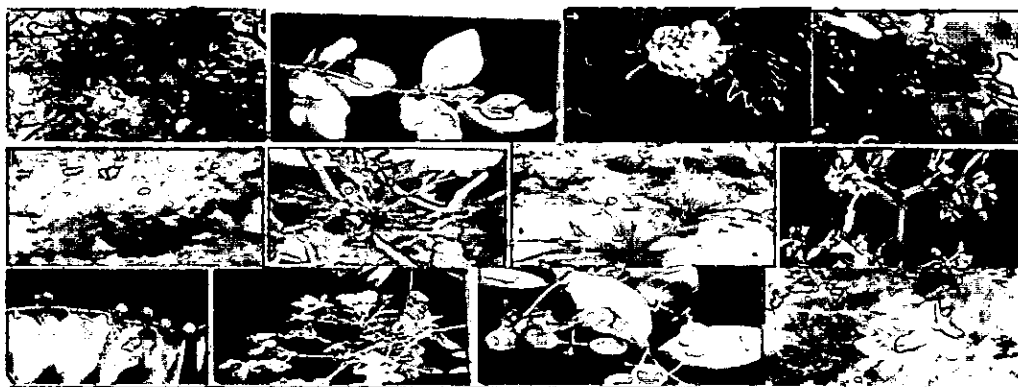




**UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**TRABALHO DE LICENCIATURA**

**ESTUDO FITOQUÍMICO DAS PLANTAS MEDICINAIS USADAS  
NO TRATAMENTO DE DOENÇAS CAUSADAS POR  
PROTOZOÁRIOS E MICOBACTÉRIAS.  
AVALIAÇÃO DOS ALCALÓIDES DE GRUPO DE BERBERINA  
NAS PLANTAS MEDICINAIS.**



**Autor : Etelvino Magan Santiago**

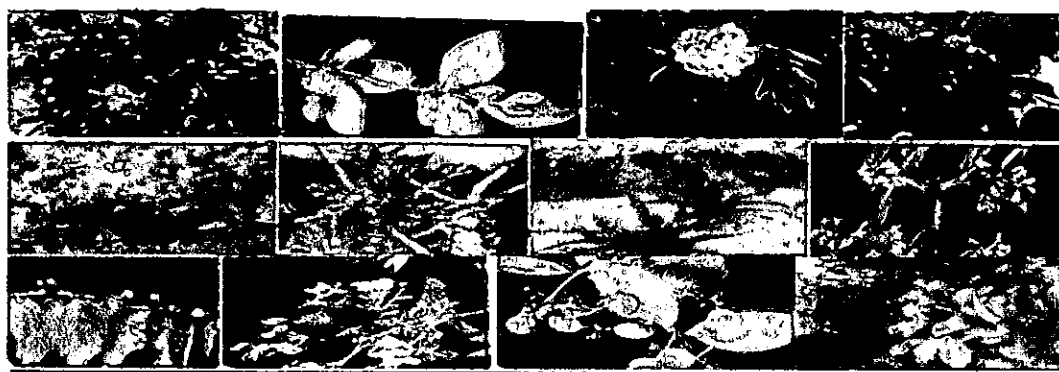
**Maputo, Novembro de 2007**



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TRABALHO DE LICENCIATURA

ESTUDO FITOQUÍMICO DAS PLANTAS MEDICINAIS USADAS  
NO TRATAMENTO DE DOENÇAS CAUSADAS POR  
PROTOZOÁRIOS E MICOBACTÉRIAS.  
AVALIAÇÃO DOS ALCALÓIDES DE GRUPO DE BERBERINA  
NAS PLANTAS MEDICINAIS.



Autor : Etelvino Magan Santiago  
Supervisor : Prof. Doutor Victor Sevastyanov  
Co-Supervisora: dra. Filomena Barbosa

U. E. M. DEPARTAMENTO DE QUÍMICA	
BIBLIOTECA	
R. E.....	89-T.L.....
DATA.....	08/04...../2008
AQUISIÇÃO.....	Oferta.....
COTA.....	

Maputo, Novembro de 2007

---

### **Dedicatória**

Aos meus pais, Tomás Caetano Santiago e Maria Magan Santiago pelo carinho, amor, educação e ensinamentos que desde o primeiro momento da vida foi decisivo no crescimento da minha personalidade.

À Vanda Leopoldina, pelo companheirismo, amor, compreensão durante esta longa caminhada.

Aos meus irmãos e cunhados, pela força e coragem.

---

## Agradecimentos

À DEUS, pela vida e saúde que me proporcionou durante esta batalha.

Aos meus pais que me trouxeram ao mundo.

Ao meu Supervisor Professor Doutor Victor Sevastyanov pela orientação competente, e pela amizade e confiança demonstrada em cada ensinamento e conselho durante esta caminhada.

À minha Co-Supervisora, dra Filomena Barbosa, pela parte botânica.

À Professora Doutora Maria José Ubemlina Ferreira, da Universidade de Lisboa, pelos testes de actividade biológica.

Aos professores do Departamento de Química, pelos ensinamentos durante as disciplinas curriculares e ao CTA deste Departamento pela paciência e vontade de ensinar, demonstrada ao longo deste período.

Aos senhores Siteo e Cândido, do Instituto de Investigação Agrária de Moçambique pelo apoio na moagem do material vegetal. Ao Cremildo Maueia do Departamento de Ciências Biológicas, da Universidade Eduardo Mondlane pela colheita das amostras e sua identificação.

Aos colegas do Curso de Química 2001/2002/2003 cuja amizade se formou permitiu a conquista dessa vitória.

Aos meus colegas e amigos, Nuno Vieira, Jaime, Mapilele, Manuela, Segredo, Bustani, Mudei, Chotai, Companhia, Talabo, Crimildo, Jamú, Dondo, Sacuze, Nerantzoulles, Iracema, pelo esforço incansável e carinho nos momentos mais difíceis desta longa caminhada.

À senhora Madalena e Amélia, pelo carinho, dedicação, paciência, ensinamentos e disponibilização de materiais e reagentes durante o trabalho laboratorial.

Em especial a Vanda Leopoldina e a família Santiago, pela constante colaboração e incentivo nos momentos mais difíceis.

A todos que contribuíram directa ou indirectamente para a realização deste trabalho.

---

Este trabalho foi financiado pelo projecto FIP do Ministério de Ciências  
e Tecnologia e tem como objectivo estudar a Etnobotânica e  
Fitoquímica das plantas usadas no tratamento de doenças causadas  
por protozoários e micobactérias.

---

### **Declaração de Honra**

O presente relatório de Trabalho de Licenciatura foi elaborado pelo autor, com base nos recursos a que se faz referência ao longo do texto.

O autor

Etelvino Magan Santiago

(Etelvino Magan Santiago)

---

## ÍNDICE

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Declaração de Honra.....	iv
Índice geral.....	v
Índice de figuras.....	xi
Índice de tabelas.....	xi
Abreviaturas.....	xii
Fórmulas Químicas.....	xiii
Índice de anexos.....	xiv
Resumo.....	xvii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Reino Vegetal e Alcalóides.....	1
2 OBJECTIVOS DO TRABALHO.....	2
2.1 Objectivo geral.....	2
2.2 Objectivos específicos.....	2
3 METODOLOGIA.....	2
4 PESQUISA BIBLIOGRÁFICA.....	3
4.1 Alcalóides.....	3
4.1.1 Definição dos Alcalóides.....	3
4.1.2 Propriedades gerais.....	3
4.1.3 Classificação.....	4

---

4.1.4	Aspectos de Distribuição.....	4
4.1.5	Isolamento.....	4
4.1.6	Testes de identificação.....	5
4.1.7	Ocorrência e Características de Berberina e seus análogos.....	5
4.1.8	Actividade Biológica.....	6
4.1.8.1	Interacção com bio – moléculas.....	7
4.1.8.2	Actividade citotóxica e apoptosis.....	7
4.1.8.2.1	Relação entre estrutura e actividade citotóxica.....	8
4.1.8.3	Actividade antimicrobial.....	8
4.1.8.3.1	Relação entre estrutura e actividade antimicrobial.....	8
4.1.8.4	Actividade antiinflamatória.....	9
4.1.8.5	Actividade antimalárica.....	9
4.1.8.6	Outros efeitos.....	10
4.2	Descrição botânica, uso na Medicina Tradicional e princípios activos das plantas em estudo.....	10
4.2.1	<i>Acridocarpus natalitius</i> (Mabhophe).....	10
4.2.2	<i>Annona senegalensis</i> (Rhompifa).....	11
4.2.3	<i>Artabbrotrys brachypetalus</i> (Ntita).....	11
4.2.4	<i>Bridelia cathartica</i> (Munwangali).....	12
4.2.5	<i>Cassia abbreviata</i> (Numanhama).....	12
4.2.6	<i>Combretum molle</i> (Xikukutse).....	13
4.2.7	<i>Elephantorrhiza elephantina</i> (Xivurai).....	14
4.2.8	<i>Garcinia livingstonei</i> (Himbe).....	14
4.2.9	<i>Hypoxis hemerocallidea</i> (Xirangabwana).....	15
4.2.10	<i>Sclerocarya birrea</i> (Nkanhu).....	15
4.2.11	<i>Senna petersiana</i> (Nembe-Nembe).....	16

---



---

4.2.12	<i>Spirostachys africana</i> (Mubhandwa).....	17
4.2.13	<i>Strychnos decussata</i> (Xinkwakwani).....	17
4.2.14	<i>Strychnos henningsii</i> (Manono).....	18
4.2.15	<i>Tabernaemontana elegans</i> (Nkahlu).....	18
4.2.16	<i>Terminalia sericea</i> (Conola).....	18
4.2.17	<i>Tiliacora funifera</i> (Xiwizila).....	19
4.2.18	<i>Vernonia colorata</i> (Nhatelo).....	19
4.2.19	<i>Ximenia americana</i> (Nthunduluka).....	20
4.2.20	<i>Zanthoxylum capense</i> (Manungwani).....	21
4.2.21	<i>Ziziphus mucronata</i> (Mphafa).....	22
5	PARTE EXPERIMENTAL.....	24
5.1	Materiais e Métodos.....	24
5.2	Tratamento das Amostras .....	25
5.2.1	Secagem e moagem das amostras.....	25
5.2.2	Extracção.....	25
5.2.3	Concentração .....	26
5.3	Métodos Cromatográficos.....	27
5.3.1	Cromatografia em camada fina TLC.....	27
5.3.2	Aplicação da amostra .....	27
5.3.3	Desenvolvimento das placas e cálculo de valores $R_f$ .....	28
5.3.4	Condições cromatográficas .....	28
5.3.5	Sistema de detecção .....	28
5.3.6	Cromatografia Líquida de Média Pressão MPLC....	29
5.4	Tratamento químico das amostras .....	29

---

---

5.4.1	Procedimento de isolamento de Berberina .....	29
5.5	Tratamento químico dos extractos etanólicos concentrados das amostras.....	30
5.5.1	<i>Zanthoxylum capense</i> .....	30
5.5.2	<i>Vernonia colorata</i> .....	30
5.5.3	<i>Tabernaemontana elegans</i> .....	31
5.5.4	<i>Hypox hemerocallidea</i> .....	31
5.5.5	<i>Terminalia sericea</i> .....	32
5.5.6	<i>Ximenia americana</i> .....	32
5.5.7	<i>Bridelia cathartica</i> .....	32
5.5.8	<i>Acridocarpus natalitius</i> .....	33
5.5.9	<i>Strychnos henningsii</i> .....	33
5.5.10	<i>Tiliacora funifera</i> .....	34
5.5.11	<i>Elephantorrhiza elephantina</i> .....	34
5.5.12	<i>Annona senegalensis</i> .....	34
5.5.13	<i>Sclerocarya birrea</i> .....	35
5.5.14	<i>Artabotrys brachypetalus</i> .....	35
5.5.15	<i>Garcinia livingstonei</i> .....	36
5.5.16	<i>Spirotachys africana</i> .....	36
5.5.17	<i>Cassia abbreviata</i> .....	37
5.5.18	<i>Senna petersiana</i> .....	37
5.5.19	<i>Ziziphus mucronata</i> .....	37
5.5.20	<i>Strychnos decussata</i> .....	38
5.5.21	<i>Combretum molle</i> .....	38
5.6	Preparação do reagente de DRG (K[BiI <sub>4</sub> ]).....	39
5.7	Preparação da Amostra – Padrão de Berberina.....	39

---

---

5.8	Cromatografia em camada fina dos extractos clorofórmicos das amostras das plantas.....	39
5.9	Preparação do extracto clorofórmico de <i>Zanthoxylum capense</i> para MPLC.....	39
5.9.1	Preparação da coluna.....	40
5.9.2	Eluição.....	40
5.9.3	Fraccionamento do extracto clorofórmico de <i>Zanthoxylum capense</i> e análise das fracções obtidas por MPLC.....	41
5.10	Testes de actividade biológica.....	41
5.10.1	Lavagem do material.....	42
5.10.2	Preparação da amostra sólida.....	42
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	43
6.1	Análise cromatográfica (TLC) dos extractos EtOH concentrados, clorofórmicos e aquosos obtidos pelo procedimento de isolamento de Berberina.....	44
6.1.1	<i>Zanthoxylum capense</i> .....	44
6.1.2	<i>Vernonia colorata</i> .....	44
6.1.3	<i>Tabernaemontana elegans</i> .....	45
6.1.4	<i>Hypox hemerocallidea</i> .....	45
6.1.5	<i>Terminalia sericea</i> .....	45
6.1.6	<i>Ximenia americana</i> .....	45
6.1.7	<i>Bridélia cathartica</i> .....	45
6.1.8	<i>Acridocarpus natalitius</i> .....	45
6.1.9	<i>Strychnos henningsii</i> .....	45
6.1.10	<i>Tiliacora funifera</i> .....	46
6.1.11	<i>Elephantorrhiza elephantina</i> .....	46
6.1.12	<i>Annona senegalensis</i> .....	46

---

---

6.1.13	<i>Sclerocarya birrea</i> .....	47
6.1.14	<i>Artabotrys brachypetalus</i> .....	47
6.1.15	<i>Garcinia livingstonei</i> .....	48
6.1.16	<i>Spirotachys africana</i> .....	48
6.1.17	<i>Cassia abbreviata</i> .....	48
6.1.18	<i>Senna petersiana</i> .....	49
6.1.19	<i>Ziziphus mucromata</i> .....	49
6.1.20	<i>Strychnos decussata</i> .....	49
6.1.21	<i>Combretum molle</i> .....	50
6.2	Análise Cromatográfica de TLC dos extractos clorofórmicos das amostras das plantas com Amostra – Padrão.....	51
6.2.1	TLC1: extracto CHCl <sub>3</sub> das amostras em sistema eluente n-BuOH-EtilAcetato-AcOH-H <sub>2</sub> O (30:50:10:10).....	51
6.2.2	TLC2 das 24 fracções obtidas por MPLC e da fracção benzénica.....	52
6.2.3	TLC3 das 6 fracções (II) resultantes da análise das 24 fracções (I) por MPLC....	54
6.2.4	TLC4 das 6 fracções (II) resultantes da análise das 24 fracções (I) por MPLC....	55
6.3	Resultados dos testes de actividade biológica.....	57
7	CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	58
7.1	Conclusões.....	58
7.2	Recomendações.....	59
	BIBLIOGRAFIA.....	60
	ANEXOS.....	65

---

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Fórmulas estruturais de alcalóides de grupo de Berberina e Benzofenantridina.....	6
Fig. 2. Cromatograma de TLC1 dos extractos clorofórmicos com a Amostra-Padrão.....	51
Fig. 3. Cromatograma das fracções (I) a UV 366 nm em n- BuOH – EtilAcetato – AcOH – H <sub>2</sub> O.....	52
Fig. 4. Cromatograma das fracções II com Amostra-Padrão em Ciclohexano – Et <sub>2</sub> NH.....	54
Fig. 5. Cromatograma das fracções II com Amostra-Padrão em n- BuOH – AcOH – H <sub>2</sub> O.....	55

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 4.1. Substituintes e nomes dos alcalóides do grupo Berberina e Benzofenantridina.....	6
Tabela 4.2. Planta e grupos de compostos químicos presente.....	22
Tabela 5.1. Nomes científicos, famílias a que pertencem e parte das plantas analisadas.....	24
Tabela 5.2. Nome científico com dados da extracção e concentração do extracto bruto.....	26
Tabela 5.3. Sistema de solventes (% v/v) usado na Cromatografia Líquida de Média Pressão....	41
Tabela 6.1. Alcalóides com dados teóricos de R <sub>f</sub> , cor das manchas e sistemas de solventes.....	43
Tabela 6.2. Resultado da análise cromatográfica de presença de Berberina e outros alcalóides, dos extractos etanólicos submetidos ao procedimento de isolamento.....	51
Tabela 6.3. Resultado comparativo de presença de Berberina em <i>Z. capense</i> com Amostra – Padrão.....	52
Tabela 6.4. Resultado de TLC das fracções I no sistema eluente n-BuOH-EtilAcetato-AcOH-H <sub>2</sub> O.....	53
Tabela 6.5. Resultado de TLC1 das fracções II no sistema eluente Ciclohexano – Et <sub>2</sub> NH (90:1).....	54
Tabela 6.6. Resultado de TLC4 das fracções II no sistema eluente n- BuOH – AcOH – H <sub>2</sub> O....	56

---

## ABREVIATURAS

*P. Falciparum* – *Plasmodium Falciparum*

*P. vivax* – *Plasmodium vivax*

*E. gracilis* - *Euglena gracilis*

*C. albicans* – *Candida albicans*

*C. Tropicalis* – *Candida Tropicalis*

*E. coli* - *Escherichia coli*

*S. aureus* - *Staphylococcus aureus*

*M. Semegmatis* – *Mycobacterium semegmatis*.

t-RNA – Ácido Ribonucléico transportador

DNA – Ácido desoxiribonucléico

M – Concentração molar

µg/mL, µg mL<sup>-1</sup> – Concentação em micrograma por mililitro

g/cm<sup>3</sup> – Densidade em grama por centímetro cúbico

fig. - Figura

°C – Temperatura em graus Celsius

g – Massa em grama

dec. – Decompõe-se

m.p – Ponto de fusão

Mr – Massa molecular

mL – Volume em mililitro

min. – Minutos

h - Hora

R<sub>f</sub> - Factor de Retenção

UV-Vis – Ultravioleta e Visível

---

---

nm – Comprimento de onda em nanómetro

## FÓRMULAS QUÍMICAS

HCl – Ácido Clorídrico

NH<sub>4</sub>OH – Hidróxido de Amónio

CHCl<sub>3</sub> – Clorofórmio

H<sub>2</sub>O – Água

NH<sub>4</sub>Cl – Cloreto de Amónio

Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> – Nitrato de Bismuto

KNO<sub>3</sub> – Nitrato de Potássio

KI – Iodeto de Potássio

HNO<sub>3</sub> – Ácido Nítrico

n-BuOH – n -Butanol

AcOH – Ácido Acético

C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> – Benzeno

MeOH – Metanol

n- PrOH – n-Propanol

HCOOH – Ácido Fórmico

EtOH – Etanol

DRG – Reagente de Dragendorff

---

## ÍNDICE DOS ANEXOS

ANEXO I: Figuras das Plantas.....	I
Fig.1 – <i>Acridocarpus natalitius</i> .....	I
Fig.2 – <i>Annona nenegalensis</i> .....	I
Fig.3 – <i>Artabbrotrys brachypetalus</i> .....	I
Fig.4 – <i>Bridelia cathartica</i> .....	I
Fig.5 – <i>Combretum molle</i> .....	I
Fig. 6 – <i>Elephantorrhiza elephantina</i> .....	I
Fig.7 – <i>Garcinia livingstonei</i> .....	II
Fig.8 – <i>Hypoxis hemerocallidea</i> .....	II
Fig.9 – <i>Sclerocarya birrea</i> .....	II
Fig 10 – <i>Senna petersiana</i> .....	II
Fig 11– <i>Spirostachys africana</i> .....	II
Fig 12 – <i>Strychnos decussata</i> .....	II
Fig 13– <i>Strychnos henningsii</i> .....	II
Fig 14– <i>Tabernaemontana elegans</i> .....	II
Fig.15 – <i>Terminalia sericea</i> .....	III
Fig. 16 – <i>Vernonia colorata</i> .....	III
Fig.17 – <i>Ximenia americana</i> .....	III
Fig.18 – <i>Zanthoxylum capense</i> .....	III
Fig. 19 - <i>Ziziphus mucronata</i> .....	III



ANEXO II: Fluxograma de isolamento de Berberina.....	IV
1. Separação de Berberina como alcalóide principal.....	IV
2. Separação de Berberina onde não existe como alcalóide principal.....	V
ANEXO III: Equipamentos.....	VI
Fig. 1- Moinho usado para a moagem das amostras.....	VI
Fig. 2 Extracção por Soxhlet.....	VI
Fig. 4 - Aparelho de MPLC usado para fraccionamento do extracto clorofórmico de <i>Zanthoxylum Capense</i> .....	VI
Fig. 3 - Rota vapor usado para concentrar a solução etanólica.....	VI
Fig. 5- Fracções obtidas depois do fraccionamento da amostra de clorofórmica de <i>Z. capense</i> por MPLC.....	VI
Fig. 6 - Aparelho de Lâmpada UV usado para a leitura dos cromatogramas a 366 nm.....	VI
ANEXO IV: Cromatogramas .....	VIII
1. <i>Zanthoxylum capense</i> .....	VIII
2. <i>Vernonia colorata</i> .....	VIII
3. <i>Tabernaemontana elegans</i> .....	IX
4. <i>Hypoxis hemerocallidea</i> .....	IX
5. <i>Terminalia sericea</i> .....	IX
6. <i>Ximenia americana</i> .....	IX
7. <i>Bridelia cathartica</i> .....	IX
8. <i>Acridocarpus natalitius</i> .....	IX
9. <i>Strychnos henningsii</i> .....	X
10. <i>Teliacosa funifera</i> .....	X
11. <i>Elephantorrhiza elephantina</i> .....	X
12. <i>Annona senegalensis</i> .....	X
13. <i>Sclerocarya birrea</i> .....	X
14. <i>Artabotrys brachypetalus</i> .....	X

---

15. <i>Garcinia livingstonei</i> .....	XI
16. <i>Spirotachys africana</i> .....	XI
17. <i>Cassia abbreviata</i> .....	XI
18. <i>Senna petersiana</i> .....	XI
19. <i>Ziziphus mucronata</i> .....	XI
20. <i>Strychnos decussata</i> .....	XI
21. <i>Combretum molle</i> .....	XII
 ANEXO V: Testes de actividade biológica.....	 XIII
Material e métodos.....	XIII
Tabela de Resultados.....	XV
Fotos dos resultados dos testes de actividade biológica.....	XVI

---

## RESUMO

No presente trabalho foram analisadas 21 plantas colhidas nas províncias de Maputo e Gaza usadas por praticantes de Medicina Tradicional, para a cura e/ou tratamento de várias doenças causadas por protozoários e micobactérias.

As amostras das plantas foram deixadas a secar, moídas e depois submetidas a extracção por Soxhlet usando como solvente etanol a 95%, para a extracção dos princípios activos. Os extractos etanólico obtidos foram submetidos a procedimentos químicos de isolamento de Berberina e seus análogos. Os extractos clorofórmicos do procedimento de extracção dos alcalóides foram submetidos a análise por cromatografia em camada fina TLC, em sistemas de solventes de diferentes polaridades.

Nos extractos clorofórmicos de algumas plantas analisadas observou-se presença de alcalóides que podem ser análogos da Berberina ou com nitrogénio quaternário, em e somente em *Zanthoxylum capense* foi identificado presença da Berberina usando Amostra – Padrão.

