



**UNIVERSIDADE
EDUARDO MONDLANE**

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



TRABALHO DE LICENCIATURA

TEMA: AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE
ANTIMICROBIANA DOS EXTRACTOS DAS RAÍZES E
FOLHAS DE *COMBRETUM MOLLE*



Autor: Fernando Ângelo Cuamba

Maputo, Outubro de 2014



**UNIVERSIDADE
EDUARDO MONDLANE**



**FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
TRABALHO DE LICENCIATURA**

TEMA: AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE
ANTIMICROBIANA DOS EXTRACTOS DAS RAÍZES E
FOLHAS DE *COMBRETUM MOLLE*



Autor: Fernando Ângelo Cuamba

Supervisor: Prof. Doutor François Munyemana

Co-Supervisor: dr. Afonso Albino Langa

Maputo, Outubro de 2014

Dedicatória

A DEUS,

Pelo Dom da Vida, Sabedoria e Entendimento pois sem Ele nada teria sido feito e alcançado.

AOS MEUS PAIS,

Dedico-vos, **Ângelo Fernando Cuamba** e **Ludovina Manuel Come**, este presente trabalho porque sem o vosso esforço e abnegação, hoje Eu não estaria aqui com nível superior concluído. Voís tendes sido para mim exemplos de vida a seguir.

À MINHA IRMÃ E AO MEU SOBRINHO,

Jossefina minha querida irmã, pelo apoio incondicional durante esta caminhada e pelos sábios conselhos, **Fabício** por seres um sobrinho educado, atencioso e na esperança de seguires pelo mesmo caminho, dedico-vos.

Agradecimentos

Com certeza esta é umas das partes mais difíceis quando se elabora um trabalho de licenciatura, pois as pessoas que aqui irei mencionar e as que não irei, nunca poderei de facto retribuir pela ajuda e suporte por elas demonstrado a mim.

O meu muito obrigado em primeiro lugar a Deus pelas suas imensas dádivas, protecção e saúde.

Aos meus Pais, o meu muito obrigado pelos seus ensinamentos, pelo amor e afecto demonstrado durante estes anos todos de vida, à minha irmã e sobrinho pela paciência e companheirismo.

À minha tia avô, Maria Nhwere Nfumo, o meu muito obrigado pela ajuda por ela prestada quando eu ainda procurava por plantas usadas na medicina tradicional.

Ao meu supervisor, Prof. Doutor François Munyemana, o meu muito obrigado pelo estímulo, suporte e ensinamentos durante a elaboração deste trabalho.

À dra. Amélia, o meu muito obrigado pelos ensinamentos e acompanhamento durante o período em que realizei as experiências no Laboratório de Produtos Naturais na Faculdade de Ciências da UEM.

Ao dr. Langa do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Veterinária da UEM, o meu muito obrigado pela atenção e disponibilidade para a realização dos testes antimicrobianos.

Aos técnicos dos Laboratórios de Química da Faculdade de Ciências e de Microbiologia da Faculdade de Veterinária da UEM, o meu profundo agradecimento pelo apoio e suporte prestado durante a realização das respectivas experiências laboratoriais.

Aos meus colegas e amigos Nelson, Vasco, Juvêncio, Marinela, Marta e Portásio pelo vosso carinho, companheirismo e amizade o meu muito obrigado.

A todos que directa ou indirectamente contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos!

Declaração de Honra

Declaro por minha honra que este trabalho de licenciatura foi elaborado por mim e nunca foi apresentado na sua essência para quaisquer fins, estando indicadas no texto e nas referências bibliográficas todas as fontes por mim consultadas.

Maputo, aos _____ de _____ de _____

(Fernando Ângelo Cuamba)

RESUMO

O surgimento de cepas de bactérias resistentes aos antibióticos actualmente usados vem crescendo de forma vertiginosa causando uma maior morbidade e mortalidade, daí a necessidade de encontrar novos antibióticos que sejam mais eficazes. A utilização de extractos vegetais tem sido um bom caminho para a pesquisa de novas drogas contra microrganismos indesejáveis. Em Moçambique, a planta *Combretum molle* é usada na medicina tradicional para tratar diferentes doenças incluindo prisão de ventre, dores de cabeça, dores de estômago, febre, disenteria, inchaços e como um anti - helmíntico para ancilostomíase. O presente trabalho dedicou-se à triagem fitoquímica preliminar e avaliação antimicrobiana dos extractos de raízes e folhas de *Combretum molle*. Os extractos brutos foram obtidos por maceração com agitação usando como solvente a acetona e as fracções foram obtidas usando os solventes éter de petróleo, clorofórmio, n-butanol e metanol a 65%. Para a avaliação da actividade antimicrobiana foi utilizado o método de Kirby e Bauer também conhecido como método de difusão em disco, onde foram testados os seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp*, *Escherichia coli*, *Salmonela sp* e *Candida albicans*. O antibiótico utilizado para o controlo positivo foi a *Ciprofloxacina* e para o controlo positivo dos fungos foi a *Nistatina*. Os testes fitoquímicos realizados nos extractos brutos e fracções das raízes e folhas demonstraram a presença de esteróides, triterpenóides, antraquinonas, saponinas, flavonóides e taninos. *Escherichia coli* e *Salmonela sp* foram as bactérias que apresentaram maior resistência às fracções das raízes bem como às fracções das folhas. *Staphylococcus aureus* foi a bactéria que mais se demonstrou sensível às fracções das raízes e a *Streptococcus sp* foi a bactéria que apresentou uma maior sensibilidade às fracções das folhas. Os resultados obtidos no presente trabalho vêm confirmar de certa maneira a relação existente entre a utilização da planta *Combretum molle* na medicina tradicional como antimicrobiano e a sua composição fitoquímica.

AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRACTOS DAS RAÍZES E
FOLHAS DE *COMBRETUM MOLLE*

ÍNDICE GERAL

Dedicatória.....	i
Agradecimentos	ii
Declaração de Honra.....	iii
RESUMO.....	iv
ÍNDICE DE TABELAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. OBJECTIVOS.....	3
2.1. Objectivo geral.....	3
2.2. Objectivos específicos.....	3
III. METODOLOGIA USADA.....	4
1. Revisão bibliográfica.....	4
2. Parte experimental.....	4
a) Material vegetal.....	4
b) Preparação dos extractos brutos e fracções.....	4
c) Testes qualitativos de identificação de metabólitos secundários.....	4
d) Testes antimicrobianos.....	4
e) Discussão e interpretação dos resultados.....	5
IV. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
4.1. Descrição da planta em estudo.....	6
4.1.1. <i>Combretum molle</i>	6
4.1.2. Distribuição.....	6
4.1.3. Descrição taxonómica.....	7

*AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRACTOS DAS RAÍZES E
FOLHAS DE COMBRETUM MOLLE*

4.1.4. Usos na medicina tradicional.....	7
4.2. Compostos isolados da família Combretaceae.....	7
4.3. Actividade antimicrobiana da família Combretaceae	11
4.4. Principais metabólitos secundários da família <i>Combretaceae</i> com actividade antimicrobiana.....	11
4.4.1. Alcalóides	12
4.4.2. Flavonóides.....	13
4.4.3. Taninos	15
4.4.4. Saponinas.....	16
4.4.5. Terpenos	18
V. PARTE EXPERIMENTAL	19
5.1. Colheita do material vegetal.....	19
5.2. Solventes e reagentes usados na extracção e testes fitoquímicos.....	19
5.3. Preparação dos extractos	20
5.4. Fluxograma.....	21
5.5. Testes fitoquímicos	22
5.5.1. Teste de reconhecimento de flavonóides.....	22
5.5.2. Teste de reconhecimento de taninos e fenóis	22
5.5.3. Teste de reconhecimento de saponinas.....	23
5.5.4. Teste de reconhecimento de triterpenóides e esteróides.....	23
5.5.5. Teste de reconhecimento dos alcalóides livres.....	23
5.5.6. Testes de Borntrager para reconhecimento de antraquinonas	24
5.6. Testes antimicrobianos.....	25
5.6.1. Materiais e Reagentes.....	25
5.6.2. Microrganismos	26

*AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRACTOS DAS RAÍZES E
FOLHAS DE COMBRETUM MOLLE*

5.6.3. Preparação de meios de cultura	26
5.6.4. Dissolução em água	26
5.6.5. Distribuição de meios de cultura	26
5.6.6. Conservação do meio.....	27
5.6.7. Preparação dos extractos com concentração máxima “200 mg/mL”	27
5.6.8. Preparação dos discos	27
5.6.9. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos	27
5.6.10. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	28
VI. RESULTADOS	29
6.1. Resultados obtidos na preparação das fracções das folhas e raízes	29
6.2. Resultados dos testes fitoquímicos.....	29
6.3. Resultados dos testes da actividade antimicrobiana.....	30
6.4. Resultados da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	31
VII. DISCUSSÃO.....	33
VIII. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	36
8.1. Conclusões	36
8.2. Recomendações	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
Anexos	A

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Solventes e reagentes	19
Tabela 2: Reagentes utilizados.....	25
Tabela 3: Materiais utilizados.....	25
Tabela 4: Microrganismos estudados.....	26
Tabela 5: Quantidades obtidas das fracções do pó das raízes e folhas de <i>Combretum molle</i>	29
Tabela 6: Resultados dos testes fitoquímicos nas fracções de raízes de <i>Combretum molle</i>	29
Tabela 8: Resultados dos testes antibacterianos e antifúngicos das raízes de <i>Combretum molle</i> pelo método de difusão em disco na concentração de 200 mg/mL (Halos de inibição em mm)..	30
Tabela 9: Resultados dos testes antibacterianos e antifúngicos das folhas de <i>Combretum molle</i> pelo método de difusão em disco na concentração de 200 mg/mL (Halos de inibição em mm)..	31
Tabela 10: Resultados dos testes antifúngicos na determinação da CIM dos extractos de raízes de <i>Combretum molle</i> para <i>C. albicans</i> (halo de inibição em mm).	31
Tabela 11: Resultados dos testes antibacterianos na determinação da CIM dos extractos de raízes de <i>Combretum molle</i> para <i>Staphylococcus aureus</i> (halo de inibição em mm).....	31
Tabela 12: Resultados dos testes antibacterianos na determinação da CIM dos extractos de raízes de <i>Combretum molle</i> para <i>Streptococcus sp</i> (halo de inibição em mm).....	32
Tabela 13: Resultados dos testes antifúngicos na determinação da CIM dos extractos de folhas de <i>Combretum molle</i> para <i>C. albicans</i> (halo de inibição em mm).	32
Tabela 14: Resultados dos testes antibacterianos na determinação da CIM dos extractos de folhas de <i>Combretum molle</i> para <i>Streptococcus sp</i> (halo de inibição em mm).....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Folhas de <i>Combretum molle</i>	6
Figura 2: Alguns exemplos de flavanonas isoladas de <i>Combretum caffrum</i>	8
Figura 3: Alguns exemplos de triterpenoides isolados de <i>Combretum molle</i>	9
Figura 4: Alguns exemplos de compostos químicos isolados de <i>Combretum zeyheri</i>	10
Figura 5: Estruturas de alguns alcalóides farmacologicamente importantes: codeína (IX) morfina (X), cafeína (XI), berberina (XII)	12
Figura 6: Esqueleto básico de flavonóides.....	13
Figura 7: Estrutura de flavanonol quercetina (XIII) e seu glicósido rutina (XIV).	14
Figura 8: Estruturas de ácido gálico (XV) e ácido elágico (XVI).	15
Figura 9: Estruturas de taninos condensados: epicatequina (XVII), galocatequina (XVIII)	16
Figura 10: Estruturas da hecogenina (XIX) e ácido glicirrízico (XX).....	17
Figura 11: Estrutura do isopreno (XXI).....	18

