



FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

Trabalho de Licenciatura

ESTUDO DA COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE FARMACOLÓGICA E ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE *VERNONIA POLYANTHES*



Autor: Salomão Américo Langa

Maputo, Novembro de 2015



FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

Trabalho de Licenciatura

ESTUDO DA COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE FARMACOLÓGICA E ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE *VERNONIA POLYANTHES*



Autor: Salomão Américo Langa

Supervisor: Prof. Doutor Cristiano Macuamule

Co-supervisora: dra. Amélia Furvela

Maputo, Novembro de 2015

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais Américo André Langa e
Paulina João Baloi, aos meus irmãos Realdo, Tirso, Lina e
Isabel. A minha cunhada Argentina e aos meus sobrinhos
Wilken e Gleyce.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus todo-poderoso pela vida, bênção e sabedoria.

Agradeço a todos os amigos, colegas, professores pelo companheirismo e apoio ao longo da minha trajectória.

Ao meu supervisor Prof. Doutor Cristiano Macuamule, pelos ensinamentos ao longo da realização do trabalho.

À dra. Amélia Furvela pela monitoria durante a realização do trabalho.

À dra. Angélica, dra. Paula, Senhor Joaquim e Senhor Gilberto pela disponibilização do espaço e material para realização do trabalho.

Aos meus amigos e colegas que dum forma directa ou indirecta têm contribuído na minha formação.

Meu especial agradecimento ao Manuel Matússe pelo apoio incondicional e pela amizade que me tem proporcionado ao longo do curso.

Ao Erasmo Cossa, Rui Felizardo, Adérito Cuna, Jhon Edson, Francisco Julião, Luís Aguiar, Alexandre Marquele, Neta Sitóe, António Elija, Sérgio Chilengue, Isménio Nhaca, Américo Machava, Matias Machava, Lourenço Chiunguete, Benaias Muia e Izac Dinis pelo companheirismo.

A todos os funcionários e professores do Departamento de Química que contribuíram dum forma significativa para a realização do curso de Química.

DECLARAÇÃO DE HONRA

Declaro por minha honra que este trabalho é resultado da minha investigação, com base numa consulta das fontes citadas no texto e nas referências bibliográficas.

Autor

Maputo, Novembro 2015

.....

(Salomão Américo Langa)

RESUMO

Os compostos químicos encontrados nas plantas revelam alta diversidade em termos de estrutura e de propriedades químico-biológicas, muitos deles constituindo modelos para a síntese de um grande número de fármacos.

O objectivo deste trabalho foi de determinar a composição fitoquímica e avaliar a actividade antimicrobiana, antipirética, analgésica e antitripanossómica de extractos de *Vernonia polyanthes* (*Funguza*).

Foram preparados extractos brutos da casca do caule de *Vernonia polyanthes*, por maceração com etanol a 70%, água destilada e por extração a Soxhlet com etanol a 90 %. Os extractos obtidos foram submetidos a testes de identificação de fitoconstituintes, tendo-se encontrado compostos tais como saponinas, taninos, esteróides/triterpenóides, flavonóides e antraquinonas. Os extractos foram usados para aferir a actividade antimicrobiana, antipirética, analgésica e antitripanossómica. No ensaio da actividade antimicrobiana, os extractos nas concentrações de 125 mg.mL⁻¹, 250 mg.mL⁻¹ e mg.mL⁻¹ apresentaram maior inibição do crescimento de bactérias Gram+ (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*), menor inibição do crescimento de bactérias Gram- (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) e não exibiram qualquer inibição do crescimento de fungos (*Candida sp*).

Em relação à actividade antipirética, os extractos etanólicos na dose de 500 mg.kg⁻¹ revelaram um efeito antipirético comparável ao do paracetamol na dose de 120 mg.kg⁻¹.

Na actividade analgésica o extracto aquoso e os extractos etanólicos na dose de 500 mg.kg⁻¹ mostraram um aumento significativo do tempo de resposta ao estímulo nociceptivo térmico, comparativamente ao paracetamol, usado como analgésico padrão.

Na actividade antitripanossómica o extracto etanólico obtido pelo método de maceração na dose de 500 mg.kg⁻¹ não exibiu qualquer efeito contra *Trypanosoma congolense*.

Os resultados deste estudo corroboram com o uso tradicional da *Vernonia polyanthes* (*Funguza*) e constituem importante contribuição para validação científica e para elaboração de recomendações para uso seguro de medicamentos à base desta planta, particularmente para o tratamento de infecções bacterianas, dor e febre.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Folhas e flores de <i>Vernonia polyanthes</i> . Fonte: Luciane, 2015.	5
Figura 2. Esqueleto básico da molécula de flavonóides	7
Figura 3. Estrutura molecular da luteolina.....	7
Figura 4. Estrutura molecular de pirogalol, ácido elágico, ácido gálico, glucose e ácido caféico. 8	
Figura 5. Estrutura de taninos hidrolisáveis; (2) Éster galoil (tanino gálico) e (3) Éster hexahidroxidifenoil (tanino elágico).....	8
Figura 6. Estrutura da Galocatequina (10) e Catequina (11)	9
Figura 7. Estrutura molecular de berberina, sanguinarina, urabaina, nicotina e esparteina.	10
Figura 8. Esqueleto básico das saponinas: esqueleto esteroidal (17) e esqueleto triterpénico pentacíclico (18).....	11
Figura 9. Compostos isolados do extracto clorofórmico das folhas de <i>V. polyanthes</i> ; Lupeol, e - amirina.	12
Figura 10. Estrutura básica das antraquinonas; (x) Dicetona do antraceno:.....	12
Figura 11. Esquema de preparação de extractos a partir da casca do caule de <i>V. polyanthes</i>	18
Figura 12. Animais usados nos ensaios e respectivas gaiolas de acomodação.....	19
Figura 13. Placas de Petri com colónias frescas de <i>Escherichia coli</i> (A) e <i>Candida sp</i> (B).	20
Figura 14. Representação esquemática da placa de Petri para antibiograma	21
Figura 15. Placas de Petri com indicação das áreas de inibição de crescimento de <i>S. aureus</i> (1) e <i>B. cereus</i> (2). P – padrão, E – extracto e V – veículo.	21
Figura 16. Esquema geral dos testes realizados com os extractos <i>V. polyanthes</i>	24
Figura 17. Representação gráfica da actividade inibitória do crescimento de <i>S. aureus</i> por extractos de <i>V. polyanthes</i>	27

Figura 18. Representação gráfica da actividade inibitória do crescimento de <i>E. coli</i> por extractos de <i>V. polyanthes</i>	28
Figura 19. Representação gráfica da actividade inibitória do crescimento de <i>B. cereus</i> por extractos de <i>V. polyanthes</i>	28
Figura 20. Representação gráfica da actividade inibitória do crescimento de <i>P. aeruginosa</i> por extractos de <i>V. polyanthes</i>	29
Figura 21. Representação gráfica da actividade inibitória do crescimento de <i>Candida sp</i> por extractos de <i>V. polyanthes</i>	30
Figura 22. Representação gráfica dos resultados do ensaio da actividade antipirética dos extractos de <i>V. polyanthes</i>	32
Figura 23. Representação gráfica dos resultados da avaliação da actividade analgésica de extractos de <i>V. polyanthes</i> em murganhos.....	34
Figura 24. Alcalóides com actividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teste para reconhecimento de metabólitos secundários em material vegetal.....	19
Tabela 2. Grupos de animais para o teste da actividade antipirética <i>V. polyanthes</i>	22
Tabela 3. Grupos de animais para o teste da actividade analgésica <i>V. polyanthes</i>	23
Tabela 4. Formação de grupos de murganhos para o teste da actividade antitripanossómica <i>V. polyanthes</i>	24
Tabela 5. Rendimento do processo de extração da casca de caule de <i>V. polyanthes</i>	25
Tabela 6. Resultados dos testes fitoquímicos da casca de caule de <i>V. polyanthes</i>	26
Tabela 7. Resultados da actividade antibacteriana dos extractos de <i>V. polyanthes</i> frente a <i>S. aureus</i>	27
Tabela 8. Resultados da actividade antibacteriana dos extractos de <i>V. polyanthes</i> frente a <i>E. coli</i>	28
Tabela 9. Resultados da actividade antibacteriana dos extractos de <i>V. polyanthes</i> frente a <i>B. cereus</i>	28
Tabela 10. Resultados da actividade antibacteriana dos extractos de <i>V. polyanthes</i> frente a <i>P. aeruginosa</i>	29
Tabela 11. Resultados da actividade antifúngica dos extractos de <i>V. polyanthes</i> frente a <i>Candida sp.</i>	29
Tabela 12. Resultados do teste da actividade antipirética dos extractos de <i>V. polyanthes</i>	31
Tabela 13. Resultados do teste da actividade analgésica da casca de caule de <i>V. polyanthes</i>	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

(s)	segundo
°C	Graus Celsius
Conc	concentração
COX	ciclooxigenase
DCA	Departamento de ciências animais
DMSO	dimetil sulfóxido
EtOH	etanol
FAVET	Faculdade de Veterinária
Gram-	gram negativa
Gram+	gram positivo
HTA	Higiene e Tecnologia de Alimentos
IIAM	Instituto de Investigação Agrária de Moçambique
LPS	lipopolissacarídeo (s)
PG ₂	prostaglandina E ₂ .
PGs	prostaglandinas
UEM	Universidade Eduardo Mondlane

ÍNDICE GERAL

DEDICATÓRIA	ii
AGRADECIMENTOS	iii
DECLARAÇÃO DE HONRA.....	iv
RESUMO	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. JUSTIFICATIVA	3
2. OBJECTIVOS	4
2.1. OBJECTIVO GERAL.....	4
2.2. OBJECTIVOS ESPECÍFICOS	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. <i>VERNONIA POLYANTHES</i>	5
3.1.1. USO MEDICINAL DE <i>VERNONIA POLYANTHES</i>	6
3.1.2. COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA	6
3.1.2.1. Flavonóides	6
3.1.2.2. Taninos.....	7
3.1.2.3. Alcalóides	9
3.1.2.4. Saponinas	11
3.1.2.5. Antraquinonas	12
3.2. MICRORGANISMOS COMO AGENTES DE DOENÇA	13
3.3. FEBRE	15
3.4. DOR E NOCICEPÇÃO	15

4. PARTE EXPERIMENTAL	17
4.1. LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO	17
4.2. MATERIAL VEGETAL	17
4.2.1. PREPARAÇÃO DOS EXTRACTOS.....	17
4.3. ANIMAIS EXPERIMENTAIS	19
4.4. ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	19
4.5. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA	20
4.6. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE FARMACOLÓGICA	21
4.6.1. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIPIRÉTICA	21
4.6.2. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANALGÉSICA.....	22
4.7. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTITRIPANOSSÓMICA	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1. RENDIMENTO DO PROCESSO DE EXTRACÇÃO	25
5.2. ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	26
5.3. ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA	27
5.4. ACTIVIDADE ANTIPIRÉTICA	31
5.5. ACTIVIDADE ANALGÉSICA	33
5.6. ACTIVIDADE ANTITRIPANOSSÓMICA.....	35
6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	38
<i>REFERÊNCIAS</i>	39

1. INTRODUÇÃO

O aumento da incidência de doenças tropicais como a malária, das infecções bacterianas, fúngicas, bem como o registo crescente de resistência dos microrganismos aos antibióticos, têm impulsionado a realização de estudos de prospecção de fitoquímicos com propriedades antibacterianas, antifúngicas, antiparasitárias e antipiréticas (Fontenelle *et al.*, 2007).

