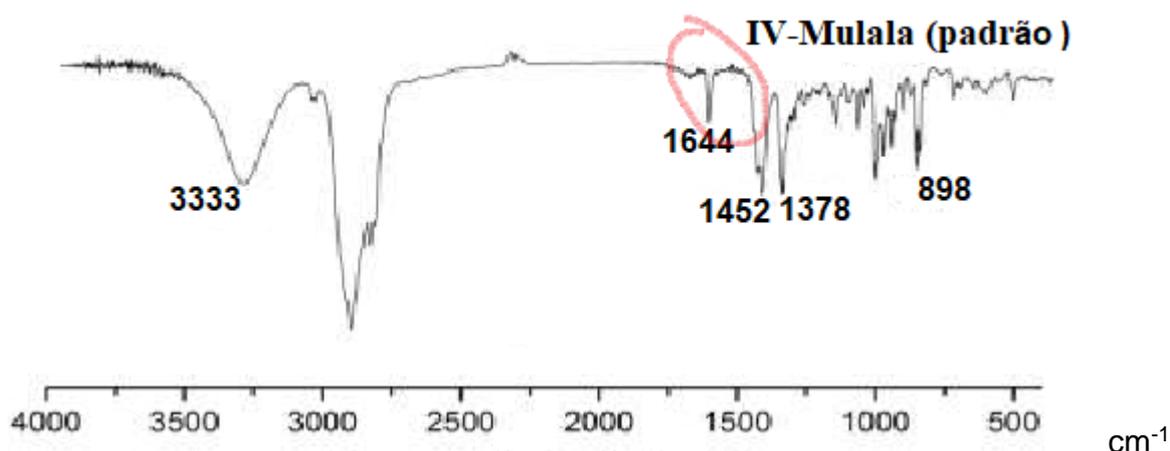
**Figura 4.1:** Análise espectrofotométrica (I-V) da *euclea natalensis* (mulala)

Observam-se duas regiões em que as intensidades das bandas foram prolongadas, isto é, de 1700  $\text{cm}^{-1}$  a 1500 $\text{cm}^{-1}$ , que confirmam a presença de ligações de tipo C=O, portanto a presença de grupo carbonilo e ligação do tipo O-H que corresponde ao grupo hidroxilo, estes grupos funcionais são predominantes nas naftoquinonas, portanto podemos assim concluir que, a solução aquosa de *euclea natalensis* é fonte desta substância activa (naftoquinona). Estes resultados foram similares aos

encontrados por Sadhasivam e Durairaj (2014), em que a banda em  $1700\text{cm}^{-1}$  a  $1500\text{cm}^{-1}$  mostrou alongamento de ligação O-H (grupo hidroxilo) e alongamento de ligação C=O (grupo carbonilo).

Como esta substância activa (naftoquinona), apresenta efeito anti-bacteriano, anti-fúngico, anti-microbiano e anti-inflamatório, justifica-se o uso desta raiz no desenvolvimento e produção de antissépticos bucais usando a raiz da *euclea natalensis*.

A figura 5.2, mostra a análise espectrofotométrica Infravermelho padrão segundo Lall e Meyer (2000), usado para comparar com os picos da amostra obtidos durante as experiências laboratoriais deste trabalho.



**Figura 4.2:** Análise espectrofotométrica (I-V) da *euclea natalensis* (mulala) padrão (segundo Lall e Meyer 2000)

No espectro padrão no IV da *euclea natalensis*, também se observam duas regiões em que as intensidades das bandas foram prolongadas, isto é, de  $1700\text{ cm}^{-1}$  a  $1500\text{cm}^{-1}$ , que confirmam a presença de ligações de tipo C=O e do tipo O-H, estes grupos funcionais são predominantes nas naftoquinonas, assim conclui-se que o espectro obtido na experiência realizada neste trabalho não tem diferenças significativas em relação ao espectro padrão obtido por Lall e Meyer (2000).

#### 4.3. Determinação da densidade.

Na tabela 4.2, encontram-se os valores obtidos na determinação experimental da densidade da solução aquosa da *euclea natalensis*. O valor da densidade foi calculado com base na equação 4, usada no método do picnómetro.

**Tabela 4.2:**Determinação da densidade da solução da *euclea natalensis*

Ensaio	Massa P1 (g)	Massa P2 (g)	Volume (V) [ml]
1	40,2346	15,5843	20,4233
2	40,2256	15,5678	20,4233
3	40,2345	15,5847	20,4233
Média	43,2316	15,5789	20,4233
Densidade ( $\rho$ ) [g/ml]	1,2071		

Ora, a densidade dos antissépticos é um dos parâmetros físicos usados para controlar a qualidade e a sua eficiência, portanto é sempre necessário ajusta-la de modo adequado, segunda a recomendação da Organização Mundial da Saúde (OMS), porque os antissépticos devem ter um tempo de residência na cavidade oral de pelo menos.

#### 4.4. Determinação da viscosidade.

Na tabela 4.3, encontram-se os valores obtidos durante a determinação experimental da Viscosidade cinemática da solução da *euclea natalensis*. O valor da viscosidade foi calculado com base na equação 5, usada na determinação da viscosidade cinemática pelo método de Redwood.

**Tabela 4.3:**Determinação da viscosidade cinemática

Ensaio	Tempo (s)	Volume (ml)	Cp1	Cp2
1	60	50	0,2600	179
2	59	50		
3	61	50		
Média	60	50		
Viscosidade ( $\nu$ ) [mm <sup>2</sup> /s]	12,6100			

Na determinação da densidade e viscosidade tivemos como base a densidade e viscosidade padrão dos antissépticos bucais comuns, portanto ajustamos a densidade para 1,2071 g/ml contra  $1,1425 \pm 0,0200$  g/ml de antissépticos bucais comuns, e viscosidade de 12,6100 cP contra  $12,4000 \pm 0,0200$  cP de antissépticos bucais comuns.

Os valores de viscosidade e densidade obtidos são ligeiramente maiores que o dos antissépticos bucais comuns, porém o erro relativo é inferior a 5%, o que é aceitável em testes laboratoriais.

