



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE



FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TRABALHO DE LICENCIATURA

AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS RAÍZES DE *SECURIDACA LONGEPEDUNCULATA* (FRESEN)



Autora: Célia Rita José

Maputo, Dezembro de 2011



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE



FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TRABALHO DE LICENCIATURA

AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS RAÍZES DE *SECURIDACA LONGEPEDUNCULATA* (FRESEN)



Autora: Célia Rita José

Supervisor: Prof. Doutor François Munyemana

Co- Supervisora: dra. Alice Manjate

Maputo, Dezembro de 2011

DEDICATÓRIA

*A Deus, pela força e pela oportunidade
de realizar mais esse sonho.*

*Aos meus pais, Lino José e Gracinda Afonso, pela confiança
em mim depositada e pelo amor incondicional.*

*Às minhas irmãs Sinésia e Benilde, pela força nos momentos
difíceis e pelo constante incentivo.*

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

- A Deus pela sua presença, infinita sabedoria e iluminação sempre que pedi. Pela oportunidade de ser sempre testada e poder vencer as lutas de cada dia.
- Ao meu Supervisor Prof. Doutor François Munyemana, pela sábia orientação, apoio prestado em todas as fases deste trabalho, pela oportunidade de aprender cada vez mais e por sempre me ajudar a alcançar a melhor opção. Pela dedicação e confiança neste trabalho.
- À minha Co-Supervisora dra. Alice Manjate do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da UEM, pelos ensinamentos transmitidos e paciência.
- À dra. Amélia Furvela pela atenção prestada, pela companhia nos momentos de dificuldade e em todos os momentos que sempre precisei de seus conhecimentos e de sua experiência laboratorial.
- À Prof. Dra. Fung Dai Kin pela revisão do presente relatório.
- Aos Técnicos dos Laboratórios da Faculdade de Ciências da UEM e da Microbiologia da Faculdade de Medicina da UEM pela disponibilidade dispensada.
- Ao Senhor Ernesto Boane do Departamento de Biologia da Faculdade de Ciências da UEM, pela ajuda prestada na identificação da planta em estudo.
- À minha família, em especial aos meus pais Lino José e Gracinda Afonso, às minhas irmãs Sinésia José e Benilde José e aos meus sobrinhos Igor e Yuran, pelo amor e incentivo e por estarem presentes no decorrer de todo este trabalho.
- Aos meus colegas, amigos e funcionários do Departamento de Química pelo respeito, amizade, conhecimento transmitidos e pelo auxílio fornecido sempre que necessário.
- A todos aqueles que directa ou indirectamente contribuíram para a concretização deste trabalho de licenciatura.

- Recebam meu sincero MUITO OBRIGADA!

DECLARAÇÃO SOB COMPROMISSO DE HONRA

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

A autora

(Célia Rita José)

ÍNDICE GERAL	PÁGINA
Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Declaração sob compromisso de honra.....	iii
Lista de figuras.....	viii
Lista de tabelas.....	ix
Lista de abreviaturas e siglas.....	x
Lista de anexos.....	xi
Resumo.....	xii

Conteúdos

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJECTIVOS.....	4
2.1. Objectivo geral	4
2.2. Objectivos específicos	4
3. METODOLOGIA	5
4. REVISÃO DA LITERATURA	6
4.1. Caracterização e descrição botânica da planta em estudo.....	6
4.1.1. Descrição taxonómica.....	6
4.1.2. Usos medicinais.....	7
4.1.3. Outros usos.....	8
4.2. Alguns compostos isolados da família Polygalaceae.....	9
4.3. Actividade antimicrobiana	12
4.3.1. Efeito dos agentes antimicrobianos.....	13
4.3.2. Mecanismos de acção de agentes antimicrobianos	13
4.3.3. Resistência aos agentes antimicrobianos	17

4.3.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	18
4.3.5. <i>Salmonella sp, Shigella flexneri e Echerichia coli</i>	19
4.3.6. <i>Vibrio cholerae</i>	22
4.3.7. <i>Candida albicans</i>	24
4.4. Metabólitos secundários com actividade antimicrobiana	25
4.4.1. Alcalóides	25
4.4.2. Esteróides	26
4.4.3. Flavonóides	26
4.4.4. Saponinas	27
4.4.5. Taninos	27
4.4.6. Terpenóides.....	28
5. PARTE EXPERIMENTAL	28
5.1. Colheita e identificação botânica da planta.....	29
5.2. Secagem e moagem da amostra.....	30
5.3. Preparação dos extractos.....	30
5.4.1. Extracção por Maceração.....	32
5.4.2. Extracção por Soxhlet.....	32
5.4.3. Maceração sequencial por ordem crescente de polaridade	32
5.4.4. Preparação dos extractos metanólico e aquoso usados para os testes antimicrobianos	33
5.5. Extracção de alcalóides totais.....	33
5.6. Testes fitoquímicos	35
5.7. Análise cromatográfica	37
5.7.1. Aplicação da amostra.....	37
5.7.2. Desenvolvimento das placas	37
5.7.3. Sistema de detecção.....	37
5.8. Testes antimicrobianos.....	38
5.8.1 Reagentes	38
5.8.2. Equipamento	38
5.8.3. Material.....	38
5.8.4. Microrganismos testados.....	39

5.8.5. Preparação dos meios de cultura	39
5.8.6. Pesagem dos compostos	39
5.8.7. Dissolução em água.....	39
5.8.8. Distribuição do meio	40
5.8.9. Conservação das placas	40
5.8.10. Isolamento de colónias puras	40
5.8.11. Preparação de soluções com diferentes concentrações a partir dos extractos de plantas ..	41
5.8.12. Preparação de discos contendo extractos.....	41
5.8.13. Escolha dos microrganismos.....	41
5.8.14. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA)	42
6. RESULTADOS.....	43
7. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	50
8. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	54
8.1. Conclusões	54
8.2. Recomendações	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
Anexos.....	I

Lista de figuras

Figura 1: Xantonas isoladas de <i>Polygala pulchella</i>	8
Figura 2: Estruturas dos compostos isolados no extracto metanólico das raízes da <i>S. longepedunculata</i>	9
Figura 3: Alguns compostos isolados do extracto de diclorometano obtido das raízes da <i>S. longepedunculata</i>	10
Figura 4: Saponinas isoladas no extracto metanólico das raízes da <i>S. longepedunculata</i>	11
Figura 5: Mecanismo de acção dos antibióticos β -lactâmicos.....	13
Figura 6: Diferentes etapas da tradução que podem ser afectadas por agentes antimicrobianos.....	14
Figura 7: Exemplos de drogas que interferem com a síntese protéica.....	15
Figura 8: Inibição competitiva entre Sulfas e derivados.....	15
Figura 9: Esquema geral das etapas seguidas no trabalho.....	27
Figura 10: Esquema geral para a obtenção dos extractos para os testes antimicrobianos.....	29
Figura 11: Esquema para obtenção dos alcalóides totais.....	32

Lista de tabelas e gráficos

Tabela 1: Diferentes doenças tratadas pela <i>S.longepedunculata</i>	7
Tabela 2: Quantidades obtidas nos extractos do pó das raízes de <i>S. longepedunculata</i>	41
Tabela 3: Quantidades obtidas na extracção sequencial por ordem crescente de polaridade.....	41
Tabela 4: Quantidades obtidas na extracção por maceração.....	42
Tabela 5. Resultados dos testes fitoquímicos dos extractos obtidos das raízes de <i>S. longepedunculata</i>	42
Tabela 6. Resultados dos testes fitoquímicos dos extractos das raízes de <i>S. longepedunculata</i> obtidos na extracção por maceração.....	43
Tabela 7. Actividade antimicrobiana dos extractos das raízes da <i>S. longepedunculata</i> na concentração de 200mg/mL (Halos de inibição em mm).....	44
Tabela 8: Actividade antimicrobiana dos extractos das raízes da <i>S. longepedunculata</i> na concentração de 150mg/mL (Halos de inibição em mm).....	45
Tabela 9: Actividade antimicrobiana dos extractos das raízes da <i>S. longepedunculata</i> na concentração de 100mg/mL (Halos de inibição em mm).....	45
Tabela 10: Actividade antimicrobiana dos extractos das raízes da <i>S. longepedunculata</i> na concentração de 50mg/mL (Halos de inibição em mm).....	46
Tabela 11: Actividade antimicrobiana dos extractos das raízes da <i>S. longepedunculata</i> na concentração de 25mg/mL (Halos de inibição em mm).....	46
Gráfico 1: Índice de Susceptibilidade microbiana para os extractos brutos e das raízes de <i>S.longepedunculata</i>	47
Gráfico 2: Actividade dos extractos brutos das raízes de <i>S.longepedunculata</i> em relação à <i>S. aureus</i>	47

Lista de abreviaturas

AT- Alcalóides Totais

Aq- Aquoso

BCG- Bacillus Calmette-Guérin

C. albicans- *Candida albicans*

CIM- Concentração Inibitória Mínima

DCM – Diclorometano

DNA- Ácido desoxirribonucleico

E. coli- *Escherichia coli*

EtOAc- Acetato de etilo

EP- Éter de Petróleo

HIV- Viros da Imunodeficiência Humana

IIAM- Instituto de Investigação Agrária de Moçambique

Lab- Laboratório

MeOH- Metanol

mRNA- Ácido desoxirribonucleico mensageiro

n-BuOH- n-Butanol

NAD- Nicotinamida adenina dinucleótido

NAG- n-Acetil glucosamina

NAM- n-Acetil murâmico

OMS- Organização Mundial da Saúde

P- Placa

PABA- Ácido para-aminobenzóico

PMT's – Praticantes da medicina tradicional

Rf- Factor de retenção

RNA- Ácido ribonucleico

SIDA- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

S. aureus- *Staphylococcus aureus*

sp- Espécie

S. longepedunculata- *Securidaca longepedunculata* (Fresen)

S. flexneri- *Shigella flexneri*

TLC- Cromatografia em Camada Fina

tRNA- Ácido ribonucleico transmissor

TSA- Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

UEM- Universidade Eduardo Mondlane

V. cholerae- *Vibrio cholerae*

XLD- Xilose-lysina-desoxicolato

Lista de anexos

Anexo 1: Fotografia da *S. longepedunculata*.....I

Anexo 2: Cromatograma de extractos brutos TLC usando a lâmpada UV 254 nmI

Anexo 3: Cromatograma de extractos brutos usando vanilina como revelador.....II

Anexo 4: Cromatograma do extracto de alcalóides totais brutos usando a lâmpada UV 254nm..III

Anexo 5: Cromatograma do extracto de alcalóides totais usando reagente de Drangedroff como reveladorIII

Anexo 6: Fotografia das colónias de diferentes microrganismos usadosIV

Anexo 7: Fotografia do antibiograma da *S. aureus* após 24h de incubação.....V

Resumo

A *Securidaca longepedunculata* (Fresen) é uma planta pertencente a família Polygalaceae a qual é representada por 19 géneros e aproximadamente 1.300 espécies bem distribuídas por todo o mundo.

A família é alvo de diversos estudos fitoquímicos e farmacológicos. Foram identificados vários compostos químicos como: saponinas, xantonas, cumarinas, ácidos gordos, fenóis e alcalóides.

O presente trabalho centralizou-se numa espécie da família Polygalaceae especificamente *S. longepedunculata* a qual foi feita a avaliação da actividade antimicrobiana dos extractos das raízes. Para obtenção dos extractos usou-se o método de maceração sob agitação contínua com diferentes solventes: éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo, n-butanol, água e metanol. Foram realizados testes fitoquímicos preliminares para identificação das principais classes de compostos. Para avaliação da actividade antimicrobiana foram usadas as bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Shigella flexneri*, *Staphylacoccus aureus*, *Vibrio cholerae* e o fungo *Candida albicans*, usando o método de difusão em ágar.

Os testes fitoquímicos realizados mostraram a presença de: alcalóides, esteróides, flavonóides, saponinas, taninos e terpenos nos extractos das raízes.

Na avaliação antimicrobiana os extractos de éter de petróleo, acetato de etilo, aquoso e metanólico apresentaram actividade inibitória no crescimento de quase todas as bactérias testadas excepto *V. cholerae* na concentração de 200mg/ mL.

Nenhum extracto apresentou actividade inibitória contra o fungo *C. albicans*.

A bactéria *S. aureus* mostrou-se mais sensível contra todos os extractos.

Os resultados dos testes antimicrobianos obtidos mostraram um potencial efeito antimicrobiano das raízes de *S. longepedunculata*, que pode ser relacionado com a presença de flavonóides, saponinas e taninos, principalmente de saponinas.

1. INTRODUÇÃO

Em África a medicina tradicional é uma prática comum na qual muitas plantas têm sido usadas para o tratamento de diversas infecções e doenças (Junaid *et al.* 2008).

O aumento de preocupações com questões ambientais e de saúde nos últimos anos, faz com que aumente o interesse por produtos naturais.

Em África existem actualmente mais de 350 espécies de plantas, usadas na medicina tradicional, com actividade antimicrobiana confirmada (Eldeen e Van, 2007). Alguns extractos de plantas apresentaram também efeitos imunomoduladores em diferentes culturas de células e em animais de experimentação (Eloff, 2001). No entanto, ainda há escassez de informação e de validação científica das plantas utilizadas nesta região, como agentes antimicrobianos.

Moçambique possui um importante repertório de diversidade fitogenética. Esta diversidade é usada por cerca de 90% da população rural, para cobrir as suas necessidades de habitação, energia, alimentos e de saúde. Porém, estes recursos fitogenéticos estão ameaçados devido ao desmatamento e às queimadas descontroladas. Considerando que a maioria da população moçambicana vive na zona rural, estudar e preservar os recursos fitogenéticos revela-se importante tendo em conta os benefícios que estes representam na saúde humana e animal nas comunidades.

Os produtos naturais isolados de plantas têm desempenhado um importante papel na descoberta de medicamentos contra uma infinidade de doenças infecciosas.

Estima-se que 75% dos medicamentos anti-infecciosos aprovados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), são medicamentos derivados de plantas (Cragg *et al.*, 1997).

De acordo com a OMS, mais de 65% da população mundial utiliza plantas medicinais em cuidados de saúde primária (Farnsworth, 1985) e, em países em vias de desenvolvimento, 80% da população depende de plantas medicinais locais, para cobrirem as suas necessidades de saúde primária (Who, 2002-2005).

A procura de novos agentes antimicrobianos, a partir de plantas, é intensa devido à crescente resistência dos microrganismos patogénicos frente aos antibióticos actualmente usados.

Muitos extractos de plantas fornecem o seu potencial pela presença de substâncias tais como: taninos e compostos fenólicos. Essas substâncias são geralmente encontradas em várias partes das plantas como raízes, folhas, casca. Muitas plantas têm-se, por isso, tornado fontes de importantes drogas, e as indústrias farmacêuticas têm explorado a medicina tradicional como uma fonte de agentes bioactivos que podem ser usados na preparação de medicamentos sintéticos, no controlo e tratamento de várias infecções e doenças (Junaid *et al.* 2008).

Os antibióticos providenciam a mais importante base na terapia de infecções bacterianas combatendo grande variedade genética de bactérias. Assim, existem pesquisas contínuas com a finalidade de descobrir novos e mais potentes antibióticos. A resistência aos agentes antimicrobianos é um problema crescente em muitos países do mundo, especialmente em países em vias de desenvolvimento (Junaid *et al.* 2008).

Assim, a literatura relata inúmeros métodos de extracção e isolamento de compostos de plantas. O número de pesquisas envolvendo a busca de moléculas activas em plantas, organismos marinhos, insectos e microrganismos, tem vindo a crescer actualmente. Esta observação pode ser vista tanto na área académica como industrial.

No entanto, esta busca de substâncias activas torna-se realmente interessante quando se trata do isolamento de compostos bioactivos, e não só de uma estrutura de um composto novo. Tal facto vem ao encontro da necessidade de estudos fitoquímicos biodirecionados e, portanto, na multidisciplinaridade que envolve botânicos, químicos, farmacólogos e toxicólogos. Neste contexto, pretende-se avaliar a actividade da espécie vegetal *S. longepedunculata*, pertencente à família Polygalaceae, popularmente conhecida por Mulha-lhovo em Maputo. Comum em quase todo o território moçambicano. Esta planta é amplamente usada na medicina tradicional.