Os extractos etanólicos de 5 plantas em análise, submetidas a testes de actividade biológica, mostraram actividade antimicrobiana contra germe Gram-positivo *Staphylococcus aureus* e uma boa acção contra *Mycobacterium semegmatis*.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Reino Vegetal e Alcalóides

O reino vegetal é uma fonte imensa de novos tipos de compostos químicos que constituem a pedra basilar da medicina moderna cada vez mais crescente a nível mundial. A indústria farmacêutica absorve a maior parte dessas matérias-primas, utilizando-as na preparação de extractos e no isolamento de constituintes quimicamente puros e farmacologicamente activos. A investigação de plantas medicinais forneceu à Medicina Ocidental muitos medicamentos populares da antiga Medicina Chinesa, Ayurvedica, dos Índios das Américas, que foram utilizados com sucesso contra diferentes doenças, tais como: os alcalóides da *Digitalis* na insuficiência cardíaca, a Quinina (casca da *Cinchona*) contra a malária, os opiáceos (*Papaver somniferum*) como analgésicos, a Pilocarpina (*Pilocarpus brasiliensis*) contra o glaucoma, a Emetina (*Cephalis ipecacuanha*) contra amebíase, os alcalóides da Vinca na quimioterapia do câncer. Estes são só alguns exemplos de produtos de origem vegetal que tiveram um valor incontestável na terapia e que servem hoje como base para a produção de medicamentos.

As plantas são uma valiosa fonte de produtos do metabolismo primário e secundário, os quais são utilizados como fármacos (com acção tranquilizante, analgésica, anti inflamatória, citotóxica, anticoncepcional, antimicrobiana, antiviral, fungicida, etc.), agroquímicos, flavorizantes, aromatizantes, corantes, bioinseticidas, aditivos alimentares e outros [46]. Actualmente, a metade dos medicamentos mais vendidos no mundo tem sua origem em produtos naturais de plantas. [43]

A flora de Moçambique possui muitas plantas aromáticas e medicinais utilizadas por praticantes de medicina tradicional no tratamento de várias doenças causadas por protozoários e micobactérias (Tuberculose, Malária, entre outras). Grande parte de população moçambicana recorre ao uso de medicina tradicional para cura e/ou tratamento de certas doenças. É neste contexto que no presente trabalho propõe-se realizar o estudo fitoquímico de presença de alcalóides do grupo de Berberina em 21 plantas usadas por praticantes de medicina tradicional, no âmbito de extrair os princípios activos (no extracto EtOH) e sua avaliação farmacológica, em testes de actividade biológica.

## 2 OBJECTIVOS DO TRABALHO

### 2.1 Objectivo geral

- ✓ Estudo fitoquímico de plantas medicinais usadas no tratamento de doenças causadas por protozoários e micobactérias nas províncias de Gaza e Maputo.

### 2.2 Objectivos específicos

- ✓ Estudo teórico dos alcalóides de grupo de Berberina, sua ocorrência, propriedades, actividade biológica e farmacológica.
- ✓ Descrição taxonómica, etnobotânica e fitoquímica das plantas.
- ✓ Testes de actividade biológica dos extractos das plantas.
- ✓ Elaboração de método de determinação de Berberina e seus análogos nas plantas em estudo.
- ✓ Determinação de Berberina nos extractos etanólicos das plantas em análise.

## 3 METODOLOGIA

O presente trabalho seguiu a seguinte sequência:

- ✓ Pesquisa bibliográfica.
- ✓ Trabalho experimental que teve seguintes etapas:
  - Secagem e moagem de amostras.
  - Extracção e Análise cromatográfica.
  - Fraccionamento e Análise cromatográfica.
- ✓ Discussão dos resultados.
- ✓ Elaboração do relatório final.

## 4 PESQUISA BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 Alcalóides

#### 4.1.1 Definição dos Alcalóides

Não existe uma definição do termo “alcalóide” que seja completamente satisfatória, mas geralmente incluem metabólitos secundários de azoto com natureza básica, contendo pelo menos um átomo de nitrogénio presente num anel heterocíclico como amina primária ou nitrogénio de amónio quaternário. Tem-se as seguintes definições para alcalóides:

1. Segundo o farmacêutico Meissner (1879) são compostos nitrogenados com estrutura molecular complexa, com alta actividade farmacológica e pertencem ao reino vegetal.
2. Para o químico Pelletier (1882) são metabólitos secundários produzidos por organismos vivos, contendo átomos de nitrogénio em moléculas com estrutura cíclica, em que o átomo de nitrogénio possui número de oxidação negativo.

#### Nomenclatura

A característica comum dos alcalóides é a terminação – *ina*, que reflecte o facto de estes serem aminas. Geralmente os alcalóides são especificados de acordo com a família ou plantas onde se encontram, tipo de anel heterocíclico a que pertencem. [18]

#### 4.1.2 Propriedades gerais

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

### 4.1.3 Classificação

**Alcalóides verdadeiros** – são aqueles que contêm átomo de nitrogénio num anel heterocíclico, e derivam duma amina formada por descarboxilação de um aminoácido. Pode-se considerar diferentes subdivisões consoante o aminoácido precursor (ex. Alcalóides derivados de fenilalanina são morfina, codeína).

**Protoalcalóides** – derivam dos aminoácidos mas não possuem um anel heterocíclico (ex. Efedrina, hordenina).

**Pseudoalcalóides** – são bases azotadas que parecem não estarem relacionados com aminoácidos. Esta categoria pertence certo número de compostos terpénicos e esteróides, derivados metilados de purina (cafeína, teobromina, teofilina, etc.).

De acordo com a natureza de anel heterocíclico a que pertencem podem ser classificados como alcalóides do grupo Pirrolidina, Piridina, Tropano, Isoquinolina, Quinolizidina, Purina, Harmala e Esteroidais.

### 4.1.4 Aspectos de Distribuição

Existe uma diferença qualitativa e quantitativa de alcalóides nos tecidos de plantas, isto pode se dever a diversos factores, como clima, meio ambiente e composição (química) do solo.

O teor de cada alcalóide pode também ser influenciado pela estação do ano. A ocorrência (presença significativa) de diferentes alcalóides, pode ser especificamente restrito a determinadas partes de plantas, enquanto que outros compostos são distribuídos em todas as partes das plantas, variando simplesmente o teor nos diferentes tecidos, como folhas, caules e raízes. [10]

### 4.1.5 Isolamento

#### Detecção preliminar

Quimicamente os alcalóides são heterogéneos e numerosos. Sendo bases, os alcalóides são normalmente extraídos das plantas com ácido fraco (10 % ácido acético) em solventes alcoólicos e depois precipitados e concentrados com amónia, ou ainda por extracção por solvente durante pelo

menos 4 h. O extracto é concentrado a  $\frac{1}{4}$  do volume inicial e precipita-se o alcalóide com gotas de solução de hidróxido de amónio concentrado que é colectado por centrifugação, e lavado com 1% de  $\text{NH}_4\text{OH}$ . O resíduo obtido dissolve-se em EtOH ou  $\text{CHCl}_3$ . [18]

#### 4.1.6 Testes de identificação

Reacções de identificação (pode ser características de átomo de N ou de outros grupos funcionais na molécula).

##### Reagentes gerais

O átomo de N forma complexos com os iões de Bi, Hg,  $\text{I}_2$ :

-reagente de Mayer,  $\text{KI}/\text{HgCl}_2$

-reagente de Dragendorff ( $\text{K}[\text{BiI}_4]$ )

##### Reagentes específicos

$\text{FeCl}_3$ , p-dimetilaminobenzaldeído, ninihidrina.

#### 4.1.7 Ocorrência e Características de Berberina e seus análogos

A Berberina ocorre em nove famílias das plantas *Berberidaceae*, *Annonaceae*, *Menispermaceae*, *Rutaceae* [42]. Alcalóides do grupo de Berberina (Palmatina, Columbamina, Jatrorrhizina) junto com alcalóides Benzofenantridínicos (Sanguinarina, Nitidina, Fagaridina), apresentam um verdadeiro interesse científico e prático devido a sua vasta ocorrência nas plantas superiores e alta actividade antiprotozoária. Os alcalóides de grupo Berberina derivam do sistema isoquinolínico (anel A e B figura 1.a). O anel isoquinolínico é também a base estrutural de vários tipos de alcalóides com nitrogénio quaternário, incluído os grupos de benzilisoquinolínicos e benzofenantridínicos. As fórmulas estruturais de alcalóides de grupo Berberina e Benzofenantridina estão representados na figura 1 (b) e (c), respectivamente.



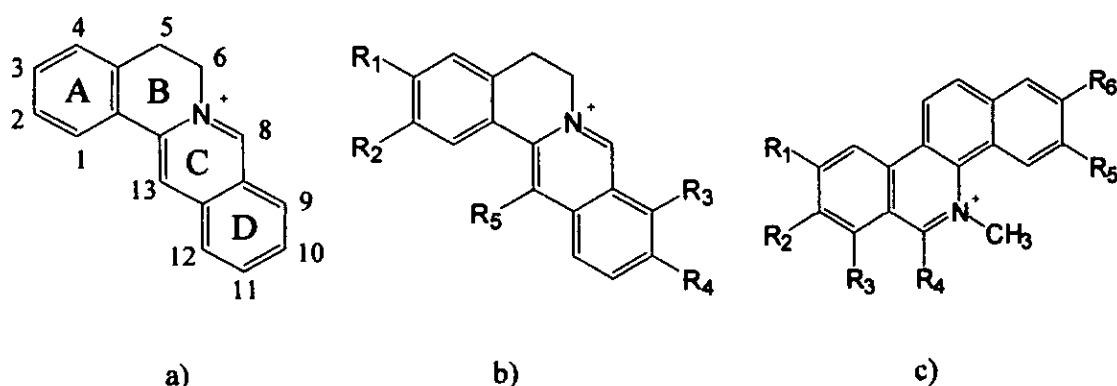


Fig. 1 – Fórmulas estruturais de alcalóides de grupo de Berberina e Benzofenanthridina

- a) Fórmula estrutural do esqueleto de alcalóides do grupo de Berberina e posições no anel.
- b) Estrutura parental dos alcalóides do grupo de Berberina
- c) Estrutura parental dos alcalóides do grupo de Benzofenanthridina

Tabela 4.1. Substituintes e nomes dos alcalóides do grupo b e c

Substituintes b em	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>
Berberina	O—CH <sub>2</sub> —O		OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	
Palmatina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	
Jatrorrhizina	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	
Columbamina	OCH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	
Coptisina	O—CH <sub>2</sub> —O		O—CH <sub>2</sub> —O		H	
Substituintes c em	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>
Sanguinarina	H	O—CH <sub>2</sub> —O		H	O—CH <sub>2</sub> —O	
Nitidina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	O—CH <sub>2</sub> —O	
Fagaridina	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	O—CH <sub>2</sub> —O	
Fagaronina	H	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OH

#### 4.1.8 Actividade Biológica [16]

Protozoários são responsáveis por grande número de doenças tropicais graves tais como a Malária, Amebíase, Leishmaníase, Tripanossomíase Tuberculose e Diarreia. A Berberina é um alcalóide conhecido como um fármaco com actividade poderosa antiamebiana, antileishmaniótica e antineoplásica e é empregado na prática médica hoje em dia. A Berberina é altamente usada como um fármaco amebicidal na Ásia [20]. Evidentemente, os análogos de Berberina (Palmatina,

Columbamina, Jatrorrhizina) e os alcalóides benzofenantridínicos, possuindo as estruturas quase semelhantes (Sanguinarina, Fagaronina), também apresentam um alto interesse científico e prático devido a sua alta actividade antiprotozoária.

Foi descoberto que a Berberina e seus análogos possuem efeitos farmacológicos tais como, inibição de WEHI Leucemia [57], redução do teor de Colesterol [9], actividade anti tumor, citostática/citotóxica [29], actividade antiviral contra Cytomegalovirus [19], pode melhorar a memória espacial (doença de Alzheimer) [59], controla a indução do ciclo celular em carcinoma gástrica humana [34].

#### 4.1.8.1 Interacção com bio – moléculas [16]

Alcalóides do grupo de Berberina possuem acção inibidora contra enzima Topoisomerase-I (Topo-I) e Topoisomerase-II (Topo-II), actuando com actividade anti tumor. Formam ligações com oligonucleótidos. Nomeadamente, os aspectos moleculares de interacção da Berberina com os ácidos Nucleicos (t-RNA, DNA Topoisomerase), efeitos em actividade de algumas enzimas (Acetilcolinesterase, Oligopeptidase) são discutidos em publicações [58], [44], [28], [35] e [32].

#### 4.1.8.2 Actividade citotóxica e apoptosis [16]

A Berberina tem um potencial efeito inibidor contra actividade telomerase em células de leucemia humana, actuando como inibidor (50% de inibição) a concentração de 35  $\mu\text{M}$ . A concentração de 30 – 300  $\mu\text{M}$  inibe a telomerase de *P. Falciparum*. A alta concentração (75  $\mu\text{g/mL}$ ), a Berberina tem uma grande actividade citotóxica. Derivados de Berberina apresentam uma actividade potencial inibidora contra caspase 3, possuindo um efeito apoptosis grande; este efeito observa-se a concentração de 20  $\mu\text{M}$  do ligando. Estudos comparativos de inibição e actividade anti-leucemica, de alguns alcalóides de grupo de Berberina demonstraram que estes têm menor actividade do que os alcalóides de grupo de Benzofenantridina.

#### 4.1.8.2.1 Relação entre estrutura e actividade citotóxica

Sob ponto de vista actividade – estrutura, algumas modificações de substituintes apresentam efeitos significativos, com introdução dum grupo alquil na posição C-13 do anel a citotoxicidade aumenta com aumento de CH<sub>2</sub> na cadeia. 12-Bromo-8-hezilberberina possui maior actividade citotóxica do que a correspondente 8-fenil e 8-butil derivados, isto sugere que o comprimento da ligação de átomo de carbono em C-8 também exerce influencia na toxicidade. Brominação em C-12 aumenta a citotoxicidade.

O 8-oxoderivados, Tetrametoxi-8-oxoberberina quando submetidos a testes de actividade citotóxica *in vitro* usando células de glândulas mamarias MDAMB-231 demonstram actividade inibidora contra a proliferação de células, a concentração de 10<sup>-5</sup> M, este efeito citotóxica não depende de inteiração com DNA.

A Berberina e a Jatrorrhizina têm potencial actividade antimutagénica contra “acridina orange” usando *Euglena gracilis* como teste de modelo eucariótico e alcalóides de grupo Benzofenantridina não.

#### 4.1.8.3 Actividade antimicrobial [16]

A Berberina e a Jatrorrhizina em pequenas concentrações demonstraram grande actividade de inibição contra bactérias de acne *Propionibacterium*. A Berberina apresenta maior actividade do que a Jatrorrhizina contra *staphylococci* coagulase-negativa. Teste de actividade antifúngica contra *Cândida* demonstrou que somente *C. Tropicalis* (resistente a Niasitina, o Miconazole, e a Econazole) foi fortemente inibido por Berberina.

##### 4.1.8.3.1 Relação entre estrutura e actividade antimicrobial [16]

Adição de grupos na posição C-8 aumentam actividade antimicrobial, 12-bromo derivado de 8-alquil e 8-fenil Berberina apresentaram alta actividade contra microorganismos testados do que os análogos sem bromo. A Jatrorrhizina em baixas concentrações possui alta actividade antifúngica com baixa toxicidade.

As formas terciárias dos alcalóides, não exibem significativa actividade e uma pequena parte de formas quaternárias apresentam actividade contra *Leptosphaeria nodrum* e *Puccinia recondita*.

13-Hezilberberina e 13-hezilpalmatina apresentam grande actividade contra *S. aureus*, sendo mais activos do que a Berberina e o Sulfato de Canamicina.

#### 4.1.8.4 Actividade antiinflamatória [16]

Extracto etanólico contendo Berberina possui elevado efeito antiinflamatório. Em estudos *in vitro* utilizando células humanas, a Berberina demonstrou actividade inibidora de activador de proteína, um factor de transcrição fundamental em inflamação e carcinogenesis. A Berberina exerce um efeito inibidor significativo em transformação de linfócito, e sua acção antiinflamatória pode ser devido a inibição de síntese de DNA do linfócito. Durante a activação de plaqueta em resposta a danos de tecidos, a Berberina tem efeito directo em diversos aspectos de processo de inflamação. [23]

#### 4.1.8.5 Actividade antimalárica

A Berberina *in vitro* possui forte efeito inibidor de síntese de ácidos nucleicos e proteínas de *P. falciparum*, sob forma de cloreto pode bloquear as sínteses de proteínas em *P. falciparum* na concentração 50  $\mu\text{M}$ . [42]

A Berberina, a Palmatina, a Jatrorrhizina e a Columbamina manifestam *in vitro* actividade contra três espécies de *Plasmodium*, isolados de pacientes [42]. Os valores de  $\text{IC}_{50}$  são, o Cloreto de Berberina 0,14 – 0,36  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; a Palmatina 0,16 – 0,28  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; a Jatrorrhizina 0,42 – 1,61 e a Columbamina 0,72  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

A malária pode ser rapidamente diagnosticada de forma efectiva. A Berberina foi usada como marcador de cromossoma Y de parasitas de malária de forma fluorescente em sangue de pacientes com sintomas clínicos de malária, tornando o DNA de *P. vivax* e *P. Falciparum* fluorescentes. Este teste tem alta sensibilidade e pode ser usado como uma avaliação eficaz e potencial ferramenta de diagnóstico de malária. [12]

#### 4.1.8.6 Outros efeitos [16]

A Berberina possui efeito antidiabético que está relacionado com propriedade estimulante de secreção de insulina e modulação dos lípidos. Alguns derivados de Berberina apresentam actividade antiarritmica. Os aspectos toxicológicos foram esclarecidos em comunicação. [33]

#### 4.2 Descrição botânica, uso na Medicina Tradicional e princípios activos das plantas em estudo

Em ordem alfabética estão apresentadas nomes científicos seguidos de nomes vernaculares entre parêntesis e família de plantas a que pertencem, usadas por praticantes de Medicina Tradicional para tratamento de doenças como a Malária, Tuberculose Amebíase e Leismaniase, analisadas neste trabalho.

##### 4.2.1 *Acridocarpus natalitius* (Mabhophe)

##### Família Malpighiaceae

**Descrição taxonómica:** Arbusto com tendência de trepar, usualmente aparecendo como um forte trepador que pode cobrir as florestas, mas às vezes desenvolve-se em pequenas árvores de cerca de 5 m de altura; ocorre em franjas ribeirinhas, ao longo das margens das florestas abertas, ou em rochas [39].

É usado por praticantes de Medicina Tradicional como remédio contra Amebíase.

**Uso medicinal zulu:** as raízes podem ser mastigadas ou postas em cima da língua como feitiço para parar a raiva quando for cometido um erro. As raízes são usadas para propósitos medicinais não especificados [26].

**Outros usos medicinais:** as raízes em pó são usadas como purgativo e também em pomadas pelos Tsongas e Shanganas. Certas partes inespecíficas da planta, são usadas em várias partes de África como feitiço protectivo contra guerra e também para o amor. [26]

#### 4.2.2 *Annona senegalensis* (Rhompifa)

##### Familia Annonaceae

**Descrição taxonómica:** Arbusto ou pequena árvore com 3 a 4 m de altura, podendo atingir os 8 m em condições ambientais favoráveis; cresce em solos arenosos, ocorrendo ao longo de ribeiras ou em bosques, rochas em afloramento e em florestas pantanosas.

É usado por praticantes de Medicina Tradicional como remédio contra Amebíase.

**Uso medicinal zulu:** as raízes são usadas para tratar loucura, para defender enfermidades e para induzir esquecimento em crianças pequenas. [26]

**Outros usos medicinais:** os “vhavenda” usam as raízes para mordidas de cobras, doenças venéreas, diarreia, disenteria, sangue nas fezes, dores de cabeça e como protecção contra feitiçaria. Em Tanzânia, a decocção de raízes e folhas é tomada para dores abdominais durante a contracção muscular; pastas de raízes são aplicadas nas mordidas de cobras, abscessos e outras feridas. As raízes são tomadas em decocções para tratamento de gonorreia. As raízes e os frutos são usados para esterilidade e doenças venéreas e as folhas para gonorreia e disenteria.

Extractos purificados contendo 60% de taninos em forma de pó, são usados em preparações patentes para hemorróides e pernas inchadas, enquanto que extractos da planta contendo 60% de taninos, são usados em preparações patenteadas contra a malária.

**Constituintes químicos:** a presença de glicósidos conhecidos por anonceína, resina cianogenética, 0.02% de annonaina e 0.14% de outros alcalóides, é reportada na planta. Alcalóides, saponinas e taninos são indicados na casca dos troncos e 18 aminoácidos foram isolados. [26]

#### 4.2.3 *Artabbrotrys brachypetalus* (Ntita)

##### Familia Annonaceae

**Descrição taxonómica:** Trepadeira local comum; arbusto ou pequena árvore expansiva; ocorre em locais quentes, secos, áreas de baixa altitude ao longo de regiões ribeiras; é o mais comum trepador através de distintas hastes florais ou pedúnculos que se amarram em volta dos ramos de árvores vizinhas.

É usado por praticantes de Medicina Tradicional para tratamento de Tuberculose.

Usos: o fruto é comestível e em Moçambique é usado para fazer remédio desintoxicante. [26]

#### 4.2.4 *Bridelia cathartica* (Munwangali)

Família Euphorbiaceae

**Descrição taxonómica:** Arbusto desordenado ou árvore multicaulado que ocorre nas margens das florestas arenosas e nas extremidades das matas ribeirinhas.

É usado por praticantes de Medicina Tradicional contra Amebíase, Malária e Tuberculose.

**Uso medicinal zulu:** é usado na medicina do encanto amoroso e para pacientes que se pensa que tenham sido seduzidos.

**Outros usos medicinais:** as raízes são usadas tradicionalmente como feitiço para prevenir bruxarias e são tomadas em várias preparações para dores de cabeça, menorrágia e esterilidade masculina no Zimbabwe. O fumo da queima das raízes é inalado para epilepsia. No Este de África, a decocção de raízes é tomada para dores de estômago. [26]

**Constituintes químicos:** ácido hidrocianico e a potencial toxina salicilato são conhecidas no género. [26]

#### 4.2.5 *Cassia abbreviata* (Numanhama)

Família Caesalpiniaceae

**Descrição Taxonómica:** Arbusto ou pequena árvore de tamanho médio 3 a 10 m de altura, ocorre em baixa e média altitude, em matas abertas ou em matas capinzais ao longo de ribeiras, em colinas e frequentemente associada a montanhas de térmites. [39]

É usado por praticantes de Medicina Tradicional no tratamento de Amebíase e Tuberculose.

**Usos medicinais:** As sementes são usadas como tónicos, as raízes são usados para curar casos severos de dores abdominais e como remédio para dores de dentes e o fumo da queima das varas é inalado para curar dores de cabeça. [26]

As folhas e vagens são tradicionalmente usadas como purgativo em várias partes de África, para complicações estomacais no Este de África e para diarreia no Botswana.

**Uso medicinal zulu:** a infusão do leite das raízes é tomada para influenza e o pó das raízes misturado com gordura, é usado se a fleuma é obstrutiva.

**Constituintes químicos:** o oximetil-antraquinona, é encontrado nas folhas e vagens e a planta, aparentemente contém taninos. Senosidos, foram isolados da planta no Irão. [26]

#### 4.2.6 *Combretum molle* (Xikukutse)

##### Familia Combretaceae

**Descrição Taxonómica:** Pequena árvore expansiva ou de tamanho médio, acima de 10 m de altura, ocorre em altitude, desde o nível do mar até 1500 m, em matas abertas. [26]

Praticantes de Medicina Tradicional usam no tratamento da Malária, Tuberculose, Desintéria Amebíase.

**Usos medicinais:** Na medicina africana, as folhas tanto frescas como secas ou humedecidas providenciam curativo para feridas, as folhas e as raízes juntas, acredita-se que são antídoto para mordedura de cobras enquanto que a raiz só, é usada para tratar constipação e abortos. Para uma criança febril é banhada com a decocção de folhas secas para reduzir sua temperatura, enquanto que a infusão da casca interior é tomada oralmente ou como enema para curar complicações estomacais [39].

As raízes são usadas para dores abdominais, diarreia, infertilidade, etc. no Zimbabwe. Em Tanzânia, a infusão de raízes é tomada para diarreia. Extractos de várias partes da planta mostraram actividade anti-tumoral contra sarcoma 180.