LISTA DE ABREVIATURAS

C. albicans – *Candida albicans*

C. apiculatum – *Combretum apiculatum*

C. caffrum - *Combretum caffrum*

C. molle – *Combretum molle*

CIM – Concentração Inibitória Mínima

Cipro – Ciprofloxacina;

E.B – Extracto bruto

FAQ – Fracção aquosa

FBL – Fracção butanólica

FCL – Fracção clorofórmica

FEP – Fracção de éter de petróleo

FHM – Fracção hidrometanólica

Nist – Nistatina

T. calamansanai – *Terminalia calamansanai*

T. oblongata – *Terminalia Oblongata*

UEM – Universidade Eduardo Mondlane

I. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais têm sido usadas durante séculos como remédios para doenças humanas e oferecer uma nova fonte de compostos químicos biologicamente activos como agentes antimicrobianos. Estima-se que 14 – 28% de espécies de plantas superiores são utilizadas medicinalmente e que 74% dos componentes farmacologicamente activos foram descobertos após o acompanhamento de uso de plantas medicinais (Nyenje, 2011). Os fitofármacos têm sido preparados e administrados de forma empírica, com falta de critério e conhecimento de efeitos farmacológicos. A população moçambicana não constitui excepção a esta regra apesar de possuir certo conhecimento das plantas medicinais porem ainda é empírico e não formal. Apesar do advento e da expansão da medicina formal no país, existe ainda uma grande dependência nos preparados feitos pelos praticantes da medicina tradicional para a cura de doenças (Simone, 2001). Deste modo, o Governo de Moçambique, em colaboração com parceiros nacionais e internacionais, fomenta a realização de pesquisas que contribuem para o melhor conhecimento das práticas médicas e avaliação de medicamentos tradicionais, bem como a potenciação do ensino superior a desenhar actividades de formação e investigação nas áreas de medicina e farmacologia tradicional (MISAU, 2004).

A resistência bacteriana é um problema de saúde pública com sérias consequências para a sociedade, tais como, o aumento de morbilidade e mortalidade em hospitais com perdas económicas para as instituições de saúde por isso, nos dias de hoje, tem crescido a busca por novos antibióticos, pois o surgimento de cepas resistentes aos antibióticos vem crescendo de forma vertiginosa, daí a necessidade de encontrar novos fármacos que sejam mais eficazes no combate às doenças (Sánchez *et al.*, 2006). Desta forma, a utilização de extractos vegetais tem sido um bom caminho para a pesquisa de novas drogas contra microrganismos indesejáveis, visto que alguns destes já se encontram resistentes aos fármacos sintéticos de última geração lançados no mercado (Bonella *et al.*, 2011). Estudos feitos por Nyenje (2011) na África do Sul sobre a avaliação da actividade antimicrobiana dos extractos acetónicos, metanólicos, etanólicos da casca do caule de *Combretum molle* contra *Streptococcus pyogenes*, *Plesiomonas shigelloides*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *Helicobacter pylori*, mostraram que o extracto

*AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRACTOS DAS RAÍZES E
FOLHAS DE COMBRETUM MOLLE*

acetónico foi o que apresentou maior actividade com diâmetros de inibição 0 – 32mm e CIM de 0.078 – 5.0 mg/mL.

Estudos feitos por Saidu & Abdullahi (2011) sobre a composição fitoquímica e actividade antimicrobiana de extractos aquosos, etanólico e metanólico das folhas das plantas de *Combretum molle* contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia* e *Escherichia coli*, mostraram que a mistura dos extractos etanólico e metanólico apresenta um grande sinergismo e possibilita o aumento da actividade antimicrobiana. Neste contexto, no presente trabalho, pretende-se avaliar a actividade antimicrobiana dos extractos das raízes e folhas de *Combretum molle* e comparar a sua eficácia frente a diferentes microrganismos.

II. OBJECTIVOS

2.1. Objectivo geral

- Avaliar o potencial antimicrobiano dos extractos das raízes e folhas da planta *Combretum molle*

2.2. Objectivos específicos

- Realizar testes antimicrobianos dos extractos das raízes e folhas em estudo contra as cepas de bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp*, *Salmonella sp*.
- Realizar testes antifúngicos dos extractos das raízes e folhas em estudo contra *Candida albicans*
- Determinar a concentração inibitória mínima dos diferentes extractos das partes da planta em estudo.
- Estabelecer uma comparação entre o potencial antimicrobiano dos extractos das raízes e folhas de *Combretum molle* e estabelecer a correlação entre a composição fitoquímica dos extractos e a sua actividade antimicrobiana.

III. METODOLOGIA USADA

O presente trabalho obedeceu à seguinte ordem:

1. Revisão bibliográfica

A revisão bibliográfica focou-se na consulta de livros, revistas, artigos científicos e publicações na internet que abordam vários assuntos sobre *Combretum molle* sendo os principais os que concernem à fitoquímica, botânica, farmacologia e microbiologia.

2. Parte experimental

a) Material vegetal

O pó usado neste trabalho foi obtido do material vegetal colhido pela Candida Mavie no dia 20 de Julho de 2006 na região de Xiboene, distrito de Moamba, província de Maputo. A identificação foi feita no herbário do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências da UEM, a partir de um exemplar da espécie nº 7987 (Mavie, 2007).

b) Preparação dos extractos brutos e fracções

Os extractos foram preparados pelo método de maceração sob agitação constante à temperatura ambiente e as fracções foram obtidas por extracção solvente-solvente.

c) Testes qualitativos de identificação de metabólitos secundários

Para a realização dos testes de identificação dos metabólitos secundários, foram feitos testes qualitativos colorimétricos e de precipitação.

d) Testes antimicrobianos

Os testes antibacterianos e antifúngicos foram realizados usando o método de difusão em ágar (método de Kirby-Bauer).

e) Discussão e interpretação dos resultados

A análise dos resultados consistiu na comparação dos resultados obtidos, estabelecendo a correlação entre os testes de sensibilidade microbiana e a composição fitoquímica das partes da planta estudada. As conclusões e recomendações foram feitas de acordo com os resultados obtidos.

IV. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Descrição da planta em estudo

4.1.1. *Combretum molle*



Nome científico: *Combretum molle*

Nome vernacular: Xicucutsi

Reino: Plantae

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Myrtales

Família: Combretaceae

Género: *Combretum*

Figura 1: Folhas de *Combretum molle*

4.1.2. Distribuição

É uma espécie predominante nas florestas abertas e savanas e com larga distribuição na África Austral, em países tropicais e na Arábia. Também ocorre na República Centro Africana, Djibuti, Eritreia, Etiópia, Gabão, Quênia, Senegal, Somália, Sudão, Uganda, sul da Arábia Saudita, Nigéria e Iémen.

Em Moçambique é distribuída em quase todo o território mas com maior predominância nas províncias de Maputo, Gaza, Zambézia, Nampula e Tete (Zucula, 2011).

4.1.3. Descrição taxonómica

Combretum molle pertence a família Combretaceae, no género *Combretum*. É uma árvore angiospérmica de tamanho pequeno a médio, que alcança os 10-20 m de altura. As folhas são estreitamente elípticas, normalmente com cerca de 60-100 mm de comprimento e 40- 60 mm de largura. As flores são amarelas-esverdeadas, atractivas, de cheiro desagradável. As frutas têm a forma de asas e possuem geralmente 15-20 mm de comprimento e 15-20 mm de largura; quando secas apresentam a cor castanha-avermelhada. Ocorre acima de uma gama extensiva de altitudes, de nível de mar para aproximadamente 1500 m, em bosque aberto. (Palgrave, 2002; Zucula, 2011).

4.1.4. Usos na medicina tradicional

O decocto das raízes de *C. Molle* é utilizado contra ancilostomiase, dores de estômago, picada de cobra, lepra, febre, disenteria, inchaço geral do corpo e aborto, bem como para o inchaço do abdómen, esterilidade e constipação. Muitas vezes, *C. molle* é misturado com outras espécies de *Combretum* ou com outras espécies de plantas. Acredita-se que estes remédios feitos a partir de misturas de espécies de plantas têm melhores efeitos curativos. A mistura de raízes de *C. molle* com raízes de *Annona chrysophylla* ou *Annona senegalensis* é utilizada como um expectorante. Há poucos relatos sobre o uso medicinal da casca do caule de *C. Molle*; uma suspensão aquosa da casca do caule é usada para gargarejar e é bebida para tratar a angina e o decocto da casca interna é usado para o tratamento de problemas gástricos (Nyenje, 2011). Alguns praticantes de medicina tradicional na província de KwaZulu-Natal, África do Sul alegam que decoctos, infusões e outros extractos de *C. molle* são remédios eficazes para o tratamento e controlo de uma variedade de doenças humanas, tais como artrite e outras condições inflamatórias (Ojewole, 2008).

4.2. Compostos isolados da família Combretaceae

O ácido gálico e seus derivados são constituintes comuns de plantas da família *Combretaceae*. Um grande número de taninos foi isolado a partir das plantas do género *Terminalia*: por exemplo a partir das folhas de *T. Calamansanai* foi isolado o elagitanino (Pettit *et al.*, 1996).

Dois flavonóides a arjonolone e arjonone foram isolados a partir da *T. Arjuna* que é uma planta muito usada na Índia e países vizinhos no tratamento de doenças derivadas da insuficiência

cardiovascular. A partir das folhas de *C. Leprosum* foram isolados também dois flavonóides 3-O-metilquercetina e 3-O- α -L-ramnopiranosilquercetina (Martini *et al.*, 2004).

A partir do extracto acetónico das frutas de *C. molle* foram isolados alguns triterpenóides tais como ácido arjunólico, arjugenino e arjunglicósido. Duas flavanonas arjunolone (I) e arjonone (II) foram isoladas a partir das folhas de *C. Caffrum*.

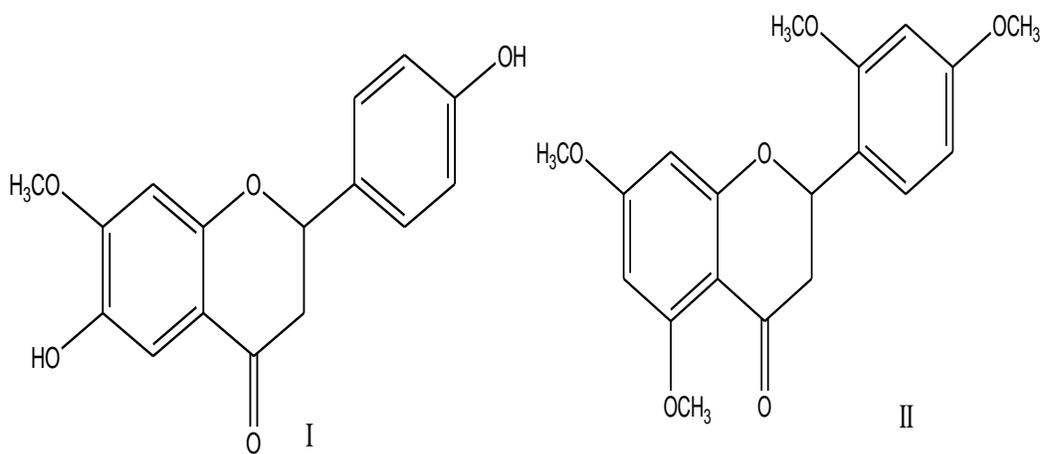


Figura 2: Alguns exemplos de flavanonas isoladas de *Combretum caffrum*.