S. longepedunculata é uma planta medicinal comumente usada em África, para o tratamento de inúmeras doenças tais como: tuberculose, diarreia, gonorreia, etc. É neste

contexto que no presente trabalho se pretende avaliar a actividade antimicrobiana dos extractos das raízes de *S. longepedunculata*.

2. OBJECTIVOS

2.1. Objectivo geral

- Avaliar o potencial antimicrobiano das raízes de *S. longepedunculata*.

2.2. Objectivos específicos

- Identificar as classes dos compostos químicos presentes nas raízes de *S. longepedunculata*;
- Realizar os testes antimicrobianos dos extractos brutos das raízes da *S. longepedunculata*;
- Estabelecer a relação entre a composição fitoquímica dos extractos e a sua actividade antimicrobiana.

3. METODOLOGIA

O presente trabalho obedeceu à seguinte sequência:

1. Pesquisa bibliográfica: consistiu na recolha de informação usando literatura actual sobre *S. longepedunculata* com especial atenção no que concerne às suas raízes e actividade antimicrobiana;
2. Colheita e preparação da amostra;
3. Extracção: efectuou-se a extracção usando o método de Maceração e Soxhlet;
4. Realização de testes antimicrobianos;
5. Análise dos resultados e considerações finais: a análise dos resultados consistirá na comparação dos resultados obtidos com os da literatura consultada e as considerações finais com base nos resultados. Por fim elaborou-se o relatório de pesquisa.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1. Caracterização e descrição botânica da planta em estudo

4.1.1. Descrição taxonómica



Nome comum: *Securidaca longepedunculata*
(Fresen)

Nomes vernaculares: Mulha-lhovo, nítzatzi, tsate, tsato, tcháché.

Reino: Plantae

Divisão: Magnoliopsida

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Fabales

Família: Polygalaceae

Género: Securidaca

Espécie: *longepedunculata*

Ocorrência e descrição botânica

Moçambique, Angola, Etiópia, Nigéria, Gana, Mali, Botswana, Burundi, Camarões, Senegal, Namíbia, Tanzania, Quênia, Zimbabwe, Zâmbia, Uganda, África do Sul, Serra Leoa, Sudão, Malawi (Nuvunga, 1998).

S. longepedunculata é amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais de África. A planta é comumente referida como "*violet tree*" (em Inglês). É uma pequena árvore, pode atingir 6 a 8 metros de altura, erecta, perene, lenhosa, a casca é lisa de cor cinza pálido. As folhas são alternas, simples, variáveis em tamanho e forma, e geralmente tem 10-40 mm de comprimento e 5-15 mm de largura (Palmer e Pitman, 1972; Van *et al.* 2002).

S. longepedunculata produz flores aglomeradas, atraentes e pequenas de cor rosa ou violeta-púrpura. Cada flor mede aproximadamente 10 mm de comprimento. O fruto é como uma noz mais ou menos arredondado, com asas membranosas que medem mais de 4 cm de comprimento, verde púrpura quando imaturo e castanho quando maduro (Van *et al.* 2002).

4.1.2. Usos medicinais

Em muitas partes de África, as raízes, caule, casca e folhas de *S. longepedunculata* são amplamente utilizados na medicina tradicional, para o tratamento de uma variedade de doenças humanas e de animais. Várias preparações das raízes desta planta são também usadas no tratamento de feridas, úlceras, e também como contraceptivos (Van e Wink, 2004) e no tratamento de diarreia, gonorreia e tosse (Ajali, 2004).

A forma de utilização e a administração variam de acordo com a doença e a parte da planta usada (ver a tabela 1).

A raiz e a casca são administradas por via oral (em pó) ou como infusão, para o tratamento de tuberculose, infertilidade, doenças venéreas, esquizofrenia, furúnculos, febre, diarreia, gonorréia, tosse, cefaléia, reumatismo, indução do aborto, desobstrução de prisão de ventre, alívio de dores de peito, dores de dente, dores de cabeça, entre outras. No leste da África Central e em algumas partes da África Ocidental, a planta é usada para o tratamento de pacientes com SIDA (Ajali, 2004 Nuvunga, 1998 e Adebisi, 2006).

Um estudo recente realizado por Luo *et al.* (2011) mostrou que os extractos obtidos usando n-hexano possuem considerável actividade contra *Mycobacterium bovis* BCG e *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, tendo como principais componentes ácidos gordos insaturados de cadeia linear.

Tabela 01: Diferentes doenças tratadas pela *S. longepedunculata* (Nuvunga, 1998; Van et al. 2002)

Doença	Partes da planta usada	
Constipação	Raíz	Folha
Entorses	Raíz	
Epilepsia	Raíz	
Queimaduras	Raíz	
Diarreia	Raíz	
Diabetes mellitus	Raíz	
Tuberculose	Raíz	

4.1.3. Outros usos

As raízes da *S. longepedunculata* são extremamente tóxicas, e contem salicilato de metilo que em parte, permite explicar a grande diversidade de utilizações. Usam-se como veneno nas flechas em algumas partes da África, incluindo a África Ocidental e como repelente para cobras (Ndou e Sisulu, 2006; Nuvunga, 1998).

A casca é usada para fazer sabão, e as fibras, para redes de pesca (Ndou e Sisulu, 2006; Nuvunga, 1998).

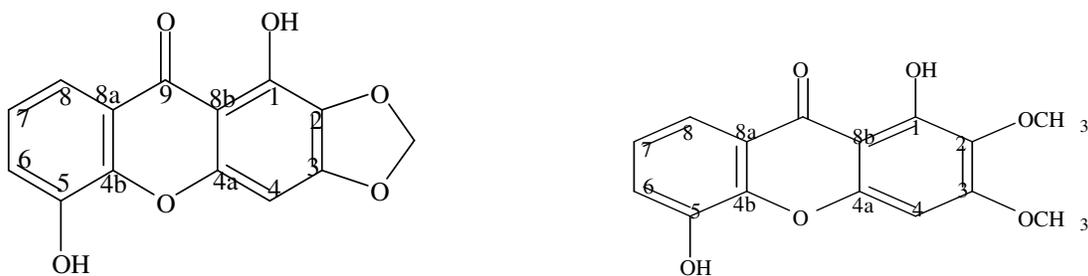
A planta é adequada para produção de mel, pois existe muita frequência de abelhas nas flores e as folhas jovens são usadas no consumo humano. A madeira é pálida, mole, esponjosa, muito leve e frágil e é considerada de pouco valor. É usada na construção de pólos de cabana, arcos e vassouras (Van *et al.* 2002).

4.2. Alguns compostos químicos isolados da família Polygalaceae

As plantas da família Polygalaceae são predominantemente encontradas em regiões tropicais. Os membros desta família são conhecidos por conterem uma grande diversidade de compostos químicos, muitos dos quais exibem significantes actividades biológicas. Investigações fitoquímicas em diferentes espécies de *Polygala* (família

Polygalaceae) revelaram vários compostos incluindo ligninas citotóxicas, saponinas, xantonas, cumarinas e flavonóides (Soares, 2008).

O estudo fitoquímico realizado com extractos das folhas, caules e raízes secas da espécie *Polygala pulchella* usando diclorometano revelou a presença de duas xantonas, (1) 1,5-dihidroxi-2,3- metilenodioxixantona e (2) 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona (Missau *et al*, 2009). As suas estruturas estão representadas na figura 1.



(1) 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona

(2) 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona

Figura 1: Xantonas isoladas de *Polygala pulchella*

Várias actividades biológicas têm sido descritas em algumas espécies de *Polygalas*. Entre elas destacam-se *Polygala tenuifolia* com propriedades expectorante, sedativa, tônica, doenças de Alzheimer's, anti-stress, *P. caudata* muito utilizada para o tratamento de tosse, hepatite e como agente sedativo e expectorante, *P. telephioides* como desintoxicante de narcóticos, *P. sabulosa* com propriedades anticonceptivas e anestésico local, *P. cyparissias* com propriedades antinociceptivas, anestésico de uso tópico e analgésica, *P. alpestris* com actividade antioxidante, e citotóxica, entre outras (Soares, 2008).

Existem vários compostos que foram isolados da *S. longepedunculata*, entre eles podemos destacar: saponinas, salicilato de metil e diferentes monossacarídeos, como glicose e frutose, alcalóides, taninos, flavonóides, etc (Junaid *et al*. 2008).

Por exemplo, Jayasekara *et al*, (2002), no seu estudo, isolaram no extracto metanólico 3 compostos: (3)-2-hidroxi-benzoato de metil (salicilato de metilo), (4)-2-hidroxi-6-

metoxibenzoato de metilo e (5) - 2-hidroxi-6-metoxibenzoato de benzilo. As estruturas se apresentam na figura 2.

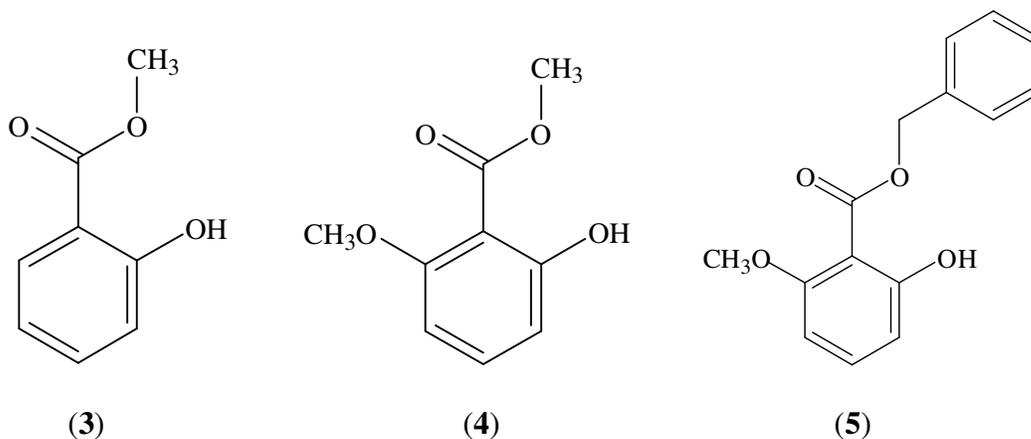


Figura 2: Estruturas dos compostos isolados no extracto metanólico das raízes da *S. longepedunculata* (Jayasekara *et al.* 2002).

Joseph *et al.* (2006), isolaram uma variedade de composto do extracto diclorometano das raízes da *S. longepedunculata*: (6) (4-metoxi-benzo [1,3]dioxol-5-il)-fenilmetanona; (7) 1,7-dihidroxi-4-metoxixantona; (8) 2-hidroxi -6-metoxibenzoato de benzil e (9) 2-hidroxi-6-metoxibenzoato de metil (Ver figura 3).

O composto (6) apresentou actividade antibacteriana contra *Aeruginosa pseudomonous* e actividade antifúngica contra *Aspergillus fumigatus*. O composto (7) apresentou actividade antibacteriana contra *S. aureus* e actividade antifúngica contra *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* e uma espécie *Penicillum*. Os compostos (8) e (9) foram inactivos contra todas as bactérias e fungos testados.

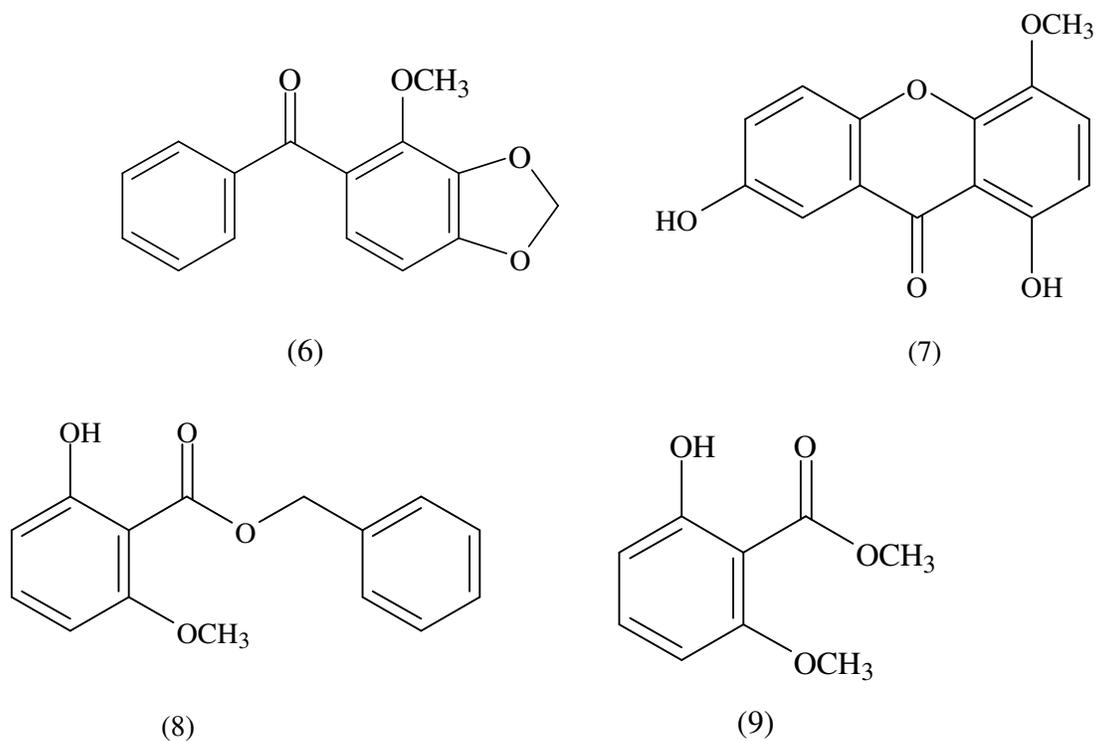


Figura 3: Alguns compostos isolados do extracto de diclorometano obtido das raízes da *S. longepedunculata* (Joseph *et al.* 2006).

Duas saponinas bidesmosídicas foram isoladas a partir do extracto metanólico das raízes de *S. longepedunculata*, **securidacasida A** e **securidacasida B**, (Figura 4) (Stevenson *et al.* 2009).

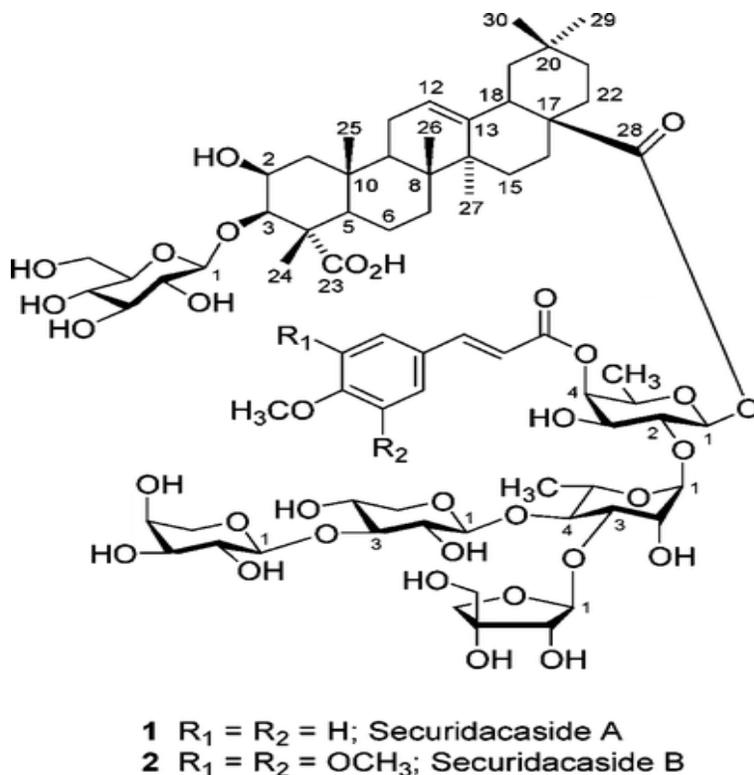


Figura 4: Saponinas isoladas no extracto metanólico das raízes da *S. longepedunculata* (Stevenson *et al.* 2009).

4.3. Actividade antimicrobiana

Os antimicrobianos são importantes componentes do sistema imunitário de muitas espécies e compreendem três grandes classes: antibacterianos, antiprotozoários e antifúngicos.

Antibióticos são metabólitos microbianos ou análogos sintéticos capazes de inibir processos vitais de outros organismos, mesmo em concentrações diminutas, sem causar toxicidade elevada ao hospedeiro.