**Uso medicinal zulu:** as folhas frescas ou secas são usadas como curativo para feridas. As folhas e raízes são usadas juntas contra mordidas de cobras como antídoto e a raiz só, é usada para tratar abortos e constipação. A infusão da casca interna é administrada oralmente como enema para várias complicações estomacais.

**Constituintes químicos:** triterpenóides, ácido málico e seus glicósidos, xilósido e arabinose, foram isolados das folhas. A combinação de triterpenóides pentacíclicos e cicloartano foram isoladas dos frutos. [26]



#### 4.2.7 *Elephantorrhiza elephantina* (Xivurai)

##### Família Fabaceae

**Descrição taxonómica:** Arbusto às vezes com menos de 30 cm, ou árvore pequena acima de 6 m de altura; ocorre em declives de regiões rochosas. [39]

É usada na Medicina Tradicional no tratamento de Tuberculose, Malária e Amebíase.

**Usos:** é remédio tradicional para uma vasta gama de doenças, incluindo diarreia e disenteria, desordens estomacais, hemorróides e úlceras; é também usada como emética. É popular no tratamento de doenças da pele e acne.

**Constituintes químicos:** A cor vermelha brilhante dos rizomas indica a presença de taninos ou outros compostos fenólicos. O género *Entada* contém ácidos antagénicos, triterpenóides pentacíclicos e é possível que estes ou terpenóides e suas saponinas estejam presentes no género *Elephantorrhiza*. [41]

#### 4.2.8 *Garcinia livingstonei* (Himbe)

##### Família Clusiaceae

**Descrição taxonómica:** Árvore pequena ou média com 2 a 10 m de altura; tem um hábito distintivo que é de se tornar duro com ramos rígidos que nascem de ângulos agudos; ocorre em regiões de baixa altitude, em franjas ribeiras, em matas fechadas bem como pode ser encontrado crescendo por debaixo do abrigo de grandes árvores. [39]

É usada na Medicina Tradicional para tratamento de Amebíase e Tuberculose.

**Usos medicinal zulu:** as raízes em pó são usadas como afrodisíaco e os ramos são tradicionalmente colocados nos túmulos.

**Outros usos medicinais:** decocção de raízes é tomada para dores abdominais durante a gravidez na Somália e Este de África. Os frutos e os ramos são usados para tosse, febre e doenças parasitárias em África. [26]

Extractos de folhas e flores foram testados e mostraram propriedades antibióticas. [39]

**Constituintes químicos:** Cinco xantonas prenilatadas foram isoladas da casca da raiz. Dois destes compostos são contra o agente fúngico *Cladosporium cucumerinum* e a terceira mostra acção inibitória contra a linha de células do carcinoma do colo humano. [26]

#### **4.2.9 *Hypoxis hemerocallidea* (Xirangabwana)**

##### **Familia Hypoxidaceae**

**Descrição taxonómica:** As espécies de *Hypoxis*, são tubérculos pereniais com folhas longas em forma de coreia chapada e flores amareladas em forma de estrela chapada. As espécies podem ser distinguidas pelo tamanho, configuração e orientação das folhas, bem como o tamanho e configuração das flores. [55]

É usada na Medicina Tradicional para tratamento de Amebíase.

**Usos:** a infusão dos bolbos é usada como emética para tratar doenças, desordens vesiculares e demência (loucura). Decocções são dadas a crianças fracas como tónico e o suco é reportado como aplicado para queimaduras. Os estames e as folhas são misturadas com outros ingredientes para tratar problemas da próstata. Usos tradicionais são também incluídos no tratamento de tumores testiculares, hipertrofia prostática e infecções urinárias.

**Constituintes químicos:** A actividade da droga contra adenoma da próstata, é subscrita a glicósidos fitoesterol -  $\beta$ -sitoesterol. É interessante notar que o óleo da abóbora que contém alto nível de fitoesterol, é comercializado na Europa para tratar hipertrofia benigna da próstata. A actividade anti-câncer, anti-HIV e antiinflamatória, é descrita para rooperol (o aglicone de hypoxosido, que é o 4, 4'- diglicósido) e os compostos mostraram resultados promissores em análises clínicas. [55]

#### **4.2.10 *Sclerocarya birrea* (Nkanhu)**

##### **Familia Anacardiaceae**

**Descrição taxonómica:** Árvore de tamanho médio, acima de 10 m de altura, podendo atingir os 15 m se as condições forem favoráveis; ocorre em regiões de baixa à média altitude, em matas abertas ou bosques. [39]

É usada na Medicina Tradicional para tratamento de Tuberculose Amebíase e Malária.

**Usos:** a casca é usada no tratamento da diarreia, disenteria e problemas do estômago. É acreditado seu valor no combate à febre e no tratamento da malária. É também usada como tônico geral. Mastigar folhas jovens e engolir o suco, ajuda em casos de problemas de indigestão. Em algumas partes de África, é usada no tratamento de diabetes. [54]

**Constituintes químicos:** A casca contém procianidinas e a planta é tida como tendo galotaninas, flavonóides e catequinas, mas são poucos os detalhes disponíveis. As procianidinas não foram encontradas no género *Sclerocarya* mas é incluído meramente na lista daqueles que possuem procianidinas típicas. [56]

#### 4.2.11 *Senna petersiana* (Nembe-Nembe)

##### **Familia Fabaceae**

**Descrição Taxonómica:** Arbusto ou pequena árvore de tamanho médio com cerca de 12 m de altura, ocorre frequentemente ao longo de ribeiras e nos extremos de franjas ribeirinhas.

**Usos medicinais:** Muitas partes da árvore são usadas na medicina africana como purgativo para tratar febres, gonorreia e infecção da pele. [39]

Decocção de folhas e frutos são usadas como antihelmíntico pelos Swazis. As folhas são usadas como purgativo, para dores de cabeça e malária em várias partes de África Austral e Tropical. A infusão de raízes é usada para dores de estômago. Em Madagáscar, as raízes, folhas e caules são usados para problemas diuréticos e para malária.

As propriedades medicinais da planta incluem cicatrizante, abortifaciente, diurética, laxativo e tônico. Fraca actividade contra malária foi observada.

**Constituintes químicos:** apigeninas, fisciona, emodol e xantona cassiolina, foram isolados da planta. Várias antraquinonas foram isoladas das raízes, folhas e sementes. Compostos encontrados nas folhas, incluem glucósidos, flavonóides e pigmentos de atraquinona, biantraquinona e emodina. [26]

#### 4.2.12 *Spirostachys africana* (Mubhandwa)

##### Familia Euphorbiaceae

**Descrição taxonómica:** Árvore de tamanho médio com topo circular, usualmente com cerca de 10 m de altura podendo ocasionalmente atingir os 15 m; ocorre em matas de

Fruto: cápsula trilobada, ocasionalmente bilobada, com cerca de 10 mm de diâmetro; castanho amarelado que se abre quando maduro. Seu látex abundante é muito venenoso e causa irritação extrema para peles sensíveis e dor severa ou mesmo danificação da vista. [39]

É usada na Medicina Tradicional para tratamento de Amebíase.

**Usos:** A gota da seiva fresca, é aplicada para a cura de dores fortes de dentes; causa breve paragem da dor que depois pode vir a sentir-se. O citotóxico éster forbol, presumivelmente destrói os nervos expostos nos dentes mal posicionados. Pedacos do tronco são colocados nos guarda-roupas como repelentes de insectos. Em Namíbia e Zimbabwe, é usado como droga para peixes. Por outro lado, infusão simples da casca e da raiz é usado como purgativo; todas partes da planta é tóxicas e casos fatais ocorrem pelo seu uso; a seiva é extremamente irritante para a pele. [53]

**Composição química:** a seiva do tronco contém uma mistura complexa de diterpenos como a estaquenona, estaquenol e outros compostos como metabólitos ácidos e difenóis. Ainda não está clara quais destes compostos é principalmente responsável pela toxicidade da planta. [55]

#### 4.2.13 *Strychnos decussata* (Xinkwakwani)

##### Familia Loganiaceae

**Descrição Taxonómica:** Pequena árvore delgado com cerca de 3 a 12 m de altura muitas vezes com ramos densamente folhadas e inclinados, o cone em bosques de baixa altitudes ao longo de curso de água rochosos, bem como uma montanha de térmites em matas a beira da costa.

É usada na Medicina Tradicional no tratamento de Amebíase e Tuberculose.

**Uso:** A casca e os frutos são venenosos especialmente quando verdes, mas a casca da raiz raspada e triturada, é favorável como rapé e a infusão preparada a partir dela fornece remédio contra desordens estomacais. [39]

**Composição química:** As espécies de *Strychnos* são famosas por apresentarem a striquinina

e outros alcalóides. *S. Henningsii* contem numerosos alcalóides estruturalmente relatados à striquinina. O exemplo é a henningsiina. [54]

#### 4.2.14 *Strychnos henningsii* (Manono)

##### Familia Strychnaceae

**Descrição taxonómica:** A planta varia em tamanho desde arbusto grande a árvore alta com mais de 15 m de altura.

É usada na Medicina Tradicional no tratamento de Tuberculose.

**Usos:** a casca é usada para o tratamento de náuseas e queixas estomacais e foi tomada como tónica de mordidas. É tida como remédio cólico e purgativo e possivelmente com valor na febre reumática e dismenorreia. Os frutos verdes e a casca da raiz das espécies de *Strychnos* são usados como remédio contra mordeduras de cobras por toda região Austral de África.

**Composição química:** striquinina e outros alcalóides. *A. S. henningsii*, produz numerosos alcalóides estruturalmente relatados à strychnina. O exemplo é a henningsiina. [56]

#### 4.2.15 *Tabernaemontana elegans* (Nkahlu)

##### Familia Apocynaceae

**Descrição taxonómica:** Arbusto ou pequena árvore efémera ou semi-efémera, com um único tronco vertical; ocorre em bosques e florestas costais, muitas vezes ao longo de regiões ribeiras ou lugares rochosos. A casca é grossa e semelhante à cortiça; fissurada longitudinalmente. Seiva ou látex branca. [54]

É usada na Medicina Tradicional no tratamento de Amebíase e Tuberculose.

**Uso medicinal zulu:** as raízes são usadas para complicações do peito.

**Outros usos:** o látex é usado como estíptico e as raízes são usadas para complicações pulmonares pelos Tsongas.

**Propriedades biológicas:** todos os extractos da planta são fortemente activos contra bactérias gram-positivas e moderadamente activas contra gram-negativas, mas mostraram pequena actividade antiespumante e antifungal. [26]

#### **4.2.16 *Terminalia sericea* (Conola)**

##### **Familia Combretaceae**

**Descrição taxonómica:** É uma árvore pequena ou de tamanho médio e bem moldada, usualmente com 4 a 6 m de altura, mas ocasionalmente atinge os 10 m; ocorre em matas abertas, frequentemente em solos arenosos e muitas vezes nas margens das valas.

É bastante usada na Medicina Tradicional no tratamento de Amebíase.

**Usos medicinal:** O chá feito à base de raízes é usado tradicionalmente para tratar desordens do estômago e diarreia. O Chá feito por infusão é usado como loção para a vista e para tratar pneumonia. A casca é tomada para tratar pneumonia e lesões. [39]

**Composição química:** Vasta gama de triterpenóides pentacíclicos, foram isolados de espécies de *Terminalia*, dos quais o ácido sérico e o éster conhecido por sericoside, são os compostos comuns nas raízes e também taninos. Os frutos de *Terminalia chebula* por exemplo, dão um recurso comercial de taninos. [56]

#### **4.2.17 *Tiliacora funifera* (Xiwizila)**

##### **Familia Menispermaceae**

Não foi encontrado nenhum dado na literatura.

É usada na Medicina Tradicional no tratamento de Amebíase e Tuberculose.

#### **4.2.18 *Vernonia colorata* (Nhatelo)**

##### **Familia Asteraceae**

**Descrição taxonómica:** Arbusto muito ramificado ou árvore com ramos quebradiços; ocorre em bosques, muitas vezes nas zonas ribeirinhas. [54]

É usada na Medicina Tradicional no tratamento de Amebíase e Tuberculose.

**Uso medicinal zulu:** As raízes são usadas como tónico para curar furúnculos.

**Outros usos:** A raiz, a casca do caule e as folhas são usadas medicinalmente. Decocções das folhas são usadas para febre e como expectorante e laxativos no Oeste de África. A casca das raízes e caules é usada para febre e diarreia, as raízes sem casca são tomadas como tónicos. Partes não especificadas, são usadas como tónicos e estimulantes em Angola. As folhas de *Vernonia colorata*, são reportadas como sendo tomadas em decocções ou mastigadas para tosse no Botswana, enquanto a infusão de raízes é tomada para doenças venéreas, especialmente nos casos com descarga de pus.

Os extractos das folhas são reportados como tendo actividade antiamebíica, antihelmíntica e parassimpatolítica mas não antiinflamatória. [26]

**Constituintes Químicos:** A vernonina foi isolada das raízes. O glicósido cardíaco foi isolado dos caules, folhas e raízes da planta na Nigéria. Duas lactonas sesquiterpénicas com acção citotóxica *in vitro* foram também isoladas.

Outros compostos encontrados nas folhas, incluem os aminoácidos alanina, fenilalanina, glicina, leucina, prolina, serina, treonina, tirosina, valina e vernolina. Compostos com propriedades antiinflamatória encontrados nas flores e na casca incluem vernolida e, lactonas sesquiterpénicas e glicósidos. [26]

#### 4.2.19 *Ximenia americana* (Nthunduluka)

##### Família Olacaceae

**Descrição taxonómica:** Arbusto muito ramificado ou pequena árvore com aparência azul-esverdeada; Sexos separados em diferentes plantas; Pode ocorrer a hemi-parasitose nas raízes dos arbustos muitas vezes em áreas quentes e de baixa altitude. As ramificações são espinescentes.

**Uso medicinal zulu:** os zulus usam a casca na medicina tradicional.

**Usos:** O fruto é comestível com sabor azedo amargo. As sementes produzem óleo usado como amaciador da pele e para propósitos cosméticos. A casca é usada medicinalmente. [54]

O óleo das sementes é usado tradicionalmente para amaciar o cabedal e para propósitos cosméticos no Transvaal.

No Zimbabwe, as raízes ou decocção de frutos esmagados são administrados para partos de vacas com diarreia sangrenta. A casca de frutos esmagados, é usada para feridas e para repelir pulgas nos animais domésticos, em partes não especificadas de África, e as raízes são usadas para febre e diarreia na Tanzânia. As raízes são usadas para combater a febre e doenças venéreas no Oeste de África e como ingrediente no remédio de insónia na Nigéria.

A casca é usada com raízes para úlceras e a decocção de rebentos, é usada para lavar a boca em problemas de dentes e como loção para a vista enquanto o óleo é colocado no buraco do dente antes da extracção. As raízes são reportadas como usadas para esquistosomíase e também para dores internas e externas no Botswana. [26]

Partes não especificadas são reportadas como usadas para esquistosomíase na Guiné-Bissau, como anti-helmíntico no Este de África, para dores de dentes, conjuntivite e reumatismo no Senegal, para sangue nas fezes e menoragia em "Venda" e como astringente e purgativo na Argentina. As raízes pulverizadas são usadas no sabão para sarna em Angola, onde as folhas são reportadas como usadas para cistalgia em "Hens" e partes não específicas em pequenas pústulas, escorbuto, cáries dentárias, ouvidos, nariz, complicações na garganta e anemia. Efeitos moluscicidas significantes foram reportados de extractos. Extractos de folhas foram mostrados como sendo fracamente activos. Os extractos possuem actividade hipotensiva e antiviral mas testes antibacterianos foram negativos. [26]

**Constituintes químicos:** as folhas e frutos são reportados como tendo ácido hidrocianico. A casca do Sudão contém 16.9% de taninos. As sementes contêm 63.9% de óleo fixado. [26]

#### **4.2.20 *Zanthoxylum capense* (Manungwani)**

##### **Familia Rutaceae**

**Descrição taxonómica:** Usualmente, é uma pequena árvore muito ramificada com cerca de 4 a 7 m de altura, podendo ocasionalmente atingir os 10 m; ocorre em variados habitats desde matas secas ou bosques, bem como lugares rochosos de alta altitude, mesmo em estreito do mar. O fruto é acrídico com sabor forte de limão, deixando uma sensação de queimadura na boca. [39]

É usada na Medicina Tradicional no tratamento de Amebíase e Tuberculose.

**Usos:** o fruto é usado para aliviar cólicas, especialmente flatulências e para tratar paralisia.

Desordens gástricas e intestinais bem como parasitoses intestinais são tratadas com infusão das



folhas. A casca que deve ser tomada como tónica ou mastigada para aliviar dores de dentes, é também usada comumente como remédio contra mordidas de cobras, quer seja tomada oralmente bem como aplicada localmente na ferida. A decocção e a infusão de folhas, é efectiva contra constipação e foi usado como tratamento popular durante a epidemia da influenza em 1918. O tronco é de baixo valor. [39]

**Constituintes químicos:** Não há estudo detalhado da *Zanthoxylum capense* e a planta é conhecida pobremente em termos químicos. De qualquer modo, grande número de espécies de *Zanthoxylum* fora estudado e contém Sanguinarina, um alcalóide benzofenatridínico, e outros alcalóides. [55]

#### 4.2.21 *Ziziphus mucronata* (Mphafa)

##### Familia Rhamnaceae

**Descrição taxonómica:** árvore pequena de tamanho médio, acima de 9 m de altura, ocasionalmente muito alta, ocorre em vasta gama de habitats, em matas abertas e/ou em solos aluviais, ao longo de ribeirinhas, e frequentemente em montanhas de térmites; é tida como indicadora de presença de água subterrânea. A polpa é um pouco seca e comestível (Março a Abril). [39]

**Uso medicinal:** Tem numerosos usos mágicos medicinais. Usa-se como remédio para dores. Inchaços e outras infecções da pele são tratadas com a pasta de folhas e esta, juntamente com uma decocção das raízes é um tratamento aceite para tumores e tuberculares entre alguns africanos. Sofredores de disenteria e lumbago mastigam as raízes ou tomam infusões feitas a partir de raízes, enquanto que os Zulus usam folhas trituradas e casca para acalmar problemas de tórax e tomam a infusão feita a partir da casca, para curar a tosse. [39]

**Constituintes químicos:** uma vasta gama de alcalóides, muitas vezes rejeitadas como alcalóides peptídicos é conhecida de espécies de *Ziziphus*. Cerca de 12 alcalóides com a estrutura relatada, desta classe, foram isolados das raízes, casca dos ramos e das folhas de *Ziziphus mucronata*; a mucronina D é exemplo típico. [56]

Tabela 4.2. Planta e grupos de compostos químicos presente

Nome Científico	Classe química de princípio activo					Referência bibliográfica
	Alc.	Terp.	Est	C.Fen	Outros compostos	
<i>Zanthoxylum capense</i>	+	-	+	-	-	1, 4,26,54
<i>Vernónia colorata</i>	-	+	+	-	Aminoácidos	26,45

<i>Tabernaemontana elegans</i>	+	-	-	-	-	31, 50
<i>Hypox hemerocallidea</i>	-	-	+	+	Hypoxyside	20,25,26,56
<i>Terminalia sericea</i>	-	+	-	+	Stilbenóides	5,13, 26, 41,56
<i>Ximenia americana</i>	+	-	+	+	Antraquinonas, HCN	20,38
<i>Bridélia cathartica</i>	-	+	-	+	-	8,27
<i>Acridocarpus natalitius</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Strychnos henningsii</i>	+	-	-	-	-	17,54
<i>Tiliacora funifera</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Elephantorrhiza</i>	-	+	-	+	-	26, 52
<i>Annona senegalensis</i>	+	+	+	+	Cetonas e ácidos gordos	36,52
<i>Sclerocarya birrea</i>	+	+	+	+	Vitaminas C, E, P, ácidos gordos, metais	22,26, 56,23
<i>Artabotrys brachypetalus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Garcinia livingstonei</i>	-	-	-	-	-	6,47
<i>Sprostachys africana</i>	-	-	-	-	Exoecarin	24,27
<i>Cassia abbreviata</i>	-	-	-	-	-	11
<i>Senna petersiana</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Ziziphus mucronata</i>	+	-	-	+	Sesamina	1, 26, 54, 56
<i>Strychnos decussata</i>	+	-	-	-	-	24, 26
<i>Combretum molle</i>	-	+	-	+	Stilbenos, fenantreno, combretas, taninas	20

Na tabela Alc = Alcalóides, Terp = Terpenóides, Est = esteróides e C.Fen = Compostos Fenólicos

## 5 PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1 Materiais e Métodos

#### Considerações Iniciais

Neste capítulo são apresentados os equipamentos e as metodologias utilizadas para a realização dos ensaios experimentais neste trabalho de licenciatura.

As análises foram realizadas no Laboratório de Química de Produtos Naturais, Faculdade de Ciências, Departamento de Química da Universidade Eduardo Mondlane. As amostras das plantas foram colhidas nas províncias de Gaza e Maputo e identificadas segundo a nomenclatura científica e vernacular (tabela 5.1), no Departamento de Ciências Biológicas, da Universidade Eduardo Mondlane, pelo estudante finalista Cremildo Maueia, supervisionado por dr<sup>a</sup> Filomena Barbosa, docente e chefe da Secção de Botânica. Mais detalhes podem ser encontrado no trabalho final do curso do estudante citado.

Tabela 5.1. Nomes científicos, famílias a que pertencem e parte das plantas analisadas.

Nome Científico	Nome Vernacular	Família	Parte da amostra analisada
<i>Zanthoxylum capense</i>	Manungwani	<i>Rutaceae</i>	Raízes
<i>Vernónia colorata</i>	Nhathelo	<i>Asteraceae</i>	Raízes
<i>Tabernaemontana elegans</i>	Nkahlu	<i>Apocynaceae</i>	Raízes
<i>Hypox hemerocallidea</i>	Xirangabwana	<i>Hypoxidaceae</i>	Tubérculos
<i>Terminalia sericea</i>	Conola	<i>Combretaceae</i>	Raízes
<i>Ximenia americana</i>	Nthunduluka	<i>Olacaceae</i>	Raízes
<i>Bridélia cathartica</i>	Munwangali	<i>Euphorbiaceae</i>	Raízes
<i>Acridocarpus natalitius</i>	Mabhophe	<i>Malpighiaceae</i>	Raízes
<i>Strychnos henningsii</i>	Manono	<i>Loganiaceae</i>	Raízes
<i>Tiliacora funifera</i>	Xiwezila	<i>Menispermaceae</i>	Raízes
<i>Elephantorrhiza elephantina</i>	Xivurai	<i>Fabaceae</i>	Raízes
<i>Annona senegalensis</i>	Rhompifa	<i>Annonaceae</i>	Raízes
<i>Sclerocarya birrea</i>	Nkanhu	<i>Anarcardiaceae</i>	Raízes
<i>Artabotrys brachypetalus</i>	Ntita	<i>Annonaceae</i>	Raízes
<i>Garcinia livingstonei</i>	Himbe	<i>Clusiaceae</i>	Raízes
<i>Sprostachys africana</i>	Mubhandwa	<i>Euphorbiaceae</i>	Troncos
<i>Cassia abbreviata</i>	Numanhama	<i>Caesalpinioideae</i>	Raízes
<i>Senna petersiana</i>	Nembe-Nembe	<i>Caesalpinioideae</i>	Raízes
<i>Ziziphus mucronata</i>	Mphafa	<i>Rhamnaceae</i>	Raízes
<i>Strychnos decussata</i>	Xinkwakwani	<i>Loganiaceae</i>	Raízes
<i>Combretum molle</i>	Xikukutse	<i>Combretaceae</i>	Raízes

## 5.2 Tratamento das Amostras

### 5.2.1 Secagem e moagem das amostras

As amostras (raízes e caules) foram fragmentadas em pequenos pedaços, deixadas a secar primeiro a temperatura ambiente e posteriormente na estufa a 50 °C, e depois pesada até se obter uma massa constante (para garantir a ausência da humidade que pode influenciar na moagem). A moagem do material vegetal foi feita no IIAM (Instituto Investigação Agrária de Moçambique) com moinho de marca RetschMühle (fig. 1 anexo III). Depois de moídas as amostras, uma parte foi submetida a extracção e a parte restante (foi tarada) conservou-se em garrafas esmeriladas previamente bem lavadas e submetidas a secagem na estufa a temperatura de 100 °C. Para o procedimento de extracção mediu-se a massa, de acordo com o tamanho do cartucho e do Soxhlet para cada experiência.