Essas doenças têm afectado todas as faixas etárias da população Moçambicana, colocando em causa a saúde pública e contribuindo dum certo modo no abrandamento do crescimento sócio-económico do país.

As plantas são tradicionalmente usadas desde a antiguidade por populações de todos os continentes no tratamento de doenças, sendo fonte importante de produtos naturais biologicamente activos, muitos dos quais constituem modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Estes produtos normalmente revelam alta diversidade em termos de estrutura e de propriedades químico-biológicas (Simões *et al.*, 2001).

Moçambique apresenta uma vasta biodiversidade de plantas com valores terapêuticos, contudo, têm sido pouco divulgadas informações relacionadas aos produtos de origem vegetal, o que têm levado ao seu mau uso e aproveitamento (Bandeira *et al.*, 2006).

A busca por uma droga antipirética ideal é um interminável desafio. O paracetamol e outros antitérmicos sintéticos populares bem como alguns antimicrobianos como a ciprofloxacina e cetoconazol têm vários efeitos colaterais. Comummente acredita-se que materiais à base de plantas são igualmente eficazes, menos tóxicos e relativamente livres de efeitos colaterais (Periyasamy *et al.*, 2011).

Vernonia polyanthes (Funguza) é uma planta de extrema importância, usada para terapia e profilaxia de diversas enfermidades. Estão contidos nas diferentes partes da planta vários compostos químicos com uma vasta utilidade farmacológica. Os fitoconstituintes que mais se destacam na *V. polyanthes* são: Ácidos gordos, Alcalóides, Aminoácidos, Cumarinas, Triterpenos, Antraquinonas, Flavonóides, Saponinas e Taninos (Luciane, 2015).

O presente trabalho foi desenvolvido em diversas fases incluindo fundamentalmente: pesquisa do campo, pesquisa bibliográfica e trabalho laboratorial.

A pesquisa de campo consistiu em entrevista com pessoas conhecedoras de plantas usadas para fins terapêuticos ou profiláticos. A identificação botânica da planta em estudo, foi feita por técnicos do Instituto de Investigação Agrária de Moçambique em Maputo e confirmada por técnicos do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Eduardo Mondlane.

A pesquisa bibliográfica consistiu na consulta de literatura científica publicada na forma de artigos em revistas com revisão de pares bem como em literatura cinzenta¹ disponível na forma de relatórios e/ou relatos de utilização de *Vernonia polyanthes* ou *Funguza* no tratamento de diversas enfermidades, e ainda através de pesquisa na Internet usando as palavras-chave *Vernonia plantai*, *V. polyanthes*+ Moçambique e Plantas medicinais+ Moçambique.

Trabalho laboratorial consistiu na preparação do material vegetal para posterior preparação de extractos com recurso aos métodos de maceração e soxhlet. Com os extractos obtidos foram realizados os testes de identificação dos fitoconstituintes bem como os testes de actividade antimicrobiana, antipirética, analgésica e antitripanossómica.

¹Considera-se Literatura cinzenta publicações não-convencionais, evasivas e, às vezes, efêmeras. Podem incluir, mas não estão limitadas aos seguintes tipos de materiais: relatórios (pré-impresso, preliminar e avançados, técnicos, relatórios estatísticos, memorandos, estudos de mercado), actas de conferências, especificações técnicas e normas, traduções não-comerciais, bibliografias, documentação técnica e comercial, bem como documentos oficiais não publicados comercialmente (Alberani *et al.*, 1990).

1.1. JUSTIFICATIVA

As doenças infecciosas constituem actualmente um importante ramo da medicina em virtude de sua alta frequência na população em geral e da gravidade dos quadros que podem apresentar. Apesar dos recentes avanços na área preventiva, diagnóstico e tratamento, as doenças infecciosas representam ainda importante problema médico em todo o mundo. Nos países em desenvolvimento as infecções bacterianas endógenas, as infecções hospitalares e outras, geralmente de natureza endémica, causadas por bactérias, fungos, vírus e protozoários constituem um importante problema de saúde pública (Krog *et al.*, 2006).

Em Moçambique a maioria da população ainda consiste em uma esfera social pouco beneficiada economicamente e apresenta necessidades que estão relacionadas com o atendimento médico e a aquisição de alguns medicamentos. Em muitos casos tem-se verificado o agravamento das enfermidades devido principalmente à falta de recursos para adquirir medicamentos que lhes auxiliem no tratamento e, como alternativa muitos recorrem às plantas medicinais (Krog *et al.*, 2006).

As plantas medicinais, diferentes dos medicamentos convencionais, têm baixo custo e algumas vezes podem ser encontradas na própria região/localização de moradia de muitos dos usuários. Contudo, a forma de uso, conservação e indicação de tais plantas para fins terapêuticos não são sempre feitas de forma correcta pelos usuários levando ao risco de mau uso e agravamento da situação de saúde dos mesmos.

De acordo com Gaspar 2014, medicamentos à base de plantas são comercializados nos mercados e diversas casas particulares em Moçambique. Um inquérito feito a anciãos que comercializam plantas medicinais nos mercados informais de Xipamanine, Xiquelene e Compone na cidade de Maputo no âmbito da preparação deste estudo, verificou que *V. polyanthes* (Funguza) é uma das plantas amplamente comercializada e bastante usada no tratamento de febres e tosses, sendo que as recomendações para o uso da mesma são baseadas unicamente em conhecimentos etnobotânicos, portanto sem nenhuma base científica que suporte a utilização da planta, colocando dessa forma os usuários em risco de intoxicações e outros efeitos indesejáveis. Este estudo pretende contribuir para aumentar o conhecimento científico sobre *V. polyanthes* e seus usos como planta medicinal, contribuindo dessa forma para uma utilização eficaz e segura da mesma.

2. OBJECTIVOS

2.1. OBJECTIVO GERAL

- Determinar a composição fitoquímica e avaliar o efeito *in vitro* de extractos brutos de *V. polyanthes* contra bactérias e contra fungos bem como a sua actividade analgésica, antipirética e antitripanossómica em murganhos.

2.2. OBJECTIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar extractos a partir da casca do caule de *V. polyanthes*;
- Identificar as classes dos principais compostos contidos nos extractos da casca do caule de *V. polyanthes*;
- Determinar *in vitro* a actividade antimicrobiana de extractos da casca do caule de *V. polyanthes* contra algumas bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos;
- Determinar *in vivo* a actividade antipirética dos extractos da casca do caule de *V. polyanthes* em murganhos;
- Determinar *in vivo* a actividade analgésica dos extractos da casca do caule de *V. polyanthes* em murganhos;
- Determinar *in vivo* a actividade antitripanossómica dos extractos da casca do caule de *V. polyanthes* em murganhos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. VERNONIA POLYANTHES: DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA, USOS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Vernonia polyanthes pertence à família Asteraceae, ordem Asterales, classe Magnoliopsida, divisão Magnoliophyta e reino Plantae. A família Asteraceae destaca-se entre as angiospermas por ser considerada a maior em número de espécies, tendo cerca de 1.535 géneros, 3 subfamílias e aproximadamente 23 mil espécies. O género *Vernonia* é representado por mais de 1500 espécies (Lorenzi, 2000). Esta planta é muito predominante no Sul de Moçambique e é vulgarmente conhecida por Funguza em Ronga ou Changana (Koenig, 1993).

Vernonia polyanthes é uma planta medicinal perene, que se espalha por meio de sementes. É conhecida por ser uma planta daninha que cresce na beira das estradas, terrenos baldios e esgotos (Lorenzi, 2000).



Figura 1. Folhas e flores de *Vernonia polyanthes*. Fonte: Luciane, 2015.

3.1.1. USO MEDICINAL DE *VERNONIA POLYANTHES*

Várias partes da planta têm sido usadas pelas populações, alegando apresentarem actividade antipirética, diurética, analgésica, hemostática, antiasmática, anti-hemorroidal entre outras. A utilização da planta é ainda indicada para afecções da pele, útero; indicada também para asma, dor muscular, pneumonia, cálculos renais, gripe, reumatismo e pontadas nas costas e no peito (Sanguinetti, 1989).

A infusão de toda a planta é utilizada como antifebril, em bronquites, gripes e tosses. As folhas e raízes desta espécie são usadas na forma compressa e na forma de chá, para eliminação de cálculos renais e conferem melhoria considerável em tosses persistentes (Rodrigues e Carvalho, 2001; Lorenzi, 2000).

Barbastefano (2003) em estudo realizado para avaliar a actividade antiulcerogénica do extracto metanólico das folhas de *V. polyanthes*, obteve uma redução de lesões gástricas que variou entre 63 e 83%.

3.1.2. COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA

Dentre as substâncias identificadas em *V. polyanthes* estão os ácidos gordos, aminoácidos, cumarinas, flavonóides, taninos, alcalóides, saponinas, triterpenos e antraquinonas (Luciane, 2015).

3.1.2.1. Flavonóides

Os flavonóides são um vasto grupo de metabólitos secundários fenólicos com inúmeras funções na natureza e diversas actividades biológicas. São moléculas de baixo peso molecular que se encontram amplamente distribuídas no reino vegetal; estão presentes em maior quantidade nas partes aérea das plantas (Ross e Kasum, 2002).

Os flavonóides apresentam uma estrutura geral com quinze átomos de carbono, C₆-C₃-C₆, na qual dois anéis benzóicos se encontram ligados por uma cadeia de três átomos de carbono, podendo ou não formar-se um terceiro anel. Os anéis são designados por A, B e C, e o sistema de

numeração tem início no átomo de oxigénio do heterocíclico, prosseguindo até aos carbonos envolvidos na junção dos anéis (Ribereau-Gayon, 1968).

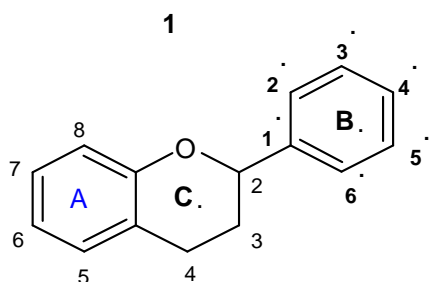


Figura 2. Esqueleto básico da molécula de flavonóides

Entre as propriedades terapêuticas atribuídas aos compostos fenólicos encontrados nas plantas destacam-se: efeito cardioprotector e vasodilatador capaz de reduzir a mortalidade por doenças coronárias; a actividade antiperoxidativa e antioxidante a nível das membranas celulares do fígado; a capacidade inibitória da carcinogénese pulmonar e antitumoral; a actividade antibacteriana; a actividade inibitória da proliferação celular tumoral; a actividade antidiarréica, especialmente dos taninos; o efeito protector em relação à radiação solar; a actividade estrogénica de algumas isoflavonas e a actividade ansiolítica de flavonas derivadas da luteolina (2) (Cunha, 2005).