A actividade antimicrobiana dos produtos naturais de origem vegetal, tanto extractos de plantas como substâncias puras, pode ser detectada quando se coloca essas amostras em

contacto com vários microrganismos, e se observa a resposta do crescimento microbiano (Ajali, 2004).

A actividade antimicrobiana de um composto pode ser quantificada com base na determinação da concentração mínima do composto, capaz de inibir o crescimento de um dado microrganismo, um valor chamado **CIM** (Concentração Inibitória Mínima). Este valor pode ser determinado através do **método de diluições sucessivas** ou do **método de difusão em agar**, ou ainda através do uso de tiras contendo um gradiente de concentração de antibiótico, conhecido como E-teste.

4.3.1. Efeito dos agentes antimicrobianos

É possível observar três tipos de efeito distintos quando um agente antimicrobiano é adicionado a uma cultura bacteriana na fase exponencial do crescimento (O **crescimento exponencial** de uma população microbiana em suspensão em meio líquido, é caracterizado pela duplicação do número de células e, por conseguinte, da biomassa ali existente). **Efeito bacteriostático**: o crescimento é inibido, mas não ocorre morte celular. Os agentes bacteriostáticos são frequentemente inibidores de síntese protéica e actuam por ligação aos ribossomas; **Efeito bactericida**: ocorre morte das células mas não há lise celular; **Efeito bacteriolítico**: há indução da morte celular por lise, levando à diminuição da turbidez da cultura e do número de células viáveis (célula capaz de se multiplicar e dar origem a duas células filhas). Exemplos de agentes bacteriolíticos são os antibióticos que inibem a síntese da parede celular em bactérias, como é o caso da penicilina (Atlas, 1997).

4.3.2. Mecanismos de acção de agentes antimicrobianos

Vários são os possíveis alvos para os agentes antimicrobianos. O conhecimento dos mecanismos de acção destes agentes permite entender a sua natureza e o grau de toxicidade selectiva de cada droga, figuras 5, 6, 7 e 8.

1) Inibição da síntese da parede celular

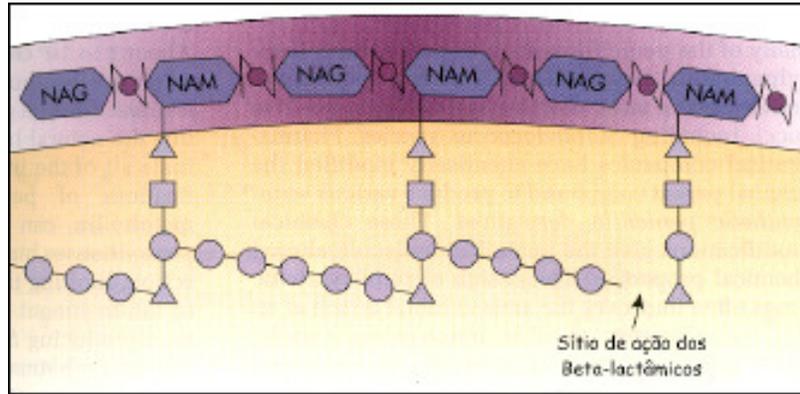


Figura 5: Mecanismo de acção dos antibióticos β -lactâmicos (Adaptado de Atlas, 1997)

Os inibidores da síntese da parede celular, são os agentes antimicrobianos mais selectivos, apresentando um elevado índice terapêutico (Atlas, 1997).

Como exemplo dos inibidores da síntese da parede celular, temos as **Penicilinas, ampicilinas e cefalosporinas**, que contém na sua estrutura um anel β -lactâmico, que interage com proteínas denominadas PBPs (Penicillin Binding Protein), inibindo a enzima envolvida na transpeptidação, responsável pela ligação entre as cadeias de tetrapeptídeos do peptidoglicano. Com isso, há o impedimento da formação das ligações entre os tetrapeptídeos de cadeias adjacentes de peptidoglicano, ocasionando uma perda na rigidez da parede celular. Acredita-se também que tais drogas podem actuar promovendo a activação de enzimas autolíticas, resultando na degradação da parede celular. Outros inibidores da síntese da parede celular são a **Bacitracina**: que interfere com a acção do transportador lipídico que transporta os precursores da parede pela membrana, resulta na não formação das ligações entre o NAM e NAG, e a **Vancomicina** que liga-se directamente à porção tetrapeptídica do peptidoglicano. É ainda a droga de escolha para linhagens resistentes de resultados na *S. aureus* (Atlas, 1997).

2) Inibição da síntese de ácidos nucleicos

Os inibidores da síntese de ácidos nucleicos são de selectividade variável. Por exemplo a **Novobiocina** liga-se à DNA girase, afectando o desenvolvimento do DNA, impedindo a sua replicação. As **Quinolonas** inibem a DNA girase, afectando a replicação, transcrição e reparção. A **Rifampicina** liga-se à RNA polimerase-DNA-dependente, bloqueando a transcrição (Atlas, 1997).

3) Inibição da tradução

São geralmente bastante selectivos. Constituem um dos principais grupos de agentes antimicrobianos, uma vez que a síntese protéica corresponde a um processo altamente complexo, envolvendo várias etapas, diversas moléculas e estruturas. **Estreptomicina e gentamicina**: ligam-se à subunidade ribossomal 30S, bloqueando-a e promovendo erros na leitura do mRNA. Interferem com a formação do complexo de iniciação. **Tetraciclina**: liga-se à subunidade ribossomal 30S (sítio A), impedindo a ligação do aminoacil-tRNA. **Cloranfenicol**: liga-se à subunidade ribossomal 50S e inibe a ligação do tRNA da peptidil transferase, inibindo a elongação. **Eritromicina**: liga-se à subunidade ribossomal 50S e inibe o processo de elongação (Mathew *et al.* 2007) (Figura 6).

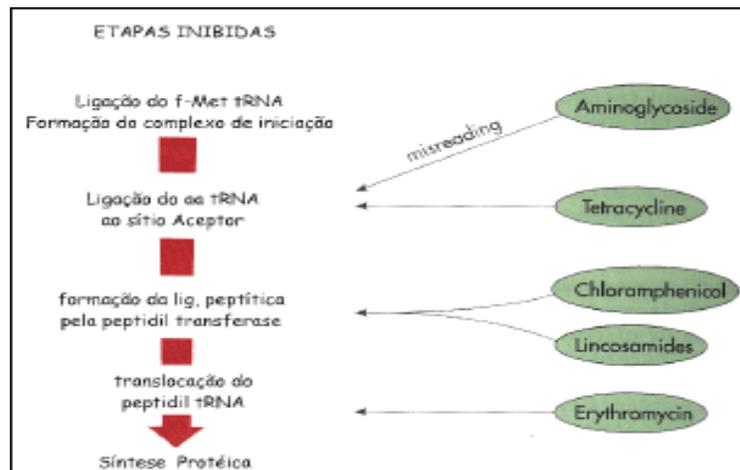


Figura 6: Diferentes etapas da tradução que podem ser afectadas por agentes antimicrobianos (Adaptado de Atlas, 1997).

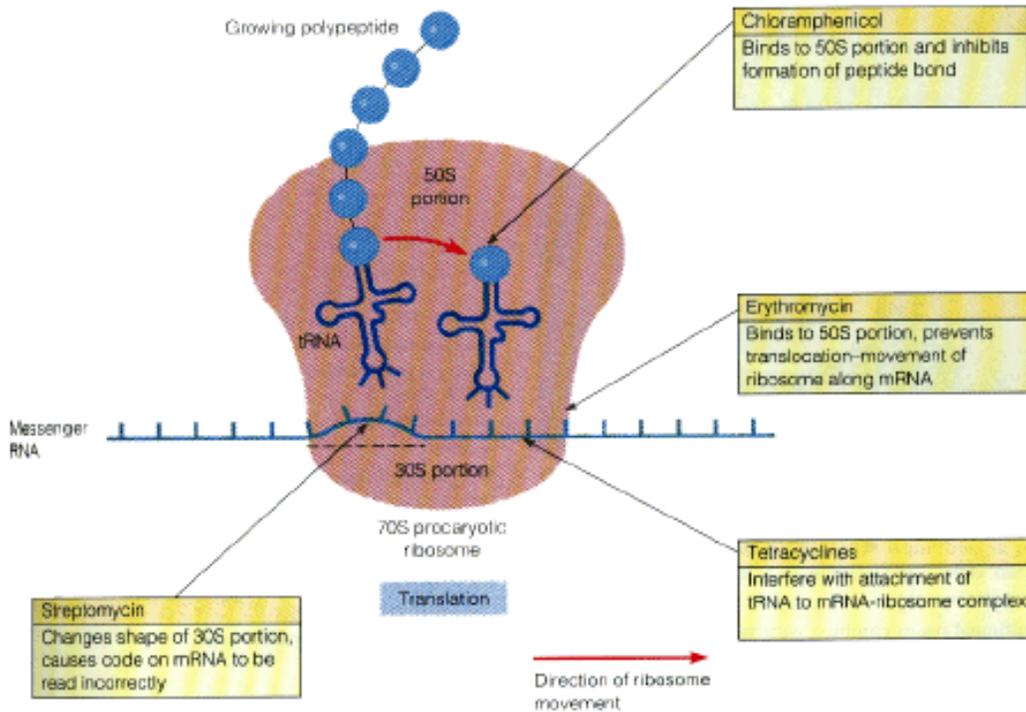


Figura 7: Exemplos de drogas que interferem com a síntese protéica (Adaptado de Atlas, 1997).

4) Antagonismo metabólico

O antagonismo metabólico, geralmente ocorre por um mecanismo de inibição competitiva. Um exemplo de drogas que actuam por este mecanismo são as **Sulfas** e seus derivados, que actuam inibindo a da síntese do ácido fólico, pela competição com o PABA. Por exemplo o antibiotco **Trimetoprim** bloqueia a síntese do tetraidrofolato, inibindo deste modo a enzima dihidrofolato redutase. A **Isoniazida** afecta o metabolismo do NAD ou piridoxal, inibindo a síntese do ácido micólico – “factor corda” (Atlas, 1997).

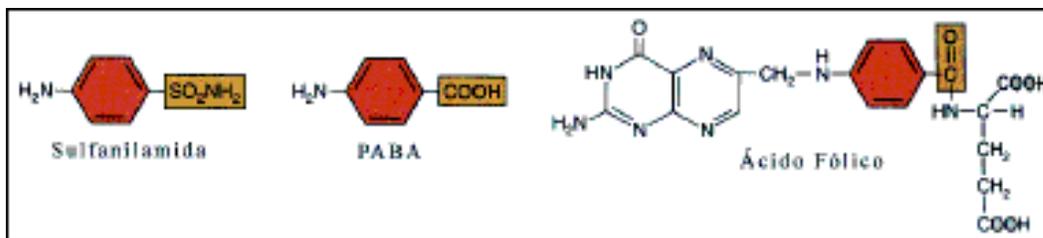


Figura 8: Inibição competitiva entre Sulfas e derivados.

4.3.3. Resistência aos agentes antimicrobianos

Este tema tornou-se motivo de preocupação crescente entre os profissionais da área de saúde, pois a cada ano observa-se um aumento de linhagens resistentes aos mais diversos agentes antimicrobianos.

A resistência microbiana aos antimicrobianos pode ser de dois tipos: natural – que é dependente da natureza da própria bactéria, adquirida - através de mutações espontâneas e selecção, ou por recombinação após transferência de genes.

Dentre os principais mecanismos de resistência podemos citar:

Impermeabilidade à droga: muitas bactérias Gram negativas são resistentes à penicilina-G por serem impermeáveis à droga, ou por apresentarem alterações em proteínas de ligação à penicilina. No caso das sulfonamidas, o microrganismo pode também apresentar uma menor permeabilidade à droga.

Inativação: muitas drogas são inativadas por enzimas codificadas pelos microrganismos. Por exemplo, a penicilinase (β -lactamase) é uma enzima que cliva o anel β -lactâmico inactivando a droga. Outras drogas podem ser inativadas em decorrência de modificações introduzidas pelo microrganismo, tais como a adição de agrupamentos químicos. Assim, muitos microrganismos são capazes de promover a fosforilação ou acetilação de antibióticos.

Modificação da enzima ou estrutura alvo: por exemplo, alterações na molécula do rRNA 23S no caso de resistência à eritromicina e ao cloranfenicol, alteração da enzima, no caso de drogas que actuam no metabolismo, ou uso de vias metabólicas alternativas.

Bombeamento para o meio: efluxo da droga. No caso da resistência às tetraciclinas, em bactérias entéricas.

4.3.4. *Staphylococcus aureus*

Características gerais

O género *Staphylococcus* é composto por cerca de 27 espécies, sendo algumas delas causadoras de infecções de carácter oportunista em seres humanos e animais, como o *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus haemolyticus*. Um marcador de patogenicidade destes microrganismos é a capacidade de coagular o plasma. Os *Staphylococcus* são amplamente distribuídos na natureza e fazem parte da microbiota normal da pele e mucosa (Koneman *et al.* 2001; Murray *et al.* 2006; Trabulsi *et al.* 1999).

S. aureus - são cocos Gram positivos com disposição em cachos, imóvel e não formadores de esporos, pertencentes à família micrococcaceae. São catalase positivos. Este microrganismo coloniza com frequência a pele e membranas mucosas sem causar infecção. A existência de pequenas roturas da barreira muco-cutâneo permite a penetração desta bactéria em tecidos, e causar uma grande variedade de infecções e quadros clínicos devido à produção de toxinas (Jawetz *et al.* 2010).

S.aureus está geralmente envolvida em infecções piogénicas humanas tanto de origem comunitária como hospitalar, localizadas na pele (foliculites, furunculose, impetigo, pústulas ou abscessos cutâneos) ou em regiões mais profundas (osteomielites, bacteremias, endocardite, pneumonia e toxinfecções alimentares) (Jawetz *et al.* 2010).

Esta espécie está também implicada na intoxicação alimentar. A doença é causada pela toxina bacteriana presente no alimento, e não por efeito directo do microrganismo no paciente. Os alimentos mais comumente contaminados são carnes processadas (como presunto), carne de porco salgada, bolos recheados com creme, salada de batatas e

sorvete. O crescimento desta bactéria em carnes salgadas é consistente à habilidade deste microrganismo crescer em concentrações altas de sal. Ao contrário de outras intoxicações alimentares, em que um reservatório animal é importante, a intoxicação alimentar por estafilococos resulta da contaminação do alimento por um portador humano (Murray *et al.* 2006).

Actualmente, a espécie coagulase negativa também tem sido responsável por infecções graves em pacientes imunocomprometidos, ou submetidos a implantes de orteses e próteses, nos ambientes hospitalares (Koneman *et al.* 2001; Murray *et al.* 2006; Trabulsi *et al.* 1999).

➤ **Características das colónias** (Ver anexo VI)

No meio de cultura Agar sangue: as colónias de *S. aureus* são brancas ou por vezes douradas. Produzem uma hemólise total ou β -hemólise. São aeróbios ou anaeróbios facultativos, crescem bem no meio Agar sangue a 37°C.

A sua identificação é feita com as provas de coagulase, manitol e termonuclease, nas quais são positivas (Murray *et al.* 2006).

4.3.5. *Salmonella sp*, *Shigella flexneri* e *Echerichia coli*

Características gerais

São membros da família enterobacteriaceae, o maior e o mais heterogéneo conjunto de bacilos Gram-negativos, clinicamente importantes. Um total de 40 géneros e 150 espécies. As enterobacteriaceae são organismos ubiqüitários, encontrados no solo, na água e na vegetação, e são parte da microbiota intestinal da maioria dos animais, incluindo os humanos (Murray *et al.* 2006).

Apesar da complexidade dessa família, menos de 20 espécies são responsáveis por mais de 95% das infecções. Porém, *Shigella* e *Salmonella*, são imóveis, anaeróbias facultativas, oxidase-negativos e catalase positivos. Reduzem nitratos a nitritos, e são também lactoses negativas (Murray *et al.* 2006).

a) ***Salmonella sp***:

Salm. sp: pode colonizar praticamente todos os animais incluindo animais domésticos, répteis, gado, roedores, pássaros e humanos. A disseminação entre animais e o uso de rações contaminadas com *Salmonella* mantém um reservatório animal. Serotipos como *S. typhi*, e *S. paratyphi* estão altamente adaptados a humanos e não causam doenças em outros hospedeiros. Outras estirpes de *Salmonella* (*S. choleraesuis*) estão adaptadas a animais e, quando infectam humanos podem causar doenças graves. Outras estirpes não apresentam especificidade em relação ao hospedeiro, podendo causar doenças em humanos e não-humanos.