### 5.2.2 Extracção

Método de extracção sólido – líquido usado para a realização deste trabalho, foi a extracção por Soxhlet, como pode ser visto na fig. 2 do anexo III. O solvente usado foi o EtOH (polar) a 95%, e a quantidade da amostra usada dependia da capacidade do cartucho e do volume do Soxhlet, durando a extracção 24 h ou até a descoloração da solução no Soxhlet. [10]

#### Aparelho de Soxhlet – Funcionamento

O vapor de solvente de extracção geralmente por refluxo de vapor extraído, contido no balão de destilação passa através de tubo vertical colocado no condensador. O líquido condensa e goteja no sólido (no cartucho poroso contendo a amostra), onde a solução de extracto passa através dos poros do cartucho (tubo poroso) que eventualmente enche o centro de Soxhlet. O tubo de Simpson também enche com o extracto da solução e quando o líquido atinge o topo do tubo, a acção de sifão começa e o extracto é devolvido ao balão de destilação. O ciclo é automático e repete-se por várias vezes, e desta maneira os princípios activos são concentrados no balão. A amostra em pó foi pesada e colocada no cartucho (tubo poroso) e este introduzido no Soxhlet.

**Vantagem** – a extracção por Soxhlet é uma técnica que requer menos quantidade de solvente e por outro lado é um processo contínuo que pode ser interrompido.

**Desvantagem** – é muito lento, maior tempo de análise que implica grande perda de água e maior consumo de corrente eléctrica. A substância a ser extraída é aquecida durante muito tempo, correndo o risco de sofrer transformações como oxidação, hidrólise, entre outros. [2]

### 5.2.3 Concentração

Extracto etanólico (com princípios activos) obtido, foi concentrado no rota-vapor da marca Büchi R-210/215 (vide fig. 3 anexo III) acoplado com bomba de vácuo, e a temperatura de banho – Maria de 95 °C e rotação do balão a 100, e depois submetidos a procedimentos químicos de isolamento de Berberina e alcalóides com nitrogénio quaternário. Os dados relativos ao processo de extracção e concentração dos extractos estão apresentados na tabela.

Tabela 5.2. Nome científico com dados da extracção e concentração do extracto bruto.

Nome científico	Massa da amostra (g)	Volume do EtOH (mL)	Volume do extracto EtOH (mL)	
			Não concentrado	Concentrado
<i>Zanthoxylum capense</i>	150.820	200	150	25.0
<i>Vernónia colorata</i>	60.000	280	160	30.0
<i>Tabernaemontana elegans</i>	56.000	260	120	15.0
<i>Hypox hemerocallidea</i>	70.000	130	125	20.0
<i>Terminalia sericea</i>	27.591	150	128	18.0
<i>Ximenia americana</i>	58.387	200	150	25.0
<i>Bridélia cathartica</i>	66.891	250	200	20.0
<i>Acridocarpus natalitius</i>	27.157	150	140	15.0
<i>Strychnos henningsii</i>	32.697	160	80	9.0
<i>Tiliacora funifera</i>	78.780	220	130	14.0
<i>Elephantorrryza</i>	82.401	170	100	25.5
<i>Annona senegalensis</i>	25.103	170	104	4.0
<i>Sclerocarya birrea</i>	37.378	120	60	20.0
<i>Artabotrys brachypetalus</i>	27.786	100	34	13.0
<i>Garcinia livingstonei</i>	35.200	250	102	28.0
<i>Sprostachys africana</i>	41.715	220	135	18.0
<i>Cassia abbreviata</i>	22.534	90	50	5.0
<i>Senna petersiana</i>	39.741	152	149	21.0
<i>Ziziphus mucronata</i>	39.019	240	215	15.2
<i>Strychnos decussata</i>	33.541	120	80	9.0
<i>Combretum molle</i>	14.833	80	50	5.5

### 5.3 Métodos Cromatográficos

A cromatografia é um processo usado para separar e identificar os componentes de uma mistura e baseia-se nas diferentes velocidades de arrastamento dos solutos por um determinado solvente, num meio específico (Fase Estacionária). Neste trabalho duas técnicas cromatográficas foram usadas, nomeadamente, Cromatografia em camada fina (TLC) e Cromatografia Líquida a Média Pressão (MPLC).

#### 5.3.1 Cromatografia em camada fina TLC [2]

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

Como fase estacionária foi usada a sílica gel num suporte de vidro e/ou plástico, e fase móvel uma mistura de solventes.

**Vantagens** – uso de pequenas quantidades de solvente, É uma técnica de baixo custo e com reprodutibilidade dos resultados, aplica-se a quase todas classes de compostos.

**Desvantagens** – dificuldade de pulverização uniforme da amostra contida na camada adsorvente nas placas de suporte, a quantificação implica um enorme custo financeiro.

#### 5.3.2 Aplicação da amostra

As amostras foram aplicadas sem perfurar a camada adsorvente da placa de TLC, usando-se capilares de vidro na linha de start à 10 mm da extremidade inferior, mantendo uma separação mínima de 5 mm entre os pontos de aplicação.

### 5.3.3 Desenvolvimento das placas e cálculo de valores $R_f$

A eluição realizou-se no sentido ascendente em tintas de tamanho adequado, previamente saturadas durante cerca de 30 min, com sistema de solvente recomendado.

O  $R_f$  foi calculado pela fórmula  $R_f = \frac{x}{a}$ ; onde  $x$  é a distância do componente em relação a origem e  $a$  é distância (8 cm) da frente de solvente em relação a origem.

### 5.3.4 Condições cromatográficas

Para a cromatografia em camada fina TLC foram utilizadas placas comerciais de vidro (de espessura 0.25 mm) e de plástico (de espessura 0.2 mm) com camada adsorvente sílica gel 60 F<sub>254</sub>, onde para as fracções obtidas por MPLC foram usadas placas de vidro (20 cm x 20 cm), que foram cortadas ao meio e para as fracções obtidas por procedimento de isolamento da Berberina foram usadas placas de vidro e plástico (10 cm x 5 cm).

### 5.3.5 Sistema de detecção [51]

Para a detecção das manchas dos compostos em análise, duas técnicas foram usadas, de característica física e química descritas abaixo.

**Lâmpadas UV-Vis:** as manchas foram visualizadas no aparelho Camag (veja-se fig. 6, anexo III) a comprimento de onda de 366 nm e verificou-se fluorescência de diferentes cores, azul, azul verde, violeta fluorescente à fluorescência amarela de diversas tonalidades. Esta fluorescência está relacionada com a existência de ligações duplas conjugadas (cromóforos) na molécula dos compostos.

**Revelação:** para a revelação das placas desenvolvidas usou-se DRG (específico para determinação dos alcalóides com nitrogénio quaternário), aplicando-se este com um frasco de *spray* em toda a placa e activando-se por aquecimento sobre uma placa eléctrica a uma temperatura de 100 °C, até a secagem completa. As cores das manchas dos alcalóides são resultantes da formação de complexos de fórmula  $(R_4N^+)[BiI_4]$ , corados a luz visível com o DRG, que podem variar de castanho à castanho laranja, dependendo da concentração destes compostos (alcalóides). [18]

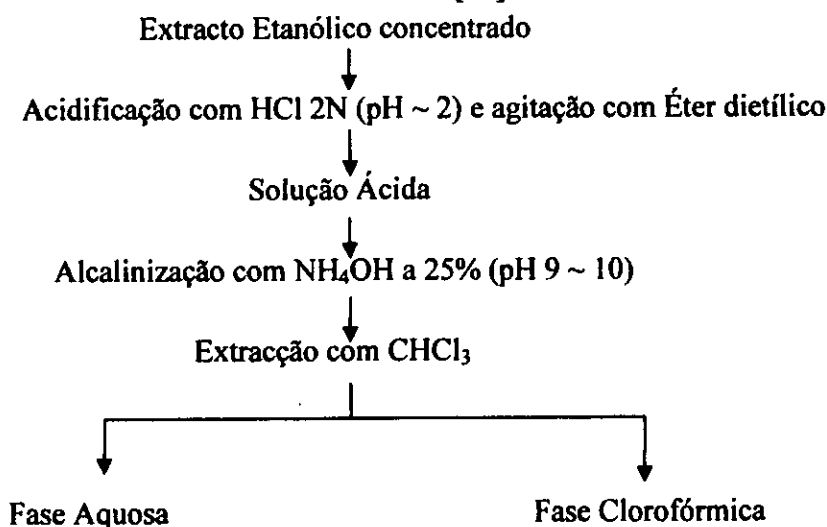
### 5.3.6 Cromatografia Líquida de Média Pressão MPLC [2]

É uma técnica usada para a separação de misturas, onde a adsorção ocorre no interior de uma coluna contendo o adsorvente empacotado e uma mistura a separar. Os componentes da mistura são separados de acordo com o grau de polaridade.

## 5.4 Tratamento químico das amostras

Para alcançar os objectivos propostos neste trabalho, foram realizados alguns ensaios preliminares, estudos (análises) de diferentes procedimentos químicos de isolamento e identificação de Berberina e seus análogos, usando a amostra de *Zanthoxylum capense*, como se pode ver nos fluxogramas 1 e 2, do anexo II. Deste conjunto de experiências, um método foi adoptado devido a sua simplicidade, e por outro lado facilidade de se poder analisar o número grande das amostras, como se descreve a seguir.

### 5.4.1 Procedimento de isolamento de Berberina [14]

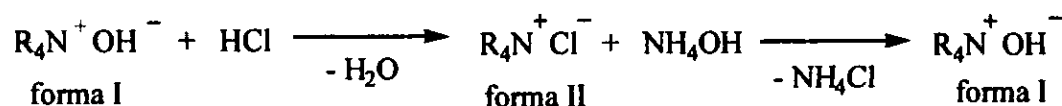


Este método é baseado na propriedade de Berberina e seus análogos (alcalóides com nitrogénio quaternário) terem um comportamento distinto em diferentes condições de pH, como se pode ver na equação de reacção abaixo. Com acidificação da solução, Berberina passa para forma de sal (forma



II) que é solúvel em H<sub>2</sub>O, e agitação com Éter dietílico vai solubilizar os outros compostos (não solúveis em H<sub>2</sub>O).

Tornando a solução fortemente alcalina (pH 9 ~ 10), a forma de sal é convertida em forma de base livre (forma I), que é solúvel em CHCl<sub>3</sub> (fase orgânica).



## 5.5 Tratamento químico dos extractos etanólicos concentrados das amostras

### 5.5.1 *Zanthoxylum capense*

15 mL de extracto etanólico concentrado teve o seguinte procedimento:

- Foi acidificado com 6 mL de HCl 2N e houve aparecimento de turvação da solução que;
- Com adição de 15 mL de Éter dietílico e agitação enérgica, a turvação desapareceu e a solução ficou de cor castanho claro;
- Alcalinizou-se com 2 mL de NH<sub>4</sub>OH a 25 %, e a solução ficou de cor castanha escuro que;
- Foi agitado energeticamente com 20 mL de CHCl<sub>3</sub> e deixado em repouso houve separação de duas camadas, clorofórmica e aquosa, que posteriormente foram separadas e usadas para a análise por TLC.

### 5.5.2 *Vernonia colorata*

5 mL de extracto etanólico concentrado teve o seguinte procedimento:

- Foi acidificado com 3 mL de HCl 2N formou-se uma turvação que desapareceu com agitação;
- Adicionou-se 10 ml de Éter dietílico e agitou-se a solução ficou de cor castanha escuro e;

- Foi alcalinizada com 20 gotas de  $\text{NH}_4\text{OH}$  e houve separação de duas camadas, castanha-escura em baixo e castanho claro em cima;
- Com adição de 10 mL de  $\text{CHCl}_3$  e agitação permanecem as duas camadas, clorofórmica e aquosa que foram separadas e usadas para análise por TLC.

### 5.5.3 *Tabernaemontana elegans*

10 mL de extracto etanólico concentrado teve o seguinte procedimento:

- Acidificação com 5 mL de  $\text{HCl}$  2N e observou-se uma turvação que desapareceu com a agitação;
- Adicionou-se 5 mL de Éter dietílico e não se observou mudança da solução;
- Alcalinizou-se a solução com 2 mL  $\text{NH}_4\text{OH}$  e a solução ficou escura;
- Com a adição de 15 mL de  $\text{CHCl}_3$  e agitação não se observou separação de camadas, para se conseguir separar as camadas adicionou-se 5 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ , e recolheu-se a fracção, clorofórmica e aquosa que foram usadas para TLC.

### 5.5.4 *Hypox hemerocallidea*

10 mL de extracto etanólico concentrado (escuro) teve o seguinte procedimento:

- Acidificou-se com 4 mL de  $\text{HCl}$  2N e não se observou;
- Agitação com 15 mL de Éter dietílico não se observou nenhuma mudança visível;
- Alcalinizou-se a solução com 5 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  e a solução permaneceu se alteração;
- Por fim adicionou-se 10 mL de  $\text{CHCl}_3$ , agitou-se mas não houve separação de fases. Adicionou-se 5 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  para facilitar a separação das camadas clorofórmica e aquosa, que foram submetidas a TLC.

### 5.5.5 *Terminalia sericea*

10 mL de extracto etanólico concentrado (castanha escuro) teve o seguinte procedimento:

- Acidificou-se com 1 mL de HCl 2N e houve formação de uma turvação que desapareceu com agitação;
- Com adição de 15 mL Éter dietílico houve formação de partículas suspensas de cor castanha;
- Alcalinizou-se a solução com 5 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  e esta ficou de cor amarelo acastanhado e;
- Por fim com adição de 30 mL de  $\text{CHCl}_3$  e agitação enérgica houve separação de duas camadas que foi deixada em repouso, e recolheu-se a fracção clorofórmica da aquosa que foram usadas para TLC.

### 5.5.6 *Ximenia americana*

15 mL de extracto etanólico concentrado teve o seguinte procedimento:

- Com acidificação de 3 mL de HCl houve formação de turvação que com agitação a solução adquiriu cor castanho avermelhada que;
- Quando agitado com 30 mL de Éter dietílico e alcalinizada com 10 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , a solução tornou-se escura;
- Com adição de 30 mL de  $\text{CHCl}_3$  formou-se 2 camadas, clorofórmicas e aquosas com precipitado de cor roxo, que posteriormente foram separadas para a análise cromatográfica por TLC e o resíduo conservado.

### 5.5.7 *Bridelia cathartica*

10 mL de extracto etanólico concentrado teve o seguinte procedimento:

- Adicionou-se 2 mL de HCl 2N e houve formação de turvação e a solução ficou castanho-escuro;
- Agitou-se com 10 mL de Éter dietílico e a solução ficou com duas camadas clara em cima e escuro em baixo;
- Com alcalinização da solução com 2 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  a solução ficou sem alteração;

- Com a adição de 15 mL de  $\text{CHCl}_3$ , e agitação a separação das camadas permaneceu e recolheu-se a camada clorofórmica da aquosa que foram usados para TLC.

#### 5.5.8 *Acridocarpus natalitius*

15 mL de extracto etanólico concentrado teve o seguinte procedimento:

- Foi acidificado com 10 mL de HCl 2N houve formação de turvação da solução;
- Agitou-se a solução com 10 mL de Éter dietílico e houve separação de duas camadas que;
- Foi alcalinizado com 2 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  e permaneceu constante a solução;
- Finalmente com adição e agitação de 20 mL de  $\text{CHCl}_3$ , a separação de camadas continuou e separou-se a camada clorofórmica da aquosa que foram usados para TLC.

#### 5.5.9 *Strychnos henningsii*

4 mL do extracto etanólico concentrado teve o seguinte procedimento:

- Com a adição de 1,5 mL de HCl 2N observou-se aparecimento de turvação de cor amarela que com agitação ficou uma solução de cor castanha que;
- Foi adicionado 4 mL de Éter dietílico e a solução dividiu-se em duas camadas, nomeadamente, escura em baixo e castanha clara em cima;
- Alcalinizou-se a solução de duas camadas com 0,10 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , e a solução adquiriu uma cor vermelha, que com agitação passou a ter duas camadas, escura em baixo e clara em cima;
- De seguida adicionou-se 10 mL de  $\text{CHCl}_3$ , agitou-se a solução resultante e deixou-se em repouso no funil de extracção, ate se observar separação de duas camadas e depois separou-se a camada aquosa (escura) da clorofórmica (castanha clara), que foram usadas para TLC.

#### 5.5.10 *Tiliacora funifera*

3 mL de extracto etanólico concentrado teve o seguinte procedimento:

- Foi acidificado com 20 gotas de HCl 2N, e observou-se aparecimento de turvação;
- Com a adição de mL de Éter dietílico e agitação formou-se uma solução de cor castanha que;
- Foi alcalinizada com 11 gotas de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , observou-se turvação da solução que desapareceu com agitação enérgica;
- Adicionou-se 20 mL de  $\text{CHCl}_3$ , agitou-se energeticamente no funil de extracção e deixou-se em repouso até aparecimento de duas camadas, para separar a fase clorofórmica (castanha claro em baixo) da aquosa (escuro em cima), que foram submetidos a TLC.

#### 5.5.11 *Elephantorrhiza elephantina*

5 mL de extracto etanólico concentrado teve o seguinte procedimento:

- Acidificou-se a solução com 1,5 mL de HCl 2N houve formação de turvação de cor branca que;
- Adicionou-se 4 mL de Éter dietílico e agitou-se, a solução ficou escura e no fundo do copo havia uma massa pastosa (resina);
- Com adição de 3,5 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  para alcalinizar a solução a cor permanece constante;
- Adicionou-se 30 mL de  $\text{CHCl}_3$  e agitou-se energeticamente, houve separação de duas camadas, que foi deixada em repouso e em seguida separou-se a camada clorofórmica (clara, em baixo) da aquosa (escura, em cima) que foram usados para TLC.

#### 5.5.12 *Annona senegalensis*

4 mL de extracto etanólico concentrado viscoso e escuro teve o seguinte procedimento:

- Adicionou-se 1 mL de HCl 2N e verificou-se turvação de solução que;

- Com agitação de 5 mL de Éter dietílico, houve separação de duas camadas, escuro em baixo e castanho claro em cima;
- Com adição de 0,6 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  para alcalinizar a solução, formou-se algumas partículas sólidas de cor castanho-escuro;
- Finalmente adicionou-se 10 mL de  $\text{CHCl}_3$ , agitou-se a solução, deixou-se em repouso e separou-se a camada clorofórmica da aquosa, para análise por TLC.

#### 5.5.13 *Sclerocarya birrea*

6 mL de solução etanólica concentrada ( cor roxa) teve o seguinte procedimento:

- Foi acidificado com 2 mL (24 gotas) de  $\text{HCl}$  2N e houve formação de turvação, que com agitação a cor da solução passa à vermelho acastanhado que;
- Adicionou-se a esta 4 mL de Éter dietílico e agitou-se energeticamente e houve separação de duas camadas, nomeadamente clara em cima e vermelho escuro em baixo;
- Depois de alcalinizada com 0,7 mL  $\text{NH}_4\text{OH}$  e agitação a cor da solução torna-se roxa;
- Com adição de 15 mL de  $\text{CHCl}_3$  e agitação enérgica a solução se separa em duas camadas, a clorofórmica e aquosa que posteriormente foi separada e usada para TLC.

#### 5.5.14 *Artabotrys brachypetalus*

7 mL de extracto etanólico concentrado (de cor castanha) teve o seguinte procedimento:

- Com a adição de 1 mL de  $\text{HCl}$  2N formou-se uma turvação da solução que desapareceu com agitação;
- Adicionou-se 2 mL de Éter dietílico e agitou-se energeticamente e a cor da solução não se alterou;
- Com a alcalinização da solução com 1 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  não se observou nenhuma alteração visível;

- Adicionou-se 10 mL de  $\text{CHCl}_3$ , agitou-se energeticamente, deixou-se em repouso e houve separação de duas camadas, clara em baixo (fase clorofórmica) e castanha em cima (fase aquosa) que foram recolhidas para a análise cromatográfica por TLC.

#### 5.5.15 *Garcinia livingstonei*

25 mL de extracto etanólico concentrado (castanha avermelhado) teve o seguinte procedimento:

- Foi acidificado com 1,6 mL de HCl 2N e apareceu uma turvação de cor amarela que;
- Com agitação de 10 mL de Éter dietílico a solução ficou de cor amarelado acastanhado
- Adicionou-se 3 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  para alcalinizar a solução e a cor da solução permaneceu constante;
- Quando se adicionou 20 mL de  $\text{CHCl}_3$  e agitou-se energeticamente, depois de repouso houve separação de duas camadas, amarela em baixo (clorofórmica) e castanha em cima (aquosa), que foram recolhidas para a análise cromatográfica por TLC.

#### 5.5.16 *Spirotachys africana*

10 mL do extracto etanólico concentrado (cor castanha) teve o seguinte procedimento:

- Acidificou-se com 5,6 mL de HCl 2N e houve turvação da solução de cor castanha amarela;
- Com a adição de 6 mL de Éter dietílico e agitação a cor da solução passa para castanho avermelhado, com formação de duas camadas, castanha escuro em baixo e clara em cima que;
- Foi alcalinizada com 2 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  e agitado, a solução fica de cor castanho-escuro e;
- Finalmente foi adicionado 20 mL de  $\text{CHCl}_3$  e agitado energeticamente, a solução permanece de cor castanha e a superfície de separação das camadas clorofórmica e aquosa pouco visível, que posteriormente foram separadas para análise por TLC.

### 5.5.17 *Cassia abbreviata*

5 mL de extracto etanólico concentrado (cor castanho avermelhado) teve o seguinte procedimento:

- Acidificou-se a solução com 1 mL de HCl a 2N houve aparecimento de turvação;
- Agitou-se a solução com 2 mL de Éter dietílico e a solução adquiriu uma cor roxa;
- Alcalinizou-se com 1 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  e a solução permaneceu com a mesma cor até que;
- Com adição de 15 mL de  $\text{CHCl}_3$  e agitação, depois repouso houve separação de duas camadas, clorofórmica (castanha claro em baixo) e aquosa (castanha escuro em cima) que foram usadas para análise por TLC.

### 5.5.18 *Senna petersiana*

20 mL do extracto etanólico concentrado teve o seguinte procedimento:

- Adicionou-se 7 mL de HCl a 2N para acidificar a solução e esta ficou turva de cor amarelado que;
- De seguida foi adicionada 10 mL de Éter dietílico e agitado a solução ficou de cor escura;
- Com alcalinização de solução com 3 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  a solução permaneceu escura;
- Com adição de 30 mL de  $\text{CHCl}_3$  e agitação energética a solução resultante foi muito densa, que não se conseguiu ver a separação de camadas. Deixou-se em repouso durante uma noite mas a separação de camadas não foi visível. Adicionou-se mais 10 mL de  $\text{CHCl}_3$  e separou-se a camada clorofórmica da aquosa, que foram usadas para TLC.

### 5.5.19 *Ziziphus mucronata*

12 mL do extracto etanólico concentrado (escuro) teve o seguinte procedimento:

- Adicionou-se 6 mL de HCl a 2N para acidificar a solução e houve turvação de solução que;
- Agitação de 6 mL de Éter dietílico a solução permanece de mesma cor castanha escuro;



- Alcalinizou-se a solução com 1,5 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  e agitou-se, a solução ficou de cor castanha amarela que em seguida;
- Foi adicionado 30 mL de  $\text{CHCl}_3$ , agitado e deixado em repouso até se observar separação de duas camadas, clorofórmica (claro em baixo) e aquosa (castanha em cima) que foram usadas para a TLC.