Rogers e Subramony (1988), isolaram ácidos triterpénicos pentacíclicos a partir da folha de *C. Imberbe*. O derivado glicosídico foi também isolado baseado no olean-12-en-29-oato aglicona, foi dado o nome trivial ácido imbérbico. O ácido arjunólico (IV), Arjugenino (V) e arjunglicósido (III) foram isolados a partir das frutas de *C. molle* (Panzini, 1993).

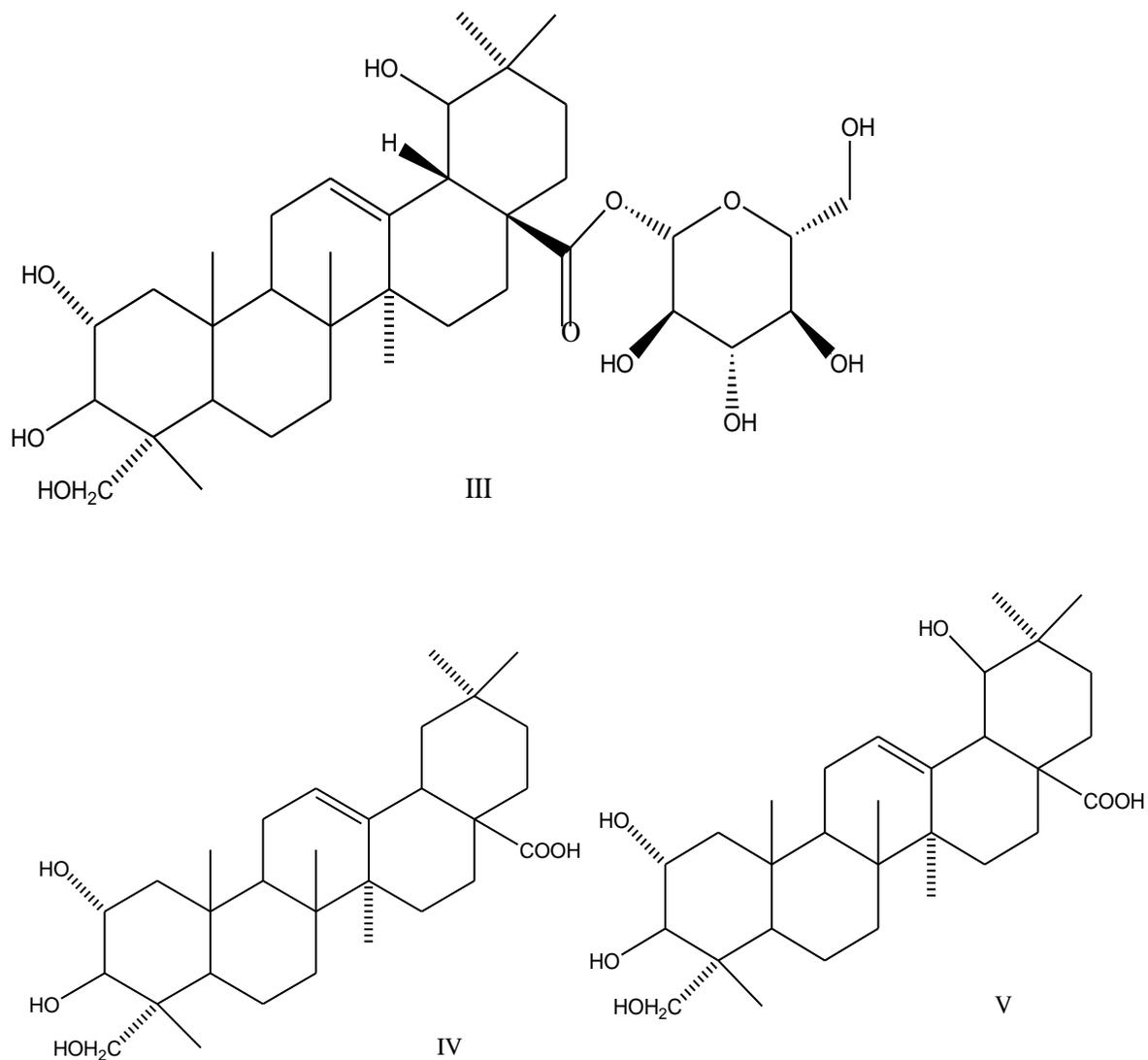


Figura 3: Alguns exemplos de triterpenoides isolados de *Combretum molle*

O extracto hexânico da fruta de *C. apiculatum* produziu um composto que foi identificado como anti-oxidante, 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol (VI), também isolado a partir das folhas de *C. Zeyheri*. Dos frutos de *C. Zeyheri* foram isolados ácido (S)-3-amino-2-(3-aminometilfenil) propanóico (VII) e (R)-3-(4-hidroxifenil)-2-metilaminopropanóico (VIII). (Panzini, 1993).

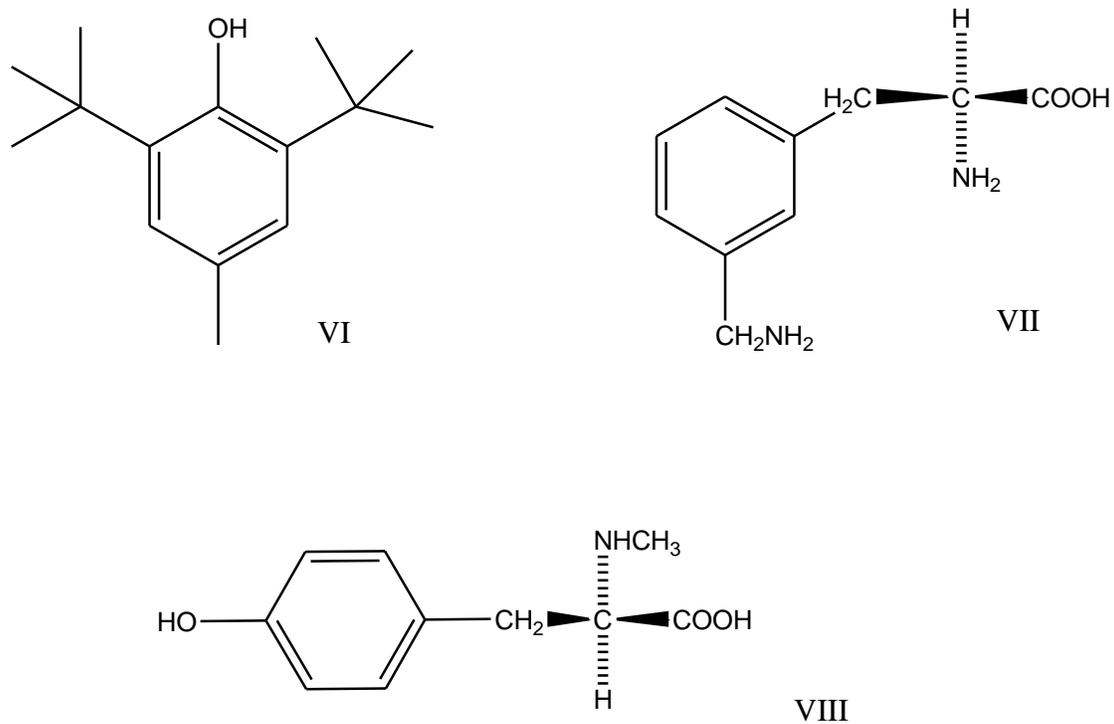


Figura 4: Alguns exemplos de compostos químicos isolados de *Combretum zeyheri*

4.3. Actividade antimicrobiana da família Combretaceae

Em 20 espécies *Combretum* foram identificadas as actividades antihelmíntica, anti-inflamatória e antiparasitária. O extracto acetónico das folhas de *C. Woodii* apresentou melhores valores de CIM em relação a cloranfenicol e ampicilina. O composto antibacteriano combretastatina B5 isolado desta planta apresentou um valor de CIM de 16 µg/mL contra *Staphylococcus aureus* (Angeh, 2006).

No seu trabalho de doutoramento, Martini isolou e caracterizou sete compostos antibacterianos incluindo kaemferol, rhamnocitrina, quercetina-5,3-dimetiléter que demonstraram uma boa actividade contra *Vibrio Cholerae* e *Enterococcus faecalis*, com valores de CIM na escala de 25-50 µg/mL. Rhamnocitrina e quercetina-5,3-dimetiléter apresentaram também resultados (25 µg/mL) contra *Micrococcus luteus* e *Shigella sonnei* (Martini *et al.*, 2004).

Estudos realizados por Arses *et al.* (2000) revelaram que o extracto acetónico do pó das cascas do caule da *Combretum molle* tem uma actividade antibacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis* causando uma completa inibição do crescimento do microrganismo nas concentrações maiores que 1 mg/mL.

Estudos feitos por Ouattara *et al.* (2006) demonstraram que os extractos hidrometanólicos das raízes de *Combretum glutinosum* possuem uma actividade antimalária inibindo o crescimento de *Plasmodium falciparum* na concentração 5 µg/mL.

4.4. Principais metabólitos secundários da família Combretaceae com actividade antimicrobiana.

Os principais metabólitos secundários com acção antifúngica e antibacteriana são alcalóides, flavonóides, taninos, glicósidos, isoprenóides e saponinas (Simon *et al.*, 2008).

4.4.1. Alcalóides

Os alcalóides são compostos orgânicos cíclicos que possuem um ou mais átomos de nitrogénio em estado de oxidação negativo, são sintetizados a partir do metabolismo dos seres vivos e possuem distribuição limitada, o que exclui aminoácidos, hormonas, ácidos nucleicos e péptidos (Morrison & Boyd, 2005). Devido à presença do átomo de nitrogénio estes compostos apresentam carácter básico, do qual se origina não apenas seu nome (Alcalóide = semelhante a uma base) como também propriedades importantes tanto para métodos de extracção, tanto no que se refere à actividade biológica (Du Preez, 2012). Outros alcalóides importantes de origem vegetal incluem a cafeína (XI), estimulantes viciantes, nicotina, codeína (IX), atropina, morfina (X), ergotamina, cocaína, nicotina, berberina (XII) e efedrina. Aminoácidos actuam como precursores para a biossíntese de alcalóides com ornitina e lisina vulgarmente utilizados como materiais de partida.