#### 4.5. Remoção das substâncias responsáveis pela cor

Os resultados apresentados nas tabelas a seguir, foram medidos por colorímetro CR-10 (Konica Minolta), tendo como padrão a água potável limpa, com os seguintes parâmetros:

$$de = 20,3; \quad dl = -18,3; \quad da = -1,4; \quad db = +8,7.$$

Onde:

**dl:** Representa a luz ou brilho da amostra, o valor de **dl** indica a intensidade da luz emitida pela amostra, isto é, quanto maior for o valor de **dl**, mais clara a amostra será e quanto menor for o valor de **dl**, mais escura a amostra será;

**da:** Representa o espaço de cor entre a cor vermelha e a cor verde, isto é, quando o valor de **da** é positivo, a amostra é mais avermelhada do que verde e quando **da**, é negativo a amostra é mais esverdeada do que avermelhada;

**db:** Representa o espaço de cor entre a cor amarela e a cor azul, isto é, quando o valor de **db**, é positivo, a amostra é mais amarelada do que azulada e quando **db**, é negativo a amostra é mais azulada do que amarelada.

A tabela 4.4, mostra os resultados de medição da cor pelo colorímetro, na solução aquosa da *euclea natalensis* sem adsorvente e com 2, 4, 6, 8, 10 e 12 gramas de adsorvente respectivamente.

**Tabela 4.4:** Resultados da medição da cor da solução aquosa da *euclea natalensis*

<i>q</i> [g]	Parâmetro de cor											
	<i>dl</i>			<i>dl</i> médio	<i>da</i>			<i>da</i> médio	<i>db</i>			<i>db</i> médio
0,0	-25,7	-24,9	-25,2	<b>-25,3</b>	1,9	1,9	2,1	<b>2,0</b>	12,3	11,9	12,1	<b>12,1</b>
2	-24,1	-24,1	-24	<b>-24,1</b>	2,2	1,6	2,4	<b>2,1</b>	11,6	10,9	11,5	<b>11,3</b>
4	-24,1	-24,3	-24,4	<b>-24,3</b>	1,5	1,6	1,5	<b>1,5</b>	10,6	10,7	10,8	<b>10,7</b>
6	-23,1	-24,2	-25	<b>-24,1</b>	1,6	1,9	1,3	<b>1,6</b>	10,7	10,6	10,5	<b>10,6</b>
8	-24,3	-23,9	-23,8	<b>-24,0</b>	1,4	1,9	1,7	<b>1,7</b>	10,3	10	11,1	<b>10,5</b>
10	-23,7	-24,1	-23,9	<b>-23,9</b>	2	1,7	1,8	<b>1,8</b>	10,3	10,4	10,4	<b>10,4</b>
12	-23,8	-24,1	-23,8	<b>-23,9</b>	2,1	1,9	1,8	<b>1,9</b>	10,0	10,2	10,2	<b>10,1</b>

Com os resultados obtidos, a variação da cor da solução aquosa da *euclea natalensis* é dado pela expressão matemática:

$$\Delta E = \sqrt{(dL - dL_o)^2 + (da - da_o)^2 + (db - db_o)^2} \quad (\text{Equação 7})$$

E o valor da remoção de cor é dado pela seguinte fórmula:

$$\text{Remoção de cor} = \frac{\Delta E_0 - \Delta E_i}{\Delta E_0} \times 100\% \quad (\text{Equação 8})$$

Onde:

$\Delta E_0$ : Solução aquosa da *euclea natalensis* sem adsorvente;

$\Delta E_i$ : Solução aquosa da *euclea natalensis* com dada quantidade de adsorvente.

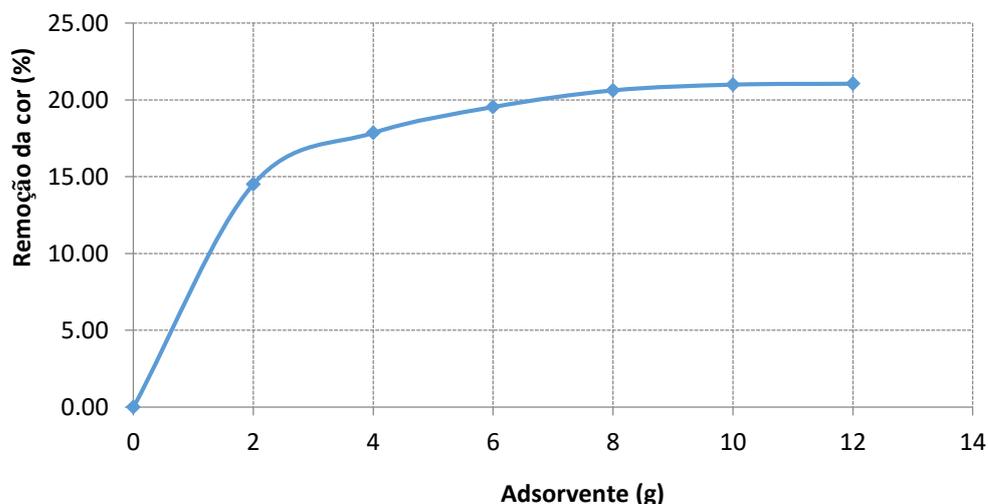
A tabela 4.5, mostra os resultados da variação da cor, calculados pela equação 8, remoção da cor em percentagem calculado pela equação 9 e a remoção dos pigmentos em gramas determinados experimentalmente pela diferença entre os pesos das soluções aquosas sem adsorvente e após o processo de adsorção com diferentes massas de adsorvente, respectivamente.

**Tabela 4.5:** Resultados da Variação, remoção de cor e remoção dos pigmentos da solução aquosa da *euclea natalensis*, antes e após a adsorção

q[g]	Parâmetro de cor			$\Delta E$	Remoção de cor[%]	Remoção dos pigmentos (g)
	dL médio	da médio	db médio			
0	-25,3	2,0	12,1	8,5	0,0	0
2	-24,1	2,1	11,3	7,2	14,5	0,5
4	-24,3	1,5	10,7	6,9	17,8	1,3
6	-24,1	1,6	10,6	6,8	19,5	1,6
8	-24,0	1,7	10,5	6,7	20,6	1,6
10	-23,9	1,8	10,4	6,7	20,9	1,7
12	-23,9	1,9	10,1	6,7	21,1	1,7

Na tabela 4.5, pode-se observar que, à medida que se aumenta a quantidade do adsorvente (2, 4, 6, 8, 10 e 12 g), a cor e os pigmentos removidos em cada processo para cada massa, tendem a aumentar até se atingir um estágio em que já não há remoção significativa de substâncias responsáveis pela cor, isto é, atinge-se uma quantidade de adsorvente (10 g) e 1,7 g de pigmentos removidos a partir do qual já não há remoção significativa da cor e dos pigmentos responsável por colorir a solução aquosa da *euclea natalensis* num volume constante de 50 ml com concentração de 0,1 g/ml, a temperatura constante de 25°C.