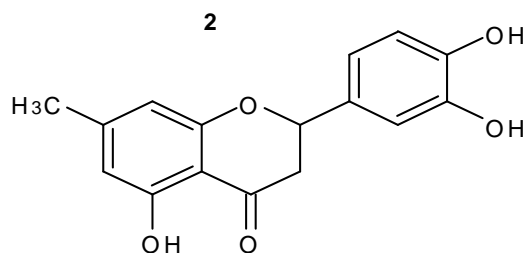


Figura 3. Estrutura molecular da luteolina.

3.1.2.2. Taninos

Os taninos são substâncias polifenólicas, polihidroxílicas, com alto peso molecular, de origem vegetal, capazes de precipitar proteínas, pectinas, alcalóides e metais pesados. Os taninos podem ser classificados como: hidrolisáveis e condensados (Simões *et al.*, 2001).

Taninos hidrolisáveis são constituídos por misturas de fenóis simples tais como o pirogalol (3) e ácido elágico (4) e também ésteres do ácido gálico (5), com açúcares como a glucose (6).

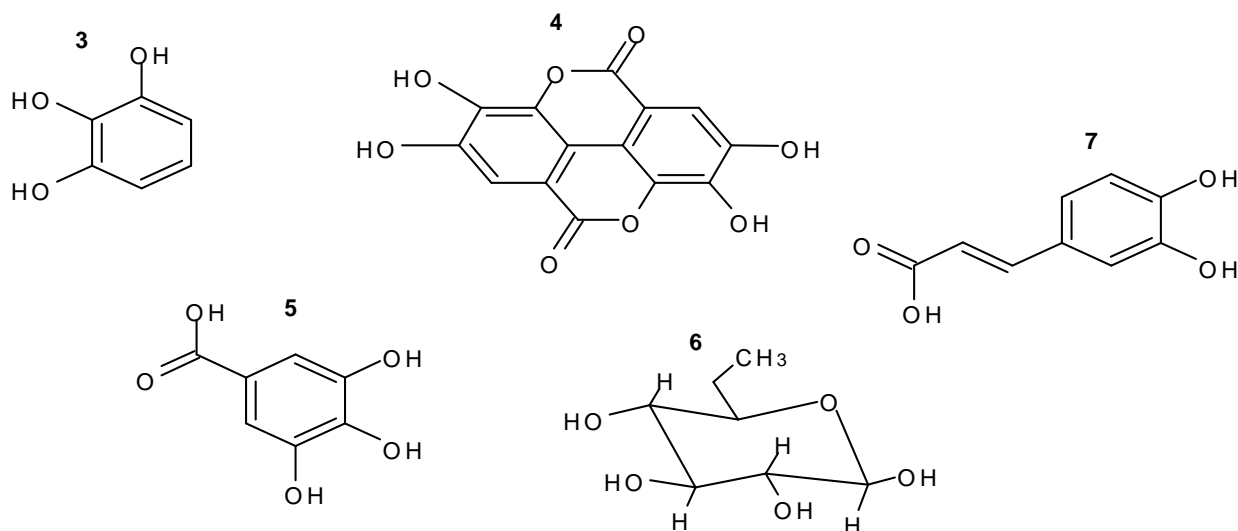


Figura 4. Estrutura molecular de pirogalol, ácido elágico, ácido gálico, glucose e ácido caféico.

Os taninos hidrolisáveis são unidos por ligações éster-carboxilo, sendo prontamente hidrolisáveis em condições ácidas ou básicas. A unidade básica estrutural desse tipo de tanino é um poli-ol, usualmente D-glucose, com os seus grupos hidroxilos esterificados pelo ácido gálico – formando galotaninos ou pelo ácido hexadihidroxifénico – formando elagitaninos (Hemingway *et al.*, 1989).

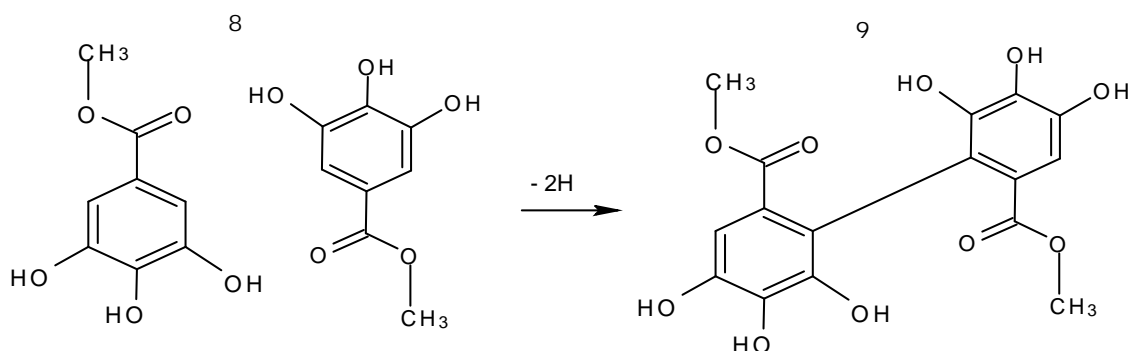


Figura 5. Estrutura de taninos hidrolisáveis; (2) Éster galoil (tanino gálico) e (3) Éster hexahidroxidifenoil (tanino elágico).

Os taninos hidrolisáveis por hidrólise ácida libertam ácidos fenólicos: gálico, caféico, elágico e um açúcar. Esses ácidos fenólicos, assim como os demais compostos fenólicos existentes em diversos vegetais, apresentam actividade antioxidante, a qual é considerada uma importante função fisiológica (Hagerman e Butler, 1981).

Os taninos condensados ou proantocianidinas são polímeros constituídos por duas ou mais unidades de flavan-3-ol. Eles estão presentes em maior quantidade nos alimentos normalmente consumidos (Salunkhe *et al.*, 1990).

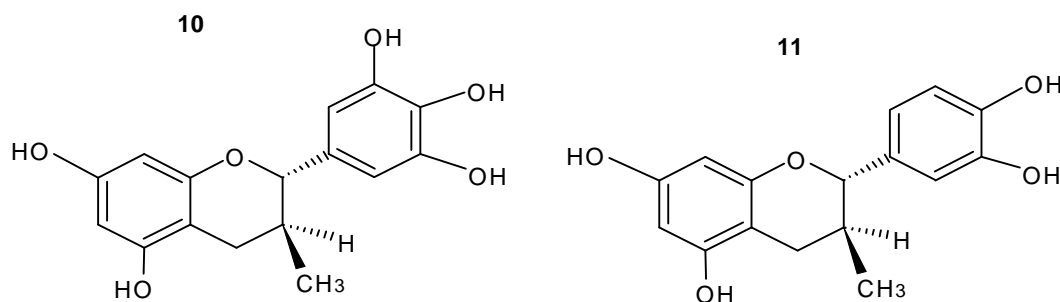


Figura 6. Estrutura da Galocatequina (10) e Catequina (11)

Os taninos condensados podem conter duas a cinquenta unidades flavonóides, possuem estruturação complexa; são resistentes à hidrólise, mas podem ser solúveis em solventes orgânicos, dependendo da sua estrutura. Os pigmentos antocianidinas são os responsáveis pelas tonalidades rosa, vermelha, violeta e azul em flores, folhas, frutos, sucos e vinhos. Também são responsáveis pela adstringência de frutas, sucos e vinhos (Pinto, 2003).

As aplicações de drogas com taninos estão relacionadas, principalmente, com suas propriedades adstringentes. Por via interna exercem efeito antidiarréico e antisséptico; por via externa impermeabilizam as camadas mais expostas da pele e mucosas, protegendo assim as camadas subjacentes. Ao precipitar proteínas, os taninos propiciam um efeito antimicrobiano e antifúngico. Ademais, os taninos são hemostáticos e, como precipitam alcalóides, podem servir de antídoto em casos de intoxicações. Em processos de cura de feridas, queimaduras e inflamações, os taninos auxiliam formando uma camada protectora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre tecidos epiteliais lesionados, podendo, logo abaixo dessa camada, o processo curativo ocorrer naturalmente (Mello *et al.*, 2001).

3.1.2.3. Alcalóides

Alcalóides são produtos naturais de baixo peso molecular, provenientes do metabolismo secundário das plantas; caracterizados pela presença de pelo menos um átomo de nitrogénio na

sua estrutura básica. Os alcalóides que contêm o átomo de nitrogénio no anel heterocíclico são chamados de alcalóides verdadeiros e classificados de acordo com o sistema anelar presente na molécula. Os compostos com átomo de nitrogénio que não pertence a um sistema heterocíclico são chamados de protoalcalóides. Os compostos nitrogenados com e sem anel heterocíclico que não são derivados de aminoácidos são chamados de pseudoalcalóides (Simões *et al.*, 2001).

Os alcalóides são quase sempre incolores com excepção daqueles altamente conjugados como a berberina (12) que apresenta cor amarela; sanguinarina (13) com cor cinzenta e urabaina (14) com cor verde.

Os alcalóides normalmente são sólidos à temperatura ambiente, com excepção de algumas bases não oxigenadas como a nicotina (15) e a esparteina (16) (Simões *et al.*, 2001).

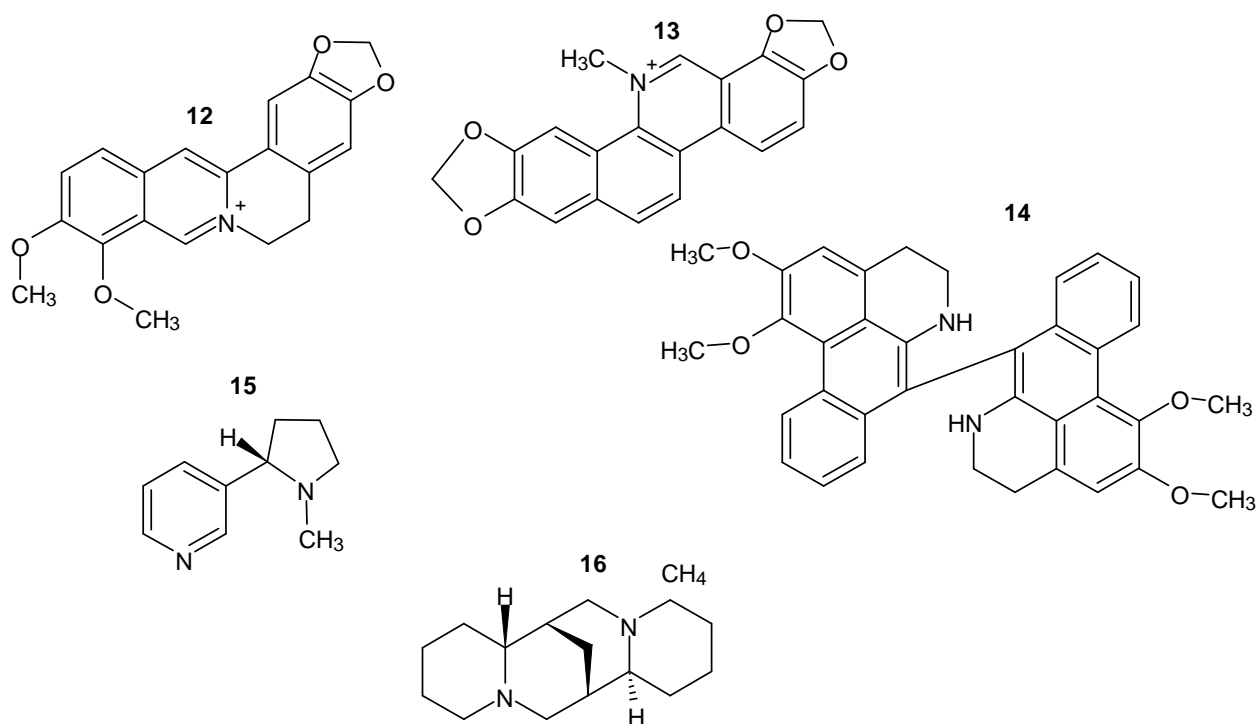


Figura 7. Estrutura molecular de berberina, sanguinarina, urabaina, nicotina e esparteina.