A maioria das infecções resulta da ingestão de alimentos contaminados e, em crianças, da disseminação fecal-oral directa. As infecções ocorrem em todo o mundo, particularmente nos meses quentes (Murray *et al.* 2006).

Doenças causadas por *Sal sp*:

Febre tifóide ou paratifóide, enterite caracterizada por febre, náuseas, vômitos, diarreia sanguinolenta ou não-sanguinolenta e cólicas abdominais, bacteremia e colonização assintomática (Murray *et al.* 2006).

Características das colónias de *Sal. sp* (ver anexo VI)

A classe taxonómica do género *Salmonella* é problemática, com a descrição de 2,463 sorogrupos peculiares. A análise cuidadosa da homologia do DNA revelou que o género consiste em 2 espécies: *Salmonella entérica* e *Shigella bongori*.

No meio de cultura XLD (Xylose-lysine-deoxycholate): As colónias são rosadas com pontos negros resultantes da produção de H₂S, são produtoras de gás e são lactose e sacarose positivas (Murray *et al.* 2006).

b) *Shigella flexneri*

Foram descritas 4 espécies, constituídas de mais de 45 sorogrupos com base no antígeno O: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* e *S. Sonnei*. A shigelose é uma doença essencialmente pediátrica; 70% das infecções ocorrem em crianças com menos de 15 anos. A doença endémica em adultos é comum entre homossexuais masculinos e contactos domésticos de crianças infectadas. A shigelose é transmitida pela via fecal-oral, principalmente por pessoas com mãos contaminadas e, com menos frequência, através da água e alimentos. Como é necessário um inóculo muito pequeno, de até 200 bactérias, para produzir doença, a shigelose dissemina-se rapidamente em comunidades onde os padrões sanitários e o nível de higiene pessoal são baixos. A doença ocorre em todo o mundo e não apresenta incidência sazonal (Murray *et al.* 2006).

Doenças causadas por *S. flexneri*

Gastroenterite (shigelose)- a forma mais comum é uma diarreia aquosa inicial progredindo em 1 a 2 dias para cólicas abdominais e tenesmo (com ou sem fezes sanguinolentas). A forma mais grave da doença é causada por *S. dysenteriae*. Contudo alguns pacientes tornam-se assintomáticos (reservatórios para futuras infecções) (Murray *et al.* 2006).

Características das colónias de *S. flexneri* (ver anexo VI)

No meio de cultura MacConkey ou XLD: As colónias são pequenas, pontifinas, avermelhadas, não produtoras de H₂S ou de gás (Murray *et al.* 2006).

c) *Escherichia coli*

O género *Escherichia* consiste em 5 espécies, das quais a *E.coli* é a mais comum e clinicamente importante. Um grande número de *E. coli* está presente no tracto gastrointestinal, e estas bactérias são comumente causadoras de sepsé, meningite neonatal, infecções do tracto urinário e gastroenterite. Como esperado, a profusão de estirpes capazes de causar doenças reflecte-se na diversidade antigénica das bactérias. A

maioria das infecções é endógena (microbiota normal do paciente); as estirpes que causam gastroenterite são normalmente adquiridas exogenamente (Murray *et al.* 2006).

Doenças causadas por *E. coli*

Bacteremia, gastroenterites, infecções do tracto urinário limitadas à bexiga (cistite), podendo-se disseminar para os rins (pielonefrite) ou próstata (prostatite), meningite neonatal e infecções intra-abdominais associadas à perfuração intestinal (Murray *et al.* 2006).

Características das colónias de *E. coli* (ver anexo VI)

As colónias de *E.coli* são lactose e lisina descarboxilase negativos e imóveis. No meio Agar MacConkey apresentam cor rosada e forma arredondada (Murray *et al.* 2006).

4.3.6. *Vibrio cholerae*

O género *Vibrio* é composto por muitas espécies de bacilos curvos, e 12 espécies foram implicadas em infecções humanas. O *Vibrio cholerae*, o *Vibrio parahaemolyticus* e o *Vibrio vulnificus* são os mais proeminentes (Murray *et al.* 2006).

Características gerais

O *V. cholerae* é o agente etiológico de uma diarreia secretória (cólera), que se desenvolve com a ingestão de água e alimentos contaminados por via fecal-oral.

São bacilos Gram-negativos curvos, anaeróbios facultativos, fermentadores. Exigências nutricionais simples, não necessitam de sal para crescer mas podem tolera-lós. Apresentam cepas subdivididas com base no antígeno O de parede celular (Murray *et al.* 2006).

O *V. cholerae* tem baixa tolerância a ácidos, e cresce a um pH de 8,0 a 9,5 (o qual inibe muitas outras bactérias Gram-negativas). É diferenciado de outros vibriões pelas suas características metabólicas, pela estrutura do antígeno O, e pela produção de uma potente endotoxina. As espécies patogénicas limitam-se aos sorogrupos *O1* e *O139* (encontrada na Ásia) e à variante *Eltor* (encontrada na América Latina). Esta última variante apresenta uma sobrevivência maior na natureza, e suas características de patogenia, é capaz

de produzir com maior frequência infecções subclínicas --- características que dificultam o seu controlo epidemiológico. Outras estirpes, designadas como *não O1*, *não O139*, associam-se a quadros menos frequentes, mais brandos e não epidémicos de diarreia (Murray *et al.* 2006).

A principal característica do *V. cholerae* é a sua capacidade de produzir uma potente enterotoxina, cujo exacto mecanismo de acção é ainda desconhecido. Estudos indicaram que uma estirpe defectiva na produção desta toxina poderia ser utilizada na produção de vacinas; entretanto, em estudos com voluntários estas estirpes foram capazes de produzir diarreia, levando a crer que o *V. cholerae* produz outras toxinas. Estas incluem a toxina *zot* e a toxina *ace*, ligadas aos genes *ctxA* e *ctxB* no cromossomo bacteriano (Kenneth e Ray, 1994)

Doença causada por *V. cholerae*

Cólera: começa com o surgimento de diarreia aquosa e vómito e podendo progredir para desidratação grave; **Gastroenterite:** forma mais branda da doença diarreica, pode ocorrer com estirpes de *V. cholerae* dos serotipos O1 ou não-O1, não produtoras de toxinas (Murray *et al.* 2006).

Características das colónias de *V. cholerae*

O crescimento deste microrganismo requer meios contendo NaCl. Antes da cultura em meio sólido, as bactérias precisam de ser enriquecidas num meio de enriquecimento, como a água peptona alcalina.

V. cholerae é fermentadora de sacarose. No meio de cultura tiosulfato, citrato e sais biliares (TCBS), que é o meio selectivo para o isolamento de *V. cholerae*, esta bactéria aparece sob a forma de colónias amarelas de dimensões médias lisas e opacas (Downes, 2001).

Cultura

Os *Vibrios* crescem na maioria dos meios utilizados em laboratórios clínicos para cultura de fezes, incluindo ágar-sangue e ágar de MacConkey. Podem também ser utilizados ágar

selectivos especiais para vibriões, bem como caldo de enriquecimento. Os microrganismos isolados podem ser identificados por testes bioquímicos selectivos e sorotipagem utilizando-se anti-soro polivalente. Nos testes para identificar vibriões halofílicos, os meios devem ser suplementados com cloreto de sódio a 1% (Murray *et al.* 2006).

4.3.7. *Candida albicans*

Características gerais

São leveduras de forma oval, têm entre 2 a 6 µm de diâmetro. Apresentam brotos, e hifas e pseudo-hifas.

Os membros do género *Candida* são microrganismos comensais, aeróbios, e fazem parte da flora microbiana indígena em seres humanos. Podem ser encontrados na cavidade oral e do aparelho digestivo, bem como no tracto vaginal (Odds, 1988). Eles podem-se tornar patógenos oportunistas causando uma série de doenças em hospedeiros imunodeprimidos sobretudo em pacientes HIV-positivos (Erkose e Erturan, 2007).

Uma característica particular da *Candida* é a sua capacidade de invadir tecidos de mucosa oral através do desenvolvimento de hifas, que aderem às superfícies dos tecidos e leva à inflamação (Ellepola e Samaranayake, 2001). Embora a colonização por *C. albicans* seja comum em pacientes imunocomprometidos, onde causa ferimentos graves, outras espécies de *Candida* têm sido isoladas de pacientes saudáveis e de crianças com síndrome de Down, tais como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. Dubliniensis* (Erkose e Erturan, 2007 e Ribeiro *et al.* 2006).

Doenças causadas por *C. albicans*

Candida sp são colonizadores conhecidos do homem e de outros animais de sangue quente e, como tal, são encontradas no homem e na natureza em todo o mundo. O principal sítio de colonização é o tracto gastrointestinal, desde a boca até recto. Esses microrganismos também podem ser encontrados como comensais na vagina e na uretra, na pele, e sob as unhas das mãos e dos pés (Murray *et al.* 2006).

A fonte predominante da infecção é o próprio paciente ou seja, endógena nas quais a flora normalmente comensal do hospedeiro se aproveita da “oportunidade” para causar a infecção.

As infecções por *Candida* incluem: infecção orofaríngea, esofagite, infecção vulvovaginal, infecções da pele e das unhas, candidíase muco-cutânea crónica, pneumonia, endocardite, pericardite, infecção do sistema nervoso central, infecção ocular, infecção dos ossos e articulações, infecção abdominal e infecções hematogénicas (Murray *et al.* 2006).

Características das colónias (ver anexo VI)

No meio de cultura Agar sabourand dextrose: As colónias são brancas, com cheiro a fermento de pão. Quando incubadas no plasma por 3 horas a 37°C, apresentam pseudofilamentos no meio, prova de tubo germinativo (Murray *et al.* 2006).

Testes adicionais para a identificação

Produção do tubo germinativo e assimilação de carboidratos.

4.4. Metabólitos secundários com actividade antimicrobiana

Os metabólitos secundários são substâncias que geralmente não estão envolvidas em funções vitais das plantas, geralmente não fazem parte do metabolismo básico e possuem características químicas muito variadas e às vezes bem complexas.

Dos metabólitos secundários com actividade antimicrobiana encontram-se:

4.4.1. Alcalóides

Não existe uma definição exacta para os alcalóides. A definição actualmente aceite para alcalóides deve ser a de *Pelletier* que considera alcalóides as moléculas cíclicas que contêm azoto e que são verdadeiros metabólitos secundários. Esta definição exclui as aminas simples, os derivados de amoníaco acíclicos e ainda os compostos nitro e nitrosos (uma vez que nos alcalóides o átomo de azoto tem de possuir estado de oxidação negativo). Os alcalóides formam um grupo muito vasto de metabólitos que podem ocorrer tanto em microrganismos como em plantas superiores e inferiores ou ainda em

animais, apesar de nestes últimos ocorrerem com muito menor frequência (Morrison e Boyd, 2005 e Campos, 2002).

4.4.1.1. Propriedades biológicas dos Alcalóides

Está comprovada a função protectora dos alcalóides nas plantas, por serem tóxicos. No entanto, acredita-se que actuam também como reserva de nitrogénio, reguladores do crescimento, do metabolismo interno e da reprodução, como agentes de desintoxicação e transformação simples de outras substâncias nocivas ao vegetal ainda como protectores contra os raios UV (Oliveira *et al.* 2000).

Alguns alcalóides são usados como potenciais agentes antimaláricos, antimicrobianos, anticancerígenos, antiinflamatória, no tratamento de diabetes, como afrodisíaco, vasodilatador, anti-séptico, cicatrizante, estomática e outras indicações (Oliveira *et al.* 2000).

4.4.2. Esteróides

Os esteróides são compostos que apresentam na sua estrutura química denominada ciclo-pentano-peridro-fenantreno. Eles formam um grande grupo de compostos solúveis em gordura (lipossolúveis), que têm uma estrutura básica de 17 átomos de carbono dispostos em quatro anéis ligados entre si (Campos, 2002).

4.4.2.1. Propriedades biológicas dos Esteróides

Em várias especialidades estes são denominados de anti-inflamatórios hormonais usados no tratamento de diversas infecções na forma tópica (pomadas, soluções) ou sistémicas (oral, inalatório, intramuscular e intravenoso) (Campos, 2002).

4.4.3. Flavonóides

Os Flavonóides são compostos químicos, com estrutura polifenólica e de baixo peso molecular, encontrados naturalmente nas plantas (folhas, flores, nozes, sementes e nas raízes).

4.4.3.1. Propriedades biológicas dos Flavonóides

Entre as várias actividades biológicas relatadas para os flavonóides podemos citar: antioxidante, antialérgica, anti-inflamatória, antiviral, anticarcinogénico, vasoprotectora, antimicrobiana, anti-hepatotóxica e insecticida.

Alguns flavonóides que não possuem radicais hidroxilos não apresentam actividade sequestradora de radicais, ao contrário de flavonóides que apresentam na sua estrutura o anel catecol (estrutura orto-dihidroxi), estes possuem alta capacidade antioxidante. Esta actividade aumenta nas seguintes classes: isoflavonas <flavanonas <flavonas <chalcona <flavonóis, porém, individualmente alguns compostos destas classes não seguem esta ordem (Nico, 2006).

4.5.4. Saponinas

Saponinas são glicosídeos produzidos por plantas, formados por uma aglicona policíclica (um triterpeno ou um esteróide) e uma cadeia sacarídica. Essas biomacromoléculas podem apresentar acções antitumorais, antivirais, anti-inflamatórias e antitrombóticas.

A diferença na polaridade dos elementos que compõem a molécula das saponinas é responsável pela capacidade das mesmas de reduzirem a tensão superficial da água levando à formação de espuma, quando em solução aquosa (Nico, 2006).

4.4.4.1. Propriedades biológicas das Saponinas

As saponinas triterpénicas são um grupo de compostos naturais que apresentam um amplo espectro de actividades biológicas e farmacológicas. A sua actividade mais comum é a capacidade de produzir hemólise. Essa actividade hemolítica das saponinas, que faz parte do sistema de protecção vegetal ou das plantas contra ataques de predadores (insectos, vírus, fungos e bactérias), está ligada a muitas das actividades antibacterianas, antifúngicas e espermicidas apresentadas por uma diversidade de plantas (Diniz, 2006).

4.4.5. Taninos

Taninos são substâncias de composição química variável, apresentam uma característica comum: são hidrossolúveis, possuem a capacidade de coagular as albuminas, os metais e os alcalóides (Taiz e Zeiger, 2006). São divididos em duas grandes classes: os **taninos hidrolisáveis** e os **taninos condensados** (Bruyne *et al.* 1999 e Khanbabae e Ree, 2001).

4.4.5.1. Propriedades biológicas dos Taninos

- São usados no tratamento de diarreias, em problemas estomacais (azia, gastrite, úlcera gástrica, tumores de estômago e duodeno) e também como anti-sépticos, anti-inflamatórios, antioxidante e hemostáticos (ou seja que suspende as hemorragias favorecendo a coagulação).
- Os taninos também possuem actividade antimicrobiana pelo que têm sido usados por via externa para tratamento de infecções da boca (Bruyne *et al.* 1999 e Khanbabaee e Ree, 2001).

4.4.6. Terpenóides

Os triterpenóides são produtos naturais que pertencem à classe dos terpenos, e derivam dos mesmos ou dos sesquiterpenos. Geralmente são substâncias insolúveis em água, sintetizados a partir de intermediários glicolíticos.

4.4.6.1. Propriedades biológicas dos Terpenóides

Os terpenóides que ocorrem naturalmente, apresentam propriedades antiinflamatórias e antinoceptivas, inibem a agregação plaquetária e interferem a nível intracelular em vários passos do mecanismo de transdução. São também bacterianos, fungicídicos, anti-virais, analgésicos, cardiovasculares, antitumorais (Taiz e Zelger, 2006).

5. PARTE EXPERIMENTAL

Nesta parte são apresentados os procedimentos usados neste trabalho desde a colheita da amostra até à realização dos ensaios laboratoriais de acordo com os objectivos definidos e com as condições técnicas e materiais disponíveis.

Na figura 9 está esquematizada a sequência das actividades seguidas durante a realização do presente trabalho.