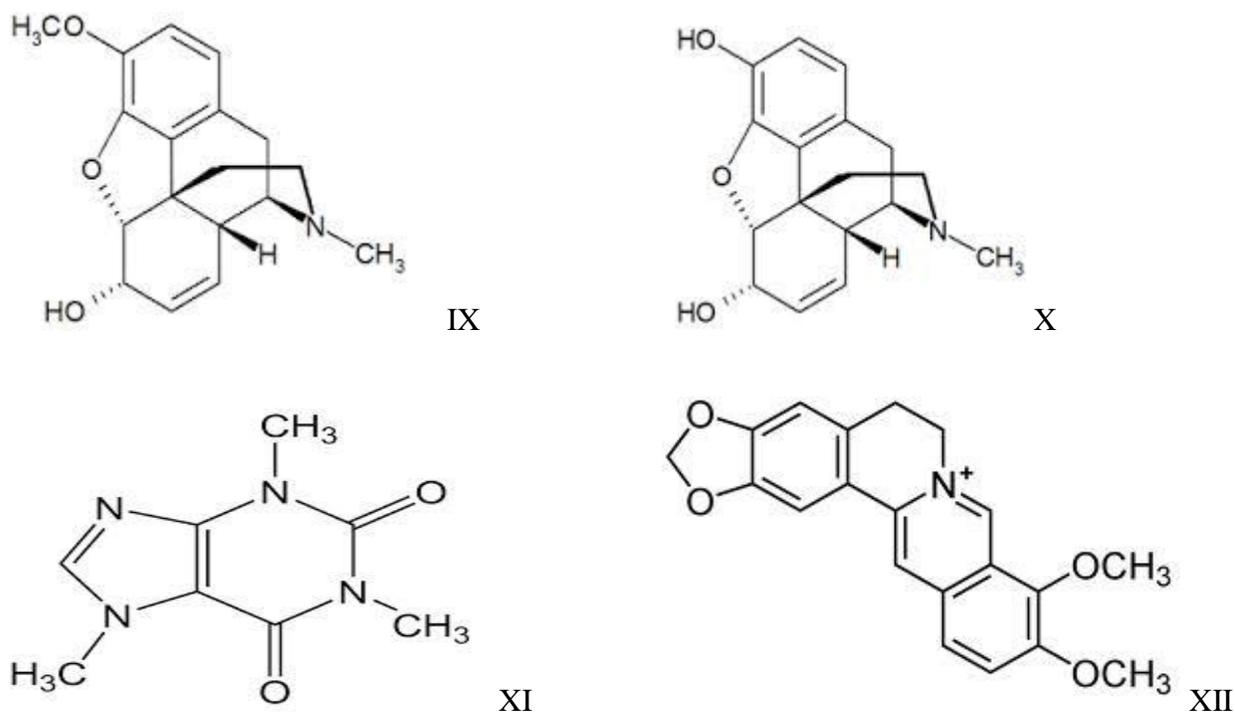


Figura 5: Estruturas de alguns alcalóides farmacologicamente importantes: codeína (IX) morfina (X), cafeína (XI), berberina (XII)

Alguns alcalóides são usados como potenciais agentes antimaláricos, antimicrobianos, anticancerígenos, anti-inflamatórios, no tratamento de diabetes, como afrodisíacos, vasodilatadores, antisépticos, cicatrizantes e estimulantes (Du Preez, 2012).

4.4.2. Flavonóides

Flavonóides são substâncias aromáticas com 15 átomos de carbono (C_{15}) no seu esqueleto básico, sendo compostos fenólicos, que possuem nessa estrutura anéis aromáticos $C_6-C_3-C_6$. O esqueleto C_{15} dos flavonóides é biogeneticamente derivado do fenilpropano (C_6-C_3) e três unidades de acetato (C_6). Os flavonóides compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana. Entretanto, tais compostos possuem uma série de propriedades farmacológicas que os fazem actuar sobre sistemas biológicos. (Yokozawa *et al.*, 1997).

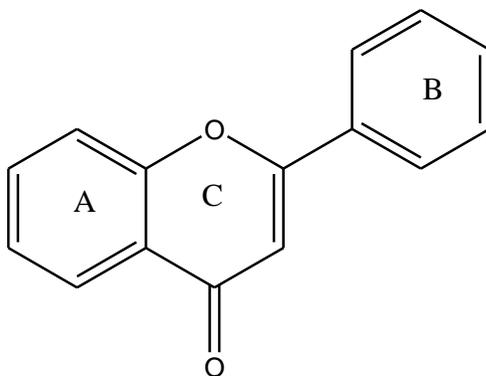


Figura 6: Esqueleto básico de flavonóides

De acordo com o grau de oxidação do fragmento C_3 , os flavonóides classificam-se em: catequinas, leucoantocianidinas, antocianidinas, flavanonas, flavononois, chalconas, flavonas, flavanóis e auronas. Dos glicosídeos flavonóides o mais conhecido e divulgado é a rutina (XIV) e sua aglicona quercetina (XIII).

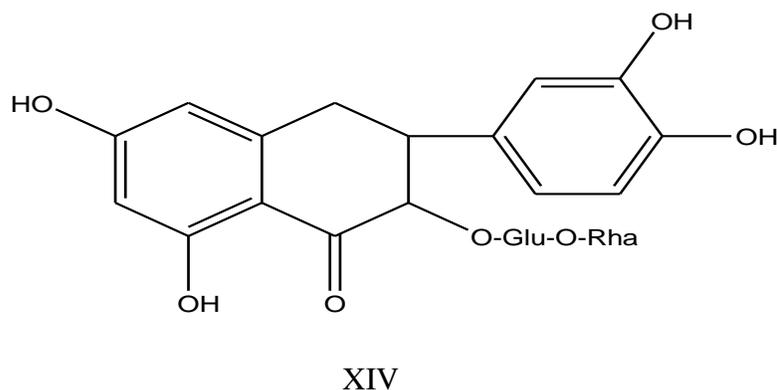
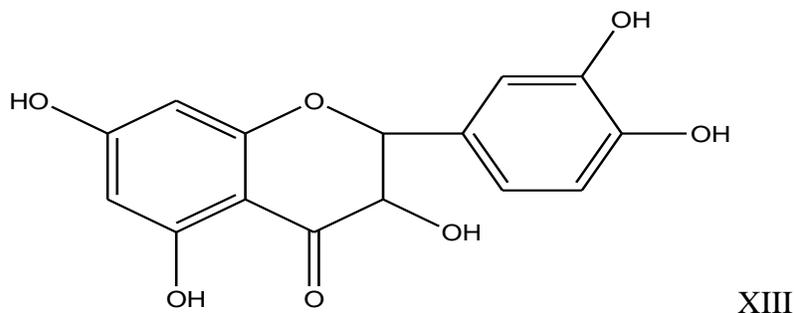


Figura 7: Estrutura de flavanona quercetina (XIII) e seu glicósido rutina (XIV).

Entre as várias actividades biológicas reveladas por flavonóides podemos citar: antimicrobiana, antivirais, citotóxicas, antineoplásicas, antioxidantes, antihepatotóxicas, antihipertensivas, hipolipidémicas, anti-inflamatórias. A acção antimicrobiana dos flavonóides, provavelmente está relacionada com capacidade de complexar proteínas extra celulares e solúveis, bem como estruturas da parede celular. Flavonóides mais lipofílicos podem actuar provocando o rompimento de membranas microbianas. As actividades bioquímicas dos flavonóides e de seus metabólitos dependem da sua estrutura química e podem variar com substituições incluindo, glicosilações, hidroxilações, malonilações, metilações, sulfatações e hidrogenação. Flavonóides e isoflavonóides ocorrem comumente como ésteres, éteres ou derivados glicosídicos ou ainda uma mistura deles (Machado *et al.*, 2008).

4.4.3. Taninos

Taninos são compostos fenólicos muito reactivos quimicamente, que formam pontes de hidrogénio intra e intermolecular. São solúveis em água e com peso molecular compreendido entre 500 e 3000 Dalton, possuem a habilidade de formar complexos insolúveis em água com proteínas, gelatinas e alcalóides (Monteiro *et al.*, 2005). Os taninos podem ser classificados como hidrolisáveis e não hidrolisáveis ou condensados. Os taninos hidrolisáveis por hidrólise ácida libertam ácidos fenólicos: gálico, caféico, elágico e um açúcar. Os taninos condensados com tratamento ácido originam moléculas de elevado peso molecular e apenas uma pequena quantidade de pequenas moléculas antocianidinas são produzidas (Carvalho, 2007). A Figura 8 apresenta-nos o ácido gálico (XV) e o ácido elágico (XVI).

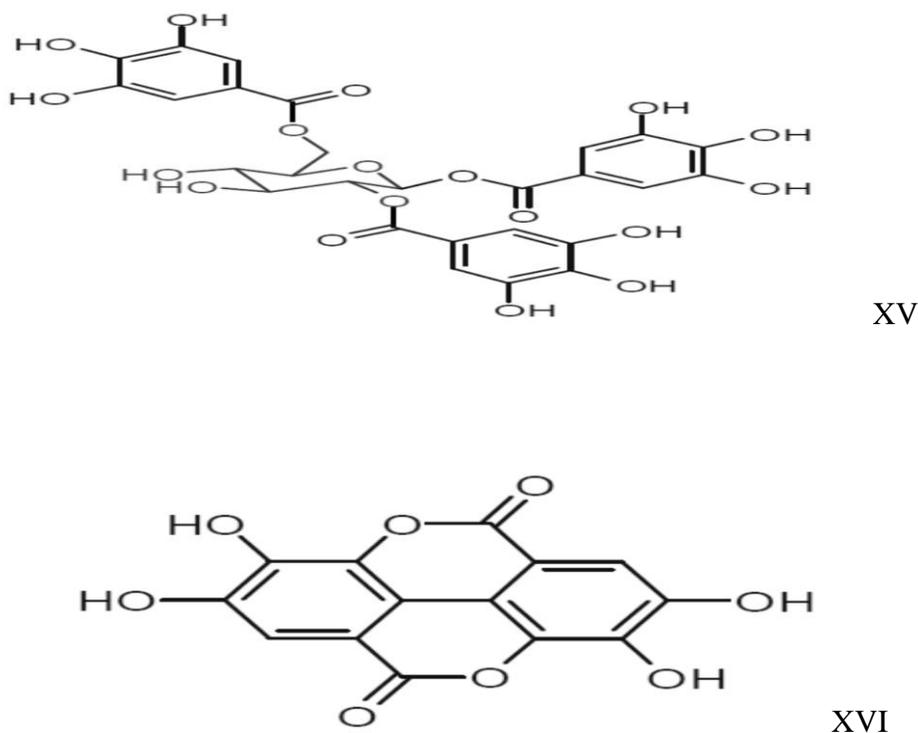


Figura 8: Estruturas de ácido gálico (XV) e ácido elágico (XVI).

Taninos condensados (taninos catéquicos, proantocianidinas), oligómeros e polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol (Figura 9). Não são hidrolisáveis e não são heterosídeos (Carvalho, 2007).