A figura 4.3, mostra a relação entre a quantidade de adsorvente em gramas e a remoção da cor em porcentagem, durante o processo de adsorção de 50 ml da solução aquosa da *euclea natalensis* usando 2, 4, 6, 8, 10 e 12 gramas de adsorvente (bentonite), respectivamente.



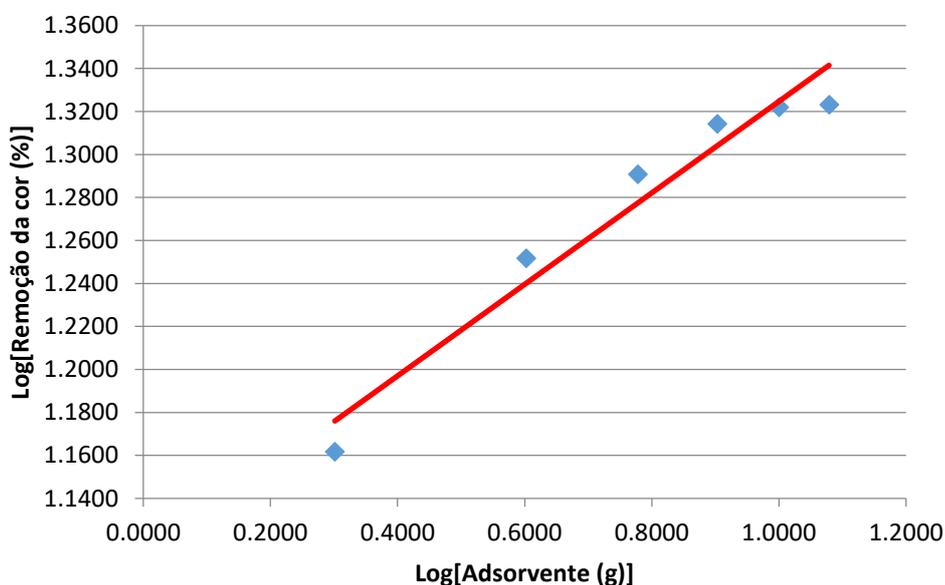
**Figura 4.3:** Relação entre a quantidade de adsorvente e a remoção de cor na solução aquosa da *euclea natalensis*

Como podemos observar a partir da figura 4.3, a remoção da cor aumenta com o aumento da quantidade de adsorvente adicionado na solução, porém quando se atinge uma remoção de cor de aproximadamente 21%, a curva tende a ser paralela ao eixo das abcissas, o que significa que a partir desta percentagem de remoção da cor, o sistema tende a estabilizar, isto é, mesmo aumentando-se a quantidade do adsorvente, a remoção da cor não altera de forma significativa, portanto atinge-se o equilíbrio e o processo de adsorção praticamente cessa.

Com os resultados obtidos na figura 4.3, obtêm-se a figura 4.4, para adequar os dados ao tipo de isoterma correspondente.

A figura 4.4, mostra que os dados obtidos se adequam a **Isoterma de Freundlich**, pois logaritmando a remoção da cor e a quantidade de adsorvente, obtêm-se uma linha aproximadamente a uma linha recta.

Na equação,  $q = KC^n$ , logaritmando, temos que:  $\text{Log}(q) = \text{Log}(KC^n)$  portanto,  $\text{Log}(q) = \text{Log}K + n\text{Log}(C)$ , que é uma função linear, de declive  $n$ .



**Figura 4.4:** Isoterma de Freundlich na remoção da cor da solução aquosa de *euclea natalensis*

Como se pode observar, a linha de tendência (linha vermelha) é uma recta, portanto, de facto os dados obtidos no processo de adsorção da solução aquosa da *euclea natalensis* usando bentonite como adsorvente obedecem a **Isoterma de Freundlich**.

#### 4.6. Actividade antimicrobiana

No presente trabalho, a análise da actividade antimicrobiana do extracto aquoso da *euclea natalensis* bruto e limpo, fez-se em simultâneo com a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das duas soluções aquosas da *euclea natalensis*, isto é, determinou-se a actividade antibacteriana e a concentração inibitória mínima numa única experiência, pois só se pode determinar a concentração inibitória mínima (CIM), se uma dada substância, tiver actividade antibacteriana, contra um certo microrganismo.

A tabela 4.6, mostra os resultados obtidos durante a determinação da concentração inibitória mínima dos dois extractos aquosos da *euclea natalensis*.

**Tabela 4.6:** Concentração inibitória mínima do extracto aquoso bruto e limpo da *euclea natalensis*

Microrganismo	Concentração inibitória mínima (CIM) [mg/ml]	
	Extracto aquoso da <i>euclea natalensis</i> bruto	Extracto aquoso da <i>euclea natalensis</i> limpo
<i>Streptococcus muntans</i>	0,125	0,125
<i>Staphylococcus aureus</i>	<0,015	<0,015
<i>Porphyromanas gingivalis</i>	0,0625	0,0625

Como se pode observar na tabela 4.6, a actividade antibacteriana não foi influenciada pela remoção das substâncias responsáveis pela cor do extracto aquoso da *euclea natalensis*, pois não há diferença nas concentrações de inibição mínima entre a solução aquosa bruta e limpa da mulala, assim o processo de adsorção pode ser empregue para melhorar o aspecto estético do antisséptico bucal obtido pela raiz da *euclea natalensis*.