#### 5.5.20 *Strchnos decussata*

3 mL de extracto etanólico concentrado (castanho escuro) teve o seguinte procedimento:

- Foi acidificado com 22 gotas de  $\text{HCl}$  2N e houve uma turvação que desapareceu com agitação da solução;
- Adicionou-se 4 mL de Éter dietílico e agitou-se, a solução ficou de cor castanha avermelhada;
- Com a adição de 14 gotas de  $\text{NH}_4\text{OH}$  para alcalinizar a solução, e agitação a solução não mudou de cor;
- Por fim foi adicionado 10 mL de  $\text{CHCl}_3$  agitou-se a solução e deixou-se em repouso onde se separou a camada clorofórmica da aquosa que foi usada para a análise por TLC.

#### 5.5.21 *Combretum molle*

2 mL do extracto etanólico concentrado ( cor castanho escuro) teve o seguinte procedimento:

- Foi adicionado 1 mL de  $\text{HCl}$  2N, para acidificar a solução, e houve formação de turvação que;
- Com adição de 2 mL de Éter dietílico e agitação, a turvação desapareceu e a solução ficou de cor castanha e;
- Alcalinizando a solução com 1 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  solução ficou de cor castanho-escuro onde;
- Com adição de 15 mL de  $\text{CHCl}_3$ , seguido de agitação e repouso houve separação de duas camadas, clorofórmica (claro em baixo) e aquosa (castanha em cima), que foram recolhidas para análise por TLC.

### 5.6 Preparação do reagente de DRG (K[BiI<sub>4</sub>])

8,0 g de Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> · 5H<sub>2</sub>O dissolveu-se em 20 mL de HNO<sub>3</sub> (1,18 g/cm<sup>3</sup>) e 27,2 g de KI em 50 mL de H<sub>2</sub>O. Misturaram-se as soluções resultantes e deixou-se em repouso. Depois da cristalização de KNO<sub>3</sub> decantou-se e adicionou-se 100 mL de H<sub>2</sub>O destilada e agitou-se a solução resultante que ficou de cor castanha avermelhada.

### 5.7 Preparação da Amostra – Padrão de Berberina

0.0526 g de cristais amarelo de Cloreto de Berberina (Fluka: (C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>ClONO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O) [5956-60-5] Mr = 407,86 g/mol, pureza assay ≥ 90 % (AT), m.p 204-206 dec.), foi dissolvido em 50 mL de H<sub>2</sub>O destilada (solução amarela pH 6) e alcalinizada com 30 gotas de NH<sub>4</sub>OH a 25 % até pH 10 (solução de cor alaranjada). De seguida procedeu-se a extracção com CHCl<sub>3</sub>, separando-se a fracção aquosa (cor amarela acastanhado) da fracção clorofórmica (30 ml de solução castanha), contendo Berberina em forma de base livre, que foi usado como padrão de referência nas análises cromatográficas.

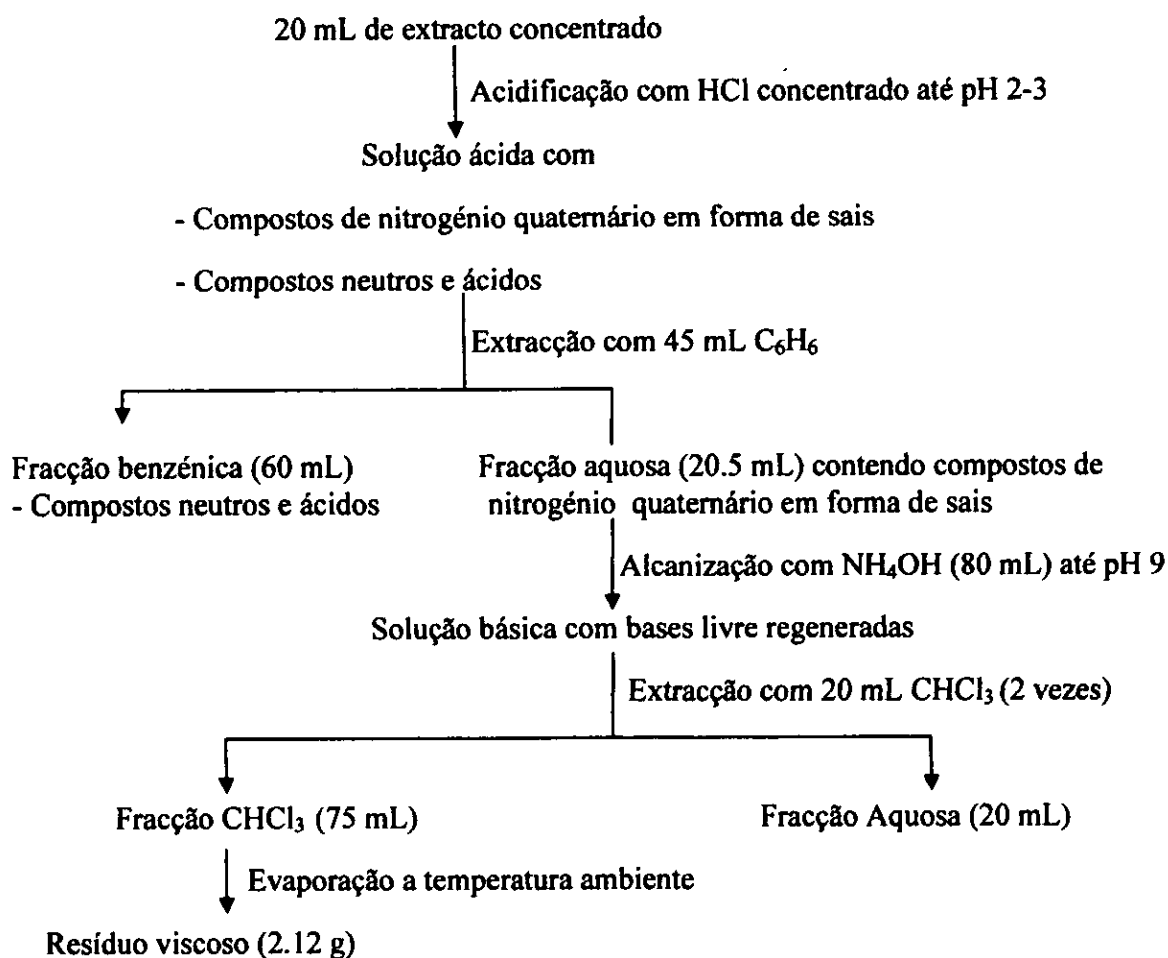
### 5.8 Cromatografia em camada fina dos extractos clorofórmicos das amostras das plantas

Os extractos clorofórmicos das amostras das plantas, submetidas ao procedimento químico de isolamento de Berberina, foram aplicados, junto com a Amostra-Padrão numa placa de Sílica gel (de dimensão 20 cm x 10 cm), com suporte de vidro. Como eluente foi usado o sistema de solvente n-BuOH-EtilAcetato-AcOH-H<sub>2</sub>O (30:50:10:10).

### 5.9 Preparação do extracto clorofórmico de *Zanthoxylum capense* para MPLC

77,000 g de material vegetal (cor amarela acastanhado) foi submetido a maceração durante 3 dias e posteriormente aplicado à extracção por Soxhlet que durou 24 h. Depois de dois a três ciclos completos de extracção observou-se coloração da solução que variou de amarelo – pálido à amarela e finalmente incolor, enquanto que no balão de destilação a solução variou de amarelo pálido à castanho – escuro. O extracto etanólico (150 mL) obtido foi concentrado na rota – vapor a

temperatura 80-90 °C até 25 mL de extracto etanólico bruto (com princípios activos). De seguida foi submetido a tratamento químico descrito no fluxograma, a seguir:



### 5.9.1 Preparação da coluna

O resíduo de massa 2,12 g foi misturado e triturado (homogeneizado) no almofariz com 5,00 g de Sílica gel, até se obter um pó de cor castanho. De seguida encheu-se a coluna (altura de sílica gel igual a 7 cm e altura da amostra 3 cm).

### 5.9.2 Eluição

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

- ✓ Fase estacionária usou-se sílica gel 60;

✓ Fase móvel (eluente) usou-se solução de  $\text{CHCl}_3$  (75 mL), seguido de mistura

$\text{CHCl}_3$  – MeOH (5,10,15 e 20%) (75 mL cada) e finalmente MeOH (75 mL), de menos apolar para mais polar, como se indica na tabela no sentido de solução de 1 à 7.

Tabela 5.3. Sistema de solventes (% v/v) usado na Cromatografia Líquida de Média Pressão

Soluções de 75 mL	% de $\text{CHCl}_3$	% de MeOH
1	100	0
2	50	5
3	20	10
4	15	15
5	10	20
6	5	50
7	0	100

### 5.9.3 Fraccionamento do extracto clorofórmico de *Zanthoxylum capense* e análise das fracções obtidas por MPLC

24 Fracções (I) foram obtidas, e submetidas a análise por TLC em placas de Sílica gel 60 F<sub>254</sub>, que da análise cromatográfica resultaram em 6 fracções (II) (1-3, 4-5, 6-9, 10-14, 15-17 e 18-24) que posteriormente foram agrupadas em 4 fracções (III) (1-3, 4-5, 6-9 e 10-24), de acordo com as mesmas características cromatográficas. O aparelho de MPLC e as fracções obtidas pelo fraccionamento podem ser vistos no anexo III fig. 4 e 5.

### 5.10 Testes de actividade biológica

Consistiu em avaliação da actividade antimicrobiana contra germe Gram-positivo *Staphylococcus aureus*, contra a estirpe *Escherichia coli*, Gram-negativo, actividade antituberculosa contra *Mycobacterium semegmatis* e actividade antifúngica contra *Cândida albicans*.

### 5.10.1 Lavagem do material

O material usado para preparar e conservar as amostras sólidas, foi cuidadosamente lavado com água destilada e secadas na estufa a temperatura de 90 – 100 °C. Depois voltou-se a lavar duas vezes com acetona e secagem na estufa a temperatura de 60 °C durante 30 minutos. Este procedimento foi feito para evitar a contaminação das amostras.

### 5.10.2 Preparação da amostra sólida

Os extractos etanólicos concentrados (bruto) das plantas em análise (1 – 2 mL) foram submetidos a evaporação do solvente no nicho a temperatura ambiente, até se obter uma massa sólida ou resinosa (oleosa). A amostra sólida obtida foi raspada com espátula, pesada (variando a massa no intervalo de 0.2 – 3.0 g) e conservada em frascos na geleira. Depois de preparadas as amostras sólidas os testes de actividade biológica foram realizados na Universidade de Lisboa. Os pormenores do teste podem ser visto no anexo V.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### Pesquisa Bibliográfica

*Acridocarpus natalitius*, *Annona senegalensis*, *Hypoxis hemerocallidea*, *Spirostachys africana* e *Terminalia sericea* são usadas por praticantes de Medicina Tradicional como remédio contra Amebíase.

*Artabbrotrys brachypetalus*, *Strychnos henningsii* são usadas por praticantes de Medicina Tradicional para tratamento de Tuberculose.

*Bridelia cathartica*, *Elephantorrhiza elephantina* e *Sclerocarya birrea* são usadas por praticantes de Medicina Tradicional contra Amebíase, Malária e Tuberculose.

*Cassia abbreviata*, *Garcinia livingstonei*, *Strychnos decussata*, *Tiliacora funifera*, *Tabernaemontana elegans*, *Vernonia colorata* e *Zanthoxylum capense* são usadas por praticantes de Medicina Tradicional no tratamento de Amebíase e Tuberculose.

*Combretum molle* é usada por praticantes de Medicina Tradicional no tratamento da Malária, Tuberculose, Desintéria Amebíase.

### Parte Experimental

Foi identificado presença de alcalóides em 14 plantas estudadas. Presença da Berberina foi confirmada no extracto de *Z. capense*.

Na tabela abaixo estão apresentados os dados bibliográficos (teóricos) de TLC dos alcalóides do grupo de Berberina.

Tabela 6.1. Alcalóides com dados teóricos de  $R_f$ , cor das manchas e sistemas de solventes.

Alcalóide	R <sub>f</sub>	Cor das Manchas	
		UV a 366 nm	DRG luz Visível
CHCl <sub>3</sub> – MeOH (3:1) [14]			
Berberina	0.46	Amarela limão	Castanho
Tolueno – EtilAcetato – DietilAmina (70:20:10) [51]			
Berberina	0.60	Amarelo limão	-----
Sanguinarina	0.94	Amarelo laranja	-----
Hydrastina	0.71 – 0.90	Branco fluorescente	-----
n- PrOH – HCOOH - H <sub>2</sub> O (90:1:9) [51]			

Hydrastina	0.03 e 0.90	Branco fluorescente	Castanho ou castanho amarelo à
Coptisina	0.15	Amarelo carregado	
Jatrorrhizina/Palmatina	0.15	Amarelo carregado	Castanho vermelho
Berberina	0.21	Amarelo limão	
Coptisina	0.15	Amarelo laranja	
Sanguinarina	0.30 – 0.40	Amarelo laranja	
n- BuOH – EtilAcetato – HCOOH - H <sub>2</sub> O (30:50:10:10) [51]			
Berbamina	0.05 – 0.10	Fluorescência azul	Castanho ou Castanha Amarelo à Vermelho
Oxyacantina	0.10	Fluorescência azul	
Palmatina	0.38	Verde fluorescente	
Columbamina	0.40	Verde amarelado	
Jatrorrhizina	0.44	Verde acastanhado	
Berberina	0.46	Amarela esverdeado	
Ciclohexano – Et <sub>2</sub> NH (90:10) [15]			
Hydrastina	0.09	Branco fluorescente	Castanha
Berberina	0.30	Amarela esverdeado	

### 6.1 Análise cromatográfica (TLC) dos extractos EtOH concentrados, clorofórmicos e aquosos obtidos pelo procedimento de isolamento de Berberina.

#### 6.1.1 *Zanthoxylum capense*

Cromatograma C.1 no extracto clorofórmico, há uma mancha pouco visível que a 366 nm tem fluorescência da Berberina e o seu  $R_f$  é igual ao  $R_f$  teórico 0,46.

Cromatograma C.4 a direita no extracto clorofórmico, há uma mancha pouco visível com  $R_f$  0,60 que é o valor para a Berberina neste sistema. Também se verificou presença de algumas manchas que podem ser análogos de Berberina no cromatograma C.2, que não está disponível aqui, nomeadamente, Berbamina, Palmatina e Jatrorrhizina.

#### 6.1.2 *Vernonia colorata*

A 366 nm observou-se faixas de cor escuras, que depois de tratado com DRG permaneceram as mesmas, faixas mal resolvidas de cor castanho.

### 6.1.3 *Tabernaemontana elegans*

Nos cromatogramas não existem manchas bem definidas aparecendo faixas longas de cor castanho avermelhadas.

### 6.1.4 *Hypox hemerocallidea*

Não se observou nada nos cromatogramas, tanto a UV 366 nm como com DRG a luz visível.

### 6.1.5 *Terminalia sericea*

Nos cromatogramas não se observou manchas resolvidas, aparecendo somente sob forma de faixas de cor castanha pouco visível.

### 6.1.6 *Ximenia americana*

Nos cromatogramas depois de revelados com DRG não se observou manchas apreciáveis, somente no cromatograma C.1 no extracto concentrado há mancha castanha amarelado  $R_f$  0.39 – 0.83 e no cromatograma C.2 mancha de cor castanha amarela  $R_f$  0.71 – 0.93.

### 6.1.7 *Bridélia cathartica*

Segundo a análise dos cromatogramas não se vê nenhuma mancha apreciável nas placas depois de revelação com DRG.

### 6.1.8 *Acridocarpus natalitius*

Nos cromatogramas não se vê manchas apreciáveis e com  $R_f$  igual ou próximo ao de berberina e seus análogos.

### 6.1.9 *Strychnos henningsii*

A 366 nm observou-se manchas mal resolvidas.

Cromatograma C.1: extracto concentrado com DRG apareceu uma faixa de cor castanha escuro a amarelo com  $R_f$  0.00 – 0.35.



Extracto clorofórmico uma única mancha de cor castanha com  $R_f$  0.00 – 0.54. No extracto aquoso com DRG observou-se manchas com  $R_f$  0.13 castanha esverdeadas, 0.20 castanho fraco, 0.28 castanho esverdeado e 0.35 castanha. Cromatograma C.2: com DRG no extracto concentrado verificou-se uma faixa castanha escuro com  $R_f$  0.00 – 0.25, extracto clorofórmico mancha mal resolvida de cor castanho a avermelhado até  $R_f$  0.29 e extracto aquoso com mancha a 0.19 e 0.26 ambas de cor castanha.

Cromatograma C.4: com DRG extracto concentrado observou-se uma faixa castanha amarelada até  $R_f$  0.46, extracto clorofórmico todas manchas de cor castanho amarelado com  $R_f$  0.22, 0.28, 0.39, 0.50 e 0.80. No extracto aquoso observou-se mancha de cor castanha amarelada com  $R_f$  0.80.

#### 6.1.10 *Tiliacora funifera*

A 366 nm só se observou faixas de fluorescência amarela. Cromatograma C.1: com DRG no extracto concentrado viu-se uma mancha com  $R_f$  0.00 – 0.13 e 0.71 ambas de cor castanho avermelhado. No extracto clorofórmico só apareceu uma mancha com  $R_f$  0.60 de cor castanho avermelhado. Extracto aquoso há manchas mal resolvidas todas de cor castanha avermelhada com  $R_f$  0.00 – 0.21, 0.33.

Cromatograma C.4 não se verificou nenhuma mancha.

#### 6.1.11 *Elephantorrhiza elephantina*

A 366 nm no cromatograma C.1 e C.2 observou-se manchas mal resolvidas de fluorescência amarela, mais visíveis nos extractos concentrado e clorofórmico que no aquoso. Com DRG o extracto clorofórmico de cromatograma C.2 é o único que apresenta mancha com  $R_f$  0.15 de cor castanha muito fraca. Também se observou duas manchas no extracto clorofórmico do cromatograma 14.4, de cor castanha pouco visível com  $R_f$  0.28 e 0.35.

#### 6.1.12 *Annona senegalensis*

A 366 nm todos os extractos concentrados e clorofórmicos apresentaram faixas com fluorescência amarela e o extracto concentrado de cromatograma C.4 apresentou ainda uma fluorescência azul de intensidade fraca e mal resolvida.

Cromatograma C.1: não se verificou nenhuma mancha de depois de tratado com DRG.

Cromatograma C.2: com DRG tanto no extracto concentrado como no clorofórmico observou-se manchas comuns, de cor castanha com  $R_f$  0.33, 0.41, e 0.45. no extracto concentrado ainda se verificou uma mancha castanha escuro com  $R_f$  0.68 – 0.81. no extracto aquoso não foi observado nada.

Cromatograma C.4: com DRG aparecem as manchas castanha escuro com  $R_f$  0.04 e 0.08, castanho fraco  $R_f$  0.84 são comuns ao extracto concentrado e clorofórmico. No extracto concentrado há mancha de cor castanha  $R_f$  0.19 e mancha castanha  $R_f$  0.24 no extracto clorofórmico.

Cromatograma C.1 e C.4 nada.

Cromatograma C.2: tanto no extracto concentrado e clorofórmico existem manchas com  $R_f$  0,44 que pode ser Palmatina 0,45 que pode ser Columbamina e 0,51 que pode ser Berberina.

#### 6.1.13 *Sclerocarya birrea*

A 366 nm não se verificou nenhuma fluorescência. Com DRG só no cromatograma C.2, no extracto etanólico concentrado observou-se mancha de cor castanha escuro com  $R_f$  0.04 – 0.15 e uma faixa escura com  $R_f$  0.17 – 0.94.

#### 6.1.14 *Artabotrys brachypetalus*

No cromatograma 17.1 a 366 nm há uma mancha mal resolvida, complexa de fluorescência amarela tanto no extracto clorofórmico como no aquoso, com DRG não se observou nenhuma mancha.

No cromatograma C.2: a 366 nm existem manchas (faixas) de fluorescência azul e amarela em todos os extractos. Com DRG as manchas de cor castanha fraca de  $R_f$  0.23 e 0.38 aparecem tanto no extracto concentrado e aquoso e manchas de cor castanho-escuro com  $R_f$  0.45 e 0.55 presentes nos extractos concentrado e clorofórmico e mancha de cor castanha com  $R_f$  0.58 presente no extracto clorofórmico.

No cromatograma C.4: a 366 nm no extracto clorofórmico e aquoso observou-se faixas de fluorescência amarela e azul. No extracto aquoso não se verificou nada.

Com DRG observou-se manchas de cor castanho amarelada comuns nos extractos concentrado e clorofórmico com  $R_f$  0.25, 0.30, 0.40 e 0.48, mas no extracto concentrado ainda se observou uma mancha de cor castanha com  $R_f$  0.19 e no extracto clorofórmico as manchas de cor castanha com  $R_f$  0.16 e 0.38. Nos cromatogramas C.1 e C. 4 não se observou nenhuma mancha apreciável. No cromatograma C.2, há duas manchas tanto no extracto clorofórmico e aquoso com  $R_f$  0,23 e 0,25 que pode ser Magnoflorina e  $R_f$  0,45 (coincidente nos dois extractos) que pode ser Columbamina.

#### 6.1.15 *Garcinia livingstonei*

##### Cromatograma C.1

Extracto concentrado – a 366 nm a partir do *start* até ao meio do percurso do cromatograma observou-se mancha de cor castanha escuro seguida de fluorescência amarela, que depois de revelação com DRG verificou-se uma faixa de cor castanha de  $R_f$  0.00 – 0.75.

Extracto clorofórmico – a 366 nm verificou-se uma única mancha castanha escuro com  $R_f$  0.84 que depois de revelado com DRG não teve uma cor visível.

Extracto aquoso – a 366 nm só se viu uma faixa mal resolvida, que com DRG verificou-se 3 manchas de  $R_f$  0.00 – 0.35 de cor castanha fraca, 0.51 – 0.54 e 0.69 todas de cor castanha muito fraco.

Cromatograma C.2: a 366 nm todos os extractos apresentam faixas escuras sem fluorescência apreciável. Com DRG somente no extracto concentrado observou-se faixa castanha de  $R_f$  0.56 – 0.94 e extracto aquoso mancha longa com  $R_f$  0.71 – 0.91 de cor castanha.

Cromatograma C.4: tanto a 366 nm como com DRG não se verificou nada. Depois de revelação dos cromatogramas com DRG não se observou nenhuma mancha com  $R_f$  de Berberina e seus análogos.

#### 6.1.16 *Spirotachys africana*

Tanto a 366 nm como com DRG não se verificou nenhuma fluorescência apreciável.

#### 6.1.17 *Cassia abbreviata*

A 366 nm todos os extractos concentrado e clorofórmico dos cromatogramas C.1, C.2 e C.4, apresentam faixas de fluorescência castanha amarelada, e os extractos aquosos faixas de manchas de

cor escura. No cromatograma C.1 com DRG, no extracto concentrado há mancha castanha mal resolvida de  $R_f$  0.00 – 0.58, no extracto clorofórmico há duas manchas de cor castanha fraca com  $R_f$  0.33 e 0.69 – 0.88. No extracto aquoso há manchas de  $R_f$  0.16 e 0.39 – 0.54 ambas de cor castanha fraca.

No cromatograma C.2 mancha cor castanha mal resolvida no extracto concentrado e aquoso desde  $R_f$  0.00 – 0.86. no cromatograma C.4 não se vê nada.

#### 6.1.18 *Senna petersiana*

Cromatograma C.1: a 366 nm em todos os extractos verificou-se manchas continuas de cor escuro e castanha amarelada, mas com predominância de cor escura no extracto aquoso.

Com DRG nos extractos concentrado e aquoso verificou-se a mesma mancha continua de cor castanha escura de  $R_f$  0.00 – 0.43, e no extracto clorofórmico mancha castanha escura de  $R_f$  0.84.

Cromatograma C.2: a 366 nm observou-se 3 manchas de fluorescência amarela e 2 castanha avermelhada, no extracto concentrado.

No extracto clorofórmico observou-se uma faixa de cor castanho avermelhado e amarela que com DRG ficou de cor castanho escura  $R_f$  0.84.