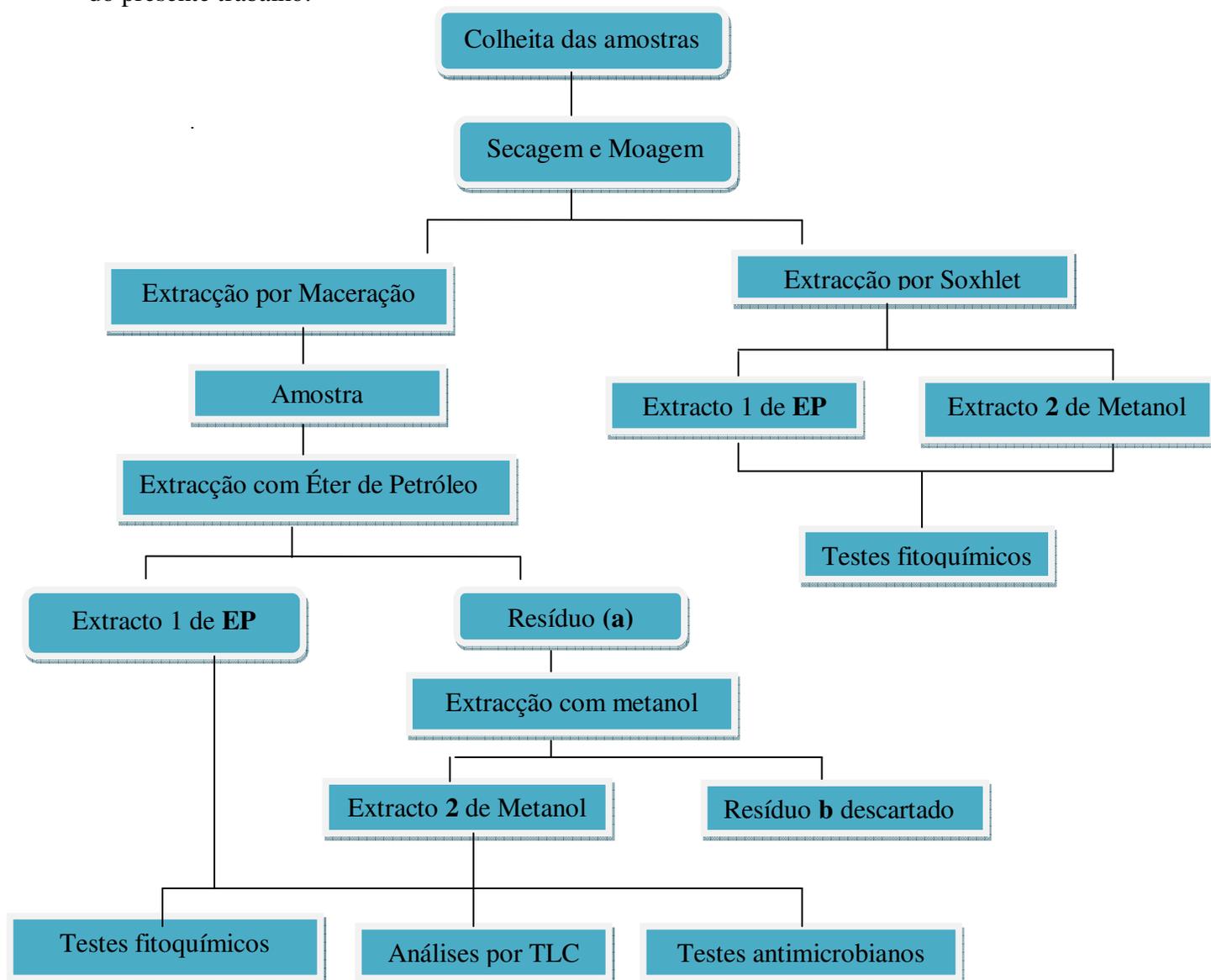


Figura 9: Esquema geral das etapas seguidas no trabalho.

5.1. Colheita e identificação botânica da planta

A colheita das amostras (raízes da planta em estudo), foi feita de forma manual, no dia 08 de Agosto de 2009 na região de Khokhole, distrito de Moamba na província de Maputo, seguindo-se a devida confirmação no Herbário do Departamento das Ciências Biológicas da Universidade Eduardo Mondlane, espécime número 02.

5.2. Secagem e moagem da amostra

Após a colheita, as raízes foram depositadas em sacos de ráfia e levadas ao laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química, onde foram limpas, cortadas e levadas à estufa (Scientific – series 2000) a 50°C durante 8 dias.

Findo este período, as amostras foram moídas no IIAM (Instituto de Investigação Agrária de Moçambique) e conservou-se o pó num cartucho à temperatura ambiente.

Os extractos utilizados na avaliação da actividade antimicrobiana foram obtidos seguindo o esquema da figura 10.

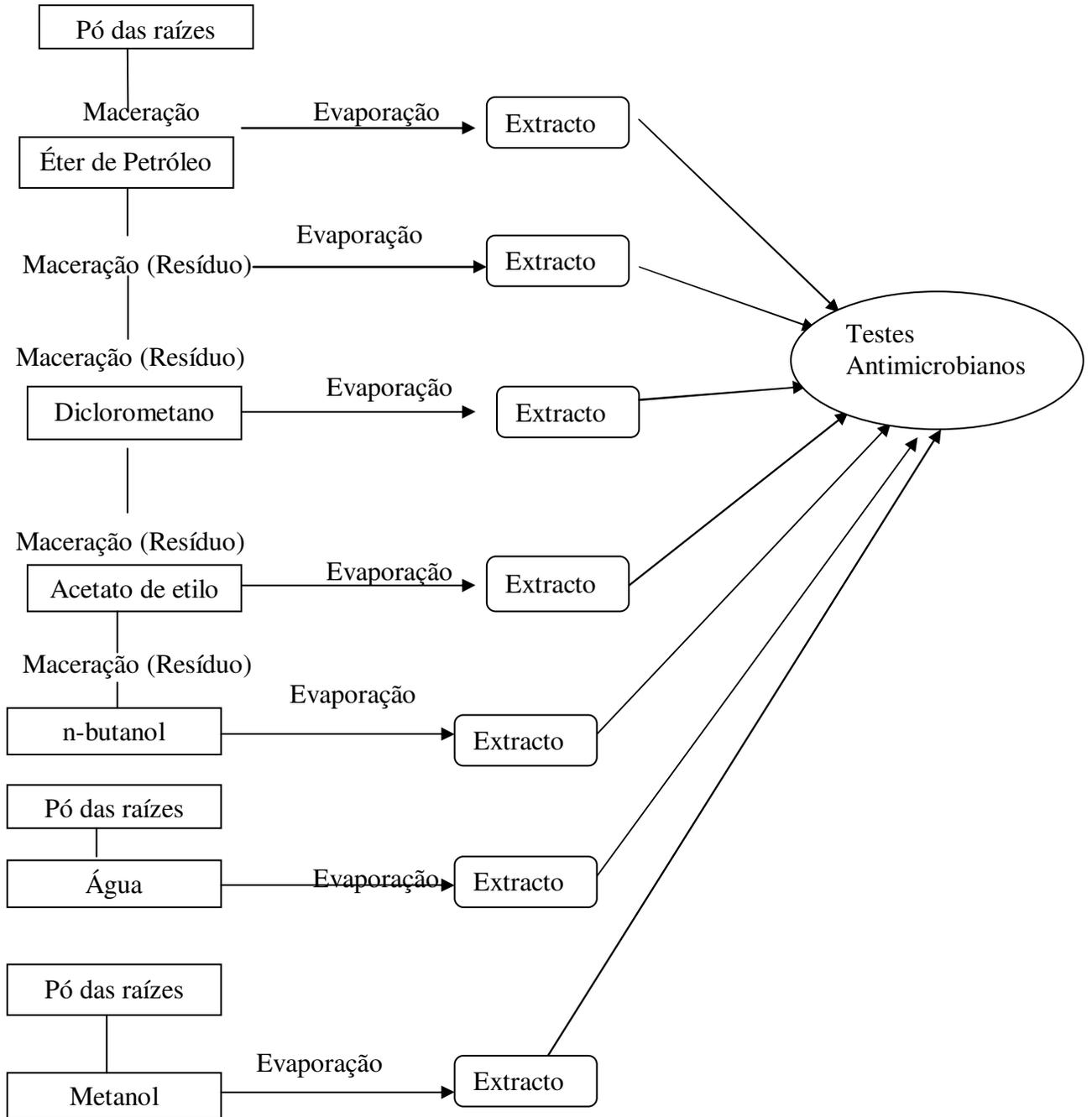


Figura 10: Esquema geral para a obtenção dos extractos para os testes antimicrobianos.

5.4.1. Extracção por Maceração

Na extracção por maceração, pesou-se 100g do pó das raízes de *S. longepedunculata* o qual foi devidamente misturado com 500 mL de éter de petróleo em um Erlenmeyer de 750 mL e macerou-se sob agitação e repouso durante 72h. Logo após, a mistura foi tratada pelo processo de filtração simples. O filtrado foi transferido para um balão de fundo redondo de 250 mL, concentrou-se no rotavapor até quase à secura obtendo-se assim um resíduo laranja cuja massa foi de 1,85g. O extracto obtido foi devidamente rotulado, identificado e guardado para prosseguir a experiência.

O resíduo foi macerado usando o mesmo processo com 300 ml de MeOH; logo após, a mistura foi tratada da mesma maneira como aconteceu com a outra, referida no parágrafo anterior. O filtrado foi transferido para um balão de fundo redondo de 250mL, concentrou-se no rotavapor até quase à secura obtendo-se assim um resíduo castanho cuja massa foi 17,70g. O extracto obtido foi devidamente rotulado, identificado e guardado para prosseguir o experimento.

5.4.2. Extracção por Soxhlet

Na extracção por Soxhlet 25 g do pó das raízes da *S. longepedunculata*, foram tratados com éter de petróleo 40-60 durante 8 horas, obtendo-se extractos de éter de petróleo de cor castanha de massa 0.41 gramas após a evaporação do solvente no rotavapor. Após a secagem, os resíduos previamente tratados com éter de petróleo foram novamente submetidos a um refluxo contínuo com metanol durante 8 horas, obtendo-se um extracto metanólico de cor castanha, pesando 8.67 gramas.

5.4.3. Maceração sequencial por ordem crescente de polaridade

Na extracção sequencial por ordem crescente de polaridade, 200g do pó das raízes foram tratados com 500 mL de éter de petróleo durante 72h, filtrou-se e o conteúdo foi concentrado no rotavapor obtendo-se um extracto de éter de petróleo (3,74g) de cor castanha. O pó das raízes extraído com éter de petróleo depois da secagem foi submetido a maceração com 500 mL de diclorometano durante 72h, filtrou-se e o conteúdo foi concentrado no rotavapor obtendo-se um extracto de diclorometano (1,96 g) de cor

castanha. O pó das raízes extraído com diclorometano depois da secagem foi submetido a maceração com 500 mL de acetato de etilo durante 72h, filtrou-se e o conteúdo foi concentrado no rotavapor obtendo-se um extracto de acetato de etilo (2,54g) de cor castanha. O pó das raízes extraído com acetato de etilo depois da secagem foi submetido a maceração com 500 mL de n-butanol durante 72h, filtrou-se e o conteúdo foi concentrado no rotavapor obtendo-se um extracto de diclorometano (2,48g) de cor castanha.

Todos os extractos obtidos foram usados para realização dos testes fitoquímicos e avaliação da actividade antimicrobiana.

5.4.4.Preparação dos extractos metanólico e aquoso usados para os testes antimicrobianos

Para preparação do extracto metanólico, 30g do pó das raízes foram tratados com 80mL de metanol durante 72h, filtrou-se e o conteúdo foi concentrado no rotavapor obtendo-se um extracto metanólico (6,72g) de cor castanha. O pó das raízes extraído foi descartado.

Para preparação do extracto aquoso, 100g do pó das raízes foram tratados com 500mL de água destilada durante 72h, filtrou-se e o conteúdo foi concentrado no rotavapor obtendo-se um extracto aquoso (15,90g) de cor castanha. O pó das raízes extraído foi descartado.

Os extractos obtidos foram usados para realização dos testes fitoquímicos e avaliação da actividade antimicrobiana.

5.5. Extração de alcalóides totais

Com o objectivo de confirmar a presença dos alcalóides presentes nas raízes que segundo a literatura são alcalóides indólicos efectuou-se a extração dos alcalóides totais seguindo o procedimento descrito por Stas-Otto como mostra a figura 11.

A extração foi feita em meio alcalino, onde 100 g do pó das raízes foram alcalinizados com hidróxido de amónio a 25 %, seguindo a extração contínua com o clorofórmio. O extracto clorofórmico foi submetido a partição com ácido clorídrico a 2% resultando em duas fases: clorofórmica e aquosa ácida. A fase aquosa ácida foi alcalinizada com hidróxido de amónio concentrado até um pH 9, e depois submetida à partição com clorofórmio. A fase clorofórmica resultante (final) foi submetida a secagem com sulfato

de sódio, filtração e evaporação obtendo-se assim um extracto dos alcalóides totais (AT) de massa igual a 0,41g.

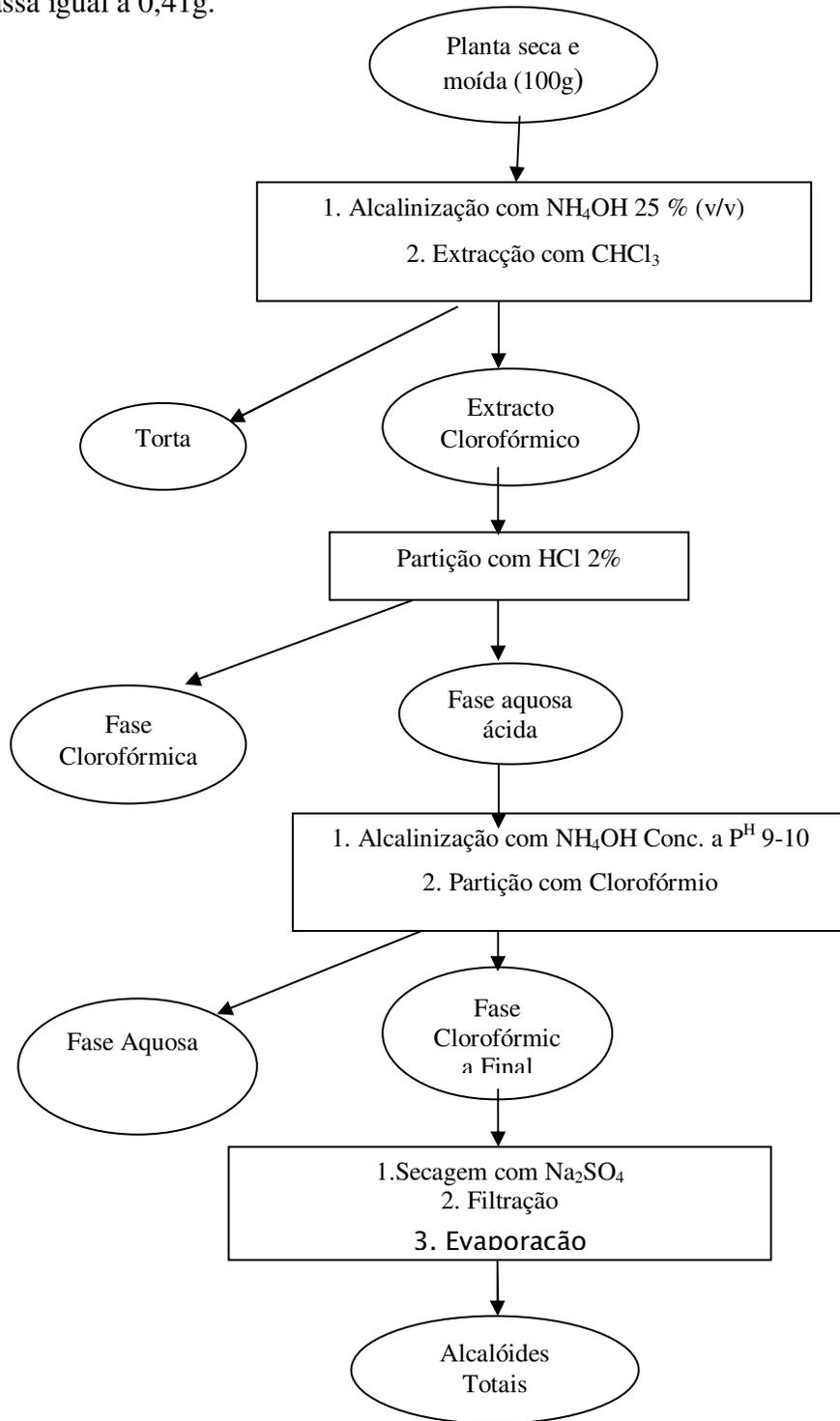


Figura 11: Esquema para obtenção dos alcalóides totais

5.6. Testes fitoquímicos

Com vista a avaliar a composição fitoquímica das raízes foram realizados testes típicos de algumas classes principais dos metabólitos secundários em diferentes extractos brutos.

a) Teste dos alcalóides livres

Dissolveu-se cada um dos extractos em 1,5 mL de HCl a 2%. Agitou-se com uma vareta de vidro até dissolução total e dividiu-se a solução obtida em volumes iguais, por 3 tubos de ensaio:

Tubo 1: Adicionou-se 3 gotas de reagente de Mayer.