Na forma de base, são solúveis em solventes orgânicos não polares como benzeno, éter etílico, diclorometano, acetato de etilo e outros. Na forma salina, são solúveis em solventes polares como água, soluções ácidas e hidroalcoólicas (Acosta, 2008).

Os alcalóides são associados com ácidos orgânicos que facilitam o transporte de substâncias nas plantas. Podem servir como produtos de armazenamento, metabolização de nitrogénio e no transporte do mesmo. Apresentam também uma função de protecção contra viroses, bacterioses, infecções fúngicas e contra herbívoros. Também actuam como semioquímicos podendo ser atraentes ou repelentes para outros organismos (Acosta, 2008; Evans, 2000).

3.1.2.4. Saponinas

Saponinas são glicósidos de esteróides ou de terpenos policíclicos. Esse tipo de estrutura possui uma parte com características lipofílicas (triterpeno ou esteróide) e uma parte hidrofílica (açúcares), o que determina a propriedade de redução da tensão superficial da água e sua acção detergente e emulsificante (Simões *et al.*, 2001).

As saponinas são classificadas em saponinas esteroidais e triterpénicas.

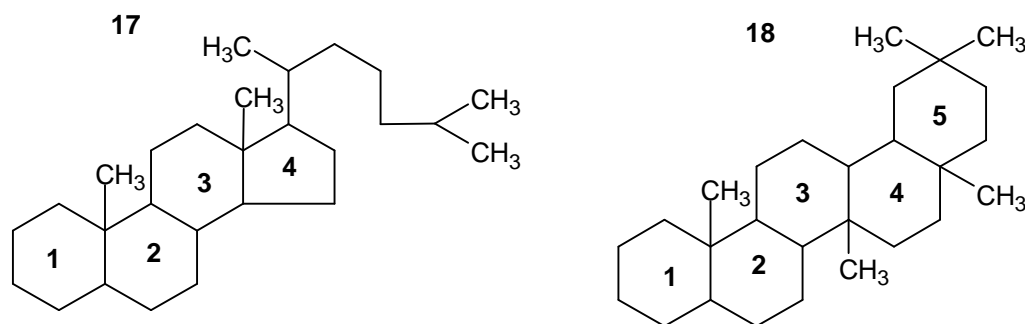


Figura 8. Esqueleto básico das saponinas: esqueleto esteroidal (17) e esqueleto triterpénico pentacíclico (18)

O comportamento anfifílico das saponinas e a capacidade de formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolípidos de membranas determinam um número variado de propriedades biológicas para essas substâncias, destacando-se a acção sobre membranas celulares, alterando a sua permeabilidade, ou causando a sua destruição. Relacionadas com essa acção sobre membranas, estão a actividade hemolítica e moluscida, frequentemente observadas. Para algumas saponinas também foi relatada acção espermicida, antimicrobiana, protozoárica, antifúngica, anti-inflamatória e anti-helmíntica (Simões *et al.*, 2001). As saponinas triterpénicas possuem diversas actividades biológicas, entre as quais destacam-se actividade analgésica, antimicrobiana, antimutagénica, cardioprotectora e antitumoral (Luciane, 2015).

Um estudo fitoquímico do extracto clorofórmico de *V. polyanthes* feito por Benfatti *et al.* (2007), permitiu o isolamento dos triterpenos como o lupeol (19), amirina (20) e amirina (21) conforme ilustra a figura 9.

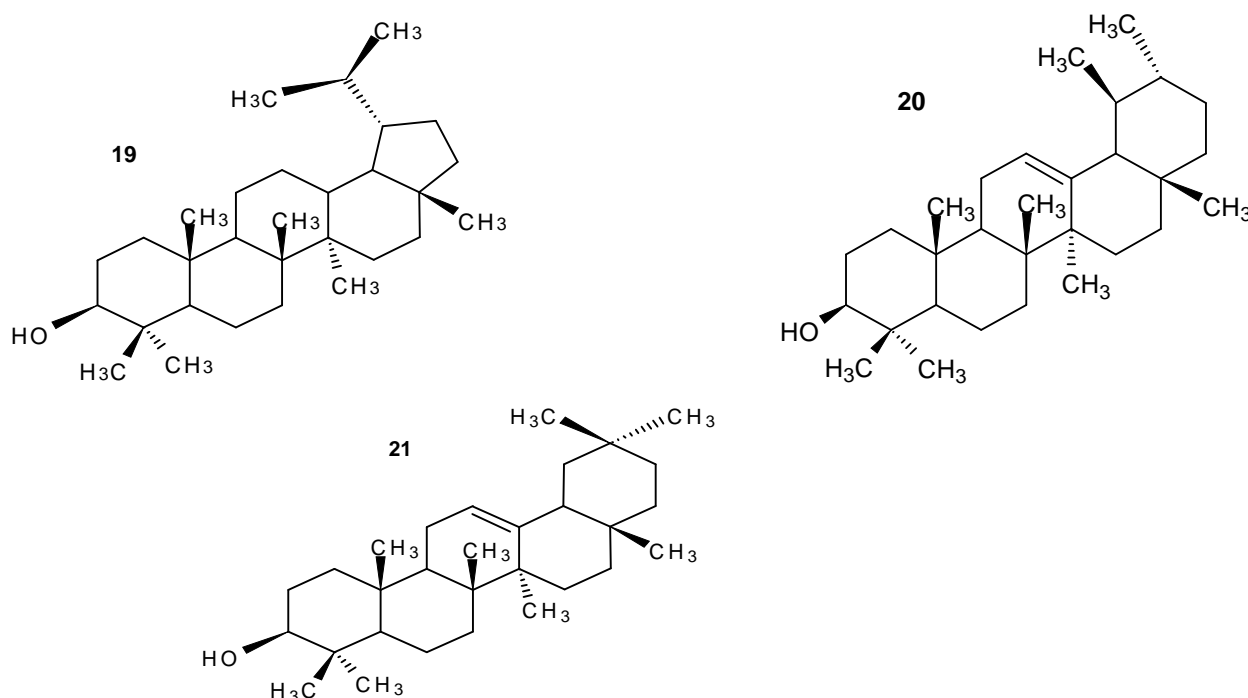


Figura 9. Compostos isolados do extracto clorofórmico das folhas de *V. polyanthes*; Lupeol, e - amirina.

3.1.2.5. Antraquinonas

As antraquinonas são quimicamente definidas como substâncias fenólicas derivadas da dicetona do antraceno.

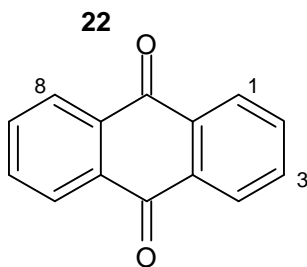


Figura 10. Estrutura básica das antraquinonas; (x) Dicetona do antraceno:

Os derivados antraquinónicos são frequentemente compostos alaranjados; são geralmente solúveis em água quente ou álcool diluído; podem estar presentes nos fármacos na forma livre ou na forma de glicosídeo. O teste de Borntrager é frequentemente usado para detecção de antraquinonas livres, onde uma coloração rósea, vermelha ou violeta é desenvolvida em meio básico. A microsublimação também é empregada para a sua caracterização, uma vez que as antraquinonas passam directamente do estado sólido para o gasoso, cristalizando-se sob a forma de agulhas amarelas (Simões *et al.*, 2001).

As antraquinonas são empregadas terapeuticamente como laxativos e catárticos, por agirem irritando o intestino grosso, aumentando a motilidade intestinal e, conseqüentemente, diminuindo a reabsorção de água (Cunha, 2005).

3.2. MICROORGANISMOS COMO AGENTES DE DOENÇA

Durante as últimas décadas, a incidência de infecções causadas por bactérias, fungos e protozoários em animais e seres humanos sofreu um aumento significativo. *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida sp* são alguns dos microrganismos com maior taxa de patogenicidade em seres humanos, sendo comumente reportados como causadores de infecções hospitalares e intoxicações alimentares. Estes microrganismos são encontrados no ambiente de circulação do ser humano, sendo o próprio homem o seu principal reservatório (Kaper *et al.*, 2004).

O *S. aureus* é uma bactéria esférica, do grupo dos cocos Gram-positivos. Esta bactéria pode ser encontrada no meio ambiente, além de estar presente em diversas partes do corpo humano, como fossas nasais, garganta, intestinos e pele. Desses sítios anatómicos, as narinas possuem o maior índice de colonização, com uma prevalência de cerca de 40% na população adulta, podendo ser ainda maior dentro de hospitais. A bactéria pode provocar doenças, que vão desde uma simples infecção (causando espinhas, furúnculos e celulites) até infecções graves tais como pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico e septicemias (Zygmunt *et al.*, 1967).

Bacillus cereus é outra bactéria comumente implicada em afecções nos seres humanos. A bactéria que pertence à família bacillaceae, apresenta-se em forma de bastão. *B. cereus* é uma

bactéria Gram-positiva, aeróbica facultativa, móvel e formadora de esporos esféricos em presença de oxigénio. A patogenicidade de *B. cereus* tem sido associada à sua capacidade de produzir toxinas. Existem três tipos de toxinas diarréicas por ela produzidas, quatro hemolisinas e três diferentes fosfolipases C (Kotiranta *et al.*, 2000; Holt *et al.*, 2000).

Escherichia coli, outra bactéria Gram-negativa anaeróbia facultativa pertencente à família *Enterobacteriaceae* que coloniza o intestino da maioria dos animais de homeotérmicos, inclusive o homem, como comensais, tem sido implicada em muitas afecções do trato gastro intestinal. O contágio por *E. coli* dá-se através da ingestão de água ou alimentos não processados e que tiveram algum tipo de contaminação fecal durante a sua produção, como por exemplo, leite não pasteurizado (Kaper *et al.*, 2004; Ives, 2012).