No extracto aquoso a 366 nm viu-se faixa castanha avermelhada e fluorescência azul, que com DRG só se verificou mancha de cor castanho escura de  $R_f$  0.63 – 0.86.

No cromatograma C.4 a 366 nm só no extracto clorofórmico se observou fluorescência de cor amarela com  $R_f$  0.50 que depois de tratado com DRG não foi visível.

#### 6.1.19 *Ziziphus mucromata*

Nos cromatogramas tanto a 366 nm como com DRG não se verificou nenhuma mancha.

#### 6.1.20 *Strychnos decussata*

Cromatograma 23.1: a 366 nm no extracto concentrado verificou-se uma faixa longa de fluorescência amarela, que também estava presente nos extractos clorofórmico e aquoso, embora neste último não tão longo. Com DRG as manchas obtidas eram de cor castanha, com  $R_f$  0.00 – 0.18

Tabela 6.2. Resultado da análise cromatográfica de presença da Berberina e outros alcalóides, dos extractos etanólicos submetidos ao procedimento de isolamento.

Nome Científico	Parte Analisada	Presença de Berberina	Presença de outros alcalóides	
			Experimental	Bibliográfico
<i>Zanthoxylum capense</i>	Raízes	+	+	+
<i>Vernónia colorata</i>	Raízes	-	+	-
<i>Tabernaemontana elegans</i>	Raízes	-	+	+
<i>Hypox hemerocallidea</i>	Tubérculos	-	-	-
<i>Terminalia sericea</i>	Raízes	-	-	-
<i>Ximenia americana</i>	Raízes	-	+	+
<i>Bridélia cathartica</i>	Raízes	-	+	-
<i>Acridocarpus natalitius</i>	Raízes	-	-	-
<i>Strychnos henningsii</i>	Raízes	-	+	+
<i>Tiliacora funifera</i>	Raízes	-	-	-
<i>Elephantorhiza elephantina</i>	Raízes	-	+	-
<i>Annona senegalensis</i>	Raízes	-	+	+
<i>Sclerocarya birrea</i>	Raízes	-	-	-
<i>Artabotrys brachypetalus</i>	Raízes	-	+	-
<i>Garcinia livingstonei</i>	Raízes	-	+	-
<i>Sprostachys africana</i>	Troncos	-	-	-
<i>Cassia abbreviata</i>	Raízes	-	+	-
<i>Senna petersiana</i>	Raízes	-	+	-
<i>Ziziphus mucronata</i>	Raízes	-	-	+
<i>Strychnos decussata</i>	Raízes	-	+	+
<i>Combretum molle</i>	Raízes	-	+	-

## 6.2 Análise Cromatográfica de TLC dos extractos clorofórmicos das amostras das plantas com Amostra – Padrão.

### 6.2.1 TLC1: extracto $\text{CHCl}_3$ das amostras em sistema eluente n-BuOH-EtilAcetato-AcOH- $\text{H}_2\text{O}$ (30:50:10:10) Tempo de eluição 38 minutos

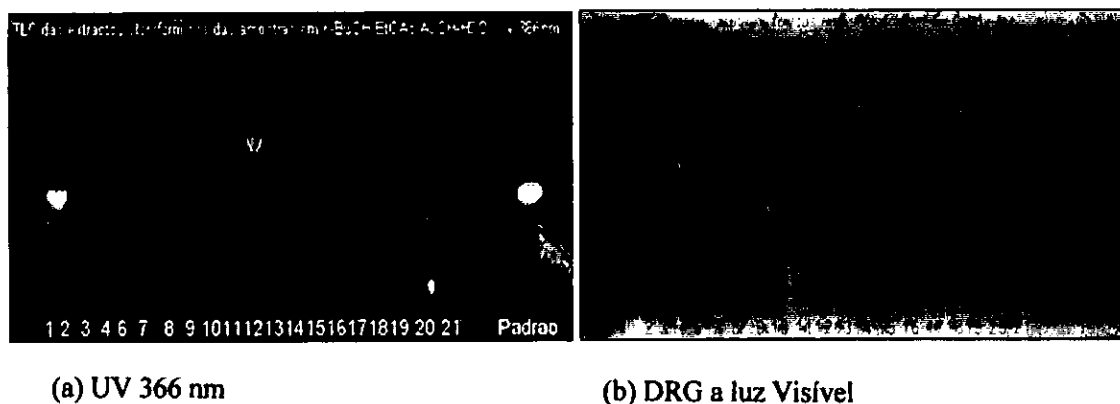


Fig. 2. Cromatograma de TLC1 dos extractos clorofórmicos com a Amostra-Padrão

e 0.20 – 0.51 ambas pertencentes ao extracto concentrado e clorofórmico, e ainda 0.54 – 0.86 no extracto clorofórmico e por fim 0.00 – 0.34 no extracto aquoso.

Cromatograma C.2: a 366 nm observou-se 3 manchas, no extracto concentrado, amarela, amarela fluorescente e amarelo fraco que com DRG simplesmente se observou manchas com  $R_f$  0.00 – 0.15 e 0.19 – 0.29 existentes também no extracto clorofórmico. No extracto aquoso a 366 nm observou-se uma faixa de fluorescência amarela que com DRG não se verificou nada.

Cromatograma C.4: a 366 nm verificou-se faixa de fluorescência amarela tanto no extracto concentrado e clorofórmico, no extracto aquoso não se observou nenhuma mancha. Com DRG no extracto concentrado observou-se duas manchas de cor castanha, com  $R_f$  0.63 e 0.73, e no extracto aquoso verificou-se 3 manchas, nomeadamente castanha  $R_f$  0.35, castanha esverdeada  $R_f$  0.61 e castanha  $R_f$  0.69 – 0.80. No extracto aquoso não se verificou nada.

#### 6.1.21 *Combretum molle*

A 366 nm nos cromatogramas só se observaram manchas escuras.

Com DRG no cromatograma C.1 verificou-se duas manchas de cor castanha de intensidade muito fraca de  $R_f$  0.59 e 0.89. No cromatograma C.2, há duas manchas de cor castanha fraco de  $R_f$  0.41 e 0.53 nos extractos concentrado e clorofórmico, e uma mancha de cor castanho de  $R_f$  0.56 – 0.69 no extracto concentrado. No extracto aquoso não se verificou nada. No cromatograma 24.4 tanto no extracto concentrado e aquoso existem manchas de cor castanha fraca, de  $R_f$  0.06, 0.55 e 0.64. No extracto aquoso não se verificou nada.

Os resultados da análise cromatográfica das partes das plantas em estudo submetidas a TLC, estão apresentados na tabela 6.2, onde se pode ver a presença de alcalóide berberina, outros alcalóides (provavelmente alcalóides com nitrogénio quaternário). Na tabela estão representados os dados teóricos de presença de alcalóides com os resultados experimentais obtidos, onde o sinal + representa presença de alcalóides e - ausência.

Tabela 6.3. Resultado comparativo de presença de Berberina em *Z. capense* com Amostra – Padrão.

Amostra	Dados experimentais		
	R <sub>f</sub>	UV-Vis 366 nm	DRG a luz Visível
Amostra-Padrão	0.50	Amarelo fluorescente	Castanho fraco
<i>Zanthoxylum capense</i>	0.49	Amarelo Fluorescente forte	Castanho fraco

O extracto CHCl<sub>3</sub> de *Zanthoxylum capense* foi o único que apresentou características semelhantes à da Amostra-Padrão, tanto quanto a fluorescência a luz UV-Vis a 366 nm e depois de tratada com DRG e lida a luz visível. Com base neste resultado, preparou-se o extracto etanólico concentrado, pelo método de extracção por Soxhlet que posteriormente foi submetido a MPLC (descrito em 5.9) As restantes amostras dos extractos CHCl<sub>3</sub>, não apresentaram características semelhantes à da Amostra-Padrão, embora algumas delas tenham dado teste positivo com DRG (mancha castanha ou castanha-amarelada), isto não significa presença de Berberina nestes extractos. Estas manchas podem ser de compostos análogos da Berberina e/ou Benzofenantridínicos (em geral compostos com nitrogénio quaternário). Por exemplo o extracto clorofórmico de *Artabotrys brachypetalus* a 366 nm não apresenta nenhuma fluorescência amarela, mas depois de revelado com DRG aparece uma mancha de cor castanha com R<sub>f</sub> muito próximo de Berberina. No cromatograma não está presente o extracto CHCl<sub>3</sub> de 5 (*Terminalia sericea*), mas o seu resultado é negativo como se pode ver na tabela 6.2

### 6.2.2 TLC2 das 24 fracções obtidas por MPLC e da fracção benzénica

Sistema eluente n- BuOH – EtilAcetato – AcOH – H<sub>2</sub>O (30:50:10:10) Tempo de eluição 38 min

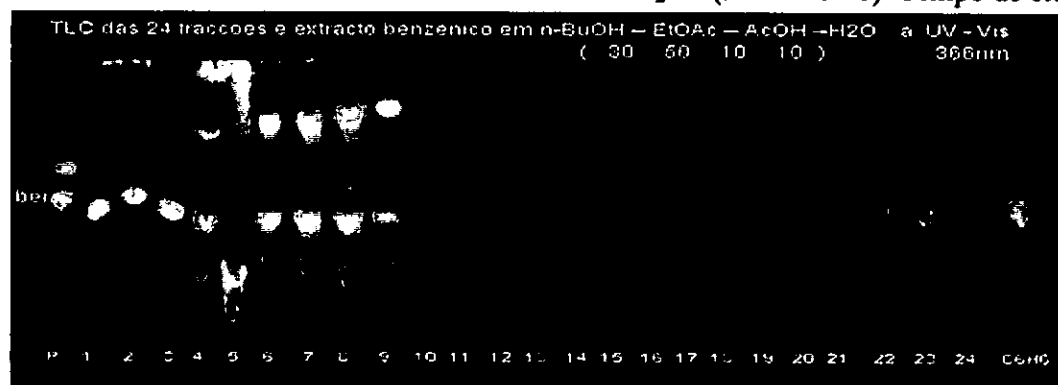
Fig. 3. Cromatograma das fracções (I) a UV 366 nm em n- BuOH – EtilAcetato – AcOH – H<sub>2</sub>O

Tabela 6.4. Resultado de TLC das fracções I no sistema eluente n-BuOH-EtilAcetato-AcOH-H<sub>2</sub>O

Fracção	Dados experimentais		
	R <sub>f</sub>	UV-Vis	DRG → luz Visível
Amostra-Padrão	0.50	Amarelo esverdeado fluorescente	Castanho-escuro
1, 2 e 3	0.41	Amarelo fraco	Castanho Fraco
	0.48	Amarelo alaranjado forte	
4, 5	0.29	Amarelo fluorescente	Todas de cor Castanha
	0.44	Amarelo alaranjado forte	
	0.74	Azul fluorescente	
	0.94	Amarelo alaranjado	
6, 7, 8 e 9	0.30	Amarelo fluorescente	Todas de cor Castanha
	0.43	Amarelo alaranjado	
	0.56	Amarelo fluorescente	
10 - 14	0.30	Amarelo fluorescente	Todas de cor Castanha Frac
	0.43	Amarelo alaranjado	
	0.53	Azul fluorescente	
15 - 17	0.04	Azul fluorescente	Todas de cor Castanha Muito fraco
	0.10	Violeta	
	0.38	Amarelo esverdeado	
18 - 24	0.04	Azul fluorescente	Todas de cor Castanha muito fraco
	0.10	Violeta	
	0.48	Amarelo esverdeado	

Fracções 1-3 apresentam manchas com as mesmas características, onde a mancha predominante tem fluorescência amarela alaranjado (forte), que apesar de ter valor de R<sub>f</sub> 0.48 próximo do 0.50 da Amostra-Padrão, não tem a mesma fluorescência amarela esverdeada desta. Pode porém, ser um composto análogo da Berberina.

Fracções 4-5 apresentam mancha amarela alaranjada (forte) e mancha de cor amarela esverdeado, mas com R<sub>f</sub> um pouco abaixo das manchas das fracções 1-3.

Fracções 6-9 apresentam manchas bem visíveis de cor amarela alaranjadas, bem próxima de amarela esverdeada fluorescente. A mancha de fluorescência amarela esverdeada pode ser Berberina ou um seu análogo bem próximo, apesar de estar um pouco abaixo de valor de R<sub>f</sub> da Amostra-Padrão. Por outro lado a mancha amarela alaranjada que está, praticamente unida com a mancha de fluorescência amarela esverdeada, pode ser um alcalóide parental muito próximo de Berberina.

Fracções 10-14 a mancha visível predominante têm valor de R<sub>f</sub> 0.43 e apresenta fluorescência amarela esverdeada, como a da Amostra-Padrão. Fracções 15-17 apresentam manchas de fluorescência amarela, mas com posição das manchas um pouco acima das de fracções 10-14.



Fracções 18-24 as manchas predominantes têm fluorescência amarela esverdeada  $R_f$  0.48, bem próximo de 0.50 da Amostra-Padrão com diferença de 0,02 unidades. Com base em análise cromatográfica este composto presente nas fracções em análise é a Berberina.

### 6.2.3 TLC3 das 6 fracções (II) resultantes da análise das 24 fracções (I) por MPLC

Sistema eluente CicloHexano – Et<sub>2</sub>NH (90:1) Tempo de eluição 29 minutos

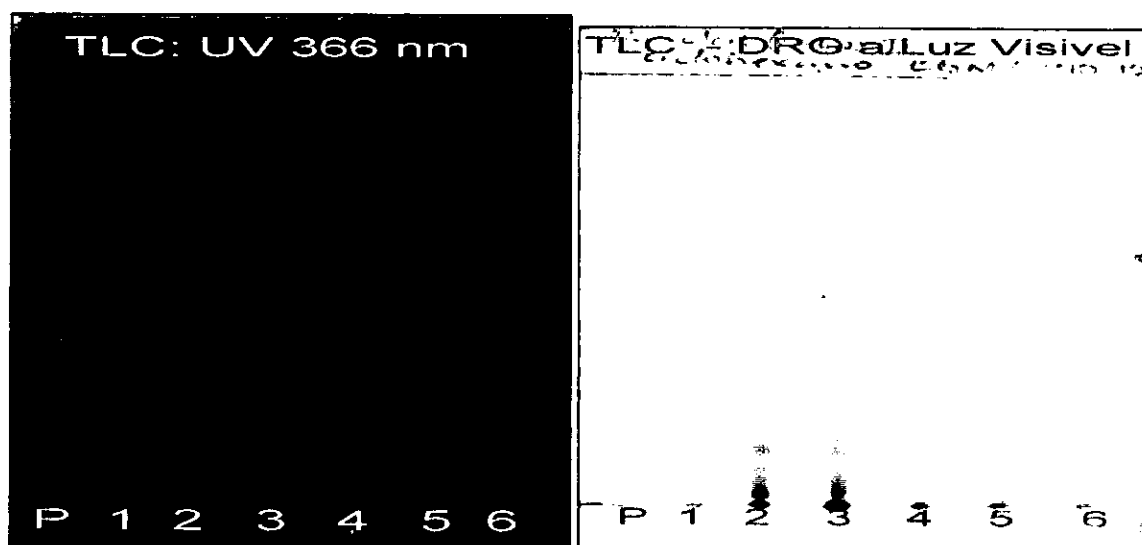


Fig. 4. Cromatograma das fracções II com Amostra-Padrão em Ciclohexano – Et<sub>2</sub>NH

Tabela 6.5. Resultado de TLC1 das fracções II no sistema eluente Ciclohexano – Et<sub>2</sub>NH (90:1)

Fracção	Dados experimentais		
	$R_f$	UV a 366 nm	DRG → luz Visível
P	0.08 0.35 0.50	Azul fluorescente Amarelo fluorescente Azul	Quase invisível
1	0.25 0.30 0.50	Castanho amarelado Azul Azul	Muito pouco visível
2 e 3	0.08 0.14 0.23 0.25 0.33 0.43	Azul esverdeado claro Azul esverdeado Amarelo acastanhado Amarelo acastanhado Amarelo fluorescente fraco Azul fluorescente	Castanho amarelo Castanho amarelo Castanho amarelo Castanho amarelo Castanho amarelo Castanho amarelo

4	0.20	Azul fluorescente	Não se vê nada
	0.24	Amarelo	
	0.29	Azul fluorescente	
	0.33	Amarelo fluorescente	
5 e 6	0.24	Amarelo acastanhado	Não se vê nada
	0.33	Amarelo fluorescente	

O  $R_f$  0.35 é da amostra padrão (fracção P), que em UV-Vis 366 nm tem cor amarelo fluorescente.

Fracção 1 não se verifica nenhuma mancha com características de amostra padrão como se pode ver no cromatograma acima, isto revela ausência de Berberina.

Fracção 2 e 3 nota-se uma mancha de cor amarelo fluorescente com  $R_f$  0.33, mais com maior intensidade que na fracção 2. Na fracção 2 existe uma mancha de cor azul violeta.

Nas fracção 4 são visíveis quatro manchas, das quais a mais notável tem  $R_f$  0.33 e cor amarela fluorescente idêntica à da Amostra – Padrão.

Nas fracções 5 e 6, a mancha predominante tem  $R_f$  0.33 e é de cor amarela fluorescente, que é bem visível. Estas manchas têm características da Amostra – Padrão.

Deste modo com base na análise do cromatograma, as fracções com as manchas de cor amarela fluorescente com  $R_f$  0.33 característico de amostra padrão está presente Berberina, apesar de ser em concentrações baixas.

#### 6.2.4 TLC4 das 6 fracções (II) resultantes da análise das 24 fracções (I) por MPLC

Sistema eluente n- BuOH – AcOH – H<sub>2</sub>O (90:1:9) Tempo de eluição 91 minutos

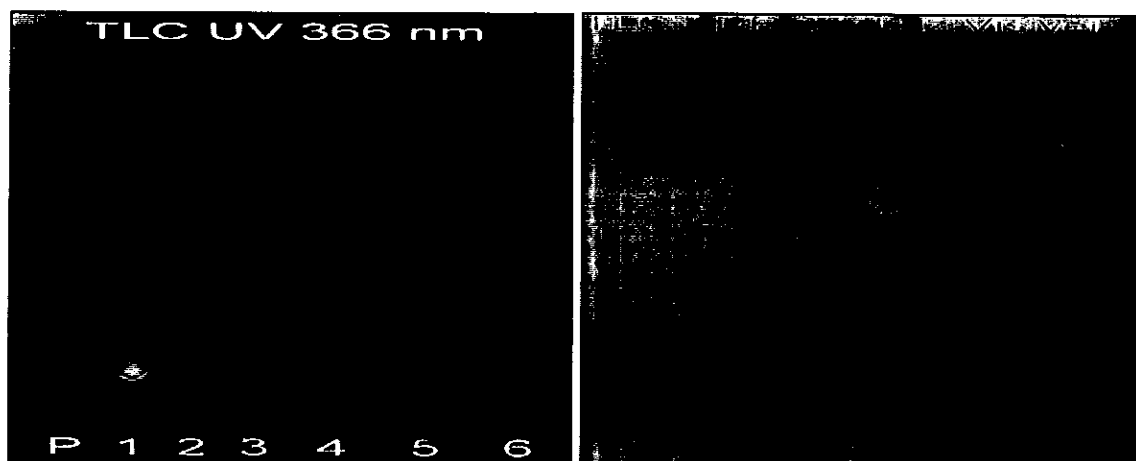


Fig. 5. Cromatograma das fracções II com Amostra-Padrão em n- BuOH – AcOH – H<sub>2</sub>O

Tabela 6.6. Resultado de TLC4 das frações II no sistema eluente n- BuOH – AcOH – H<sub>2</sub>O

Fracção	Dados experimentais		
	R <sub>f</sub>	UV a 366 nm	DRG → luz Visível
P	0.10 0.25 0.88 – 0.96	Amarela esverdeado Violeta Azul fluorescente	Castanho fraco
1	0.06 0.13 0.71 – 1.00	Amarelo fluorescente Amarelo alaranjado Azul fluorescente	Não se nada Castanho Não se vê nada
2	0.05 0.10 0.13 0.50 – 0.99	Amarelo esverdeado Amarelo esverdeado Amarelo alaranjado Azul fluorescente	Castanho Castanho Castanho Castanho intenso
3	0.05 0.10 0.13 0.50 – 0.99	Amarelo esverdeado Amarelo esverdeado Amarelo alaranjado Azul fluorescente	Castanho Castanho Castanho Castanho intenso
4, 5 e 6	0.08	Amarelo esverdeado	Castanho fraco

Na fracção P a mancha de fluorescência amarela esverdeada com R<sub>f</sub> 0.10, é da amostra padrão.

Fracção 1 há uma mancha pequena, de intensidade fraca de cor amarelo esverdeado fluorescente com R<sub>f</sub> 0.06. na mesma fracção há uma mancha de cor amarelo alaranjado forte (intenso), quase de mesmo tamanho da amostra padrão, mas não pode ser a Berberina devido a diferença de fluorescência, esta pode ser um análogo muito próximo da Amostra – Padrão.

Fracção 2 e 3 apresentam duas manchas com fluorescência amarela esverdeada com R<sub>f</sub> 0.05 e 0.10 idêntico à da amostra padrão e são mais intensas que das fracções 4,5 e 6. Para além destas duas manchas, a mancha de fluorescência amarela laranja também está presente, mas não tão intensa como na fracção 1.

De acordo com o cromatograma nas fracções 2 e 3, há uma mistura complexa de compostos, o que pode ser facilmente evidenciado pela faixa de mancha mal resolvida com intervalo de R<sub>f</sub> 0.50 à 0.99. Fracções 4,5 e 6 apresentam as mesmas manchas de fluorescência amarela esverdeada idêntico a da Amostra – Padrão e com R<sub>f</sub> 0.08, diferindo-se em 0.02 unidades. Em todas as fracções a mancha de fluorescência amarela esverdeada está presente, variando de intensidade.

### 6.3 Resultados dos testes de actividade biológica

Os extractos etanólicos das plantas (*Bridélia cathartica*, *Elephantorrhiza elephantina*, *Tiliacora funifera*, *Ximenia americana* e *Zanthoxylum capense*) mostraram actividade anti – microbiana contra germe Gram-positivo *Staphylococcus aureus* e uma boa acção contra *Mycobacterium semegmatis*. Nenhum dos extractos analisados mostrou actividade para a *E. coli*. As plantas *Bridélia cathartica* e *Ximenia americana* manifestaram actividade nos testes anti – fúngicos contra *Cândida albicans*. Os extractos analisados mostraram actividade fundamentalmente para o *S. aureus* e para *M. Semegmatis*.

Nenhuma actividade foi observada contra a estirpe *Escherichia coli*, Gram-negativo. Isto deve-se a resistência que este tipo de bactéria possui contra antibióticos. Como pode ser visto na Tabela 1 e Figuras 1 e 2 de Anexo II. Estes resultados evidenciam presença de substâncias inibidoras de crescimento dos microrganismos nos extractos etanólicos das plantas medicinais.

## 7 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

### 7.1 Conclusões

Pesquisa fitoquímica das classes dos princípios activos responsáveis pela actividade biológica e efeitos farmacológicos destas plantas dá a possibilidade de explicar e justificar com base científica o uso prático destas plantas no tratamento de Malária, Tuberculose, Desinterias Amebíase.

Foi elaborado um método cromatográfico da avaliação qualitativa dos Alcalóides de grupo da Berberina.

Foi identificada presença de alcalóides em 14 plantas (o que podem ser alcalóides com nitrogénio quaternário).

Nos extractos clorofórmicos das plantas *Artabotrys brachypetalus*, *Bridelia cathartica*, *Cassia abbreviata*, *Combretum molle*, *Elephantorrryza elephantina*, *Garcinia livingstonei*, *Senna petersiana*, *Vernonia colorata* identificou-se presença de alcalóides (que na literatura científica não foi encontrada informação sobre presença de alcalóides).

Foi identificada presença da Berberina no extracto clorofórmico de *Zanthoxylum capense*, usando Amostra – Padrão.

Os extractos etanólicos das plantas *Bridelia cathartica*, *Elephantorrryza elephantina*, *Tiliacora funifera*, *Ximenia americana* e *Zanthoxylum capense* mostraram actividade anti-microbiana positiva fundamentalmente contra germe Gram-positivo *Staphylococcus aureus* e uma boa acção contra *Mycobacterium semegmatis*.