Tubo 2: Adicionou-se 3 gotas de reagente de Dragendorff

Tubo 3: tubo testemunha

Para estes 2 testes a formação de precipitados brancos com o reagente de Mayer e precipitados amarelos com o reagente de Dragendorff são indicativos da provável presença de alcalóides.

b) Teste de Borntrager para antraquinonas

Servindo-se de um tubo de ensaio colocou-se um pequeno fragmento do extracto num tubo de ensaio e adicionou-se 5 mL de NH_4OH a 10%.

Para este teste a formação de uma coloração rosa, vermelha ou violeta sugere a provável presença de antraquinonas.

c) Ensaio de reconhecimento de flavonóides

1. Reacção com ácido sulfúrico

Tomou-se uma alíquota de cada extracto bruto, colocou-se num tubo de ensaio e adicionou-se 4 gotas de ácido sulfúrico concentrado (a 98%).

2. *Reacção de Shinoda*

Tomou-se uma alíquota de cada extracto bruto e foi acidificada com ácido clorídrico a 10% até ao pH 4 e submetida a hidrólise durante 30 minutos. Após arrefecimento adicionou-se 10 mL de água destilada e fez-se a extracção com éter de petróleo. Da solução de éter retirou-se 1 mL que foi colocado num tubo de ensaio e adicionou-se 3 pedaços de fita de magnésio metálico e algumas gotas de ácido clorídrico concentrado (a 37%).

Para estes 2 testes a formação de uma coloração vermelha é indicativo da presença de flavonóides.

d) Teste de Liebermann-Buchard para identificação de esteróides e triterpenóides.

Transferiu-se para um copo cada extracto e extraiu-se com clorofórmio. Filtrou-se a solução clorofórmica para um tubo de ensaio seco, adicionou-se 1 mL de anidrido acético e agitou-se suavemente. Adicionou-se depois 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado (a 98%) e agitou-se suavemente.

Para este teste a formação de uma cor verde ou verde azulada formada poucos minutos sugere a presença destes metabólitos.

e) Teste de saponinas

Para testar as saponinas tomou-se uma alíquota de cada extracto bruto, colocou-se num tubo de ensaio e adicionou-se 6 mL de água destilada e agitou-se energeticamente por 3 minutos.

Para este teste a formação de espuma persistente indica a provável presença de saponinas.

f) Teste de taninos

Diluiu-se em tubo de ensaio, 1 mL do extracto com 2 ml de água destilada. Agitou-se e adicionou-se 3 gotas de cloreto férrico a 1%. O mesmo procedimento foi repetido usando o acetato de chumbo.

Para este teste a formação de uma coloração azul sugere a presença de taninos hidrossolúveis enquanto a verde a presença de taninos condensados.

Os resultados obtidos nos testes estão representados nas tabelas 5 e 6.

5.7. Análise cromatográfica

Neste trabalho usou-se a técnica de cromatografia em camada fina (TLC) para as análises dos extractos usados para os testes microbiológicos e fitoquímicos e para análise dos extractos obtidos na extracção de alcalóides totais.

Os extractos de EP, DCM, EtOAc e n-BuOH obtidos na extracção sequencial por ordem crescente de polaridade foram dissolvidos em metanol e submetidos à cromatografia em camada fina (TLC).

Foi usada como fase estacionária sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck) sobre as placas comerciais de alumínio (7 x 10 cm e 20 x10 cm) e como fase móvel Acetato de etilo e Hexano (2,0: 98,0).

5.7.1. Aplicação da amostra

Os extractos depois de dissolvidos em metanol foram aplicados em placas cromatográficas a uma distância de 1 cm da extremidade inferior da placa usando tubos capilares de 2µL mantendo uma separação mínima de 0.75 cm entre os pontos de aplicação.

5.7.2. Desenvolvimento das placas

As placas foram introduzidas em tinas cromatográficas pré-saturadas de solvente evitando que o nível do solvente atingisse os pontos de aplicação durante a imersão. A eluição foi feita de modo ascendente das placas.

5.7.3. Sistema de detecção

Os componentes separados foram visualizados numa lâmpada UV a 254 nm e as placas foram depois pulverizadas com vanilina e aquecidas a 100 °C durante 2-5 minutos.

5.8. Testes antimicrobianos

Os ensaios antimicrobianos foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da UEM, onde se subcultivou algumas estirpes-padrão já existentes no Laboratório, e também se usou algumas estirpes isoladas a partir de amostras biológicas de pacientes.

Os testes antimicrobianos foram realizados de acordo com as condições do Laboratório de Microbiologia, para tal foi usado o método de difusão em ágar.

O meio usado foi Ágar Mueller Hinton, de acordo com as recomendações da U.S. Food and Drug Administration (FDA) e da Organização Mundial de Saúde (OMS), e Ágar nutriente (para *S. aureus*).

O Ágar Mueller Hinton é rico em proteínas e carboídratos, sendo deste modo, o substrato ideal para o desenvolvimento e crescimento de estirpes bacterianas de interesse clínico. Este meio é usado para o teste de sensibilidade/resistência a antibióticos de bactérias Gram positivas e Gram negativas, aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, comumente encontradas em alimentos e espécimes clínicos (Pelczar *et al.* 1996).

Material, equipamento e reagentes usados

5.8.1 Reagentes

- Água destilada
- Solução de etanol a 50%

5.8.2. Equipamento

- Balança analítica
- Bico de Busén
- Estufa de secagem
- Congelador – 20°
- Autoclave

5.8.3. Material

- Copos de Becker

- Erlenmeyers
- Proveta graduada
- Placas de Petri
- Pipeta
- Tubos de ensaios
- Espátulas
- Zaragatoas estéreis (swabs)
- Ansas bacteriológicas

5.8.4. Microrganismos testados:

- *S. aureus* (Gram-positivo)
- *E. coli* (Gram-negativo)
- *Sal. sp* (Gram-negativo)
- *S. flexneri* (Gram-negativo)
- *C. albicans* (Levedura)
- *V. cholerae* (Gram-negativo)

De referir que algumas amostras foram isoladas de pacientes como é o caso da *C. albicans*, *E. coli*, *V. cholerae* e as outras foram amostras-padrão existentes no Laboratório de Microbiologia da UEM.

5.8.5. Preparação dos meios de cultura

Para preparação de meios de cultura seguiram-se essencialmente as seguintes operações tomando sempre em consideração as indicações prescritas pelo fabricante.

5.8.6. Pesagem dos compostos

A pesagem foi feita numa balança analítica directamente para um balão de Erlenmeyer adequado a quantidade que se pretendia preparar.

5.8.7. Dissolução em água

A dissolução foi feita num balão volumétrico de vidro usando a quantidade de água destilada indicada. Em seguida aqueceu-se o balão em banho-maria agitando-se frequentemente, depois de dissolver o meio no balão em banho-maria, este era depois

autoclavado, antes de ser distribuído nas placas. Uma vez distribuído o meio nas placas, taparam-se as mesmas e deixaram-se à temperatura ambiente até à solidificação do meio. Os meios foram depois esterilizados numa autoclave a 121°C por 15 minutos; alguns meios não são submetidos a este processo, devido à sua composição particular que não os permite a submissão a temperaturas elevadas; em seguida deixa-se arrefecer em banho-maria até 50°C.

5.8.8. Distribuição do meio

Após o arrefecimento no banho-maria a 50°C, o meio foi distribuído em placas de Petri esteris com 90 mm de diâmetro. Este processo foi feito perto da chama do bico de Busén, para assegurar a esterilidade do mesmo. Em seguida deixou-se arrefecer para permitir a solidificação do meio. Para confirmar a esterilidade do meio, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Quando não houvesse crescimento de bactérias ou fungos após 24 a 48 horas de incubação o meio era considerado estéril e apto para ser usado.

5.8.9. Conservação das placas

As placas foram conservadas na geleira (2 a 8°C), com as tampas viradas para baixo etiquetadas com o nome do meio e data da preparação.

5.8.10. Isolamento de colónias puras

O processamento consistiu em inocular uma pequena porção de colónias, num meio de cultura selectivo. Após a inoculação em meios de cultura, as placas foram incubadas na estufa a 37°C, durante 18 a 24 horas, tempo necessário para a obtenção dum crescimento bacteriano óptimo. No caso de bactérias microaerófilas, as placas eram incubadas numa jarra com vela de modo a criar um meio com uma pequena concentração de CO₂.

Findo o tempo de incubação, as placas foram examinadas para a identificação das características morfológicas das colónias, e também para a realização dos testes bioquímicos e outras provas que permitissem a identificação das espécies bacterianas desejadas.

5.8.11. Preparação de soluções com diferentes concentrações a partir dos extractos de plantas

A solução de 200 mg/mL foi preparada, pesando num frasco estéril, 0,8g de extracto e dissolveu-se em 4 mL de etanol a 50%. Esta foi a solução com concentração máxima, ou a concentração “stock”, ou ainda solução 1, pois a partir dela foram preparadas as seguintes concentrações: 150 mg/mL; 100 mg/ mL; 50 mg/mL e 25mg/ mL em 4 frascos previamente esterilizados e rotulados com os números 2, 3, 4 e 5 respectivamente.

5.8.12. Preparação de discos contendo extractos

Para preparar os discos foi usado papel de filtro de boa qualidade, tipo "Whatman No.1". Com auxílio de um furador de papel comum, foram preparados os discos. Os discos resultantes eram uniformes quanto a tamanho, e aceitavelmente circulares. Posto isto, os discos foram etiquetados usando um lápis de grafite. Os discos preparados foram depois acondicionados em placas de Petri que permitiam a esterilização por calor seco, numa *estufa de Pauster* por 4 a 6 horas a uma temperatura de 120°C, tendo-se tomado o cuidado de evitar a exposição excessiva dos discos ao calor.

Seguidamente, os discos foram impregnados com soluções de diferentes concentrações de extracto previamente preparadas, tendo-se usado o volume de 20µl para cada disco. Todo o procedimento foi perto da chama do bico de Busén para garantir a esterilidade dos discos.

Após a impregnação, nas soluções preparadas, os discos foram postos a secar numa estufa a 37°C e depois conservados numa geleira a 4°C.

Os discos preparados foram usados para a determinação da sensibilidade, seguindo os procedimentos já descritos usando o método de Kirby-Bauer ou de difusão em disco.

5.8.13. Escolha dos microrganismos

A selecção das bactérias-teste foi baseada nas seguintes situações:

- Facilidade de obtenção
- Crescimento rápido em meios de cultura
- Importância em saúde pública
- Facilidade de manutenção

5.8.14. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA)

O teste de sensibilidade aos antibióticos (TSA) foi realizado com o objectivo de avaliar a capacidade dos extractos em inibir o crescimento microbiano *in vitro*. Esta habilidade foi avaliada pelo método de difusão em discos em meio ágar *Mueller-Hinton* usando a Técnica de Kirby-Bauer.

A triagem da actividade antibacteriana foi realizada a partir de culturas puras de microrganismos a testar com crescimento máximo de 24 horas. Foram seleccionadas duas a três colónias isoladas, com auxílio de uma ansa bacteriológica. Em seguida, foram misturadas num tubo de ensaio que continha solução salina (soro fisiológico a 0,9% de NaCl). A mistura foi agitada com auxílio de um misturador. Esta suspensão bacteriana foi depois comparada a turvação padrão na escala de 0,5 de *MacFarland*, que equivale a um valor de absorvância entre 0,08 a 0,1 no comprimento de onda de 580 nm. Esta turvação é equivalente a $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colónias.

Com auxílio de uma zaragatoa estéril (cotonete), foi retirada a suspensão de bactérias e distribuída uniformemente por estrias, na superfície da placa de ágar *Mueller-Hinton*. Posteriormente, foram colocados os discos na superfície do meio onde a bactéria-teste foi incorporada. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, com as tampas viradas para cima.

Geralmente os halos de inibição surgem com 24 horas sob a forma de uma área circular, transparente, sem crescimento bacteriano, geometricamente circunscrita ao disco de papel, foram medidos os diâmetros desses halos.

Os resultados obtidos dos testes antimicrobianos encontram-se nas tabelas 7 a 11.

6. RESULTADOS

6.1. Resultados obtidos na extração por Maceração e Soxhlet usando éter de petróleo e metanol como solventes.

Tabela 2: Quantidades obtidas dos extractos do pó das raízes de *S. longepedunculata*.

Extracto	Maceração (100 gramas)		Soxhlet (25 gramas)	
	Massa	Rendimento	Massa	Rendimento
EP	1,85 g	1,85 %	0,41 g	1,64 %
MeOH	17,70 g	17,70 %	8,67 g	34,68 %
Total	19,55	19,55%	9,08 g	36,32 %

6.2. Resultados obtidos na extração sequencial por ordem crescente de polaridade. A maior quantidade foi observada para n-butanol e a menor para diclorometano.

Tabela 3: Quantidades obtidas na extração sequencial por ordem crescente de polaridade.

Extracto	Maceração (200 gramas)	
	Massa	Rendimento
EP	3,74g	1,87%
DCM	1,96g	0,98%
EtOAc	2,54g	1,27%
n-BuOH	2,48g	1,24%
Total	10,72g	5,36%

6.3. Resultados obtidos na preparação do extracto aquoso e metanólico.

Tabela 4: Quantidades obtidas na extração por maceração.

Extracto	Maceração (100 gramas)	
	Massa	Rendimento
Aq	15,90 g	15,90 %

Extracto	Maceração (30 gramas)	
	Massa	Rendimento
MeOH	6, 72 g	22,4%

6.4. Para a confirmação dos princípios activos presentes nas raízes da planta em estudo realizou-se testes fitoquímicos (tabela 5), tendo se verificado que o metanol, usando os dois métodos, conseguiu extrair mais princípios activos em relação ao éter de petróleo.

Tabela 5. Resultados dos testes fitoquímicos dos extractos obtidos das raízes de *S. longepedunculata*

Metabólitos Secundários	Métodos Utilizados	Resultados			
		Maceração (Raízes)		Soxhlet (Raízes)	
		EEP	EMeOH	EEP	EMeOH
Alcalóides	Reacção com reagente de Dragendorff e Mayer	-	-	-	-
Antraquinonas livres e glicosídicas	Reacção de Borntrager directa	-	-	-	-
Flavonóides	Reacção de Shinoda	-	+	-	+
Saponinas	Formação de espuma	-	+	-	+
Taninos	Reacções: Acetato de chumbo; cloreto férrico	-	+	-	+
Terpenos e Esteróides	Reacção de Liebermann-Buchard's	+	-	+	-

EEP – Extracto de Éter de Petróleo; EMeOH – Extracto Metanólico; (-): negativo; (+): positivo.

Tabela 6. Resultados dos testes fitoquímicos dos extractos das raízes de *S. longepedunculata* obtidos na extração por maceração.

Metabólitos Secundários	Extracto de EP	Extracto de DCM	Extracto de EtOAc	Extracto de n-BuOH	Extracto metanólico (*)	Extracto aquoso (**)
Alcalóides	-	-	-	-	-	+
Antraquinonas	-	-	-	-	-	-
Flavonóides	-	+	+	+	+	+
Saponinas	-	+	+	-	+	+
Taninos	-	-	+	-	+	+
Triterpenos / Esteróides	+	-	+	-	+	+

(-): negativo; (+): positivo

(*) e (**)- extractos obtidos da maceração directa com o pó.