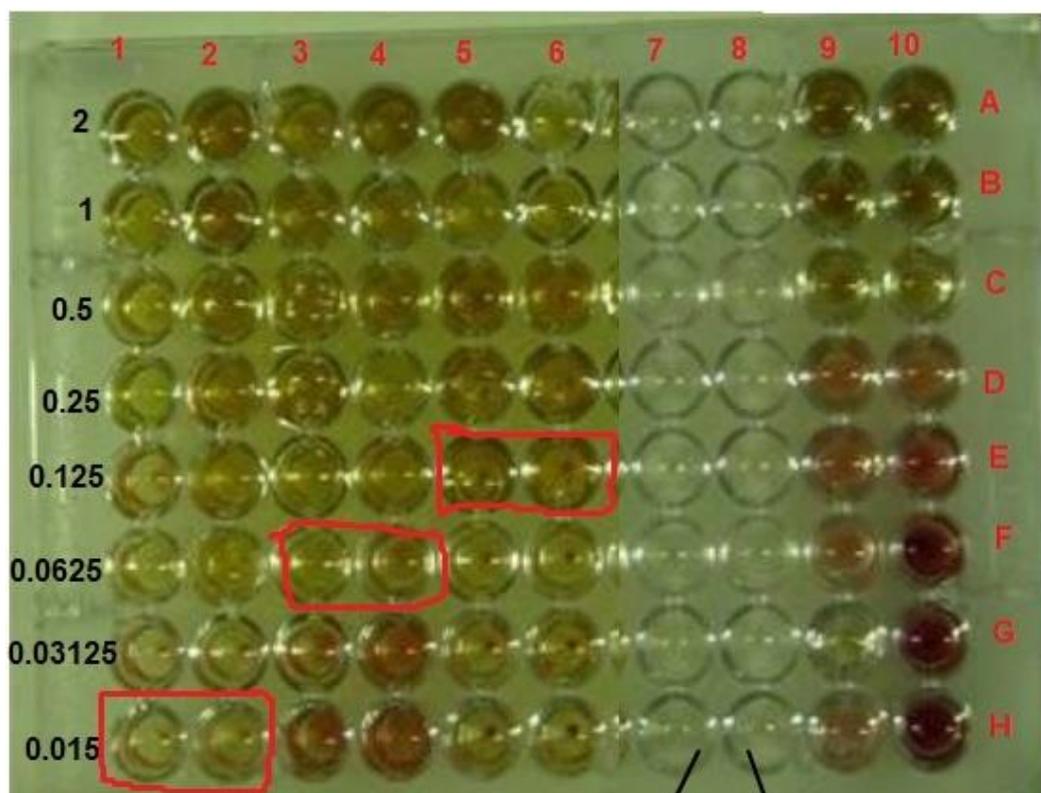
Os dois extractos aquosos da *euclea natalensis* inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus* numa concentração menor que 0,015 mg/ml, sendo esta a

menor concentração obtida na diluição da solução antimicrobiana usada neste trabalho, portanto estes microrganismos mostraram-se sensíveis a substância antimicrobiana usada como droga, porém os microrganismos *Streptococcus muntans* e *Porphyromanas gingivalis* mostraram-se mais resistentes, onde tiveram o seu crescimento suprimido numa concentração inibitória mínima de 0,125 mg/ml e 0,0625 mg/ml respectivamente. Também comparando os estudos realizados por Stander (1991), onde avaliou-se usuários e não usuários das raízes de *euclea natalensis*, observou-se que o crescimento da bactéria *Streptococcus muntans* foi suprimido pelo extracto etanólico.

Comparando os resultados da determinação da concentração inibitória mínima em extractos acentônicos e aquosos obtidos por Lall (2000), respectivamente 0,05mg/ml e 0,06mg/ml em relação ao microrganismo *Staphylococcus aureus*, sugerem que o extracto aquoso neste trabalho apresentou concentração inibitória mínima menor de 0,015 mg/ml, portanto a melhor que os obtidos anteriormente pelos pesquisadores. Esta diferença, deve-se ao facto de terem sido aplicados métodos diferentes na determinação da concentração inibitória mínima, isto é, nesse trabalho usou-se o método de diluição, enquanto no estudo desenvolvido por Lall (2000) usou-se o método de difusão.

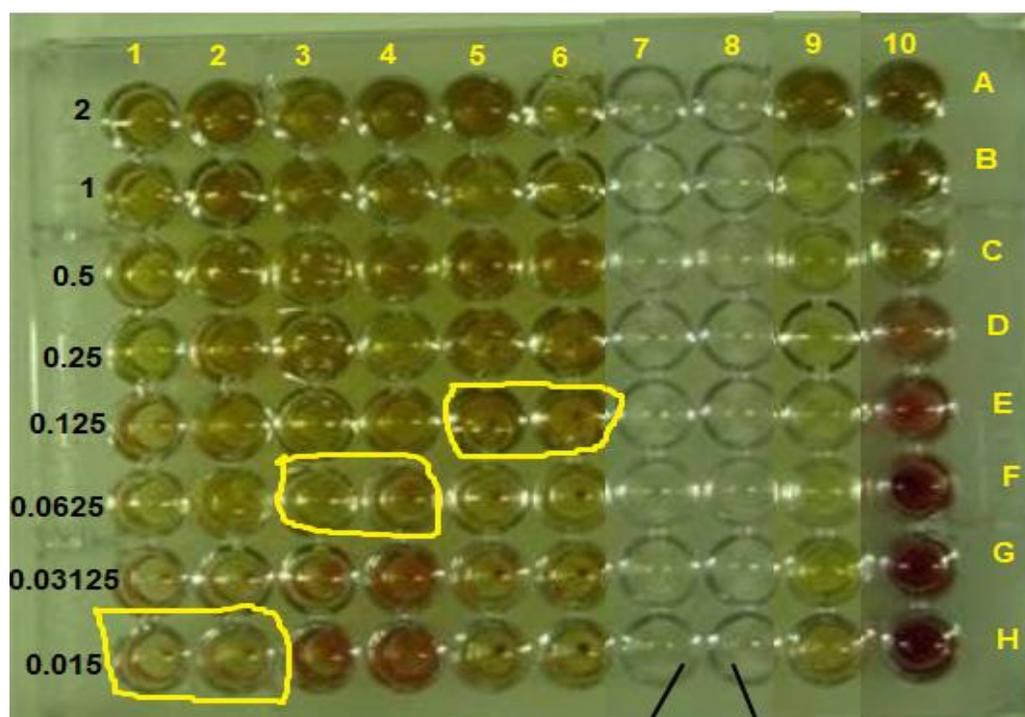
Em ensaio preliminar também sobre actividade antimicrobiana foi observado que os extractos de *euclea natalensis* obtidos com éter de petróleo e clorofórmio a partir de suas raízes foram capazes de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* numa concentração de 0,3 mg/mL (Khan *et al* 1978).