Os extractos etanólicos das plantas *Bridelia cathartica* e *Ximenia americana* mostraram actividade antifúngica para *Cândida albicans*.

## 7.2 Recomendações

Recomenda-se um estudo aprofundado das plantas que demonstraram actividade biológica, para avaliar outras classes de compostos naturais que provavelmente tenham também efeitos biológicos, bem como as que não foram submetidas a testes biológicos.

Todas as plantas analisadas devem ser submetidas a testes de actividade biológica.

O estudo de *Zanthoxylum capense* deve ser realizado até o isolamento e purificação de Berberina, neste contexto deve-se usar quantidades maiores (~ 1kg) para que se possa obter uma quantidade suficiente a isolar. Depois de obtido o composto, este deve ser analisado pelas técnicas espectroscópicas de análise, para a confirmação total.

Deve-se ter Amostra-Padrão de Sanguinarina para se confirmar se a mancha de fluorescência de cor amarela - laranja trata-se deste composto, que tem efeitos biológicos importantíssimos.

Os extractos etanólicos e clorofórmicos devem ser submetidos a testes de toxicidade, para se ter em conta a dosagem a ser administrado aos pacientes, pelos praticantes de medicina tradicional.

## BIBLIOGRAFIA

1. Addac-Mensah, Ivan. (1992). *Towards a rational scientific basis for herbal Medicine*. Gana University Press, Accra.
2. Almirante, C. D. (2006). *Saponinas esteroidais da planta Asparagus plumosus baker*. Trabalho de Licenciatura pp. 33-36. Faculdade de Ciências, Departamento de Química, UEM, Maputo.
3. Bates, R.B e Schaefer, J.P. (1971). *Reserch Techniques in Organic Chemestry*. p.16. Kenneth L. Reinehart, Jr., Editor
4. *Biologically active substance from Zanthoxylum capense (thunb) Harv*. South African Journal of Scince, vol. 94, pp.391-398.
5. Bombardelli, E., Bonatti, A., Gabetta, B., e Mustich, G. (1974). *Plants of Mozambique. VII. Triterpenóids of Terminalia sericeae*. Phytochemistry. 13, 2559-2562, from Chemistry Abstract 82 (15): 98192e.
6. Bouquet, A., Debray, M. (1974). *Plantas medicinais de Cotê d'Ivoire*. Traveaux et document de l'ORSPOM, 32:73.
7. Burke, A. (2007). *Wild flowers of the central highlands*. p. 88. First Edition, Namibia Scientific Society.
8. Chilaúle, E. R. (2005). *Plantas medicinais: Estudo da eficiência dos solventes na extracção de componenetes das folhas da Bridelia cathartica*. Trabalho de Licenciatura Faculdade de Ciências, Departamento de Química, UEM, Maputo.
9. Cicero, A.F., Rovati, L.C., Setnikar, I. (2007). *Eulipidemic effects of berberine administered alone or in combination with other natural cholesterol-lowering agents. A single-blind clinical investigation*.
10. Dana, W.M., Ronald M.P., Samuel, S., Butcher, P. (1991). *Techiques for the Organic Laboratory*. p. 110. Jhonh Willey & Sons Inc.
11. Dehmlow, E.V., Van Ree T., Guntenhoner, M. (1998). *2,4-trans-, 7,4'-dihydroxyflavan from Cassia abbreviate*. Phytoquemistry, V.49, N 6,20, November 1998, pp. 1805-1806 (2).
12. Departamento de Patologia e Medicina de Laboratório, Universidade de Louisville, Louisville, KY 40220, E.U.A., disponível em <http://www.ncbi.nlm.gov/entrez>, acesso em 30.06.2006

13. **Freepatentsonline, Sericosides and method of use.** Disponível em <http://freepatentsonline.com/4147777.html> acessado em 30/04/07.
14. Furuya, Tsutomu; Syono, Kunihiko e Akika, Ikuta. (1972). **Isolation of Berberine from callus tissue of Coptis Japonica.** Phytochemistry, Volume 11, Issue 1, January, p. 175. School of Pharmaceutical Sciences, Kltasato Umverslty, Mmato-ku, Tokyo, Japan
15. Govindana, Meledath e Govindan, Geetha. (2000). **A convenient method for the determination of the quality of goldenseal.** Fitoterapia 7, pp. 232-235
16. Grycova, Lenka; Dostál, Jiri; Marek, Radek. (2007). **Quaternary protoberberine alkaloids.** Phytochemistry 68,153 disponível em [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com), acesso em 20.08.07
17. Harborn, J.B., Hussein, H.S.N., Deeni, Y.Y. (1997). Phytochemistry. The International Journal of plant Biochemistry and Molecular Biology. Volume 44; N6, pp.977-1178. Pergamon, Oxford.
18. Harborne, J.B. (1998). **Phytochemical Methods. A Guide to modern techniques of plant analysis.** p. 214, 3ª Edição Chapman & Hall, London.
19. Hayashi, K., Minoda, K., Nagaoka, Y., Hayashi, T., Uesato, S. (2007). **Antiviral activity of berberine and related compounds against human cytomegalovirus.** Bioorg Med Chem Lett.17 (6): 1562-4.
20. Hostettmann, K., Gelfand, M., Mavi, S., Grummond, R.B. (1996). **Chemistry, Biological and Pharmacological properties of African Plants.** Harare, Zimbabwe.
21. [http://www.bioteecnologia.com.br/4hp\\_4.htm](http://www.bioteecnologia.com.br/4hp_4.htm). Acessado em 26/04/2000.
22. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&pubmed&list\\_uids=12651218&dopt](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&pubmed&list_uids=12651218&dopt), acessado em 15/05/07
23. [Http://www.nlm.nih.gov](http://www.nlm.nih.gov) acessado em 20.06.2006
24. <http://www.plantamed.com.br/DIV/plantas.suspeitas.htm>, acessado em 22/05/07.
25. <http://www.plantzafrica.com/medmonographs/hypoxisradix.pdf>, acessado em 19/04/07.
26. Hutchings, A., Scott, A., Lewis, G., Cunningham, A. (1996). **Zulu Medicinal Plants: An Inventor.** University of Natal Press. Pietermaritzburg, 450p.
27. Iauk, L., Costanzo, R., Caccamo, F., Rapisarda, A., Musumeci, R., Milazzo, I., Blandino, G. (2007). **Activity of Berberis aetnensis root extracts on Candida strains.** Fitoterapia. 78 (2): 159-61.



28. Islam, M.M., Sinha, R., Kumar, G.S. (2007). *RNA binding small molecules: studies on t-RNA binding by cytotoxic plant alkaloids berberine, palmatine and the comparison to ethidium*. Biophys Chemistry. 125(2-3): 508-20.
29. Issat, T., Jakóbisiak, M., Golab J. (2006). *Berberine, a natural cholesterol reducing product, exerts antitumor cytostatic/cytotoxic effects independently from the mevalonate pathway*. Oncol Rep. 16(6): 1273-6.
30. Jahnke, G.D., Price, C.J., Marr, M.C., Myers, C.B., George, J.D. (2006). *Developmental toxicity evaluation of berberine in rats and mice*. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.
31. Jansen, P.V., Mendes, O. (1984). *Plantas medicinais. Seu uso tradicional em Moçambique*; Tomo II, MISAU, Maputo.
32. Kuznetsova, L.P., Sochilina, E.E., Faddeeva, M.D., Iagodina, O.V. (2005). *Effect of some isoquinoline alkaloids on enzymatic activity of acetylcholinesterase and monoamine oxidase*. Ukr Biokhim Zh. 77(2): 147-53.
33. Lee, Y.S., Kim, W.S., Kim, K.H., Yoon, M.J., Cho, H.J., Shen, Y., Ye, J.M., Lee, C.H., Oh, W.K., Kim, C.T., Hohnen-Behrens, C., Gosby, A., Kraegen, E.W., James, D.E., Kim, J.B. (2006). *Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin-resistant states*. Diabetes. 55(8): 2256-64.
34. Lin, J.P., Yang, J.S., Lee, J.H., Hsieh, W.T., Chung, J.G. (2006). *Berberine induces cell cycle arrest and apoptosis in human gastric carcinoma SNU-5 cell line*. World J Gastroenterol. 12 (1): 21-8.
35. Maiti, M., Kumar, G.S. (2007). *Molecular aspects on the interaction of protoberberine, benzophenanthridine, and aristolochia group of alkaloids with nucleic acid structures and biological perspectives*. Med Res Rev.
36. Min, Y., Mahida, D.B., Adesogam, E.K., Duradola, J.I. (1995). *Roemerine an aporphine alkaloid from Annona senegalensis that reverses the multidrug-resistance phenotype with cultured cells*. Journal of Natural Products, 58, N4, pp 598-604.
37. Morgan, E.D. (1973). Citado por Merck 2001, The Merck Index, p. 155, 13<sup>th</sup> Edition. Merck
38. Ogunley, D.S. e Ibitoe, S.F. (2003). *Studies of microbial activity and chemical constituents of Ximenia Americana*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. (2): 239-241.  
Disponível em <http://www.tjpr.freehosting.net> acesso em 09/05/07.
39. Palgrave, K. C. (1977). *Trees of Southern Africa*. First Edition, C. Struik Publishers, Cape Town, 959p

40. Palgrave, K.C. (2002). *Trees of Southern Africa*. New edition, Palgrave, M. C. edition, C. Struik Publishers, Cape Town, 955p.
41. Patent specification (1977). *Pentaciclic Triterpens obtainable from Terminalia sericeae and their derivatives*. Disponível em <http://www.vmv3espacnet.com/oridoc?DB=EPODOC&IDX=GB1493926> acesso em 09/05/07
42. Phillipson, J. D., Wright, C. W. (1991). *Antiprotozoal Agents from Plant*
43. Pletsch, M. *Compostos naturais biologicamente ativos*. Disponível em <http://www.bioteecnologia.com.br/4hp4.htm>. Acessado em 26/09/2006
44. Qin, Y., Pang, J.Y., Chen, W.H., Zhao, Z.Z., Liu, L., Jiang, Z.H. (2007). *Inhibition of DNA topoisomerase I by natural and synthetic mono- and dimeric protoberberine alkaloids*. Chem Biodivers. 4(3): 481-7.
45. Rabe, T., Toubiana, R. (2002). *Isolation and indification of antibacterial compounds from Vernonia colorata leaves*. Juornal of Ethnopharmacology, vol.80. Disponível em <http://www.aapspharmaceutica.com/serch/view.asp?ID=23718> acessado em 10/05/07.
46. Ramanhandra Rao, S; Ravishankar, G. A. (2002). *Plant cell culture: chemical factories of secondary metabolites*. Biotechnology Advances. V. 20, pp 101-153
47. Sordat Diserens, J., Rogers, C.B., Sordat, B. e Hostettmann, K. (1992). *Phenylated Xanthonas from Garcinia livingstonei*. Phytochem, 31,313.
48. Tarrago, T., Kichik, N., Seguí, J., Giralt, E. (2007). *The Natural Product Berberine is a Human Prolyl Oligopeptidase Inhibit*. Chemistry Medic. 2 (3): 354-359.
49. Tome', F., Colombo, M.L. (1995). *Distribution of alkaloids in Chelidonium majus and factors affecting their accumulation*. Phytochemistry 40, 37 – 39.
50. Van der Heijden, R., Verpoorte, R., e Svedsen, A.B. (1986). *Indole Alcaloids from Tabernaemontana elegans*. Planta Med. 52 (2): 144-147. Disponível em <http://www.ferlin.lib.bioinfo.pl/pmid:17345219> acesso em 10/05/07.
51. Wagner, H., Bladt, S. (1996). *Plant Drug Analysis*. pp. 10, 11, 22,42. 2ª Edição.
52. Watt, J.M. e Brayer-Brandwijk, M.G. (1962). *The Medicinal and Poisons Plants of Southern end Eastern Africa*. 2<sup>nd</sup> Edition, London.
53. Wyk, B. E. V. e Gericke, N. (2000). *People's plants: a guide to useful plants of Southern Africa*. First Edition, Briza Publications, S. A. Pretoria.

54. Wyk, B. E. V., e Wyk, P. V. (1997). *Field guide to trees of Southern Africa*. Struik Publishers, Cape Town, 536p.
55. Wyk, B. E. V., Heerden, F. V., Oudtshoorn, B. V. (2002). *Poisonous plants of South Africa*. First Edition, Briza Publications, S. A. Pretoria.
56. Wyk, B. E. V., Oudtshoorn, B. V., Gericke, N. (1997). *Medicinal plants of Southern Africa*. p.116. First Edition, Briza Publications, S. A. Pretoria.
57. Yu, F.S., Yang, J.S., Lin, H.J., Yu, C.S., Tan, T.W., Lin, Y.T., Lin, C.C., Lu, H.F., Chung, J.G. (2007). *Berberine inhibits WEHI-3 leukemia cells in vivo*. 21(2): 407-12.
58. Zhang, W.J., Ou, T.M., Lu, Y.J., Huang, Y.Y., Wu, W.B., Huang, Z.S., Zhou, J.L., Wong, K.Y., Gu, L.Q. (2007). *9-Substituted berberine derivatives as G-quadruplex stabilizing ligands in telomeric DNA*. Bioorg Med Chem. 15(16): 5493-5501.
59. Zhu, F., Qian, C. (2006). *Berberine chloride can ameliorate the spatial memory impairment and increase the expression of interleukin-1beta and inducible nitric oxide synthase in the rat model of Alzheimer's disease*. BMC Neurosci. 7:78.

*ANEXOS*

---

ANEXOS

---

*Etelvino Magan Santiago*

**ANEXO I: Figuras das Plantas**



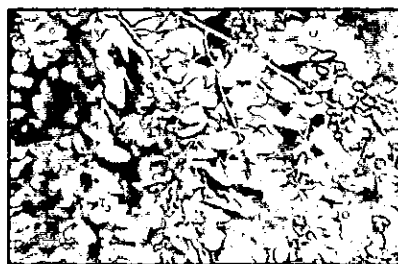
*Fig.1 – Acridocarpus natalitius*



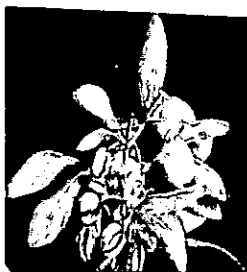
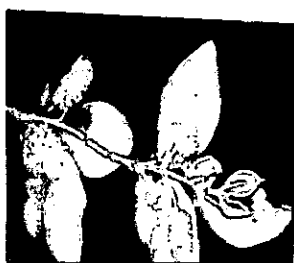
*Fig.2 - Annona senegalensi*



*Fig.3 – Artabbrotrys brachypetalus*



*Fig.4 - Bridélia cathartica*



*Fig.5 – Combretum molle*



*Fig. 6 - Elephantorrhiza elephantina*



*Fig.7 – Garcinia  
livingstonei*



*Fig.8 - Hypoxis  
hemerocallidea*



*Fig.9 - Sclerocarya birrea*



*Fig 10 – Senna petersiana*



*Fig 11- Spirostachys africana*



*Fig 12 – Strychnos  
decussata*



*Fig 13 - Strychnos  
henningsii*



*Fig 14 - Tabernaemontana  
elegans*



*Fig.15 -Terminalia sericea*



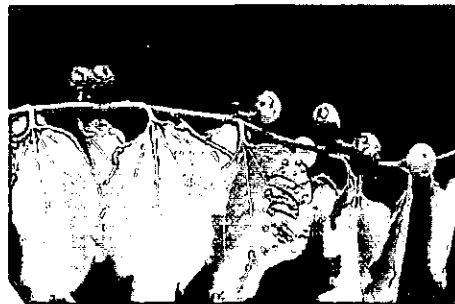
*Fig. 16 - Vernonia  
colorata*



*Fig.17 - Ximenia  
americana*



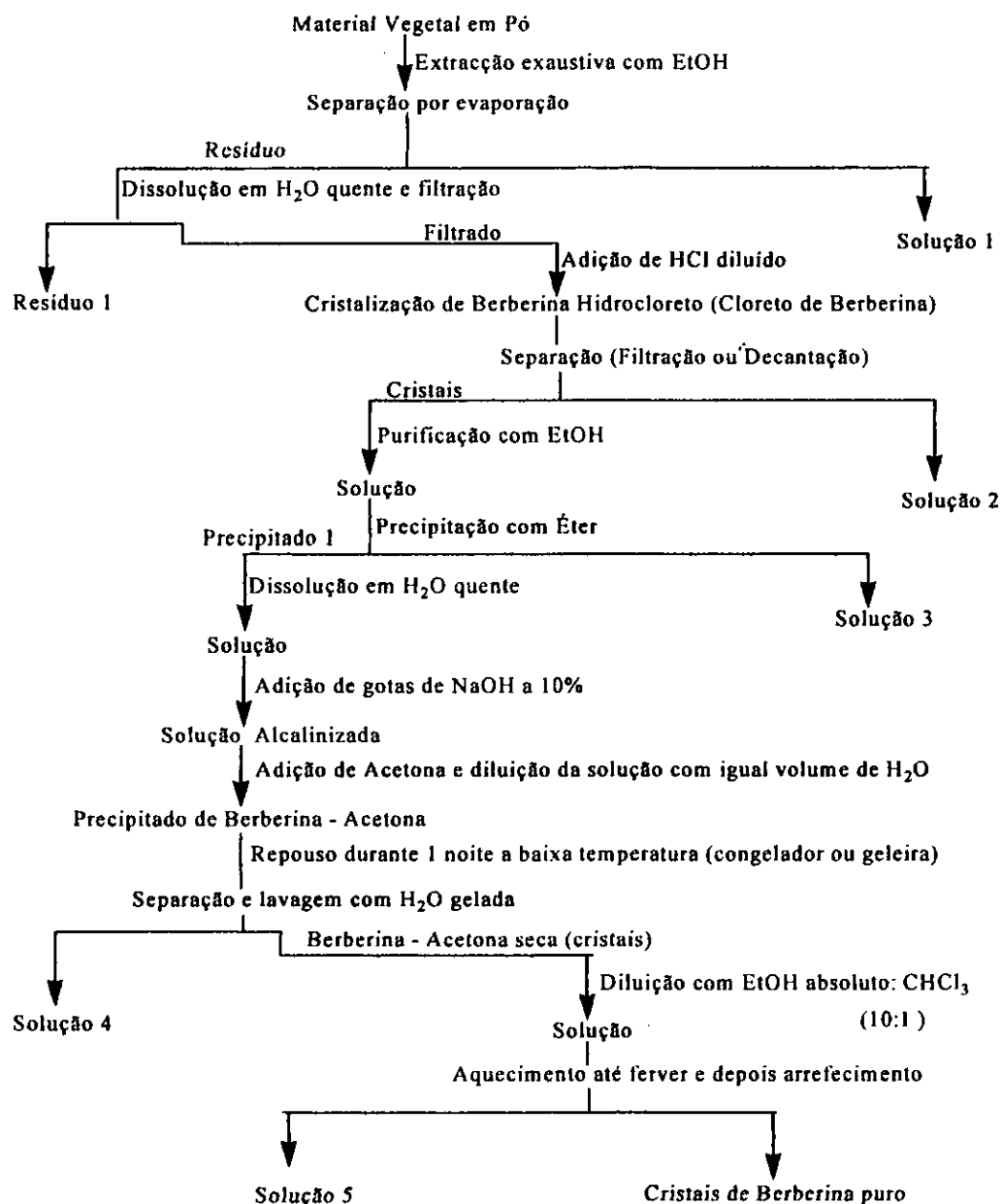
*Fig.18 – Zanthoxylum capense*



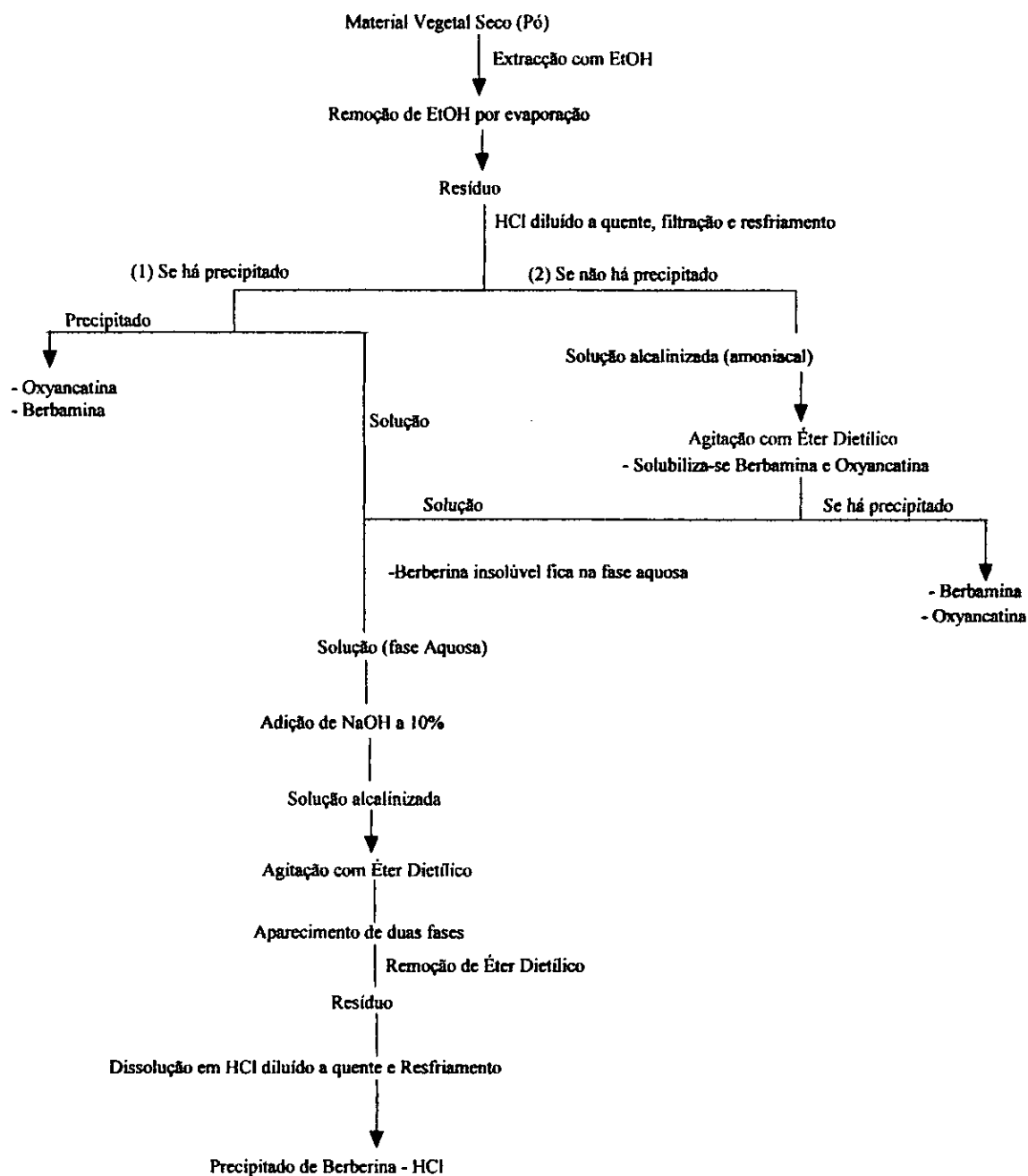
*Fig. 19 - Ziziphus mucronata*

## ANEXO II: Fluxogramas de isolamento de Berberina

## 1. Separação de Berberina com alcalóide principal





**2. Método de isolamento de Berberina onde não existe como alcalóide principal**

ANEXO III : Equipamentos

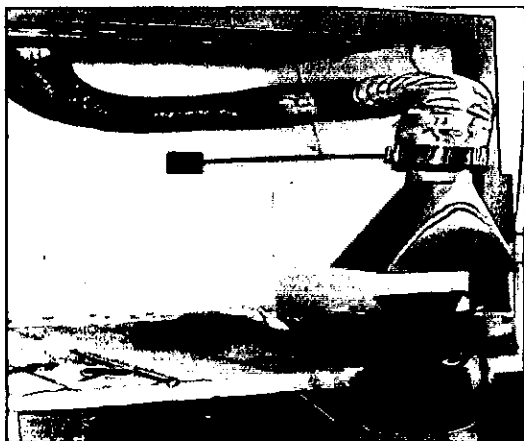


Fig. 1- Moinho usado para a moagem das amostras

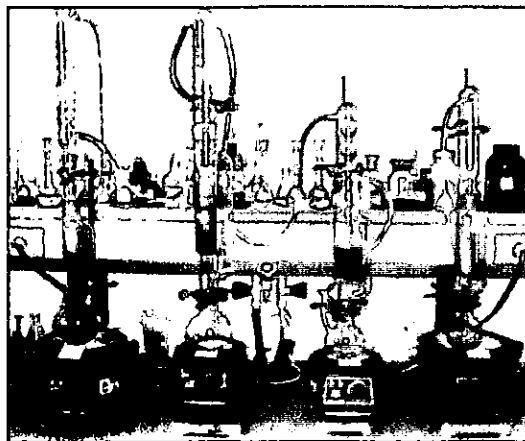


Fig. 2 – Extracção por Soxhlet



Fig. 3 – Rota vapor usado para concentrar a solução etanólica

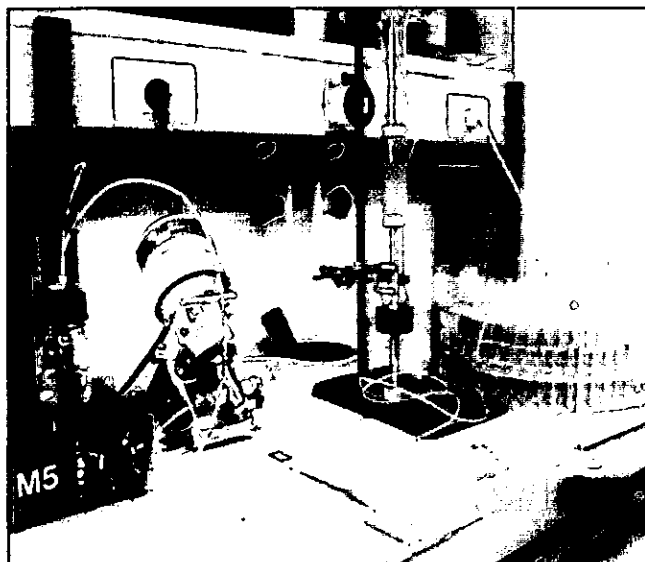


Fig. 4 - Aparelho de MPLC usado para fraccionamento do extracto clorofórmico de *Zanthoxylum Capense*