O género *Pseudomonas* constitui a família denominada *Pseudomonadaceae*. Os membros desta família caracterizam-se como bacilos Gram-negativos rectos ou ligeiramente curvos, aeróbios estritos; a maioria das cepas utiliza glicose e outros carboidratos oxidativamente e em geral são citocromo-oxidase-positivos. *Pseudomonas aeruginosa* é um agente patogénico oportunista que pode causar doenças resultantes de infecções do trato urinário, infecções no sistema respiratório, infecções da pele e dos tecidos moles, infecções oftalmológicas, infecções ósseas e articulares entre outras infecções sistémicas (Koneman *et al.*, 2001; Winn *et al.*, 2008).

Candida sp são microorganismos pertencentes ao reino *Fungi*. Geralmente são leveduras comensais do trato gastrointestinal, respiratório e membranas mucosas de animais domésticos. Entretanto, se presente em indivíduos imunocomprometidos, especialmente os portadores de HIV ou SIDA, em cerca de 74 % dos indivíduos, os fungos causam lesões na mucosa bucal (Sudbery *et al.*, 2004).

Trypanossoma congolense é provavelmente o tripanossoma patogénico mais comum e difundido na África tropical, sendo encontrado em ruminantes, suínos, cães e outros animais domésticos ao longo do cinturão da mosca tsé-tsé. O seu ciclo de vida complexo é dividido em duas fases, uma no vector (mosca tsé-tsé) e uma na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero. O *T. congolense* pertence à família *Trypanosomatidae* e reino Protista (Stephen, 1986).

3.3. FEBRE

Febre é definida como elevação anormal da temperatura corporal; uma resposta devido a danos nos tecidos, inflamação ou doença maligna. É muitas vezes acompanhada por certas características comportamentais de doença tais como depressão, sonolência, letargia, hiperalgesia e anorexia. A febre ocorre quando há um distúrbio na regulação da temperatura corporal no hipotálamo. As citocinas são formadas em grande quantidade nessa condição, resultando num aumento da formação de prostanglandina E₂ (PGE₂) que por sua vez estimulam o hipotálamo para elevar a temperatura do corpo. Mecanicamente, o hipotálamo controla o mecanismo efector de calor através do sistema nervoso autónomo quer por aumento de produção do calor ou prevenção da perda de calor por vasoconstrição (Duraisankar e Ravichandran, 2012).

Antipiréticos são substâncias capazes de reduzir a elevação da temperatura corporal ou seja substâncias que podem produzir antipirese agindo centralmente no hipotálamo, ao nível do centro regulador do calor, produzindo vasodilatação periférica, tendo como resultado um aumento do fluxo sanguíneo cutâneo, da sudação e perda de calor. Uma acção central pode envolver a inibição da síntese de prostaglandinas a nível do hipotálamo (Periyasamy *et al.*, 2011).

O paracetamol é um dos antipiréticos mais usados apesar dos seus efeitos adversos. Paracetamol produz analgesia e antipirese por inibição da ciclooxigenase no sistema nervoso central (Periyasamy *et al.*, 2011).

3.4. DOR E NOCICEPCÃO

A dor pode ser definida como uma experiência subjectiva que pode estar associada à lesão real ou potencial nos tecidos. A dor é considerada como uma experiência, uma sensação desagradável, genuinamente subjectiva e pessoal. A dor tem aspectos sensoriais, afectivos, autonómicos e comportamentais (Vanegas e Schaible, 2001).

A nocicepção é uma forma especializada de sinalização sensorial, que converte informação sobre lesões teciduais. Assim, enquanto a dor envolve a percepção de um estímulo agressivo e exige a capacidade de abstracção e elaboração de impulsos sensoriais, a nocicepção refere-se às manifestações neurofisiológicas geradas pelo estímulo nocivo (Farquhar-Smith, 2007).

A informação nociceptiva é traduzida em sinais electrofisiológicos que são transmitidos por neurotransmissores. Esta transmissão é mediada por diversos mecanismos, incluindo sensibilização periférica/primária e central/secundária e é formada por um conjunto de mediadores químicos que actuam periféricamente e na medula, comparáveis à complexidade dos neurotransmissores no cérebro (Farquhar-Smith, 2007).

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO

A preparação de extractos da casca do caule de *V. polyanthes* e os testes da actividade antipirética, analgésica e antitripanossómica foram realizados na Secção de Farmacologia da Faculdade de Veterinária, UEM.

A análise fitoquímica dos extractos foi realizada no Laboratório de Produtos Naturais da Faculdade de Ciências, Departamento de Química, UEM.

O teste da actividade antimicrobiana dos extractos foi realizado nos Laboratórios de Microbiologia e de Higiene e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Veterinária, UEM.

4.2. MATERIAL VEGETAL

A casca do caule de *V. polyanthes* foi adquirida de vendedores informais no mercado de Xipamanine localizado no centro da cidade de Maputo. Após a compra, a casca foi fragmentada e depois, triturada em partículas finas seguidamente conservadas em frasco de vidro no Laboratório de Nutrição da Faculdade de Veterinária, UEM até á preparação dos extractos.

4.2.1. PREPARAÇÃO DOS EXTRACTOS

A preparação de extractos da casca do caule de *V. polyanthes* foi feita com recurso aos métodos de Maceração e de Soxhlet.

Para preparação do extracto etanólico 50,0 g de fragmentos secos de casca do caule de *V. polyanthes* foram misturados com 250 mL de etanol a 70 %. A mistura foi vigorosamente agitada e depois deixada em repouso; e com agitações subsequentes em intervalos de 24 horas, durante 72 horas.

Para preparação do extracto aquoso, seguiu-se o procedimento descrito para o extracto etanólico, tendo no entanto sido usada água ao invés de etanol.

Após 72 horas de extracção, as misturas foram decantadas, filtradas num papel de filtro Whatman Nº 2 e concentradas numa estufa de ventilação com temperatura em torno dos 25-30 °C. Os extractos obtidos foram pesados, devidamente rotulados e conservados numa geleira a 4°C até posterior uso.

Num aparelho de Soxhlet foram colocados 50,0 g de fragmentos da casca de caule de *V. polyanthes*, embrulhados num cartucho apropriado. De seguida, foram adicionados 250 mL de etanol a 96 % e realizada a extracção até descoloração do material vegetal. Após a extracção, o extracto foi concentrado num vaporizador rotativo até á remoção completa do solvente, seguindo-se a pesagem e conservação num ambiente com ausência de luz a 4 °C até o seu uso em fases posteriores do estudo.

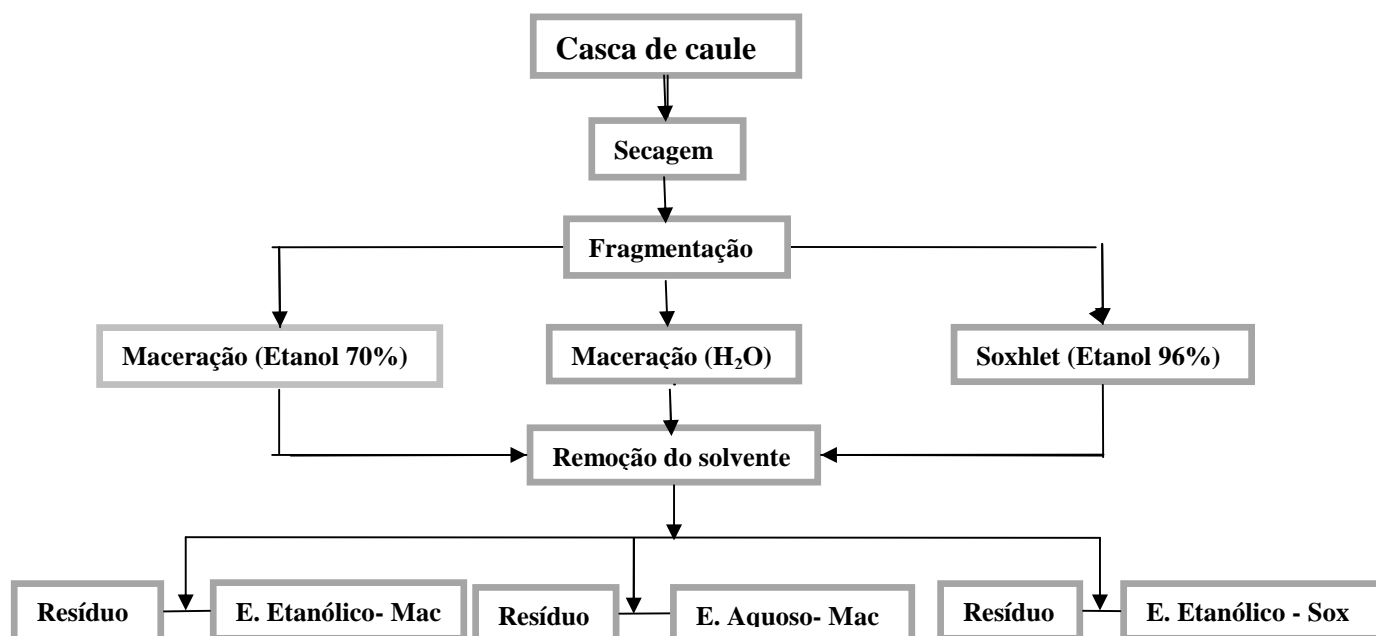


Figura 11. Esquema de preparação de extractos a partir da casca do caule de *V. polyanthes*.

4.3. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram usados 60 murganhos (*Mus musculus*) de ambos os sexos, com peso de 24-42 g adquiridos no biotério do Instituto de Investigação Agrária de Moçambique (IIAM), Departamento de Ciências Animais (DCA). Os animais foram mantidos em gaiolas metálicas Inox, com ração e água fornecidos *ad-libitum*. Para os experimentos em que a administração das soluções foi realizada por via oral, os animais foram mantidos em jejum num período de 14 horas antes dos experimentos, com acesso livre à água.



Figura 12. Animais usados nos ensaios e respectivas gaiolas de acomodação.

4.4. ANÁLISE FITOQUÍMICA

Os extractos foram submetidos a ensaios qualitativos para identificação das classes de fitoconstituintes químicos. Os extractos secos foram reconstituídos com o solvente usado para extracção, e seguidamente analisados de acordo com o proposto por Simões *et al.* (2001) e apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Teste para reconhecimento de metabólitos secundários em material vegetal.

Metabólitos secundários	Reagente	Reacção positiva
Flavonóides	Ácido clorídrico concentrado e fita de Mg	Coloração Castanha
Alcalóides	Reagente de Mayer e Wagner	Precipitado Vermelho ou amorfo
Saponinas	Clorofórmio e água destilada	Formação de Espuma
Esteróides/triterpenóides	Anidrido acético e ácido sulfúrico concentrado	Coloração Amarela dourada
Antraquinonas	Clorofórmio e Hidróxido de Sódio a 1%	Coloração Amarela
Taninos	Cloreto férrico a 2%	Precipitado de cor Azul ou Verde

4.5. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para os testes de actividade antibacteriana, foram usadas as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa* e para actividade antifúngica foi usado *Candida sp.*

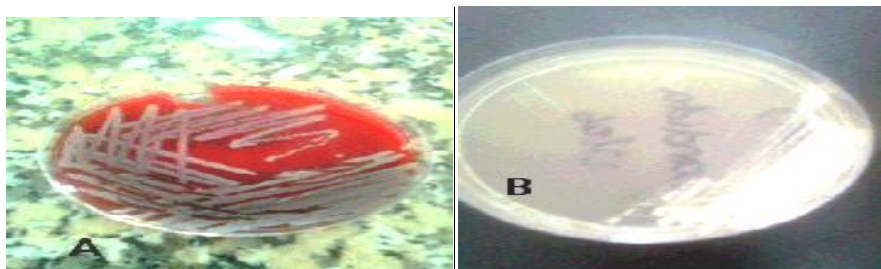


Figura 13. Placas de Petri com colónias frescas de *Escherichia coli* (A) e *Candida sp* (B).