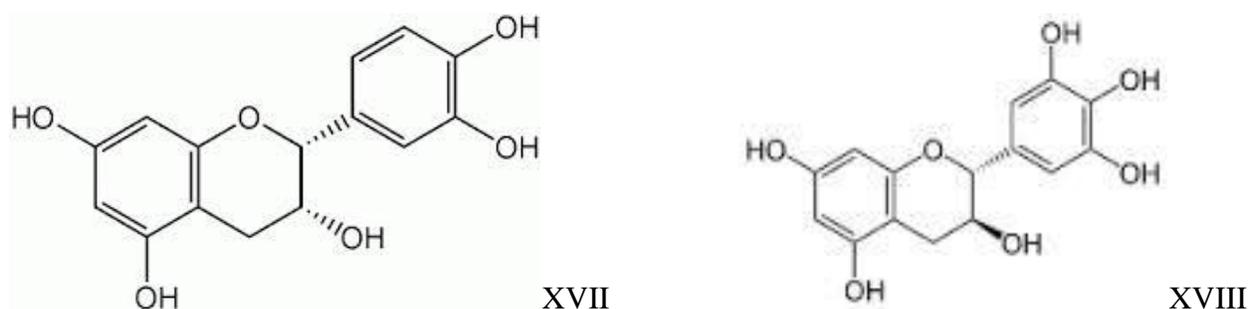


Figura 9: Estruturas de taninos condensados: epicatequina (XVII) e galcatequina (XVIII)

Vários estudos sobre actividade biológica dos taninos demonstraram importante acção antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória, antiséptica, antidiarreica, anti-HIV. Supõe-se que a actividade antibacteriana, antifúngica e anti-inflamatória destes compostos é devido à habilidade de complexar com outras moléculas, principalmente proteínas e polissacáridos (Monteiro *et al.*, 2005). Diversos substratos ricos em taninos conseguem inibir o desenvolvimento dos fungos pertencentes aos géneros *Aspergillus*, *Botrytis*, *Penicillium* e *Trichoderma*. Esta interacção é influenciada pela estrutura dos polifenóis e das proteínas, pela concentração relativa de ambos e pelas condições do meio (Carvalho, 2007).

4.4.4. Saponinas

As saponinas, também chamadas saponosídeos, formam um grupo particular de heterosídeos derivados dos triterpenos tetracíclicos. O nome provém do facto de formarem espuma abundante quando agitadas na água, à semelhança do sabão. Esta propriedade decorre de sua estrutura química, na qual açúcares solúveis estão ligados a esteróides lipofílicos ou triterpénicos (Harbone & Baxter, 1995).

Elas reduzem a tensão superficial da água e causam, *in vitro*, a hemólise de eritrócitos. A classificação das saponinas geralmente é feita de acordo com o núcleo fundamental aglicona, podendo ser denominadas saponinas esteroidais ou saponinas triterpénicas. As saponinas esteroidais são encontradas quase que exclusivamente nas monocotiledóneas, já as saponinas triterpénicas encontram-se predominantemente nas dicotiledóneas, principalmente nas famílias sapindaceae, sapotaceae, polygonaceae, caryophyllaceae e araliaceae, como por exemplo saponina esteroidal hecogenina(XIX) (Schenkel et al., 2001). As saponinas triterpénicas pertencem a um grupo de compostos naturais que possuem um amplo espectro de actividades biológicas e farmacológicas. A capacidade de produzir hemólise é a sua actividade mais comum. A actividade hemolítica das saponinas é parte integrante do sistema de protecção vegetal ou das plantas contra ataques de predadores (bactérias, fungos, vírus e insectos), está associada ao potencial antimicrobiano, antifúngico e espermicida demonstrado por uma diversidade de plantas e como exemplo temos a saponina triterpénica ácido glicirrízico (XX) (Diniz, 2006).

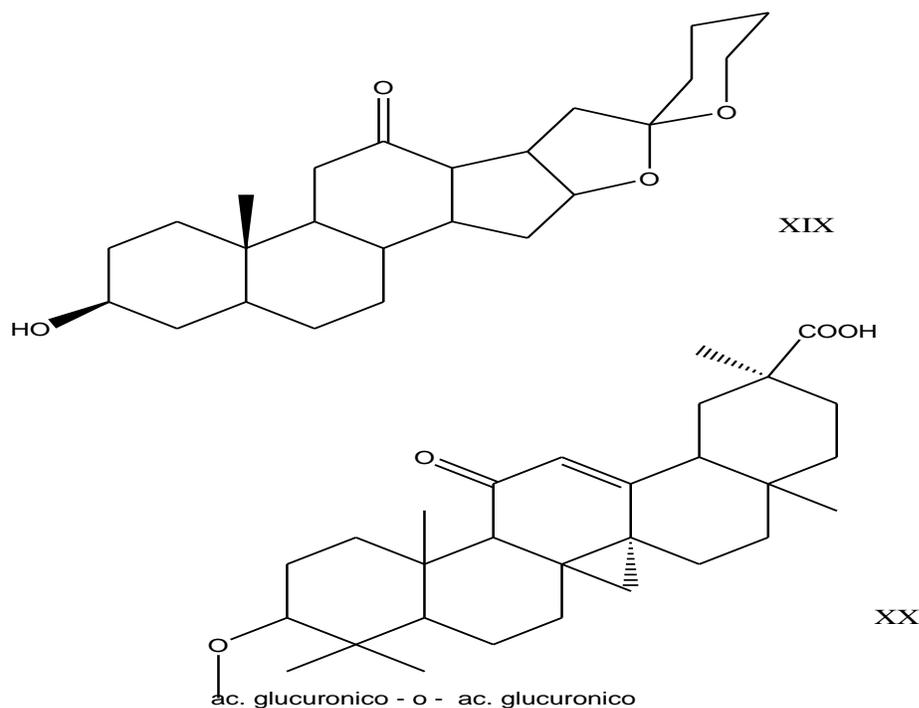
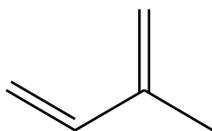


Figura 10: Estruturas da hecogenina (XIX) e ácido glicirrízico (XX).

4.4.5. Terpenos

Os terpenos estão entre os grupos mais difundidos e quimicamente diferentes dos produtos naturais. Eles são hidrocarbonetos insaturados inflamáveis, existentes na forma líquida comumente encontrados em óleos essenciais, resinas ou oleoresinas. Terpenos incluem hidrocarbonetos de origem vegetal, de fórmula geral $(C_5H_8)_n$ e são classificados como mono-, di-, tri- e sesquiterpenos, dependendo do número de átomos de carbono. Exemplos de monoterpenos geralmente importantes incluem terpinen-4-ol, tujona, cânfora, eugenol e mentol. Os diterpenos (C_{20}) são classicamente considerados como resinas e o taxol, o agente anti-câncer, é o exemplo comum. Os triterpenos (C_{30}) incluem esteróides e glicosídeos cardíacos, com actividade anti-inflamatória, sedativa, insecticida ou actividade citotóxica. Terpenos são classificados de acordo com o número de unidades de isopreno (XXI) envolvidas na formação destes compostos.



XXI

Figura 11: Estrutura do isopreno (XXI)

O efeito antimicrobiano tem sido atribuído a pequenos terpenos, como o caso de mono e sesquiterpenos. O mecanismo de acção ainda não foi completamente entendido e determinado mas supõe-se estar associado ao carácter hidrofóbico dos compostos, havendo um aumento de energia nas membranas e perda da mesma pelas células microbianas, provocando uma alteração da variedade de sistemas enzimáticos e inactivação do material genético (Knaak e Fiuza, 2010).

V. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Colheita do material vegetal

O pó usado neste trabalho foi obtido do material vegetal colhido pela Candida Mavie no dia 20 de Julho de 2006 na região de Xiboene, distrito de Moamba, província de Maputo. A identificação foi feita no herbário do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências da UEM, a partir de um exemplar da espécie nº 7987 (Mavie, 2007).

5.2. Solventes e reagentes usados na extração e testes fitoquímicos

Tabela 1: Solventes e reagentes

Acetona	Acetato de chumbo a 10%.
Álcool hidrometanólico	HCl a 2%
Água destilada	Reagente de Mayer; (K ₂ [HgI ₄])
Clorofórmio	Reagente de Dragendorff; (K[BiI ₄])
Éter de petróleo	Reagente de Wagner ([I ₂ /KI])
n – Butanol	Sulfato de sódio (Na ₂ SO ₄) anidro.
NH ₄ OH a 10 %.	H ₂ SO ₄ concentrado
NaOH a 5%.	Cloreto férrico a 2%
Acetato de magnésio a 5 %.	

5.3. Preparação dos extractos

O extracto e as fracções do pó das folhas e raízes foram obtidos aplicando o método de Martini (2001) citado por Mavie (2007) com alguma modificação.

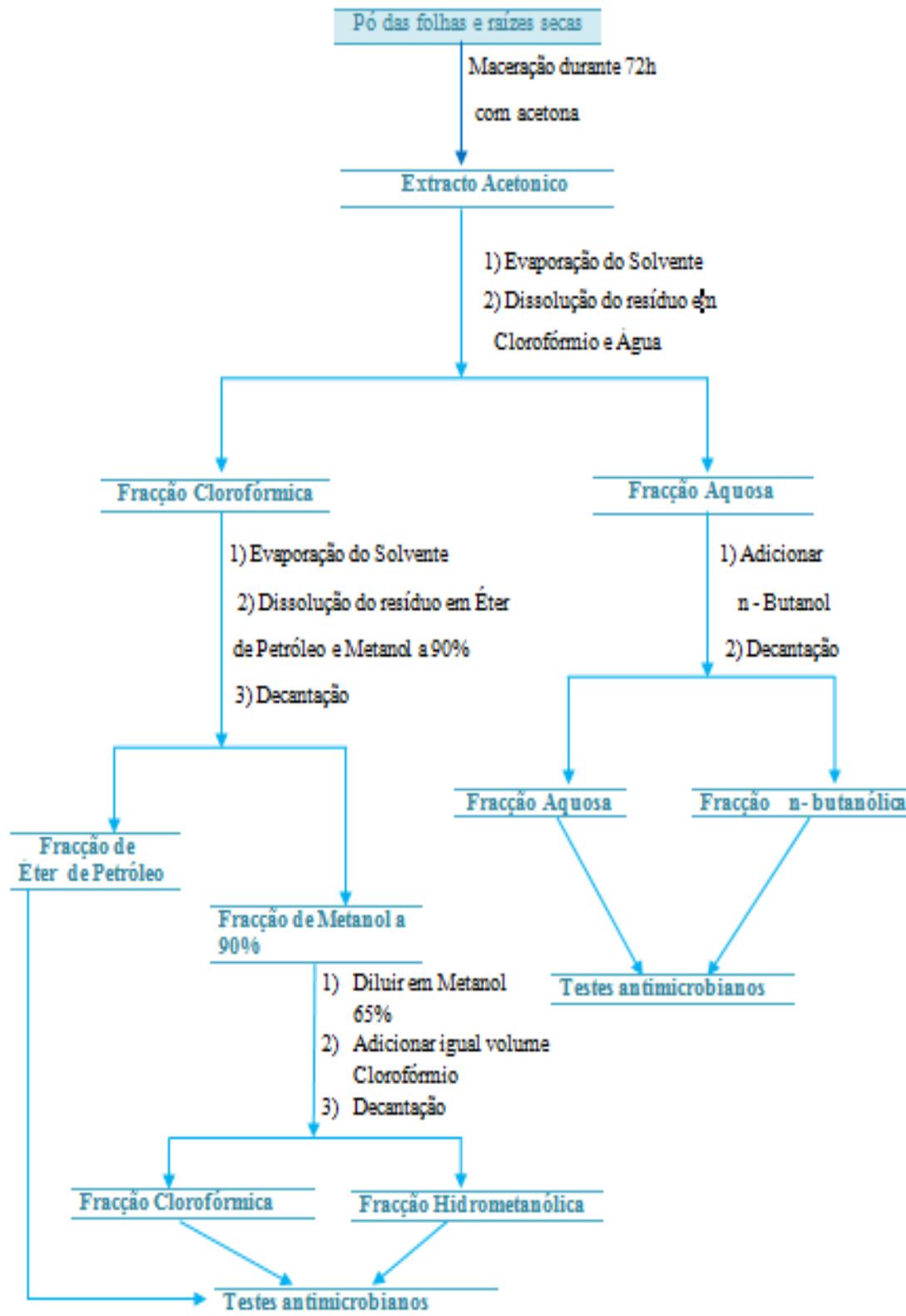
150 g do pó das folhas secas e raízes foram tratados com 500 mL de acetona durante 72 horas, filtrou-se com papel de filtro Whatman (n° 1) e o filtrado foi concentrado no rotavapor.