A figura 4.5. mostra os resultados obtidos na determinação da concentração inibitória mínima do extracto aquoso bruto da *euclea natalensis*, onde as cepas 1 e 2 são referentes a concentração inibitória mínima da *Staphylococcus aureus*, 3 e 4 *Porphyromanas gingivalis*, 5 e 6 *Streptococcus muntans*, 7 e 8 poços vazios para permitir fácil comparação a olho nu, 9 solução antimicrobiana diluída em serie, 10- cultura de microrganismos em meio ágar (Mueller Hinton), onde A-C (*Streptococcus muntans*), D-E (*Porphyromanas gingivalis*), F-H (*Staphylococcus aureus*).



**Figura 4.5:**Resultado da CIM do extracto aquoso bruto da *euclea natalensis* frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Porphyromanas gingivalis* e *Streptococcus muntans* respectivamente

A figura 4.6. mostra os resultados obtidos na determinação da concentração inibitória mínima do extracto aquoso limpoda *euclea natalensis*, isto é, após o processo de adsorção, onde as cepas 1 e 2 são referentes a concentração inibitória mínima da *Staphylococcus aureus*, 3 e 4 *Porphyromanas gingivalis*, 5 e 6 *Streptococcus muntans*, 7 e 8 poços vazios para permitir fácil comparação a olho nu, 9 solução antimicrobiana diluída em serie, 10-cultura de microrganismos em meio ágar (Mueller Hinton), onde A-C (*Streptococcus muntans*), D-E (*Porphyromanas gingivalis*), F-H (*Staphylococcus aureus*).



**Figura 4.6:** Resultado da CIM do extracto aquoso bruto da *euclea natalensis* frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Porphyromanas gingivalis* e *Streptococcus muntans* respectivamente

Devido a disponibilidade deficiente da amostra do microrganismo *Porphyromanas gingivalis* no laboratório da faculdade de veterinária as suas culturas foram inoculadas apenas em dois poços nos poços de controlo de crescimento microbiano, isto é, apenas nos poços D e E da última coluna (10), enquanto as restantes culturas foram distribuídas em três poços cada, de acordo com as normas estabelecidas, para uma amostra representativa.

## 5. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

### 5.1. Conclusões

No presente trabalho, desenvolveu-se um antisséptico bucal usando a raiz da *euclea natalensis* (Mulala) e chegou-se às seguintes conclusões:

- As propriedades físicas (densidade e viscosidade) do extracto aquoso da *euclea natalensis* são aproximadamente iguais, quando comparadas com as dos antissépticos comerciais, portanto, isto permite que o mesmo permaneça o tempo mínimo na cavidade oral a fim de penetrar o biofilme dentário e a gengiva;
- A *euclea natalensis* (mulala) pode ser empregue no desenvolvimento de um antisséptico bucal porque as suas propriedades físicas e químicas são favoráveis para o efeito, isto é, estão presentes na *euclea natalensis* as Naftoquinonas que são responsáveis pela acção antibacteriana, antifúngica, antimicrobiana, identificados neste trabalho pela espectroscopia infra-vermelho;
- O extracto aquoso da raiz da *euclea natalensis* não apresenta nenhuma toxicidade ao ser humano e a sua eficiência não é influenciada pelo processo de remoção da cor (adsorção), pois a actividade microbiana não altera significativamente após o processo de adsorção com bentonite;
- O extracto aquoso da raiz da *euclea natalensis* tem uma boa actividade antimicrobiana frente a microrganismos da flora oral, tais como *Staphylococcus aureus*, *Porphyromanas gingivalis* e *Streptococcus muntans*, responsáveis pelas doenças periodontais como cárie dentária e gengivite, onde apresentou-se a concentração inibitória mínima menor que 0,015 mg/ml, concentração inibitória mínima de 0,0625 mg/ml e concentração inibitória mínima de 0,0125 mg/ml respectivamente, portanto um Antisséptico bucal, desenvolvido na base da *euclea natalensis* mostra-se bem eficaz, seguro e acessível à toda população moçambicana para o seu uso no dia-a-dia.

## 5.2. Recomendações

Para os trabalhos futuros recomenda-se, a efectuar a operação de adsorção do extracto aquoso da *euclea natalensis* usando outros adsorvente diferentes da bentonite, pois para este trabalho usou-se apenas a bentonite, por ser o único adsorvente disponível nos laboratórios da faculdade de engenharia da UEM, que se adequasse aos objectivos deste trabalho, isto é, o extracto aquoso da *euclea natalensis* contém naftoquinonas que são substâncias orgânicas, portanto não se pode usar por exemplo o carvão activado, porque este adsorvente, adsorve as substâncias orgânicas devido as suas propriedades químicas, desta forma ia-se perder as substâncias activas (naftoquinonas) neste processo.

## 6. BIBLIOGRAFIA

Addy, M. 2008 – Oral hygiene products: Potential for harm to oral and systemic health *Periodontology*, p.54–65.

Brunauer, S., Emmett, P., Teller, E. Adsorption of gases in multi-molecular layers. *Journal of the American Chemical Society*, vol. 60, p. 309–319, 1938.

Dimech, G. 2003 – Avaliação toxicológica pré-clínica do extracto bruto da menta críspa. Dissertação (mestrado em fisiologia) laboratório de farmacologia e toxicologia pré-clínica de compostos bioactivos, Universidade Federal de Pernambuco.

Drew, A., Myers, S., 1997 – Safety issues in herbal medicine: implications for the health professions vol.166, p. 538-541.

Filipe, M., Gomes, E.T., Serrano, R. e Silva, O. 2008 – *Caracterização farmacognóstica da raiz de Euclea natalensis*. Workshop. Plantas medicinais e fitoterapêuticas nos trópicos. Universidade de Lisboa, Faculdade de Farmácia.

González, L., 2014 – Introducción a los antisépticos. *Atención Primaria* vol. 46, p.1–9.

Gunsolley, J.C., 2010 – Clinical efficacy of antimicrobial mouthrinses. *Journal of Dentistry* vol. 38, p.6–10.

Halliday, D., Resnick R., e Walker, V. 2009 – *Fundamentos de Física*, 8ª ed., vol. 2.

Homer, K., Manji F., Beighton D. 1990 – Inhibition of protease activities of periodontopathic bacteria by extracts of plants used in Kenya as chewing sticks (mchwaki). *Arch oral Biol*, vol. 35, p. 421-440.