6.5. Cromatograma dos extractos brutos

Feita a TLC (anexos II e III) dos extractos brutos (A, B, C e D) e salicilato de metilo, notou-se que:

- ✓ Todos os extractos apresentam uma mancha em comum com um Rf de cerca de 0.11 após a pulverização com vanilina com excepção do extracto D.
- ✓ Nenhuma mancha nítida foi observada sob a luz UV a 254 nm e com vanilina para o extracto D.
- ✓ Os extractos A e C apresentam uma mancha em comum.
- ✓ O extracto C apresenta maior número de manchas em relação a outros.

No caso dos alcalóides totais (anexos IV e V), notou-se que:

- ✓ Observando sob a luz UV a 254 nm verificou-se algumas manchas, e pulverizando com o reagente de Drangerdorff observaram-se também algumas manchas com o valor de Rf 0.25; 0.29 e 0.38.

6.6. Resultados dos testes antimicrobianos

A análise antimicrobiana foi realizada com o objectivo de identificar a acção inibitória dos extractos das raízes de *S. longepedunculata* no crescimento microbiano cujos resultados constam nas tabelas 7 a 11.

Tabela 7. Actividade antimicrobiana dos extractos das raízes da *S. longepedunculata* na concentração de 200mg/mL (Halos de inibição em mm).

Amostras	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>Sal. sp</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. aureus</i>	<i>V. cholerae</i>
EEP	7,0	0,0	6,0	9,5	19,0	-
EDCM	0,0	0,0	6,0	7,5	13,0	-
EEtOAc	8,0	0,0	6,0	9,0	22,0	-
En-BuOH	0,0	0,0	0,0	6,0	6,0	-
EMeOH	6,0	0,0	6,0	11,0	10,0	0,0
EAq	10,0	0,0	7,0	7,0	11,0	0,0

EEP- Extracto Etér de Petróleo; EDCM- Extracto diclorometano; EEtOAc- Extracto Acetato de Etilo; En-BuOH- Extracto Butanólico; EMeOH- Extracto metanólico; EAq- Extracto Aquoso; (-): não foi testado, *E. coli*- *Escherichia coli*; *C. albicans*- *Candida albicans*, *Sal. sp*- *Salmonella sp*; *S. flexneri*- *Shigella flexneri*; *S. aureus* - *Staphylococcus aureus*, *V. Cholerae*- *Vibrio cholerae*.

Tabela 8. Actividade antimicrobiana dos extractos das raízes da *S. longepedunculata* na concentração de 150mg/mL (Halos de inibição em mm).

Amostras	<i>E. coli</i>	<i>Candida sp</i>	<i>Sal. sp</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. aureus</i>	<i>V. cholerae</i>
EEP	0,0	0,0	0,0	0,0	16,0	-
EDCM	0,0	0,0	0,0	0,0	11,5	-
EEtOAc	6,0	0,0	0,0	6,5	19,0	-
En-BuOH	0,0	0,0	0,0	0,0	6,0	-
EMeOH	0,0	0,0	0,0	6,0	9,0	0,0
EAq	7,0	0,0	0,0	7,0	10,0	0,0

Tabela 9. Actividade antimicrobiana dos extractos das raízes da *S. longepedunculata* na concentração de 100mg/mL (Halos de inibição em mm).

Amostras	<i>E. coli</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. aureus</i>
EEP	0,0	0,0	15,0
EDCM	0,0	0,0	7,0
EEtOAc	0,0	0,0	18,0
En-BuOH	0,0	0,0	0,0
EMeOH	0,0	0,0	9,0
EAq	0,0	0,0	9,0

Tabela 10. Actividade antimicrobiana dos extractos das raízes da *S. longepedunculata* na concentração de 50mg/mL (Halos de inibição em mm).

Amostras	EEP	EDCM	EEtOAc	En-BuOH	EMeOH	EAq
<i>S. aureus</i>	11,5	6,0	16,0	0,0	8,5	8,5

Tabela 11. Actividade antimicrobiana dos extractos das raízes da *S. longepedunculata* na concentração de 25mg/mL (Halos de inibição em mm).

Amostras	EEP	EDCM	EEtOAc	En-BuOH	EMeOH	EAq
<i>S. aureus</i>	10,0	0,0	14,0	0,0	8,5	8,0

Dos resultados obtidos da actividade antimicrobiana, verifica-se que à bactéria *S. aureus* foi a mais sensível aos extractos usados e a bactéria *V. cholera* e o fungo *C. albicans* foram os microrganismos mais resistentes aos extractos (gráfico 1).

Os extractos acetato de etilo, metanólico, éter de petróleo, e aquoso mostraram uma boa actividade contra a bactéria *S. aureus*, seguido de dicloroetano e n-butanol (gráfico 2).

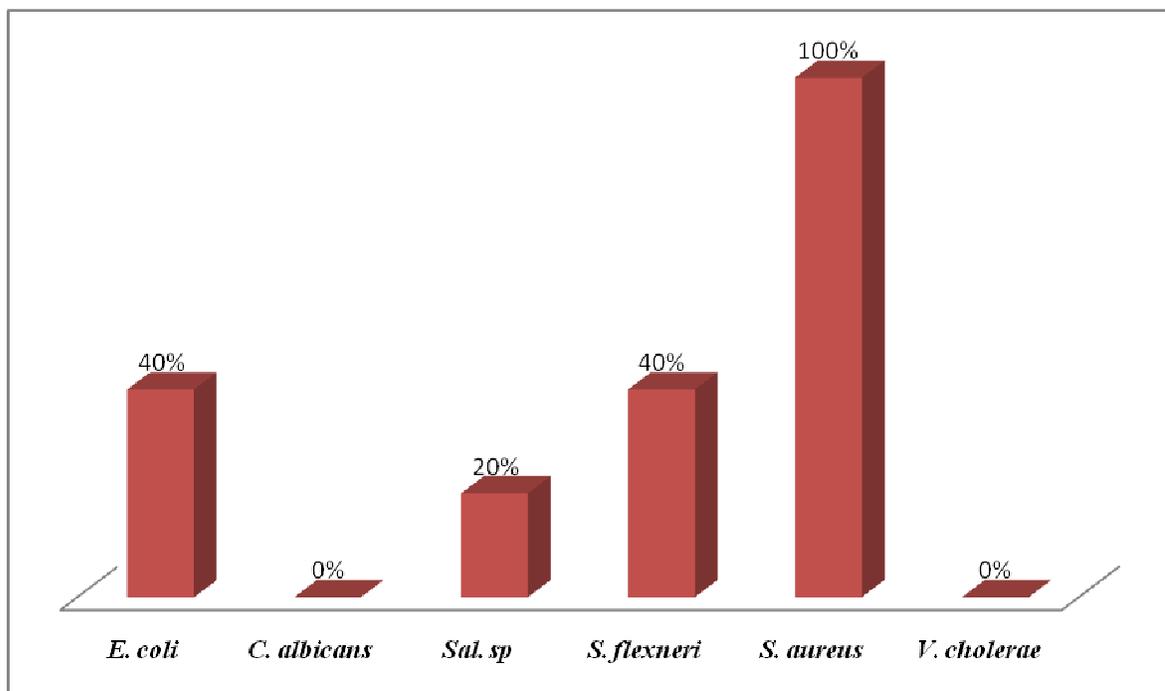


Gráfico 1: Índice de Susceptibilidade microbiana para os extractos brutos das raízes de *S. longepedunculata*.

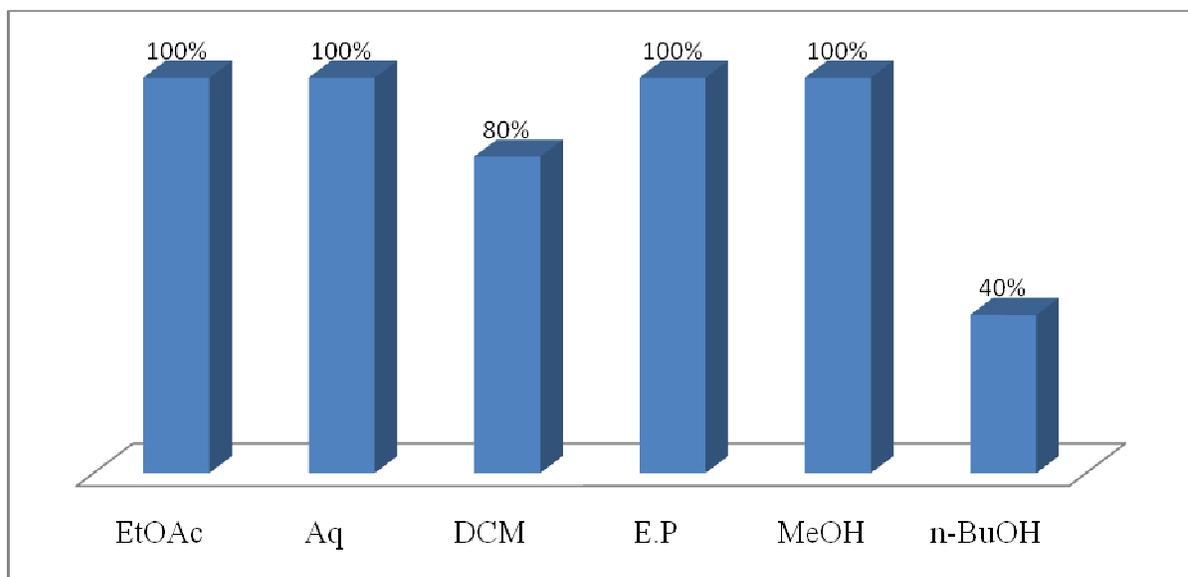


Gráfico 2 : Actividade dos extractos brutos das raízes de *S. longepedunculata* em relação à *S. aureus*

7. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Os testes fitoquímicos realizados sobre os extractos das raízes da *S. longepedunculata* revelaram a presença de: alcalóides, esteróides, flavonóides, saponinas, taninos e terpenos. Estes dados estão de acordo com os obtidos na literatura (Junaid *et al.* 2008).

A população moçambicana usa as raízes da *S. longepedunculata* para diversos fins como: lavar roupa, tomar banho, entre outros. Dos testes fitoquímicos realizados verificou-se que nas raízes da *S. longepedunculata* estão presentes grandes quantidades de saponinas.

Os testes fitoquímicos revelaram a presença dos alcalóides só no extracto aquoso e está de acordo com o trabalho realizado por Junaid *et al.* (2008).

Os testes fitoquímicos mostraram a presença dos flavonóides, saponinas, taninos, esteróides e triterpenos nos extractos de acetato de etilo, metanólico e aquoso. Durante os testes antimicrobianos os três extractos manifestaram uma notável actividade contra *S. aureus*, *E.coli* e *S. flexneri*. Andrade (2007), citado por Ismael (2010), relata que os taninos, os flavonóides, os terpenos e alguns derivados fenólicos são as principais classes de metabólitos secundários com acção antifúngica e antimicrobiana.

As plantas medicinais produzem flavonóides em resposta à infecção microbiana (Greenwood *et al.* 1992 e Nico, 2006). Essa actividade foi demonstrada *in vitro* contra uma ampla variedade de microrganismos. Esta actividade é provavelmente devido à sua capacidade de formar complexos com proteínas solúveis extracelulares e com a parede celular, ou ainda pelo carácter lipofílico dos flavonóides ser responsável pela ruptura da membrana celular dos microrganismos (Tsuchiya *et al.* 1996).

A extracção dos alcalóides totais seguindo o método descrito por Stas-Otto fig.12, permitiu obter 0,41g a partir de 100g do pó das raízes, e com a TLC foi possível identificar 3 manchas usando o reagente de Dragendorff como revelador.

Na TLC dos extractos obtidos na extracção por maceração, verificou-se que o extracto de acetato de etilo apresentou maior número de manchas e nos testes antimicrobianos foi a fracção que apresentou elevado nível de actividade antibacteriana.

Para concentração de 200mg/mL os extractos de E.P, EtOAc, MeOH e Aq conseguiram inibir o crescimento das seguintes bactérias: *E.coli*, *Sal. sp*, *S. flexneri* e *S. aureus*, tendo sido observada a maior actividade antimicrobiana no extracto de Acetato de etilo e a menor no extracto metanólico.

Na concentração de 150mg/mL apenas alguns extractos conseguiram inibir o crescimento das bactérias: *E.coli*, *S. flexneri* e *S. aureus*.

Na concentração de 100mg/mL, somente *S. aureus* é que se mostrou sensível para maioria dos extractos o que levou a determinar a CIM somente nesta bactéria, na qual se verificou que a maior actividade foi observada no extracto de Acetato de etilo e a menor no extracto n-butanólico.

Todos os extractos usados inibiram o crescimento da bactéria *S. aureus* nas concentrações de 200mg/mL e 150mg/mL, tendo os extractos de EtOAc e E.P apresentado maiores halos de inibição.

O extracto n-butanólico mostrou uma fraca inibição contra *S. flexneri* e *S. aureus* (6 mm) na concentração de 200mg/mL. Este extracto mostrou-se inactivo contra as outras bactérias testadas incluindo a levedura *C. albicans*.

Comparando os halos de inibição exibidos pelo extracto aquoso, observa-se que os halos de inibição são relativamente maiores nas bactérias *E.coli* e *S. aureus*, enquanto as bactérias *S. flexneri* e *Sal. sp*, mostraram menores halos de inibição. Estes resultados estão de acordo com os reportados na literatura (Junaid *et al.* 2008) que relatam que o extracto aquoso das raízes mostrou uma forte inibição contra as bactérias *E.coli*, *S. aureus* e *S. flexneri*.

A fraca actividade antimicrobiana verificada contra as bactérias Gram-negativas e os bons resultados verificados na *S. aureus*, que é uma bactéria Gram-positiva estão de acordo com Herrera *et al.* (1996) citado por Ismael (2010), que mostra que substâncias

com actividade antibacteriana provenientes de plantas parecem ser mais activas contra microrganismos Gram-positivos do que para Gram-negativos. A explicação para este facto é que as bactérias Gram-positivas são mais sensíveis à acção de agentes antimicrobianos devido à presença de uma parede bacteriana que normalmente não restringe a penetração de moléculas tóxicas, enquanto as Gram-negativas possuem um sistema de barreira constituído pela membrana externa da parede bacteriana formada por fosfolípidos, lipopolissacarídeos e proteínas que conferem considerável impermeabilidade aos agentes antibacterianos resultando em maior resistência dessas bactérias aos antibióticos.

A actividade antibacteriana contra *S. aureus* demonstrada pelos extractos EP, EtOAc, Aq e MeOH, em concentrações mais baixas, (25mg/mL), pode sugerir o uso desta planta (*S. longepedunculata*) no tratamento de infecções causadas por esta bactéria.

Em baixas concentrações nenhum dos extractos mostrou actividade antimicrobiana contra as bactérias Gram-negativas.

Joseph *et al.* (2006) no seu estudo usando um sistema de solventes de extracção (EP, DCM e Etanol) próximo do usado neste trabalho (EP, DCM, EtOAc e n-BuOH) apresentam resultados sobre actividade antifúngica contra *C. albicans* que são ligeiramente diferentes dos obtidos. Enquanto neste trabalho não foi observada nenhuma actividade antifúngica dos extractos de EP e DCM, no caso de Joseph *et al.* (2006), observou-se que o extracto de EP exibiu uma actividade antifúngica contra *C. albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus níger* e o extracto de DCM actividade contra *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus Níger* e *Penicillium sp.* Várias razões podem explicar estas diferenças nas actividades antimicrobianas, aqui observadas. Em primeiro lugar, é sabido que plantas semelhantes crescendo em diferentes localizações geográficas podem ter um padrão fitoquímico muito diferente (Mai *et al.* 2001)

Em segundo lugar, os compostos activos de diversas espécies de *Securidaca* variam muito, tornando geralmente necessário especificar não apenas as fontes botânicas utilizadas na extracção, mas também dar alguma indicação sobre a composição química da espécie em causa. Isso porque, além da variação interespecífica na composição

química, existem variações nas quantidades dos compostos activos dentro de uma espécie (particularmente em plantas que crescem em diferentes pontos geográficos na mesma região) (Tezuka et al. 2001)

Também tem sido reportado que plantas individuais dentro da mesma espécie podem variar de acordo com inúmeros factores tais como: plantas em crescimento, temperatura, chuvas, época em que a planta é colhida, tipo de solo onde a planta cresceu, período do dia em que se faz a colheita e as condições de armazenamento (Who, 1992 e Evans, 1996).

A bactéria *V. cholerae* mostrou-se resistente face aos extractos testados: aquoso e metanólico.

A actividade antimicrobiana observada neste estudo pode ser atribuída principalmente à presença dos flavonóides, saponinas, taninos presentes nos extractos.