O extracto acetónico foi dissolvido na mistura de clorofórmio e água destilada (1:1) num balão de fundo redondo e transferido quantitativamente para um funil de separação, tendo sido separado em fracção aquosa e fracção clorofórmica.

A fracção aquosa foi misturada com igual volume de n-butanol e as duas fases foram separadas no funil em fracção aquosa e fracção butanólica.

A fracção clorofórmica foi concentrada no rotavapor e dissolvida com um volume igual da mistura de éter de petróleo e metanol a 90%. Transferiu-se para funil de separação tendo sido posteriormente separada em fracção de éter de petróleo e fracção hidrometanólica a 90%. Esta última fracção foi diluída a 65% de metanol por adição de água destilada. A esta última fracção adicionou-se igual volume de clorofórmio e separou-se as duas fases no funil de separação em fracção clorofórmica e hidrometanólica a 65%.

5.4. Fluxograma



5.5. Testes fitoquímicos

5.5.1. Teste de reconhecimento de flavonóides

a) Reacção com ácido sulfúrico concentrado

Tomou-se uma alíquota do extracto bruto, colocou-se num tubo de ensaio e adicionou-se 4 gotas de ácido sulfúrico concentrado. A formação de uma solução vermelha no extracto é indicativa da presença de flavonóides.

b) Reacção com hidróxido de sódio a 5%

Diluiu-se 1 mL de extracto com água destilada na proporção de 1:2 e adicionou-se pela parede do tubo 2 gotas de solução de hidróxido de sódio. O desenvolvimento de coloração amarela que varia de intensidade confirma a existência de flavonóides. Esta reacção é genérica para reconhecimento de flavonóides.

c) Reacção com cloreto de ferro (III) a 2%

Tomou-se 1 mL de extracto ligeiramente concentrado, diluiu-se com água destilada na proporção de 1:2 e, em seguida, adicionou-se pela parede do tubo duas gotas de cloreto férrico a 2%. O desenvolvimento da cor que varia entre verde, amarelo-castanho e violeta é indicativo de teste positivo de acordo com o tipo de flavonóides presentes.

5.5.2. Teste de reconhecimento de taninos e fenóis

Os taninos foram testados usando os seguintes reagentes: acetato de chumbo a 10% e cloreto férrico a 2%.

a) Reacção com acetato de chumbo a 10%.

Em um tubo de ensaio deitou-se 1 mL da solução extractiva diluída a uma proporção de 1:2 e adicionou-se 2 gotas da solução de acetato de chumbo a 10%.

A formação de uma turvação e aparecimento de um precipitado castanho avermelhado volumoso e denso significa teste positivo.

b) Reacção com cloreto férrico a 2%.

Deitou-se cerca de 1 mL da solução extractiva num tubo de ensaio e adicionaram-se-lhe 5.0 mL de água destilada e duas gotas de cloreto de ferro a 2% escorrendo-o pela parede do tubo.

O aparecimento da coloração preta, verde, azul ou precipitado indica a presença de taninos conforme o tipo de estrutura química, enquanto o surgimento de coloração que varia entre azul e vermelho é indicativo de fenóis.

5.5.3. Teste de reconhecimento de saponinas

As saponinas foram testadas em diferentes fracções usando teste de espuma

Teste de espuma

Para testar as saponinas, deitou-se num tubo de ensaio 2 mL da solução extractiva e adicionou-se 5 mL de água destilada e agitou-se energicamente por 3 minutos. Neste caso a formação duma espuma persistente sugere a presença das saponinas.

5.5.4. Teste de reconhecimento de triterpenóides e esteróides

Reacção de Liebermann-Buchard

Para o ensaio de esteróides e triterpenóides, deitou-se num tubo de ensaio 2 mL do extracto e misturou-se 2 mL de clorofórmio. Em seguida filtrou-se a solução clorofórmica gota a gota em um funil com algodão coberto com 0.5 g de sulfato de sódio (Na_2SO_4) anidro. De seguida, adicionou-se 1 mL de anidrido acético e agitou-se suavemente, e adicionou-se pelas paredes do tubo três gotas de H_2SO_4 concentrado e agitou-se suavemente. Coloração azul evanescente seguida de verde, indicou a presença de esteróides ou triterpenóides respectivamente.

5.5.5. Teste de reconhecimento dos alcalóides livres

Os alcalóides foram testados em todos os extractos, usando reagente de Meyer (tetraiodomercurato de potássio, $\text{K}_2 [\text{HgI}_4]$), Wagner (iodo/iodeto de potássio, $[\text{I}_2/\text{KI}]$) e Dragendorff (tetraiodobismutato de potássio, $\text{K}[\text{BiI}_4]$).

Dissolveu-se cada um dos extractos em 2.5 mL de HCl a 2% e aqueceu-se por 10 minutos. Após o resfriamento, filtrou-se em algodão. Em seguida, dividiu-se a solução obtida em volumes iguais, por 4 tubos de ensaio e posteriormente adicionou-se em cada tubo os seguintes reagentes:

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

Tubo 2 – Adicionou-se 3 gotas de reagente de Dragendorff;

Tubo 3 – Adicionou-se 3 gotas de reagente de Wagner

Tubo 4 – Testemunha.

Uma leve turbidez ou precipitado respectivamente roxo a laranja, branco a creme e marrom evidencia a possível presença dos alcalóides.

5.5.6. Testes de Borntrager para reconhecimento de antraquinonas

a) Reacção com NaOH a 5%

Deitou-se em um tubo de ensaio 2,0 mL do extracto ligeiramente concentrado, adicionou-se 5,0 mL de clorofórmio e agitou-se. Deixou-se em repouso por 15 minutos. Recolheu-se a fase clorofórmica e dividiu-a em dois tubos de ensaio. No primeiro tubo, adicionou-se 1,0 mL de solução de NaOH a 5%.

A coloração roxa em fase aquosa indica a presença de antraquinonas (Reacção de Borntraeger).

No segundo tubo, adicionou-se 1,0 mL de solução de acetato de magnésio a 5 %.

A coloração roxa sugere a provável presença de antraquinonas livres.

b) Reacção com NH₄OH a 10 %.

Deitou-se 1 mL de extracto ligeiramente concentrado num tubo de ensaio e adicionou-se 3 mL de NH₄OH a 10 %. A coloração rósea, vermelha ou violeta sugere a provável presença das antraquinonas.

5.6. Testes antimicrobianos

Os testes antimicrobianos foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Veterinária da UEM, onde o antibiograma determinou às concentrações mínimas inibitórias dos extractos das plantas em estudo. Para realização dos testes utilizou-se o método de difusão em disco.

5.6.1. Materiais e Reagentes

As tabelas mostram o material e reagentes utilizados para os testes antimicrobianos.

Tabela 2: Reagentes utilizados

Reagentes		
Água destilada	Etanol a 50%	Etanol a 70%

Tabela 3: Materiais utilizados

Materiais		
Balança analítica	Bico de bunsen	Estufa de secagem
Geleira	Auto-clave	Banho-maria
Espátula	Algodão	Pinça
Placas de Petri	Copos de Becker – 100 mL	Erlernmeyers – 1 L
Proveta graduada de 100 mL	Ansas bacteriológicas	Micropipetas de 20 µL
Proveta graduada de 1L	Papel parafilm	Papel de alumínio

5.6.2. Microrganismos

Tabela 4: Microrganismos estudados

	Microrganismos
Bactérias Gram-positivas	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Streptococcus sp</i>
Bactérias Gram-negativas	<i>Salmonela sp</i>
	<i>Escherichia coli</i>
Fungo	<i>Candida albicans</i>

5.6.3. Preparação de meios de cultura

Para a preparação dos meios de cultura seguiram-se as especificações do fabricante,

- Ágar Mueller Hinton (AMH): pesou-se 38 g em 1000 mL de água destilada;

- Ágar Sabouraud Dextrose (ASD): pesou-se 25 g em 250 mL de água destilada.

5.6.4. Dissolução em água

Pesou-se uma quantidade do meio indicado pelo fabricante e deitou-se a água destilada até metade. Em seguida agitou-se e aqueceu-se no banho-maria até o meio liquefazer-se.

Após a fervura deixou-se arrefecer um pouco e adicionou-se o restante da água perfazendo o volume e levou-se ao autoclave por 30 minutos a uma temperatura de 121°C. Deixou-se arrefecer.

5.6.5. Distribuição de meios de cultura

Depois de retirados os meios do autoclave, distribuiu-se os mesmos nas placas de Petri com 90 mm de diâmetro, tapou-se as mesmas e deixou-se arrefecer para permitir a solidificação do meio. Esta etapa foi realizada perto de um bico de Bunsen para assegurar a esterilidade do mesmo.

Para confirmar a ausência de bactérias e fungos, realizou-se a prova de esterilidade, onde as placas foram incubadas a 37°C por 24 h. Se não houvesse crescimento de microrganismos após 24 h de incubação o meio era considerado apto para ser usado.

5.6.6. Conservação do meio

As placas foram conservadas no frigorífico a uma temperatura de 5°C, com tampas viradas para baixo e identificadas com o nome do meio e a respectiva data de preparação.

5.6.7. Preparação dos extractos com concentração máxima “200 mg/mL”

Esta solução de 200 mg/mL foi preparada, pesando num frasco esterilizado 1 g do extracto bruto e dissolveu-se em 5 mL do etanol a 50%.

5.6.8. Preparação dos discos

Na preparação dos discos usou-se papel de filtro limpo ”Whatman no 1”, com auxílio dum furador de papel comum, previamente limpado com álcool (etanol a 70%). Os discos preparados foram acondicionados em placas de Petri.

Seguidamente, os discos foram impregnados com soluções de diferentes concentrações de extractos previamente preparados, usando uma micro pipeta com volume de 20 µL para cada disco. Após a impregnação, secou-se os discos numa estufa a 37 °C e conservou-se num frigorífico a 4°C. Estes discos foram usados para a determinação de sensibilidade.