Joubert, A. van der Kooy, F.; Meyer, J.J.M.; Lall, N. 2006 – HPLC in the comparative study of the content of naphthoquinone (Quinonoid constituents) in *euclea* species of South Africa, *Chromatographia*, p. 24.

Khan, M., Mutasa. S., Ndaalio, G., Wevers, H. 1978 – Antibiotic action of constituents of root bark of *euclea natalensis* A.D.C. *Pakistan Journal of scientific and industrial research*, vol. 21, p. 197-199.

Lall, N, Weiganand, O., Hussein, A., Meyer, J. 2006 – Antifungal activity of Naphthoquinones and Triterpenses isolated from the root bark of *euclea natalensis*, *south African Journal of Botany Pretoria*, vol.72, n.4, p. 579–583.

Lall, N. e Meyer, J., 2000 – Antibacterial activity of water and cetone extracts of the roots of *euclea natalensis*, *Journal of ethnopharmacologt*, vol.72, n.(1-2), p. 313-316.

Lall, N., Meyer, J., Wang, Y., Bapela, N., Van Rensberg, C., Fourie, B., Franzblau, S., 2005 – Characterization of intracellular activity of antitubercular constituents from the roots of *Euclea natalensis*, *Pharmaceutical Biology*, vol.43, p.353–357.

Laborclin, A. 2011–*Manual para Antibiograma, Difusão em Disco (Kirby e Bauer)*.

Lessa, A.O., 2011 – *Determinação do teor de compostos fitoquímicos e estudo do potencial paraprocessoamento da polpa de frutos de Maracujá das espécies silvestres (Passiflora setacea DC, Passiflora cincinnata MAST)*. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Itapetinga: Universidade Estadual do Sudoeste de Bahia.

Lin, J.2010 – Clinical efficacy of phase I therapy combined with a triclosan/copolymer dentifrice on generalized chronic periodontitis. *Journal of Dental Sciences*, n.4/5, p. 216–220.

Loffler, L., Loffler, P. 2005– Swaziland tree atlas- including selected shrubs and climbers report, *Southern African botanical diversity network, Pretoria*, p. 38-69.

Lopes, H. 2004 – substâncias químicas empregadas no preparo dos canais radiculares, 2ª ed, Rio de Janeiro, p. 535-579.

Marsh, P.D. 2010 – Controlling the oral biofilm with antimicrobials. *Journal of Dentistry* 38(SUPPL. 1), p. 11–15.

Maria Regina, S. 2018 – antissépticos em odontologia, p. 1-32

Matope, J.2012 – Coisas de Moçambique *Mulala*. Acedido em: 9 de julho de 2016, disponível, em <http://www.mmo.co.mz/mulala/>.

Murray, P; Rosenthal, K; Pfaller, M. 2009 – *Microbiologia medica*. 6ª ed, Editora Elsevier, São Paulo.

Mustafa, M. 2005 – Triclosan reduces microsomal prostaglandin E synthase-1 expression in human gingival fibroblasts. *Journal of Clinical Periodontology* vol. 32: p.6–11.

Neves, S. 2010 – Avaliação da actividade antimicrobiana e da toxicidade aguda do extracto bruto das raízes da *euclea natalensis* A.D.C (mulala), dissertação de mestrado em ciências farmacêuticas, Pernambuco.

Newman, D., Craigg G., Snader, K. 2000 – *euclea natalensis* em produtos naturais, vol. 17, p. 215-234.

Parg, S. 2000 – Efficiency of traditionally used South African plants against schistosomiasis. *Journal of ethnopharmacology, South Africa*, vol. 73, p. 209-214.

Pretto, J. 2005 – *Potencial Antimicrobiano de Extractos, Frações e Compostos Puros Obtidos de Algumas Plantas da Flora Catarinense*. D, Itajai.

Quilombo, V. 2017 – Avaliação da actividade antibacteriana de *Adansoniadigitata* L. *E.Euclea natalensis* A.DC: sua potencial aplicação num produto cárneo.

Quirynen, M. 2002 – Topical antiseptics and antibiotics in the initial therapy of chronic adult periodontitis: microbiological aspects. *Periodontology*, vol. 28, p. 72–90.

Retief, E., Siebert, S. J. e Van, A.E.2008 – A new species of *Euclea* (Ebenaceae) from ultramafic soils in Sekhukhuneland. South Africa, with notes on its ecology, *Bothalia* vol. 38, p.31-37.

Riley, P., e Lamont, T. 2013 – Triclosan/copolymer containing toothpastes for oral health (Review) summary of findings for the main comparison.

Santana, R.S; Cerqueira, A.M. 2007 – *Bacteriologia. Apostila de aulas práticas*. Universidade Federal Fluminense.

Santos, J.C; Filho, C.D; Barros, T. F; Guimares, A.G. 2011 – *Actividade antimicrobiana in vitro dos óleos essenciais de orégano, alho, cravo e limão sobre bactérias patogénicas isoladas de vôngole*. Vol. 32.

Sharma, D.K. 2012 – Triclosan resistance in bacteria and antibiotics cross-resistance, p.88-90.

Silva, M. 2003 – um panorama actual da química e da farmacologia de Naftoquinonas com ênfase na Beta-Lapachona e derivados, química nova vol.26, n.3, p.407-416.

Silva, N. 2006 – Avaliação da actividade antimicrobiana de tinturas fitoterápicas, vol.6 n.2, p. 167-171.

Silva, O, Serrano, R, Gomes, E. 2012 – Cooperação no estudo de plantas medicinais de Moçambique relato de uma experiência.

Stander, I e Van W. 1991–Toothbrushing with the root of *euclea natalensis*, Journal Biol bccale, vol.19, n 2, p.167-172.

Treybal, R. 1981 – Mass transfer operations, McGraw-Hill, New York, 3ª ed, p. 571-580.

Van der Kooy, F, Meyer, J, Lall, N. 2006 – Antimycobacterial activity and possible mode of action of newly isolated Neodiospyrin and other Naphthoquinones from *Euclea natalensis* vol. 72, n.4, p. 349–352.

Weigenand, O., Hussein, A, Lall, N., Meyer, J. 2004 –Antibacterial activity of Naphthoquinones and Triterpenoids from *Euclea natalensis* root bark. *Journal of Natural Products*, n.67, p.1936–1938.