Os resultados obtidos permitiram identificar as razões da utilização das raízes da planta pelas populações.

8. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

8.1. Conclusões

- Os testes fitoquímicos permitiram identificar nas raízes da *S. longepedunculata*, os seguintes metabólitos: saponinas, flavonóides, alcalóides, taninos, esteróides e triterpenóides;
- A cromatografia de camada fina confirmou a presença de saponinas, alcalóides e flavonóides;
- Os extractos acetato de etilo e éter de petróleo apresentaram elevada actividade antimicrobiana contra *S. aureus* (halos de inibição de 14 e 10 mm respectivamente na concentração de 25 mg/mL).
- Todos os extractos testados não mostraram actividade antifúngica contra *C. albicans*.
- Não foi observada nenhuma actividade antibacteriana contra *V. cholerae* nos extractos aquoso e metanólico.
- A composição fitoquímica e a actividade antimicrobiana observadas no presente trabalho justificam de certa maneira a utilização das raízes de *S. longepedunculata* na medicina tradicional para o tratamento de diversas infecções.

8.2. Recomendações

- Baseando-se nestes resultados e potencial medicinal da planta, sugere-se a realização de trabalhos futuros utilizando diferentes partes desta planta, para isolar os princípios activos, e avaliar a sua actividade antimicrobiana face a outros microrganismos.

- Recomenda-se a extracção de óleos essenciais presentes na planta e usar-se os mesmos nos testes antimicrobianos.

- Mais investigações são necessárias para determinar se as plantas possuem um potencial para serem usadas no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. Essas investigações incluem: a determinação da toxicidade *in vitro* e *in vivo* e determinação das propriedades farmacocinéticas dos extractos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. Adebisi R.A., Elsa A.T., Agaie B.M. and Etuk E.U. (2006). Antinociceptive and antidepressant-like effects of *Securidaca longepedunculata* root extract in mice, *Journal of Ethnopharmacology*, **107**: 234–239.
- [2]. Ajali V.C. (2004). Antimicrobial activity of *Securidaca longepedunculata*, *Phytomedicine* **11**:701-703.
- [3]. Atlas R.M. (1997). *Principles of Microbiology*, 2ª edição, Willian C. Brown Pub, 129 pp.
- [4]. Bruyne T.D., Pieters L., Deelstra H. and Vlietinck A. (1999). Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematics and Ecology*, **27**: 445-459
- [5]. Campos, L.S. (2002). *Entender Bioquímica*, 3ª edição, Escolar Editora, Lisboa.
- [6]. Cragg G.M., Newman D.J. and Snader K.M. (1997). Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products*, **60**: 52–60
- [7]. Diniz L.R.L. (2006). *Efeito das Saponinas Triterpênicas Isoladas de Raízes da Ampelozizyphus amazonicus Ducke sobre a Função Renal*. Tese de Mestrado. pp 27-34, Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais. Disponível em: www.bibliotecadigital.ufmg.br/.../1/biblioteca_digital_disserta_o_pdf.autor_lecio_ricardo_le.pdf, acessado a 15 de Novembro de 2010.
- [8]. Downes F.P. and Ito K. (2001). Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4th edition, American Public Health Association (APHA), Washington, D.C. USA.

- [9]. Eldeen I.M.S. and Van S.J. (2007). Antimycobacterial activity of some trees used in South African traditional medicine. *South African Journal of Botany*, **73**: 248–251.
- [10]. Ellepola A and Samaranayake L.P. (2001). Adjuvative use of clorexidine in oral candidoses: review. *Oral Diseases*, **7**: 11-17.
- [11]. Eloff J.N. (2001). Antibacterial activity of Marula (*Sclerocarya birrea* (A. rich) Hochst. Subsp. Caffra (Sond Kokwaro) (Anacardiaceae) barks and leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, **76**: 305–308.
- [12]. Erkose G. and Erturan Z. (2007). Oral *Candida* colonization of human immunodeficiency virus infected subjects in Turkey and its relation with viral load and CD4+ T-lymphocyte count. *Mycoses*, **50**: 485-490.
- [13]. Evans W.C. (1996). Trease and Evan's Pharmacognosy, 14th edition. WB Saunders Company Limited, London, pp 176-177.
- [14]. Farnsworth N.R., Akerele O., Bingel A.S., Soejarto D.D. and Guo Z. (1985). Medicinal plants in therapy. *Bulletin of the World Health Organization*, **63**: 965–981.
- [15]. Ferguson L.R. (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*, **475**: 89–111.
- [16]. Greenwood D., Slack R. and Peutherer J. (1992). Medical Microbiology, A guide to Microbial Infections: Pathogenesis, Immunity, Laboratory Diagnoses and Control. 4^a edição, Churchill Livingstone, Edinburgh London Madrid Melbourne, New York and Tokyo.
- [17]. Ismael H.A. (2010). *Análise Fitoquímica e Avaliação do Potencial Antimicrobiano das Folhas da Jatropha curcas L*, Trabalho de Licenciatura em Ensino de Biologia. Universidade Pedagógica, Maputo.

- [18]. Jawetz M e Adelberg's. (2010). Medical Microbiology, 25th edition, New York, medical book, Lange Mc Graw Hill Companies, Inc
- [19]. Jayasekara T.R., Stevenson P.C., Belmain S.R., Farman D.I. and Mall D.R. (2002). Identification of methyl salicylate as the principal volatile component in the methanol extract of root bark of *S. longepedunculata*. *Journal of Mass spectrometry*, **37**: 577-580
- [20]. Joseph C.C., Moshi M.J., Sempombe J and Nkunya M.H.H. (2006). (4-methoxybenzo[1,3] dioxol-5-yl)-phenylmethanone:anantibacterialbenzophenone from *Securidaca longepedunculata*. *Afr. J.Trad.Ccam* **3** (3): 80 – 86
- [21]. Junaid S.A. et al (2008). *Evaluation of Securidaca longipendunculata leaf and root extracts for antimicrobial activities*. Acedido a 05 de Dezembro de 2010, em: www.academicjournals.org/ajmr.
- [22]. Kenneth J.R. and Ray C.G. (1994). Sherris Medical Microbiology - *An Introduction to Infectious Diseases*, third edition, USA: Appleton & Lange.
- [23]. Khanbabaee K. and Ree T.V. (2001). *Tannins: Classification and Definition*, Natural Product Reports, **18**, 641–649
- [24]. Koneman E. W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C. and Winn J.R.W.C. (2001). *Diagnóstico microbiológico*. 5ª edição, Medsi; Rio de Janeiro, pp. 796-809,
- [25]. Luo X., Pires D., Aínsa J.A., Gracia B., Mulhovo S., Duarte A., Anes E. and Ferreira M.J.M. (2011). Antimycobacterial evaluation and preliminary phytochemical investigation of selected medicinal plants traditionally used in Mozambique, *Journal of Ethnopharmacology*, **137**: 114-120.

[26]. Mai H.D., Van-Dufat H.T., Miche S., Tillequin F., Bastien D. and Sevenet T. (2001). A new diphenyl coumarin and alkaloids from the bark of *Zanthoxylum dimorphophyllum* (Rutaceae). *Z.Naturforsch*, **56**:492-494.

[27]. Mathew A.G, Cissell R. and Liamthong S. (2007). Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: a United States perspective of livestock production. *Foodborne Pathog. Dis.* **4** (2): 115–33.

[28]. Missau F.C., Junior E.P. and Pizzolatti M.G. (2009). Xantonas isoladas de *Polygala pulchella*, disponível em: sec.s bq.org.br/cdrom/32ra/resumos/T0687-1.pdf, acessado a 13 de Dezembro de 2010.

[29]. Morrison R.T. and Boyd R.N. (2005). *Química Orgânica*. 14^a edição, Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa, Portugal. pp. 674-689.

[30]. Murray P.R., Rosenthal K. S. E. e Pfaller M. A. (2006). *Microbiologia Médica*, 5^a edição, Elsevier Editora Ltda.

[31]. Ndou A.P. e Sisulu W. (2006). *Securidaca longepedunculata Fresen*, disponível em: <http://www.plantzafrica.com/plantqrs/securidlong.htm>, acessado a 20 de Agosto de 2010.

[32] Nico D. (2006). Análise da estrutura-função das saponinas purificadas QS21 de *Quillaja saponaria* Molina e CP05 de *Calliandra pulcherrima* Benth e dos seus potenciais adjuvantes na vacina FML contra a leishmaniose visceral murina, disponível em: www.propesq.ufrgs.br/.../539_1246325817_ResumoConradoPedebos.pdf, acessado a 09 de Dezembro de 2010

[33]. Nuvunga R.S. (1998). *Estudo da Planta Securidaca longepedunculata Fresen em Santaca: Estado de Conservação e Uso pelas Comunidades Locais*. Tese de Licenciatura.UEM.

- [34]. Odds F.C. (1988). *Candida* and candidoses: a review and bibliography. 2nd ed. London: Brasilière Tindall.
- [35]. Oliveira V.B., Freitas M.S.M., Mathias L., Braz-Filho R. e Vieira I.J.C. (2000). *Atividade biológica e alcalóides indólicos do gênero Aspidosperma (Apocynaceae)*. Laboratório de Ciências Químicas, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Parque Califórnia, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil, 28013-602
- [36]. Palmer E. and Pitman J. (1972). *Trees of Southern Africa*. Balkema, Cape Town
Van Wyk, B.-E., Van Oudtshoorn, B. and Gericke, N. (2002). *Medicinal Plants of South Africa*. Second Edition, Briza Publications, Pretoria, pp. 236–237.
- [37]. Pelczar M.J., Chang E.C.S. e Krieg N.R. (1996). *Microbiologia: Conceitos E Aplicações*, Volume II, 2^a ed. São Paulo: Makron Books.
- [38]. Ribeiro E.L., Scroferneker M.L., Cavalhes M.S., Campos C.C, and Nagato G.M. (2006). Phenotypic aspects of oral strains of *Candida albicans* in children with Dow's syndrome. *Brazilian Journal of Biology*, **66**: 939-944.
- [39]. Soares K.C.N (2008). *Estudo Do Efeito Vasorrelaxante E Hipotensor Do Extrato Hidroalcoólico Da Polygala Paniculata L. Em Ratos*, CURITIBA, pag. 18
- [40]. Stevenson P.C., Dayarathna T.K., Belmain S.R and Veitch N.C. (2009). Bisdesmisidic Saponins from *Securidaca Longepedunculata* Roots: Evaluation of Deterrency and Toxicity to Coleopteran Storage Pests, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**: 8860-8867.
- [41]. Taiz L e Zeiger E. (2006). *Fisiologia vegetal*, 3^a ed, Porto Alegre-S. Paulo.

- [42]. Tezuka Y., Irikawa S., Kaneko T., Banskota A.H., Nagaoka T. (2001). Screening of Chinese herbal drug extracts for inhibitory activity on nitric oxide production and identification of an active compound of *Zanthoxylum bungeanum*. *J. Ethnopharmacology*. **77**: 209-217.
- [43]. Trabulsi L.R., Alterthum F., Gompertz O.F. e Candeias J. A. N. (1999). *Microbiologia*, 3ª edição, São Paulo, Atheneu.
- [44]. Tsuchiya et al. (1996). Inhibition of the growth of carcinogenic bacteria in vitro by plant flavonoides. *Experimental*. **50**:846-849.
- [45]. Van Wyk B.E., Van Oudtshoorn B. and Gericke N. (2002). *Medicinal Plants of South Africa*. Second Edition, Briza Publications, Pretoria, pp. 236–237.
- [46]. Van Wyk B.E. and Wink M. (2004). *Medicinal Plants of the World*. First Edition, Briza Publications, Pretoria, p. 296.
- [47]. World Health Organization (1992). Expert committee on specification on Pharmaceutical preparation, Quality Assurance of Pharmaceuticals. Thirty-second report. World Health Organization, Geneva pp 44-76.
- [48]. World Health Organization: (2002) WHO traditional medicine strategy (2002-2005). World Health Organization.

ANEXOS (I-VII)

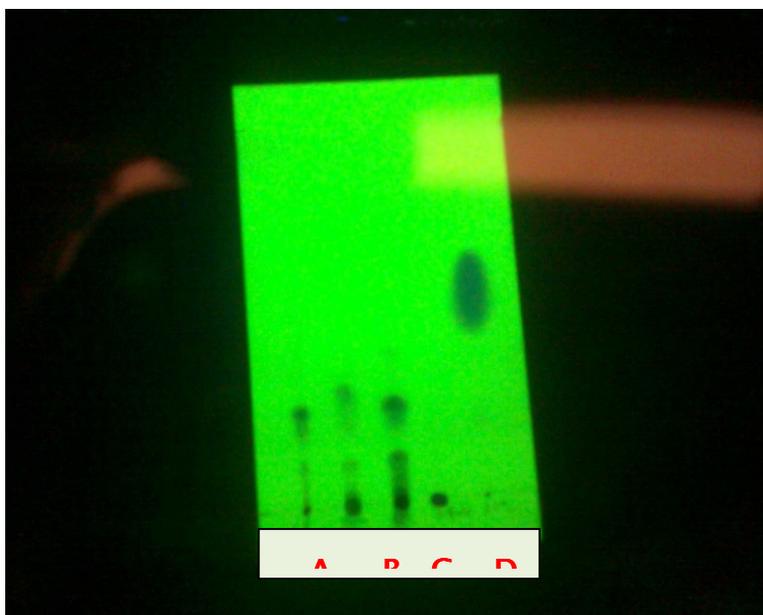
Anexo I

Fotografia de *S. longepedunculata*



Anexo II

Cromatograma dos extractos brutos de éter de petróleo (A), diclorometano (B), acetato de etilo (C), n-butanol (D) obtidos por maceração e salicilato de metilo, usando a lâmpada UV 254 nm.



Anexo III

Cromatograma dos extractos brutos de éter de petróleo (A), diclorometano (B), acetato de etilo (C), n-butanol (D) obtidos por maceração e salicilato de metilo, usando vanilina como revelador e posterior aquecimento por 3 minutos.



Anexo IV

Cromatograma do extracto bruto de alcalóides totais, usando a lâmpada UV 254 nm.



Anexo V

Cromatograma do extracto bruto de alcalóides totais, usando o reagente de Drangedorff como revelador e posterior aquecimento.



Anexo VI

Fotografia das colónias dos diferentes microrganismos usados.



Colónia de *Shigella flexneri*



Colónia de *Candida* sp



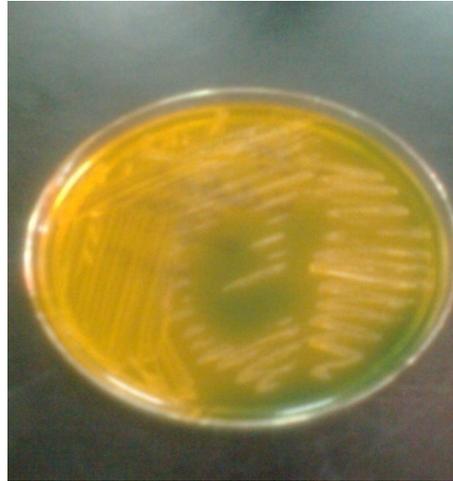
Colónia de *Escherichia coli*



Colónia de *Salmonella* sp



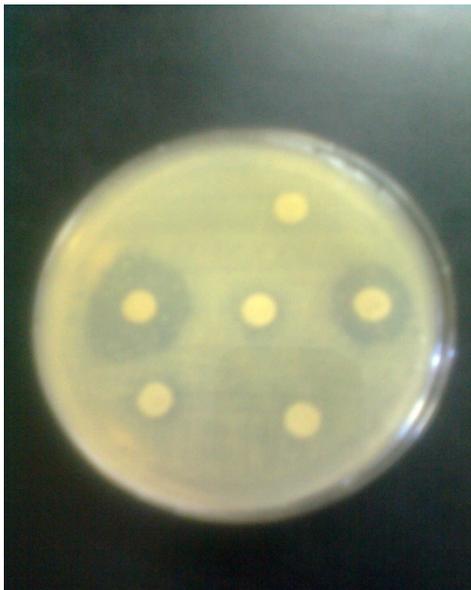
Colónia de *Staphylococcus aureus*



Colónia de *Vibrio cholerae*

Anexo VII

Fotografia do antibiograma do *Staphylococcus aureus* após 24h de incubação.



Staphylococcus aureus



Staphylococcus aureus