5.6.9. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Após a preparação das placas com meios de cultura contendo Ágar Mueller Hinton (AMH) para bactérias e Ágar Sabouraud Dextrose para fungos, seguiu-se a sementeira dos respectivos microrganismos. Colocou-se nos discos de papel com 6 mm de diâmetro contendo extractos com concentração máxima de 200 mg/mL sobre os microrganismos e para o controle das bactérias colocou-se na superfície do Ágar Mueller Hinton (AMH) os discos com antibiótico (Ciprofloxacina), e na superfície de Ágar Sabouraud os discos com antibiótico (Nistatina). Foram incubadas por 24 h a 37 °C na estufa.

A inibição do crescimento bacteriano e fúngico foi determinada pela medida dos halos ao redor dos discos com auxílio duma régua, e foi expressa em mm. Este procedimento preliminar tinha como objectivo identificar os extractos que eram activos contra os microrganismos.

5.6.10. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada utilizando o método de difusão em disco. Os extractos com concentração máxima que exibiram actividade antibacteriana e antifúngica nas folhas e raízes foram diluídos. Após a incubação a 37 °C durante 24 h as concentrações mais baixas que não permitem a visualização dos halos de inibição foram consideradas como sendo as concentrações inibitórias mínimas (CIMs).

VI. RESULTADOS

6.1. Resultados obtidos na preparação das fracções das folhas e raízes

Tabela 5: Quantidades obtidas das fracções do pó das raízes e folhas de *Combretum molle*

Fracções	FBL	FCL	FHM	FAQ	FEP
Raiz (g)	2,17	2,95	1,08	0,65	0,85
Folhas (g)	2,53	2,39	0,91	1,83	0,81

6.2. Resultados dos testes fitoquímicos

Tabela 6: Resultados dos testes fitoquímicos nas fracções de raízes de *Combretum molle*

Metabólitos Secundários	Fracções				
	FBL	FCL	FHM	FAQ	FEP
Saponinas	+	-	-	+	-
Flavonóides	+	+	+	+	+
Alcalóides	-	-	-	-	-
Taninos	+	+	-	+	-
Esteróides, Triterpenóides	-	+	-	-	+
Antraquinonas	+	-	-	+	-

(-) Ausente; (+) Presente

Tabela 7: Resultados dos testes fitoquímicos nas fracções de folhas de *Combretum molle*

Metabólitos Secundários	Fracções das folhas				
	FBL	FCL	FHM	FAQ	FEP
Saponinas	+	-	+	+	-
Flavonóides	+	+	+	+	-
Alcalóides	-	-	-	-	-
Taninos	+	-	+	+	-
Esteróides, Triterpenóides	-	-	-	-	+
Antraquinonas	-	-	-	-	-

(-) Ausente; (+) Presente

6.3. Resultados dos testes da actividade antimicrobiana

Os testes antimicrobianos permitiram identificar a acção inibitória dos extractos de *Combretum molle* e a Ciprofloxacina e a Nistatina foram usadas para o controlo positivo.

Tabela 8: Resultados dos testes antibacterianos e antifúngicos das raízes de *Combretum molle* pelo método de difusão em disco na concentração de 200 mg/mL (Halos de inibição em mm).

Microrganismos	Cipro.	Nist.	FHM	FEP	FBL	FCL	FAQ	E.B.
<i>Staphylococcus aureus</i>	20,0	-	5,0	2,0	7,0	1,0	2,0	7,0
<i>Streptococcus sp</i>	20,0	-	6,0	3,0	2,0	1,0	2,0	7,0
<i>Salmonella sp</i>	30,0	-	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,0
<i>Escherichia coli</i>	21,0	-	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0
<i>Candida albicans</i>	-	15,0	1,0	2,0	6,0	1,0	2,0	7,0

Cipro – Ciprofloxacina; Nist – Nistatina

AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRACTOS DAS RAÍZES E FOLHAS DE COMBRETUM MOLLE

Tabela 9: Resultados dos testes antibacterianos e antifúngicos das folhas de *Combretum molle* pelo método de difusão em disco na concentração de 200 mg/mL (Halos de inibição em mm).

Microrganismos	FHM	FEP	FBL	FCL	FAQ	E.B.
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,0	1,0	2,0	3,0	1,0	1,0
<i>Streptococcus sp</i>	7,0	6,0	8,0	2,0	1,0	1,0
<i>Salmonella sp</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Escherichia coli</i>	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Candida albicans</i>	7,0	4,0	2,0	3,0	0,0	6,0

6.4. Resultados da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As tabelas abaixo apresentam os resultados obtidos na determinação das concentrações mínimas inibitórias dos respectivos extractos.

Tabela 10: Resultados dos testes antifúngicos na determinação da CIM dos extractos de raízes de *Combretum molle* para *C. albicans* (halo de inibição em mm).

Extractos	200mg/mL	150mg/mL	100mg/mL	50mg/mL	25mg/mL	12,5mg/mL
E.B.	7,0	4,0	3,0	2,0	1,1	0
FBL	6,0	5,0	4,0	2,0	0	-

(-) Não foi testado

Tabela 11: Resultados dos testes antibacterianos na determinação da CIM dos extractos de raízes de *Combretum molle* para *Staphylococcus aureus* (halo de inibição em mm).

Extractos	200mg/mL	150mg/mL	100mg/mL	50mg/mL	25mg/mL	12,5mg/mL
E.B.	7,0	6,0	5,0	3,0	1	0
FHM	5,0	3,0	1,5	1,0	0	-
FBL	7,0	4,0	3,0	2,0	0	-

(-) Não foi testado

AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRACTOS DAS RAÍZES E
FOLHAS DE *COMBRETUM MOLLE*

Tabela 12: Resultados dos testes antibacterianos na determinação da CIM dos extractos de raízes de *Combretum molle* para *Streptococcus sp* (halo de inibição em mm).

Extractos	200mg/mL	150mg/mL	100mg/mL	50mg/mL	25mg/mL	12,5mg/mL
E.B.	7,0	5,0	3,0	1,0	0	-
FHM	6,0	4,0	2,0	1,0	0	-

(-) Não foi testado

Tabela 13: Resultados dos testes antifúngicos na determinação da CIM dos extractos de folhas de *Combretum molle* para *C. albicans* (halo de inibição em mm).

Extractos	200mg/mL	150mg/mL	100mg/mL	50mg/mL	25mg/mL	12,5mg/mL
E.B.	6,0	5,0	3,0	1,0	0	-
FHM	7,0	4,0	2,0	1,0	0	-

(-) Não foi testado

Tabela 14: Resultados dos testes antibacterianos na determinação da CIM dos extractos de folhas de *Combretum molle* para *Streptococcus sp* (halo de inibição em mm).

Extractos	200mg/mL	150mg/mL	100mg/mL	50mg/mL	25mg/mL	12,5mg/mL
FHM	7,0	6,0	5,0	3,0	0	-
FBL	8,0	6,0	4,0	3,0	1	0

(-) Não foi testado

VII. DISCUSSÃO

Os testes fitoquímicos preliminares dos extractos das folhas e raízes da planta *Combretum molle* revelaram a presença de flavonóides, taninos, saponinas e triterpenóides mas com maior predominância para os flavonóides e taninos. A presença destas classes de metabólitos secundários na *Combretum molle* é relatada na literatura (Simon *et al.*, 2008).

Os flavonóides são os metabólitos secundários mais predominantes tanto nas folhas e nas raízes, daí que podemos atribuir a eles a principal actividade antimicrobiana pois estes compostos sintetizados por plantas medicinais apresentam actividade antimicrobiana *in vitro* contra vários microrganismos (Okigbo *et al.*, 2009).

A fracção hidrometanólica do extracto das folhas na concentração de 200 mg/mL apresentou halo de inibição de cerca de 7.0 mm contra *Streptococcus sp* e *Candida albicans*. O destaque vai para a fracção butanólica que apresentou o maior halo de inibição com cerca de 8.0 mm contra *Streptococcus sp*.

Os estudos fitoquímicos realizados na fracção butanólica das folhas de *Combretum molle* que apresentou o maior halo de inibição revelaram a presença de flavonóides, taninos e saponinas. Andrade (2007), citado por Ismael (2010), relata que os taninos, os flavonóides e alguns derivados fenólicos são as principais classes de metabólitos secundários com acção antifúngica e antimicrobiana.

As fracções de éter de petróleo, aquosa e o extracto bruto das folhas na concentração de 200 mg/mL apresentaram o menor halo de inibição com cerca de 1 mm contra *Staphylococcus aureus*, tendo o extracto bruto e a fracção aquosa o mesmo resultado também para o *Streptococcus sp*. e parcialmente contradizendo o que está relatado em McGaw *et al.* (2000), em que os extractos em concentrações diferentes demonstraram – se inibidores da *Staphylococcus aureus*.

O extracto bruto e fracção butanólica da raíz na concentração de 200 mg/mL apresentaram o maior halo de inibição com cerca de 7.0 mm, tendo a fracção butanólica apresentado o halo contra a *Staphylococcus aureus* e o extracto bruto contra a *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus sp.*, indo de acordo com o que nos é relatado em McGaw *et al.* (2000).

As fracções hidrometanólica e clorofórmica da raiz na concentração de 200 mg/mL apresentaram o menor halo de inibição com cerca de 1 mm contra a *Candida albicans*.

Para a determinação da concentração inibitória mínima foram seleccionadas as fracções que apresentaram maior sensibilidade ao respectivo agente microbiano.

Para *Candida albicans* o extracto bruto das raízes foi o que apresentou a menor concentração inibitória mínima com cerca de 25 mg/mL. Por outro lado nas folhas a concentração inibitória mínima foi de 50 mg/mL apresentada pela fracção hidrometanólica e extracto bruto. A raiz apresentou nos testes fitoquímicos uma maior predominância de triterpenóides, isto pode justificar o seu menor valor de CIM pois segundo López (2010) os terpenóides apresentam uma actividade antimicrobiana relacionada com a sua solubilidade lipídica que lhes permite interagir com as biomenbranas dos microrganismos causando ruptura das células. A solubilidade destes compostos nas biomenbranas permite lhes interagir nos canais iónicos, com os transportadores de moléculas e nas membranas receptores, que conduz na mudança na conformação e perda de função da mesma.

Para *Streptococcus sp* a fracção butanólica das folhas foi a que apresentou a menor concentração inibitória mínima, com cerca de 25 mg/mL. Por outro lado nas raízes a concentração inibitória mínima foi de 50 mg/mL apresentada pela fracção hidrometanólica e o extracto bruto.

Para *Staphylococcus aureus* somente foram utilizadas fracções pertencentes à raiz, fracção hidrometanólica, fracção butanólica e o extracto bruto que apresentou a menor concentração inibitória mínima que foi de 25 mg/mL. Eloff (1999) relata uma concentração inibitória mínima de 1.6 mg/mL para os extractos acetónicos das raízes de *Combretum molle*.