Foram usados os meios de culturas Manitol, Endo Agar/fuscina básica, Agar Mueller Hinton para bactérias, e Agar Sabouraud para fungos.

Foram preparadas soluções de 3.2 mg.mL^{-1} do antibacteriano ciprofloxacina e de 6.4 mg.mL^{-1} do antifúngico cetoconazole. Os três extractos preparados pelas técnicas de Maceração e Soxhlet foram reconstituídos cada um em etanol a 50 % e água destilada estéril nas concentrações 500, 250 e 125 mg.mL^{-1} . Na preparação de soluções antimicrobianas para os três extractos foram realizadas diluições seriadas conforme detalhado no experimento descrito abaixo. Foi perfurado um disco de papel de filtro (Whatman N° 2), com uma perfuradora de papel de escritório, formando mini-discos de 5 mm de diâmetro, seguidamente levado para esterilização numa autoclave a 120°C . Após arrefecimento e secagem, os mini-discos de papel de filtro foram embebidos em 5 μl das diversas soluções antimicrobianas (extractos, antibacteriano e antifúngico padrão e veículo) a testar. Foi usado o método de difusão em placa (Kirby-Bauer) para aferir a actividade antimicrobiana das diversas preparações.

Foram preparadas colónias frescas de cada microrganismo a partir de culturas criopreservadas existentes no banco de microrganismos da Secção de Microbiologia da Faculdade de Veterinária. Culturas frescas inicialmente semeadas em placas foram novamente semeadas em meio líquido apropriado, seguindo as normas recomendadas pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2002).

A partir de culturas semeadas em meio líquido foram feitas sementeiras em placas, com recurso a uma ansa de vidro (ansa L) para espalhamento em toda a superfície do meio.

Em seguida, cada placa foi dividida em 4 quadrantes através de linhas traçadas na parte externa da base da placa. Cada quadrante foi usado para avaliar o crescimento conforme ilustrado na figura 14.

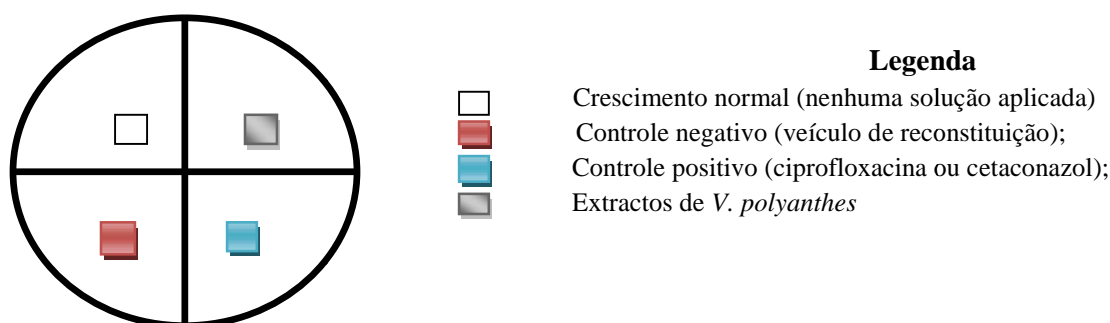


Figura 14. Representação esquemática da placa de Petri para antibiograma

Após sementeira, os discos de papel de filtro impregnados em 5 μ L do antimicrobiano foram colocados sobre o meio de cultura e comprimidos ligeiramente usando uma pinça estéril. As placas foram de seguida levadas a incubar a 37 °C para bactérias e 30 °C para fungos, durante 24 horas. Após este período cada placa foi examinada e medido o diâmetro de inibição de crescimento dos microorganismos.



Figura 15. Placas de Petri com indicação das áreas de inibição de crescimento de *S. aureus* (1) e *B. cereus* (2). P – padrão, E – extracto e V – veículo.

4.6. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE FARMACOLÓGICA

4.6.1. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIPIRÉTICA

Antes da administração do agente indutor da febre (suspensão de 20% de levedura para pão em água destilada a 30 °C), foram feitas duas medições da temperatura corporal de cada animal dos

4 grupos de 4 animais cada, em intervalos de 30 minutos, através da introdução dum termómetro digital no recto dos animais. A temperatura média nestas condições foi considerada temperatura inicial do animal. Em seguida administrou-se o agente indutor da febre por via subcutânea numa administração única de 10 mL.kg^{-1} de peso vivo do animal. 19 horas depois da administração do agente indutor da febre, e após 14 horas de jejum, os murganhos do grupo de controlo positivo (grupo I) foram tratados com suspensão de paracetamol e os animais dos grupos II, III e IV foram com extractos por via oral conforme o apresentado na Tabela 2. Após os tratamentos a temperatura corporal de cada animal foi medida em intervalos de uma hora, durante três horas, antes da última medição, vinte e quatro horas depois dos tratamentos.

Tabela 2. Grupos de animais para o teste da actividade antipirética *V. polyanthes*

Grupo	Tratamento	# Animais	Agente indutor de febre (mL.kg^{-1})	Antipirético (mg.kg^{-1})	Concentração antipirética (mg.mL^{-1})
I	Paracetamol	4	10	120	24
II	Extracto etanólico – Maceração	4	10	500	100
III	Extracto aquoso - Maceração	4	10	500	100
IV	Extracto etanólico – Soxhlet	4	10	500	100

4.6.2. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANALGÉSICA

Para actividade analgésica de extractos do caule de *V. polyanthes* foi utilizado o método de placa quente descrito por Eddy e Leimback (1953), com algumas modificações. Foram formados 4 grupos dos 4 animais cada. Cada murganho, em jejum de 8 horas, foi tratado por via oral com paracetamol (controle positivo), extracto da planta (substância teste) e colocado individualmente num copo sobre uma placa metálica aquecida a $(51 \pm 1) ^\circ\text{C}$. O tempo para o animal apresentar o reflexo de lamber as patas (tempo de latência para a resposta nociceptiva), “sapatear” – bater rápido das patas e/ou saltitar, e o tempo para o animal saltar para fora do copo foram registados antes da administração de qualquer tratamento e de 30 em 30 minutos, até 2 horas após administração das soluções a testar, bem como uma última avaliação da actividade

antinociceptiva, 24 horas após tratamento com extractos de *V. polyanthes*. O tempo de reacção dos animais foi registado com auxílio de um cronómetro, sendo o tempo máximo de permanência do animal no copo de 90 segundos, para evitar lesões nas patas do animal.

O efeito antinociceptivo – definido como aumento do tempo de reacção ao estímulo térmico – foi determinado em função do tempo de resposta ao estímulo nociceptivo antes e depois da administração das soluções em estudo.

Tabela 3. Grupos de animais para o teste da actividade analgésica *V. polyanthes*

Grupo	Tratamento	# Animais	Dose (mg.kg ⁻¹)	Concentração do analgésico (mg.mL ⁻¹)
I	Paracetamol	4	120	24
II	Extracto aquoso - Maceração	4	500	100
III	Extracto etanólico – Maceração	4	500	100
IV	Extracto etanólico – Soxhlet	4	500	100

4.7. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTITRIPANOSSÓMICA

Para avaliação de actividade antiparasitária, o extracto etanólico obtido por maceração foi reconstituído em DMSO a 10%, na concentração de 100 mg.mL⁻¹. Foram constituídos 3 grupos contendo 4 animais cada, aos quais foram inoculados 100 µL de sangue contendo *T. congolense*, colhido de murganhos previamente infectados, por via intraperitoneal.

A parasitémia dos animais infectados foi monitorada duas vezes por semana até atingir uma pontuação de 4+ na escala de Murray *et al.* (1983). Nesta altura, os animais foram tratados através duma injeção intraperitoneal dos extractos reconstituídos em DMSO. Os animais dos grupos de controlo foram tratados da mesma maneira exceptuando que, ao invés de serem administrados extractos da planta, receberam água destilada estéril (controlo negativo) ou aceturato de diminazeno - Tryponil® (controlo positivo).

A parasitémia – presença de parasitas no sangue – foi monitorada por exame do sangue periférico colhido de vasos sanguíneos da cauda de cada animal, usando o método de *buffy-coat* e observação ao microscópio óptico, sob ampliação de 400X, em dias alternados até à morte dos animais tratados e não curados.

Tabela 4. Formação de grupos de murganhos para o teste da actividade antitripanossómica *V. polyanthes*.

Tratamento	Grupo	# Animais	Dose (mg.kg ⁻¹ p.v)	Concentração (mg.mL ⁻¹)
Tryponil [®] Controlo +	I	4	3,5	0,16
DMSO a 10 % - Veículo	II	4	500	10%
Extracto etanólico - Macerado	III	4	500	100

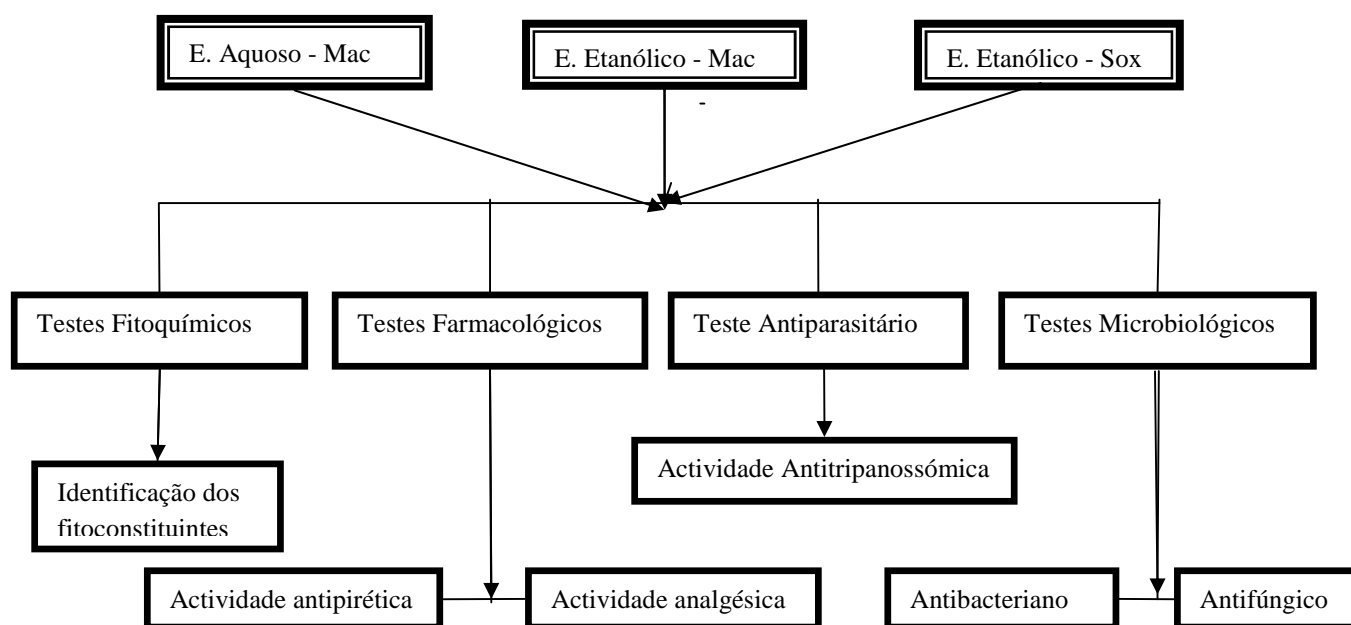


Figura 16. Esquema geral dos testes realizados com os extractos *V. polyanthes*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. RENDIMENTO DO PROCESSO DE EXTRACÇÃO

Efecturam-se extracções do material vegetal (casca do caule de *V. polyanthes*) pelos métodos de maceração e Soxhlet, usando solventes como água, etanol a 70% e a 90%. Empregaram-se tempos de 72 horas na extracção por maceração e 10 horas na extracção por Soxhlet, para conseguir o esgotamento do material vegetal.