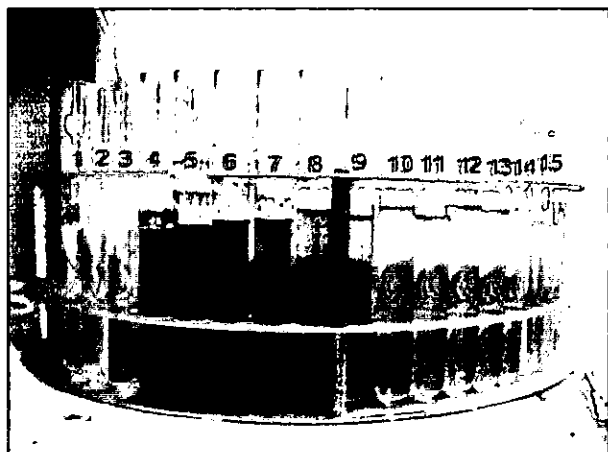


Fig. 5- Fracções obtidas do extracto clorofórmico de *Zanthoxylum Capense* por MPLC

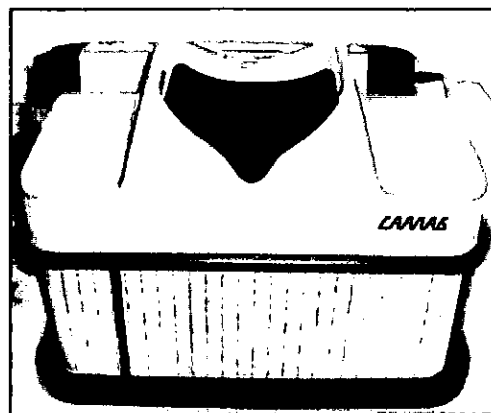


Fig. 6- Aparelho de lâmpada UV-Vis usado para a leitura dos cromatogramas

**ANEXO IV : Cromatogramas**

Nos cromatogramas abaixo:

C.1 = Cromatograma no sistema de solvente  $\text{CHCl}_3$  – MeOH (3:1)

C.2 = Cromatograma no sistema de solvente n- BuOH – EtilAcetato – AcOH -  $\text{H}_2\text{O}$  (30:50:10:10)

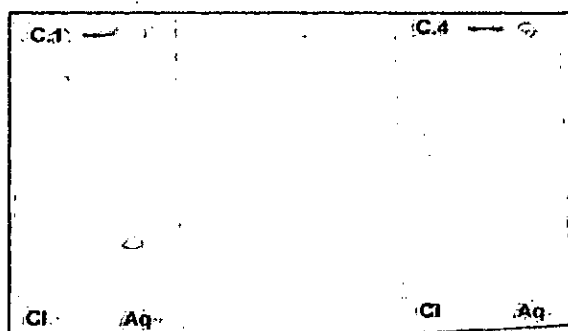
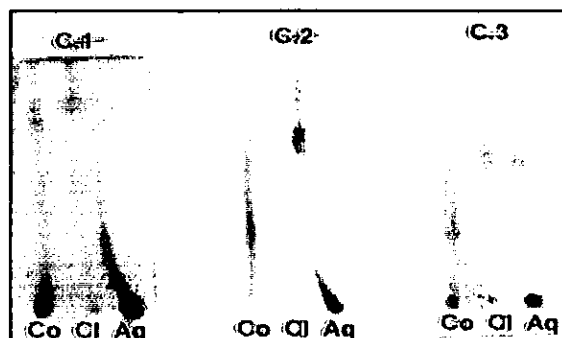
C.3 = Cromatograma no sistema de solvente n- BuOH – AcOH -  $\text{H}_2\text{O}$  (90:1:9)

C.4 = Cromatograma no sistema de solvente Tolueno – EtilAcetato – DietilAmina (70:20:10)

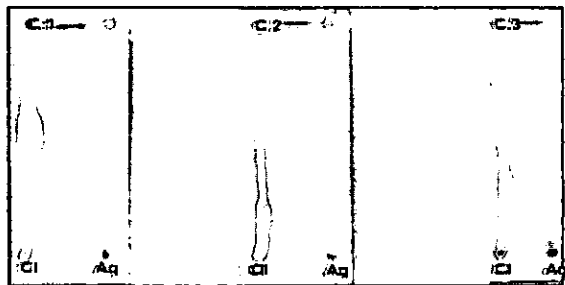
Co = Estrato Etanólico concentrado

Cl = Fracção Clorofórmica

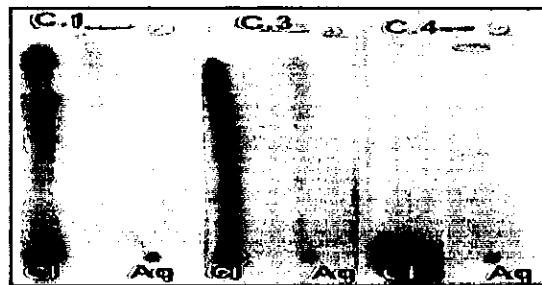
Aq = Fracção Aquosa

**1. Zanthoxylum capense****2. Vernonia colorata**

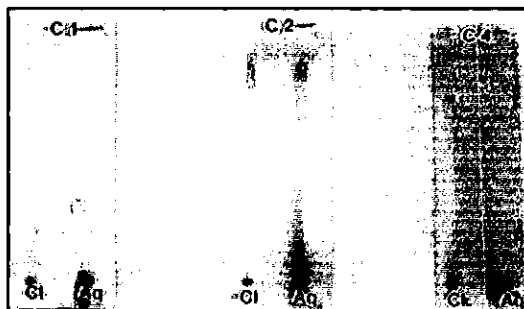
3. *Tabernaemontana elegans*



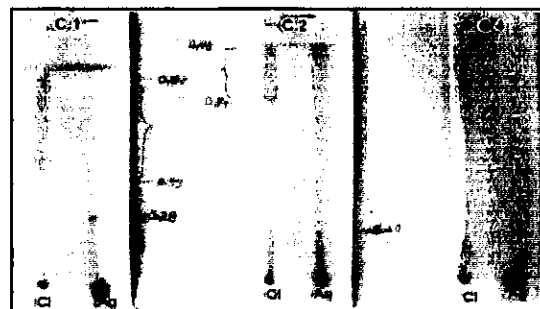
4. *Hypoxis hemerocallidea*



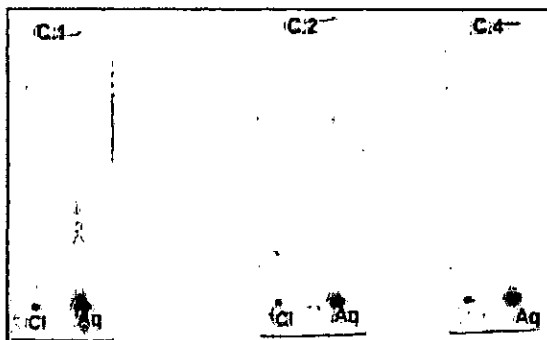
5. *Terminalia sericea*



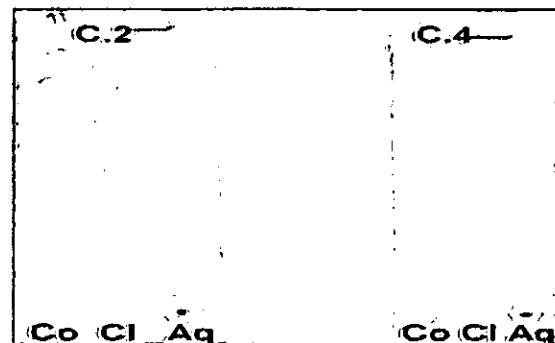
6. *Ximenia americana*



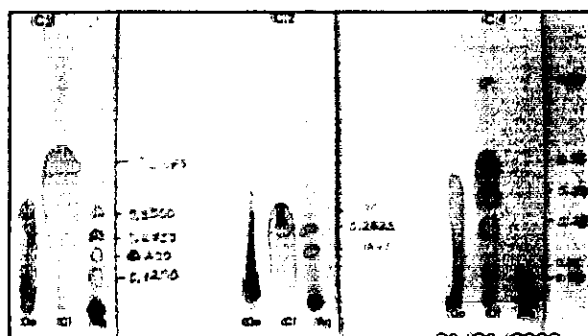
7. *Bridelia cathartica*



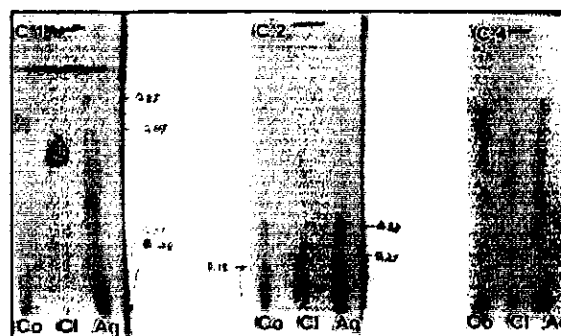
8. *Acridocarpus natalitius*



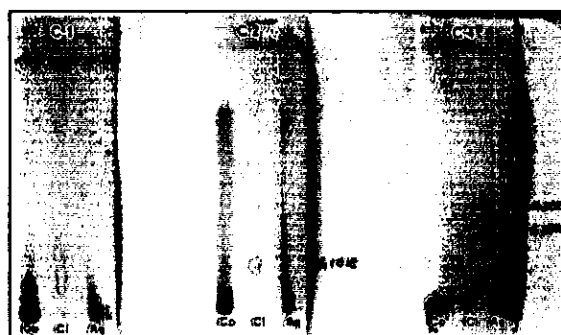
9. *Strychnos henningsii*



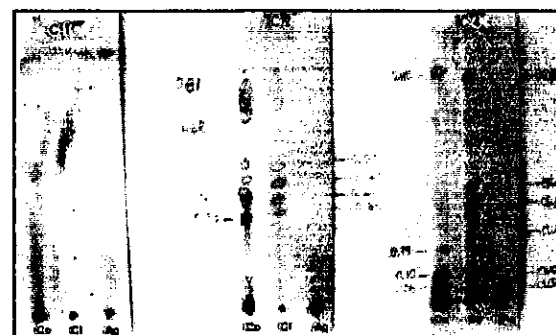
10. *Teliacosa funifera*



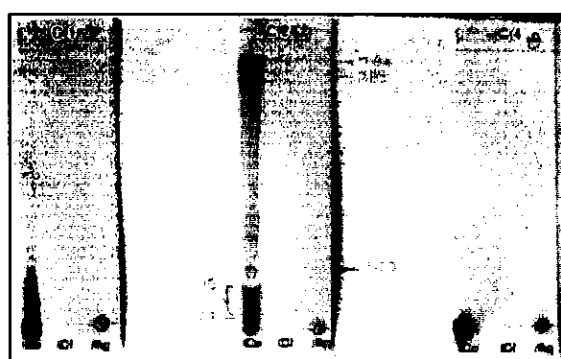
11. *Elephantorrhiza elephantina*



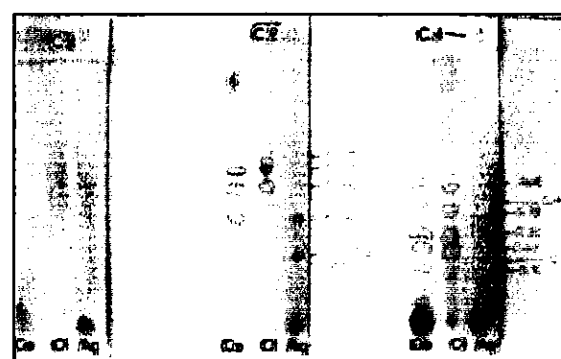
12. *Annona senegalensis*



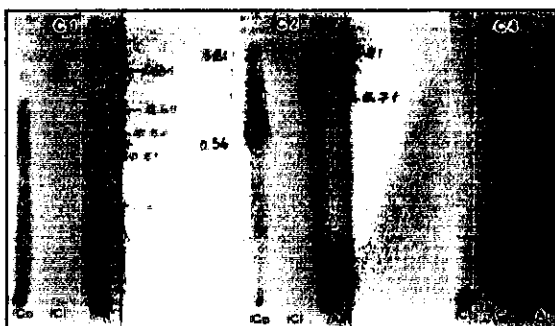
13. *Sclerocarya birrea*



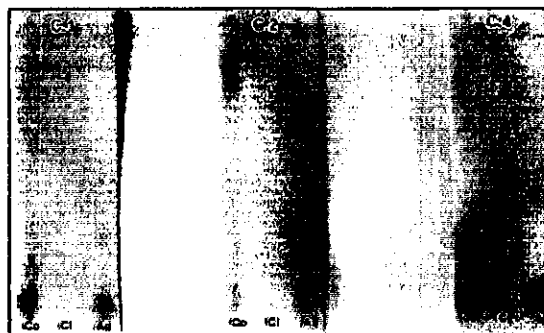
14. *Artabotrys brachypetalus*



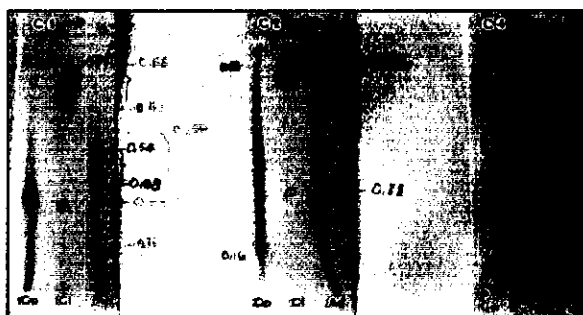
15. *Garcinia livingstonei*



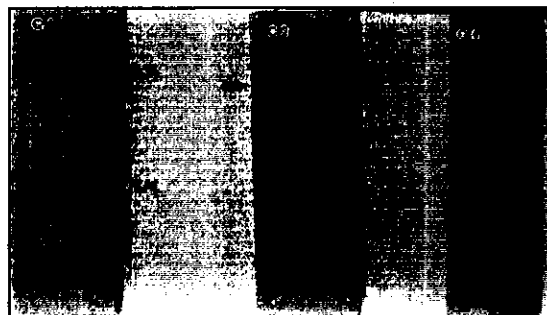
16. *Spirotachys africana*



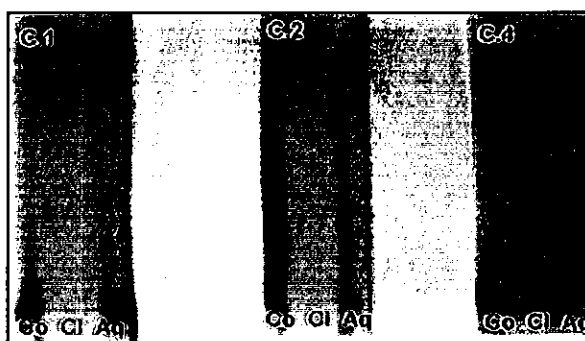
17. *Cassia abbreviate*



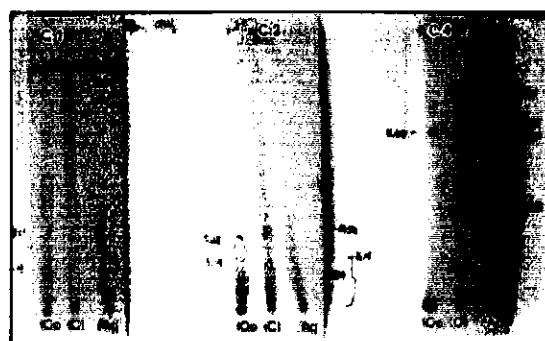
18. *Senna petersiana*



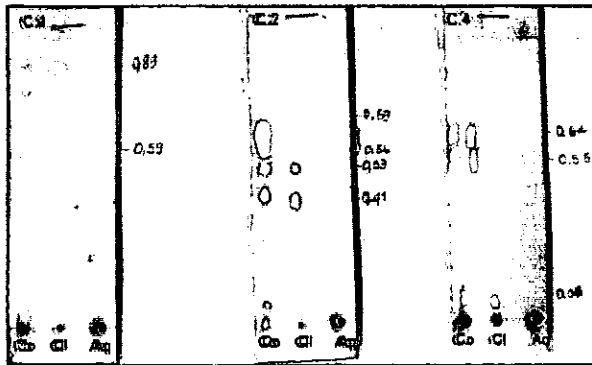
19. *Ziziphus mucronata*



20. *Strychnos decussata*



21. *Combretum Molle*





**ANEXO V: Testes de actividade Biológica****1. Material e métodos**

Os extractos foram dissolvidos em DMSO para uma concentração final de 20 mg/ml. Foram usadas estirpes standarizadas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium semegmatis*, assim como o fungo *Candida albicans*. O ensaio de actividade realizado foi o de difusão em agar quer em discos, quer em poços. Deste modo, no caso do método de difusão em discos, foram colocados em cada caixa 6 discos, os quais foram impregnados com 15  $\mu$ L da amostra a analisar, assim como do controlo negativo (DMSO). Após a impregnação do disco, deixou-se a difundir a amostra por cerca de 1 hora, findo o tempo a caixa foi colocada na estufa a 37 °C, por 24 horas ou 48 horas. No caso dos poços, a metodologia usada é muito semelhante, assim os poços são feitos com a parte de trás de uma pipeta Pasteur e é colocado em cada poço 30  $\mu$ L de amostra a testar. Cada caixa foi deixada a difundir por 1 hora, após a qual foi colocada na estufa a 37°C, 24 ou 48 horas.

☞ **SOLVENTE: DMSO**

**INOCULAÇÃO:**



☞ **EXTRACTOS:** Dissolução na concentração de 20 mg/mL

- 15 µL de extracto (300 µg), discos

- 30 µL de extracto (600 µg), poços

- 15/ 30 µL de solvente (controlo-)

1º Difusão do extracto e solvente por 1 hora

2º Incubar depois a 37°C, 24 h (todas excepto *M. semegmatis*, 48 horas)

☞ **ACTIVIDADE ANTIBACTERIANA:**

1) Método de difusão em agar (poços- 5 a 7 mm)

2) Método de difusão em agar (Discos)

Tabela de Resultados

Amostra	Micro-organismo	HALOS (disco)/mm	Halos (poços)/mm
1. <i>Bridelia Cathartica</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	9
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	8
	<i>Escherichia coli</i>	-	-
	<i>Mycobacterium semegmatis</i>	9	10
	<i>Candida albicans</i>	9	10
2. <i>Elephantorrhiza Elephantina</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	11,5	12,5
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-
	<i>Escherichia coli</i>	-	-
	<i>Mycobacterium semegmatis</i>	13,5	14
	<i>Candida albicans</i>	-	-
3. <i>Tiliacosa Funifera</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	9	14,5
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	7
	<i>Escherichia coli</i>	-	-
	<i>Mycobacterium semegmatis</i>	9	12,5
	<i>Candida albicans</i>	-	-
4. <i>Ximenia americana</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	8	9,5
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-
	<i>Escherichia coli</i>	-	-
	<i>Mycobacterium semegmatis</i>	10	15
	<i>Candida albicans</i>	-	10
5. <i>Zanthoxylum Capense</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	11	12,5
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-
	<i>Escherichia coli</i>	-	-
	<i>Mycobacterium semegmatis</i>	9	11
	<i>Candida albicans</i>	-	-

Fotos dos resultados dos testes de actividade biológica

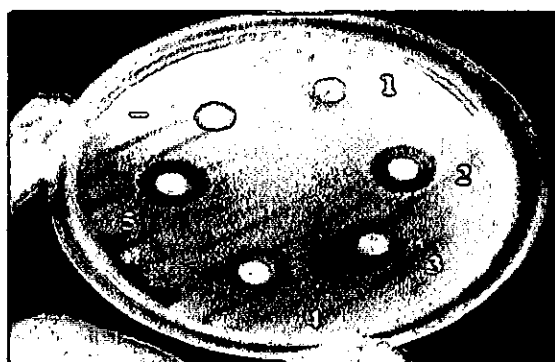


Fig. 1 - Halos de inibição (poços/discos), observados para o *Staphylococcus aureus*, após 24 horas.

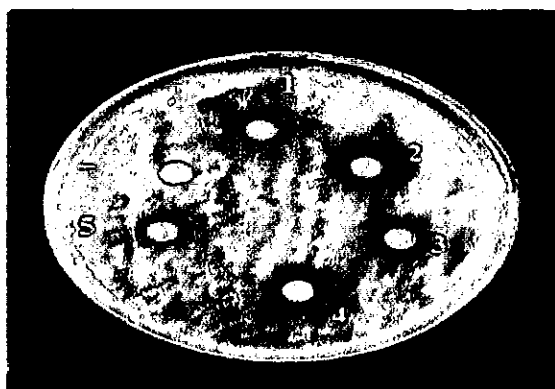


Fig. 2 - Halos de inibição (poços/discos), observados para o *Mycobacterium semegmatis*, após 48 horas.

- Amostra 1 = *Bridelia Cathartica*
- Amostra 2 = *Elephantorrhiza Elephantina*
- Amostra 3 = *Tillandsia Funifera*
- Amostra 4 = *Ximenesia Americana*
- Amostra 5 = *Zanthoxylum Capense*

Fig.1 - Halos de inibição (poços/discos) observados para *Staphylococcus aureus*, após 24 horas

Fig.2 - Halos de inibição (poços/dicos), observados para *Mycobacterium semegmatis*, após 24 horas

Amostra 1 = *Bridelia cathartica*

Amostra 2 = *Elephantorryza elephantina*

Amostra 3 = *Tiliacosa funifera*

Amostra 4 = *Ximenia americana*

Amostra 5 = *Zantoxylum capense*