Xavier, C. 2011 –Avaliação *in situ* do efeito de gel contendo *euclea natalensis* na superfície dentária, antes do desafio erosivo seguido ou não da abrasão. Dissertação de Mestrado em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas aplicadas na área de concentração de saúde colectiva. Bauru: Faculdade de Odontologia - Universidade de São Paulo.

Young, H.D, Freedman, R.A. 2003 –*Termodinâmica e Ondas*, São Paulo;

# ANEXOS

## Anexo 1

### Lista de materiais e equipamentos

#### Substâncias

As substâncias usadas para a realização das experiências deste trabalho, são nomeadamente:

- Raiz da *Euclea Natalensis* (Mulala);
- Água destilada;
- Carvão activado.

#### Materiais

Os Materiais usados para a realização das experiências deste trabalho, são nomeadamente:

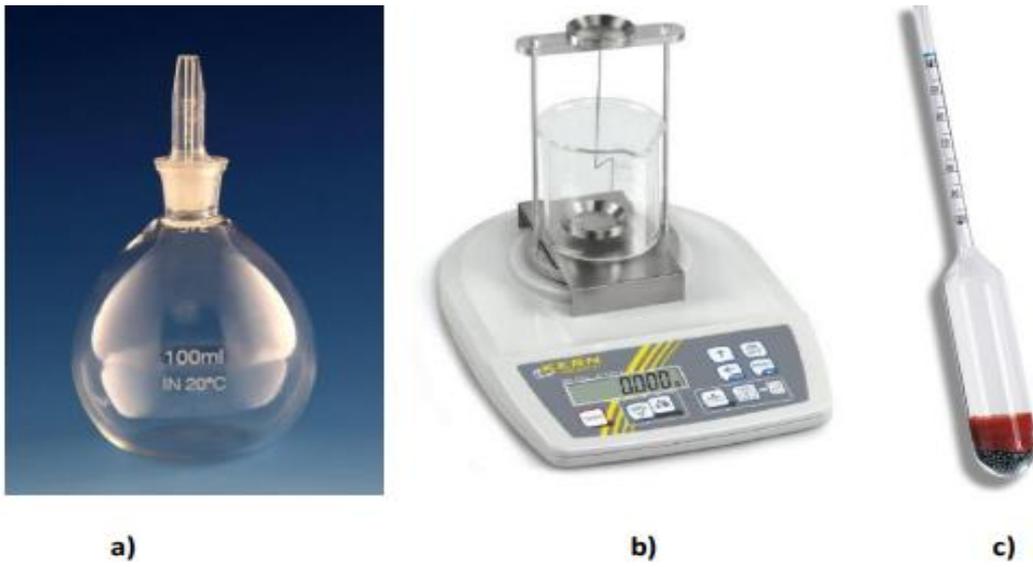
- Placas de Petri;
- Balões volumétricos;
- Copos graduados;
- Papel de alumínio;
- Funil de büchner;
- 4Erlenmeyers;
- Panela.

#### Equipamentos

Os equipamentos usados para a realização das experiências deste trabalho, são nomeadamente:

- Moinho de disco;
- Estufa;
- Fogão eléctrico;
- Espectrofotómetro (Infra-Vermelho);
- Picnómetro;
- Viscosímetro;
- Termómetro.
- 2 Agitadores magnéticos;
- 1 Colorímetro;
- 1 Balança electrónica.

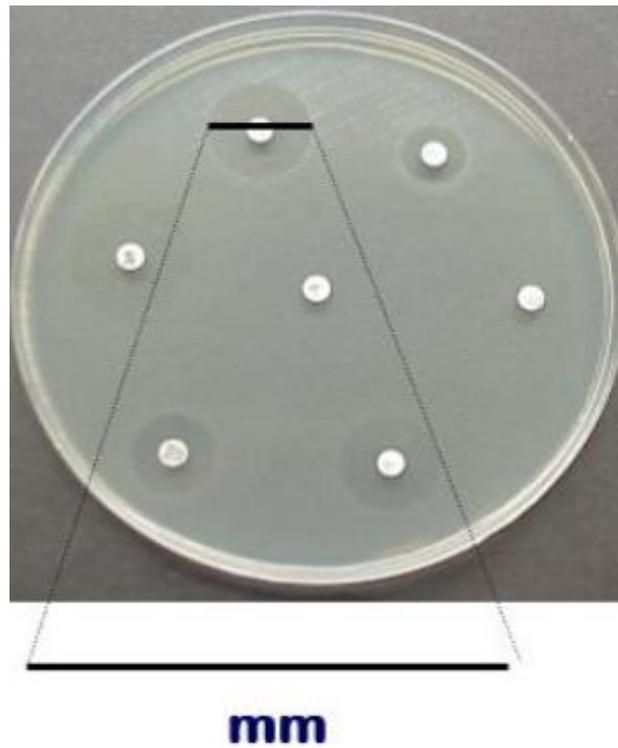
## Anexo 2



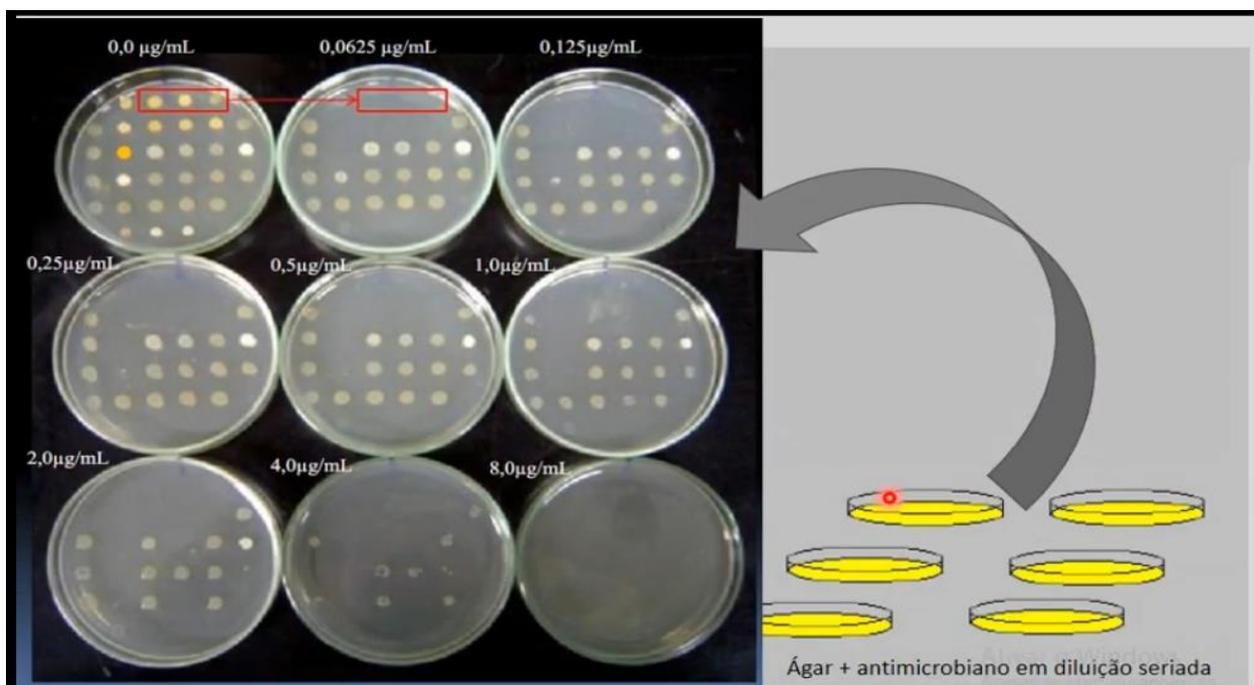
**Figura A2.1:** Pícnómetro (a), balança de densidade (b) e densímetro (c)