Nos três extractos preparados a partir da casca do caule de *V. polyanthes*, verificou-se um rendimento percentual maior (14,08%) para o extracto etanólico obtido por Soxhlet comparado com os extractos aquoso (10,40%) e etanólico (12,02) obtidos pela maceração (vide Tabela 5).

Tabela 5. Rendimento do processo de extracção da casca de caule de *V. polyanthes*.

Extractos	Quantidade inicial (g)	Quantidade final (g)	Rendimento (%)
Etanólico – Maceração	50	6,01	12,02
Aquoso - Maceração	50	5,20	10,40
Etanólico - Soxhlet	50	7,04	14,08

O maior rendimento percentual do extracto preparado pelo método de Soxhlet comparado com os dois extractos obtidos pela maceração, pode estar associado as características dos dois métodos. O método Soxhlet é contínuo, podendo o tempo de extracção variar de 1 a 72 horas e permite extracção de compostos com maior peso molecular num curto período de tempo. Neste processo, o solvente extrai o material orgânico retido na amostra (Miguel *et al.*, 1989).

A maceração é mais lenta, exaustiva e além de requerer um tempo relativamente longo (2 a 14 dias de extracção) dependendo do material, não consegue extrair todos compostos presentes nas plantas (Miguel *et al.*, 1989).

5.2. ANÁLISE FITOQUÍMICA

Os resultados dos ensaios de reconhecimento dos fitoconstituintes da casca de caule de *V. polyanthes* estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados dos testes fitoquímicos da casca de caule de *V. polyanthes*.

Metabólitos secundários	Extracto		
	Aquoso – Maceração	Etanólico – Maceração	Etanólico – Soxhlet
Flavonóides	(+)	(+)	(+)
Alcalóides	(-)	(-)	(-)
Saponinas	(+)	(-)	(-)
Esteróides /triterpenóides	(+)	(+)	(+)
Antraquinonas	(+)	(+)	(+)
Taninos	(+)	(+)	(+)

Legenda: (-) não apresenta, (+) apresenta.

Na análise qualitativa realizada com os extractos para identificação de fitoconstituintes detectou-se que flavonóides, saponinas, antraquinonas, taninos e esteróides/triterpenóides foram as classes de compostos presentes em todos os extractos preparados. Estes resultados corroboram parcialmente com os resultados obtidos por Luciane (2015) onde foram detectados compostos tais como: ácidos gordos, aminoácidos, cumarinas, alcalóides, saponinas, triterpenos, antraquinonas, flavonóides, taninos e alcalóides nas várias partes da planta *V. polyanthes*.

Os resultados obtidos vão ainda de acordo com os relatados por Sousa *et al.* (2008) num estudo feito para caracterização fitoquímica das partes aéreas de *V. polyanthes* onde foram detectados; ácidos gordos, alcalóides, cumarinas, esteróides e/ou triterpenos, glicosídeos antraquinónicos, glicosídeos flavónicos, glicosídeos saponínicos e taninos hidrolisáveis.

Uma triagem fitoquímica do extracto etanólico de *V. polyanthes* feita por Alves *et al.* (2012) indicou a presença de flavonóides, taninos, cumarinas, terpenóides, esteróides, saponinas e alcalóides. Neste estudo não foi detectada a presença de alcalóides em todos os extractos

preparados. Tal ausência pode ser atribuída à presença desta classe de substâncias, em pequenas quantidades não detectáveis pelos métodos usados.

Segundo Sousa *et al.* (2008) a presença de metabólitos secundários nas plantas está relacionada com várias funções ecológicas, entre elas: defesa contra ataques de herbívoros e de patógenos; atractivo (odor, cor e sabor) para animais polinizadores, microrganismos simbióticos, função estrutural e protecção contra stresses bióticos (radiação solar, mudança de temperatura, deficiência de nutrientes minerais) entre outras funções.

Com base nos resultados apresentados na tabela 6 comprovou-se que a planta *V. polyanthes* sintetiza metabólitos secundários responsáveis pelas diversas acções biológicas.

5.3. ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA

O teste da actividade antimicrobiana realizado usando método de difusão em disco apresentou os resultados apresentados nas tabelas 7 a 11 e figuras 17 a 21.

Tabela 7. Resultados da actividade antibacteriana dos extractos de *V. polyanthes* frente a *S. aureus*.

Concentração do extracto (mg.mL ⁻¹)	Halos de inibição (mm)				
	Etanólico – Maceração	Aquoso – Maceração	Etanólico - Soxhlet	Veículo (Água ou Etanol)	Ciprofloxacina
500	17	14	18	0	36
250	14	12	12	0	37
125	10	11	11	0	36

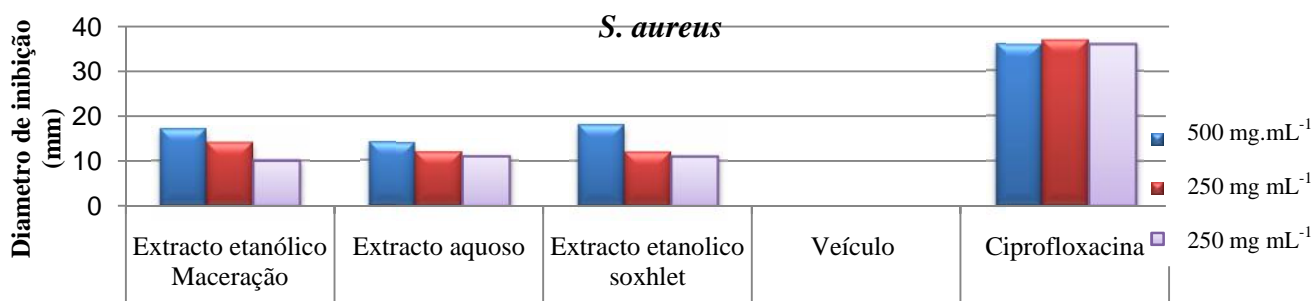


Figura 17. Representação gráfica da actividade inibitória do crescimento de *S. aureus* por extractos de *V. polyanthes*.

Tabela 8. Resultados da actividade antibacteriana dos extractos de *V. polyanthes* frente a *E. coli*.

Concentração do extracto (mg.mL ⁻¹)	Halos de inibição (mm)				
	Etanólico – Maceração	Aquoso – Maceração	Etanólico - Soxhlet	Veículo (Água ou Etanol)	Ciprofloxacina
500	8	0	7	0	36
250	0	0	0	0	34
125	0	0	0	0	36

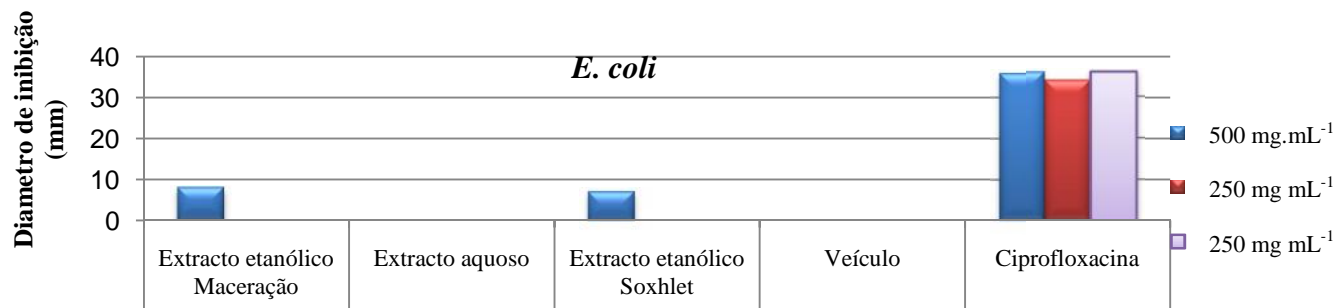


Figura 18. Representação gráfica da actividade inibitória do crescimento de *E. coli* por extractos de *V. polyanthes*.

Tabela 9. Resultados da actividade antibacteriana dos extractos de *V. polyanthes* frente a *B. cereus*.

Concentração do extracto (mg.mL ⁻¹)	Halos de inibição (mm)				
	Etanólico – Maceração	Aquoso – Maceração	Etanólico - Soxhlet	Veículo (Água ou Etanol)	Ciprofloxacina
500	19	15	16	0	35
250	14	10	12	0	34
125	13	7	9	0	34

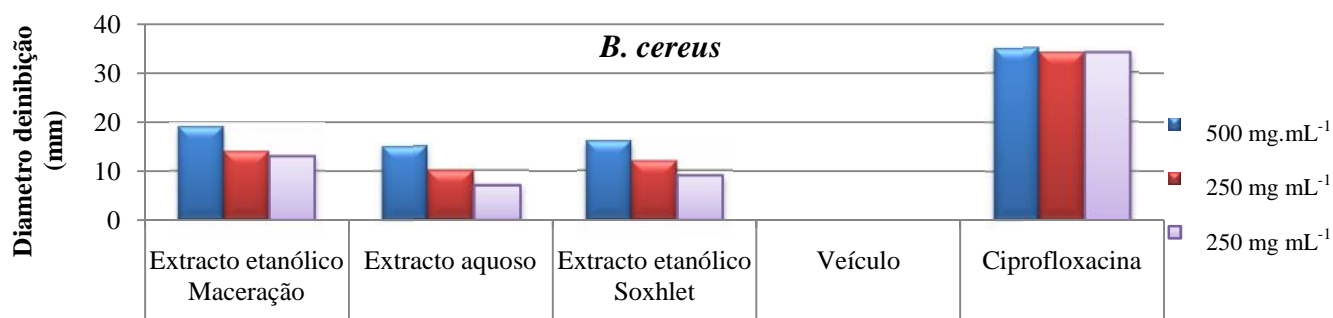


Figura 19. Representação gráfica da actividade inibitória do crescimento de *B. cereus* por extractos de *V. polyanthes*.

Tabela 10. Resultados da actividade antibacteriana dos extractos de *V. polyanthes* frente a *P. aeruginosa*.