A *Escherichia coli* e *Salmonella sp* apresentaram uma grande resistência aos diferentes extractos brutos e fracções, o que pode ser justificado por se tratarem de bactérias gram - negativas; segundo Ismael (2010) que relata que a actividade antimicrobiana de compostos provenientes de plantas medicinais parece ser mais eficiente à microrganismos gram - positivos do que para gram - negativos pois os positivos apresentam uma parede bacteriana que normalmente não restringe a passagem de moléculas tóxicas enquanto que as bactérias gram - negativas apresentam um sistema de barreira constituído pela membrana externa da parede bacteriana

*AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRACTOS DAS RAÍZES E
FOLHAS DE COMBRETUM MOLLE*

formada por lipolissacarídeos, proteínas e fosfolípidos que conferem uma maior impermeabilidade aos agentes antibacterianos resultando numa maior resistência dessas bactérias aos antibióticos.

VIII. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

8.1. Conclusões

A partir do estudo fitoquímico preliminar dos extractos brutos e fracções das raízes e folhas de *Combretum molle*, dos testes de actividade antifúngica contra *Candida albicans* e dos testes de actividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp*, *Escherichia coli* e *Salmonella sp* pode-se concluir o seguinte:

O estudo fitoquímico preliminar realizado sobre as fracções do pó das raízes de *Combretum molle* revelou a presença de flavonóides, taninos, saponinas, antraquinonas e triterpenóides.

Para o pó das folhas de *Combretum molle* os testes fitoquímicos revelaram a presença de flavonóides, saponinas, taninos e triterpenóides.

Escherichia coli e *Salmonella sp* foram as bactérias que apresentaram maior resistência as fracções das raízes bem como às fracções das folhas, tendo só o extracto bruto nas raízes e a fracção de éter de petróleo apresentado alguma sensibilidade.

Staphylococcus aureus foi a bactéria que mais demonstrou ser sensível às fracções das raízes, a butanólica e hidrometanólica. O extracto bruto da raiz também apresentou uma boa actividade.

Streptococcus sp foi a bactéria que apresentou uma maior sensibilidade as fracções das folhas, sendo elas a butanólica e hidrometanólica.

Os resultados dos testes antifúngicos contra *Candida albicans* demonstraram que as fracções das folhas de *Combretum molle* têm maior actividade antifúngica comparando com as fracções da raiz, tendo a fracção hidrometanólica apresentado o maior halo de inibição.

Os resultados obtidos no presente trabalho sobre o estudo fitoquímico e a actividade antimicrobiana evidenciaram a possível utilização dos extractos desta planta no controlo de patogénicos e comprovam o seu uso na medicina tradicional para o tratamento de doenças de origem microbiana.

8.2. Recomendações

Embora os resultados contribuam para a caracterização da actividade antimicrobiana da planta, recomenda-se o isolamento dos compostos biologicamente activos e posteriormente a análise antimicrobiana, visto que podem servir como base de estudo para a pesquisa de novos antibióticos.

Recomenda-se a realização de um estudo fitoquímico apurado para o isolamento e quantificação dos metabólitos secundários existentes nesta planta.

Recomenda-se incentivar a aplicação de extractos vegetais como antibióticos pois são de menos custos, com menores efeitos adversos e colaterais ao homem.

Recomenda-se também uma melhor coordenação entre as instituições ou órgãos responsáveis pela pesquisa e estudo das diferentes espécies Moçambicanas com propriedades antimicrobiana e os herbanários para aumentar e melhorar o nosso acervo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Angeh J. E. (2006). *Isolation and Characterization of antibacterial compounds present in members of Combretum section, Hypocrateropsis*. Tese de Doutorado. University of Pretoria, Pretoria.
- Asres, K., Bucar, F., Edelsbrunner, S., Kartnig, T., Höger, G., Thiel, W. (2000). *Investigations on antimycobacterial activity of some Ethiopian medicinal plants*. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Addis Ababa University, Addis Ababa, Ethiopia.
- Bonella, A. F., Natalli, V. F., Camizão, L. M., Vieira, F. A. e Belinelo, V.J. (2011). Estudo fitoquímico e actividade antibacteriana de extractos de folhas de *Acanthospermum australe* (LOERFL.) KUNTZE. *Enciclopédia Biosfera*. **7** (13): 1329-1335.
- Carvalho, E. B. (2007). *Estudos da interacção entre proteínas e taninos: Influência da presença de polissacarídeos*. Tese de Doutorado em Química, Departamento de Química, Faculdade de Ciências - Universidade do Porto.
- Diniz, L. R. (2006). *Efeito das Saponinas Triterpênicas Isoladas de Raízes da Ampelozizyphus amazonicus Ducke sobre a Função Renal*. Dissertação de Pós-graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Du Preez, I. (2012). *Evaluation Of Antimalarial Properties Of Indigenous Plants Used By Traditional Healers In Namibia*. Master's thesis in Biological Sciences, University of Namibia, Namibia.
- Eloff, J. N. (1999). *The antibacterial activity of 27 Southern African members of the Combretaceae*. *South African Journal of Science* **95**: 148-152.

- Harbone, J. & Baxter, H. (1995). *Phytochemical Dictionary: A Handbook Of Bioactive Compounds From Plants*. Taylor & Francis, London
- 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.
- Jansen, P. & Mendes O. (1991). *Plantas Mediciniais – Seu uso Tradicional em Moçambique*. Imprensa do Partido. Maputo.
- Knaak, N. & Fiuza, L. (2010). *Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insectos e microrganismos*. *Neotropical Biology and Conservation*. **5** (2): 120- 130.
- López, P. V. (2010). *Bioprospecção de extractos de *croton urucurana* baill e seus fungos endofíticos*. Dissertação de Pós-graduação. Programa de Pós Graduação em Microbiologia, Universidade Federal do Paraná.
- Machado, H., Nagem, T. J., Peters, V. M., Fonseca, C. S., Oliveira, T. (2008). Flavonóides e seu potencial terapêutico. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução, Juiz de Fora*. **27**(1/2): 33-39
- Martini, N. D., Katerere. D. R., Eloff, J. N. (2004). Biological Activity of five antibacterial compounds from *Combretum Erythrophyllum* (*Combretaceae*). *Journal of Ethnopharmacology* **25**: 45-50.
- Mavie, C. G. (2007). *Isolamento e Caracterização dos Flavonóides nas folhas da planta *Combretum molle**. Trabalho de Licenciatura, Departamento de Química, Faculdade de Ciências, Universidade Eduardo Mondlane.

- McGaw, L. J., Jager, A. K., Staden, J.V.(2000). Antibacterial, anthelmintic and anti-amoebic activity in South African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology.*, **72**: 247– 263.
- MISAU (2004). *Politica de Medicina Tradicional*, Acessado em 23 de Abril de 2014 de http://www.portaldogoverno.gov.mz/docs_gov/fold_politicas/saude/politica%20de%20medicina%20tradicional.pdf
- Monteiro, J. M., Albuquerque, U. A. e Araújo, E. L. (2005). Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova.* **28** (5): 892-896..
- Morrison, R. T. and Boyd, R. N. (2005). *Química Orgânica*. 14a edição, Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa.
- Nyenje M. E. (2011). *Phytochemical Analysis And Bioactivity Of The Stem Bark Of Combretum Molle On Some Selected Bacterial Pathogens*. Master of Science, Department of Biochemistry and Microbiology, University of Fort Hare.
- Ojewole, J. A. (2008). Analgesic and Antiinflammatory Effects of Mollic Acid Glucoside, a 1 α -Hydroxycycloartenoid Saponin Extractive from *Combretum molle* R. Br. ex G. Don (Combretaceae) Leaf. *Phytother. Res.* **22**: 30–35
- Okigbo, R. N., Anuagasi, C. L., Amadi, J. E. (2009). Advances in selected medicinal and aromatic plants indigenous to Africa. *Journal of Medicinal Plants Research.* **3** (2): 86-95.
- Ouattara Y., Sanon S., Traoré Y., Mahiou V., Azas N., Sawadogo L. (2006). Antimalarial Activity Of *Swartzia Madagascariensis* Desv. (Leguminosae), *Combretum Glutinosum* Guill. & Perr. (Combretaceae) And *Tinospora Bakis* Miers. (Menispermaceae), Burkina Faso Medicinal Plants. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines* **3** (1): 75 – 81.

- Palgrave C. M. (2002). *Trees of Southern Africa*. 3^o ed. Struik Publishers. Cidade do Cabo.
- Panzini, I., Pelizzoni, F., Verrotta, L., Rogers, C. B. (1993). Constituents of the fruit of South African Combretum species. *South African Journal of Science*, **89**: 324-328.
- Pettit, G. R., Doubek, D. I., Schimdt, J. M., Pettit, R. K., Tackett, L. P., Chapuis J. C. (1996). Antineoplastic agent 338. The câncer cell growth inhibitory constituents of *Terminalia arjuna* (*Combretaceae*). *Journal Ethanopharmacolgy* **53**: 57-63
- Rogers , C. B. & Subramony, G. (1988). The Structure of Imberbic acid 1 α -hydroxy pentacyclic triterpenoid from *Combretum Imberbe*. *Phytochemistry*. **27**: 531-553.
- Saidu T. B. & Abdullahi M. (2011). Phytochemical Determinations And Antibacterial Activities Of The Leaf Extracts Of Combretum Molle And Gossypium Arboreum. Bayero. *Journal of Pure and Applied Sciences*, **4**(2): 132 – 136
- Sánchez, J., Garza-Ramos, U., Sánchez, A., Rojas, T., Reyna, F., & Carrilloesús, B. (2006). Resistência a Antibióticos. *Rev Latinoam Microbiol*, **48**(2), 105-12.
- Schenkel, E., Zaninnin, M., Mentz, L., Bordignon, S., Irgang, B. (2001). *Plantas Tóxicas da Planta Ao Medicamento: Farmacognosia* . 3^a . ed., Editora Universidade / UFRGS.
- Simone, M. (2001). *Estudo de plantas medicinais em uso pelas comunidades locais no posto administrativo de Mahel e sua propagação*. Tese de Licenciatura em Biologia, Universidade Eduardo Mondane, Maputo.
- Simon, M. K., Ajanusi, J. O., George, B. D., Abubakar, M. S. & Meduna, J. A (2008). In-Vivo Evaluations Of The Stem Bark Of *Combretum molle* “R.Br/G. Don” (Keay,1989) For Anthelmintic Properties. *Continental Journal of Veterinary Sciences* **2**: 1 – 11.

- Yokozawa, T.; Dong, E.; Liu, Z. Shimizu, M. (1997). *Antioxidant Activity Of Flavones And Flavonols In Vitro. Phytotherapy Research* **11**:446-450.

- Zucula, C.V. (2011). *Avaliação in vitro da actividade antifúngica de extractos de plantas Kigelia Africana, Combretum molle e Trichilia emetica para o controlo de fitopatógenos.* Trabalho de Licenciatura, Departamento de Química, Faculdade de Ciências, Universidade Eduardo Mondlane.

AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRACTOS DAS RAÍZES E FOLHAS DE COMBRETUM MOLLE

Anexos

Anexo 1.

Fotografia do aparelho usado para concentrar os extractos brutos.



Anexo 2.

Fotografia do antibiograma de *Candida Albicans*, 24h após incubação



*AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRACTOS DAS RAÍZES E
FOLHAS DE COMBRETUM MOLLE*

Anexo 3.

Fotografia da estufa utilizada para esterilizar o material utilizado nos testes de sensibilidade microbiológica.