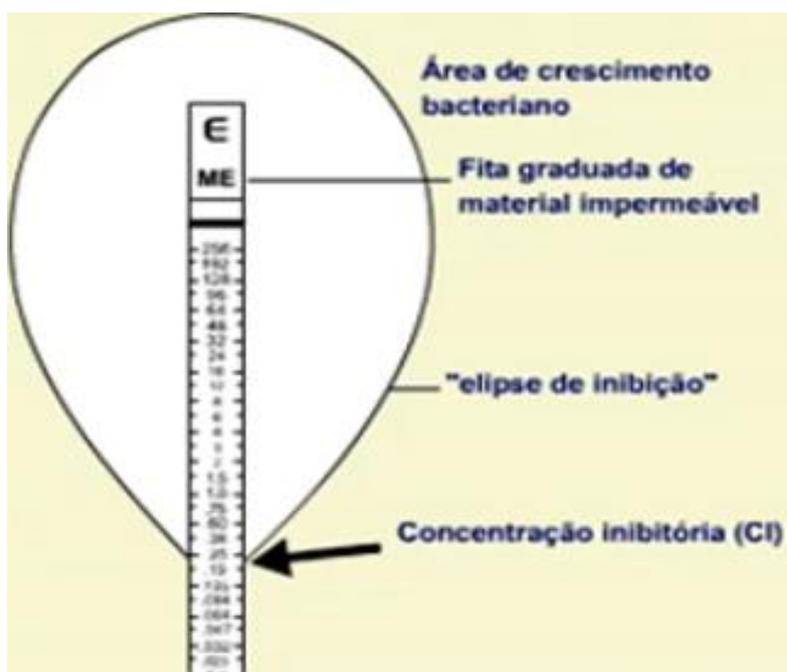
**Figura A2.2:** Viscosímetro de Redwood Universal



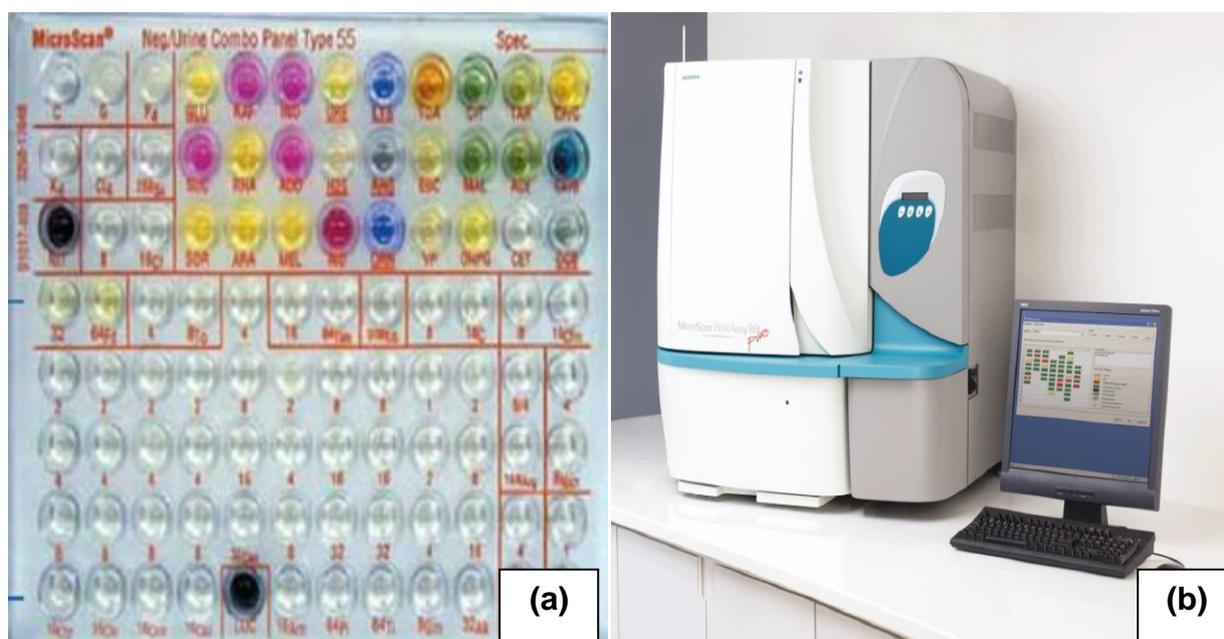
**Figura A2.3:**Leitura do halo de inibição realizada na placa com auxílio de uma régua (Carmen, A. 2021)



**Figura A2.4:**Determinação de CIM, pelo método de diluição (Carmen, A. 2021)



**Figura A2.5:** Determinação da concentração mínima (CIM), por teste epsilonométrico (Carmen, A. 2021)



**Figura A2.6:** Microplacas (a) e aparelho (b) usadas na determinação de CIM, pelo método de automação Walk Away plus 96 (Carmen, A. 2021)



**Figura A2.7:** Operação de filtração da mistura da *euclea natalensis* e adsorvente (bentonite)



**Figura A2.8:** Colorímetro CR-10 (KONICA MINOLTA)