Concentração do extracto (mg.mL ⁻¹)	Halos de inibição (mm)				
	Etanólico – Maceração	Aquoso – Maceração	Etanólico - Soxhlet	Veículo (Água ou Etanol)	Ciprofloxacina
500	7	0	6	0	31
250	0	0	0	0	33
125	0	0	0	0	32

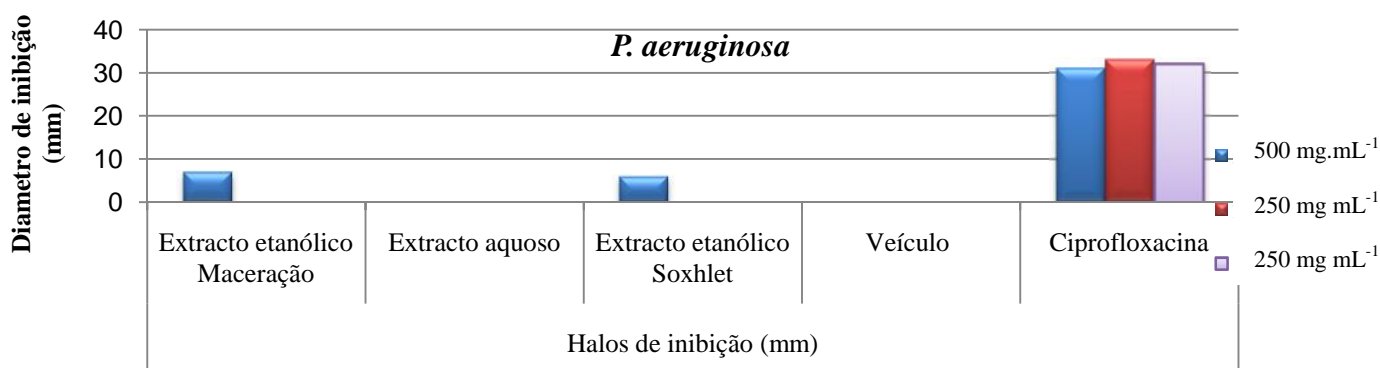


Figura 20. Representação gráfica da actividade inibitória do crescimento de *P. aeruginosa* por extractos de *V. polyanthes*.

Tabela 11. Resultados da actividade antifúngica dos extractos de *V. polyanthes* frente a *Candida sp.*

Concentração do extracto (mg.mL ⁻¹)	Halos de inibição (mm)				
	Etanólico – Maceração	Aquoso – Maceração	Etanólico - Soxhlet	Veículo (Água ou Etanol)	cetoconazol
500	0	0	0	0	11
250	0	0	0	0	12
125	0	0	0	0	11

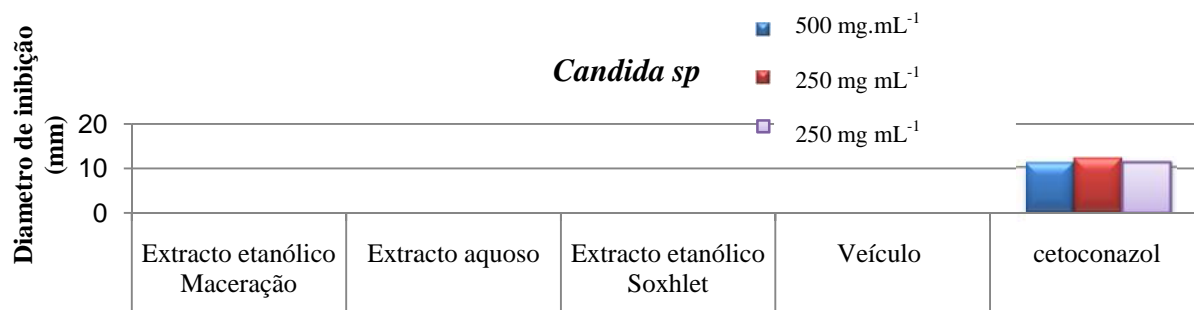


Figura 21. Representação gráfica da actividade inibitória do crescimento de *Candida sp* por extractos de *V. polyanthes*

Os resultados da actividade antimicrobiana dos extractos indicam actividade inibidora do crescimento para *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Os extractos não apresentaram nenhuma inibição de crescimento para o fungo *Candida sp*. Estes resultados vão de certa maneira de acordo com os obtidos por Jorgetto *et al.* (2011) num ensaio da acção antimicrobiana dum extracto hidroalcoólico em 15 microrganismos, onde foram obtidos halos de inibição para *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella typhimurium* e *Proteus mirabilis*, enquanto foi observada resistência de *P. aeruginosa* e de *Candida sp*.

A actividade antimicrobiana é atribuída a produtos do metabolismo secundário das plantas, como os terpenóides, saponinas, taninos e flavonóides que possivelmente lesionam as moléculas da parede celular de bactérias e fungos. As saponinas alteram a permeabilidade das membranas celulares dos microrganismos e causam a sua destruição (Jorgetto *et al.*, 2011; Alonso, 2008).

Este estudo revelou que os extractos de *V. polyanthes* apresentaram maior efeito antibacteriano nas bactérias Gram+ (*S. aureus* e *B.cereus*), em todas as concentrações testadas, sendo mais activos na concentração de 500 mg.mL⁻¹. Nas bactérias Gram- (*E.coli* e *P.aeruginosa*) apenas os extractos etanólicos apresentaram alguma actividade (fraca) antibacteriana na concentração mais alta testada, isto é, 500 mg.mL⁻¹. A fraca actividade dos extractos frente a bactérias de Gram- pode estar associada à composição da parede destas bactérias, a qual tem uma camada fina de peptidoglicanas e possui também uma segunda membrana lipoprotéica com lipopolissacarídeos diferenciados dos presentes na membrana das bactérias Gram+. Possivelmente, essas propriedades conferem a esse grupo de bactérias uma capacidade de limitar a sua permeabilidade

frente a substâncias estranhas exógenas, incluindo as substâncias contidas nos extractos de *V. polyanthes* e desse modo, maior resistência ao efeito nocivo dos antibióticos (Enoch *et al.*, 2007). Ao contrário das bactérias Gram-, as bactérias Gram+ são mais sensíveis a vários antibióticos sintéticos e extractos de plantas, visto que estes tipos de bactérias têm em sua parede, uma grossa camada de peptidoglicanas que permitem uma boa permeabilidade e absorção dos antibióticos pelas paredes das bactérias (Enoch *et al.*, 2007).

5.4. ACTIVIDADE ANTIPIRÉTICA

No ensaio para avaliação da actividade antipirética dos extractos de *V. polyanthes* na dose de 500 mg.kg⁻¹, como anteriormente indicado, para indução da febre em murganhos, foi injectada levedura para pão, suspensa em água destilada a 30 °C, por via subcutânea e verificou-se elevação da temperatura corporal, em média, na ordem de 1,1 °C em todos os animais, conforme ilustra a Tabela 12 e Figura 22 apresentados abaixo.

Tabela 12. Resultados do teste da actividade antipirética dos extractos de *V. polyanthes*.

Agente terapêutico	Temperatura inicial normal (°C)	Temperatura 19 horas após indução da febre (°C)	Temperatura após tratamento (°C)			
			1 hora	2 horas	3 horas	24 horas
Paracetamol	37,40 ± 0,62	38,40 ± 0,51	38,35 ± 0,42	37,50 ± 0,14	37,42 ± 0,36	37,93 ± 0,26
Ext. Etanólico – Maceração	36,48 ± 0,05	37,78 ± 0,81	36,25 ± 0,39	36,70 ± 0,57	36,78 ± 0,53	37,45 ± 0,40
Ext. Aquoso – Maceração	37,15 ± 0,40	37,78 ± 0,61	37,55 ± 0,60	37,10 ± 0,55	36,90 ± 0,65	37,00 ± 0,26
Ext. Etanólico – Soxhlet	37,13 ± 0,17	37,85 ± 0,24	37,08 ± 0,78	36,68 ± 0,63	36,98 ± 0,28	37,25 ± 0,30

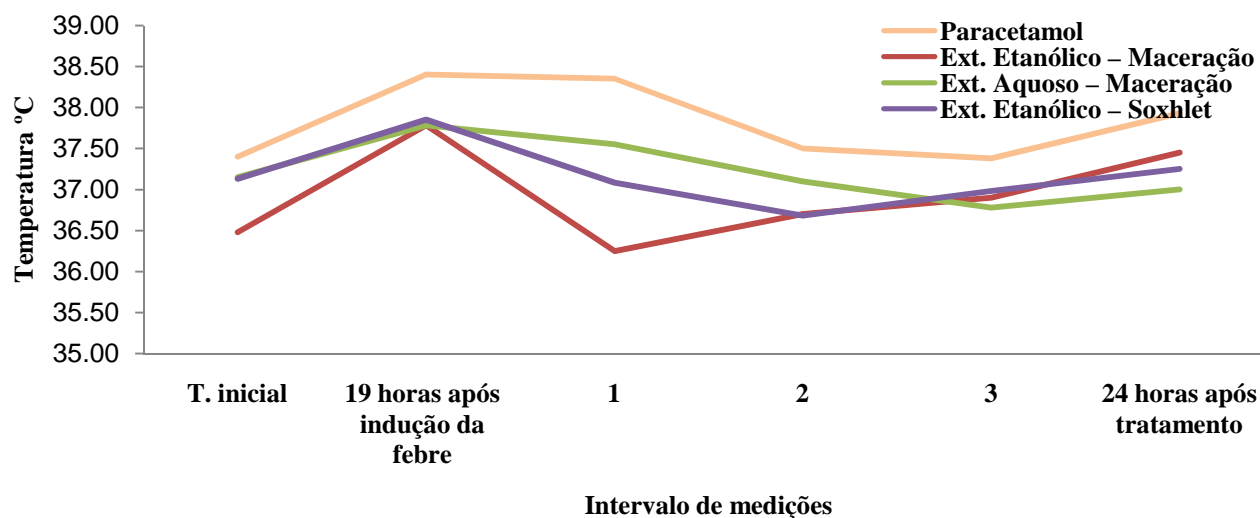


Figura 22. Representação gráfica dos resultados do ensaio da actividade antipirética dos extractos de *V. polyanthes*

A tabela 12 e figura 19 demonstram que o extracto etanólico por maceração apresentou um efeito mais acentuado na redução da temperatura corporal dos murganhos no estado febril do que o extracto aquoso por maceração e o extracto etanólico por Soxhlet e o paracetamol. Os extractos etanólicos (macerado e Soxhlet) na dose de 500 mg.kg^{-1} induziram uma diminuição da temperatura corporal dos animais do que o paracetamol. O extracto aquoso por maceração, tal como o paracetamol e os extractos etanólicos induziu uma diminuição da temperatura corporal dos animais, e o seu efeito, ao ser comparado com o paracetamol não mostra grandes diferenças na actividade antipirética.

Presume-se que o efeito antipirético dos extractos de *V. polyanthes* pode estar associado com a presença dos metabólitos secundários identificados na planta, particularmente os flavonóides, saponinas e triterpenóides os quais podem produzir antipirese por acção central no hipotálamo, ao nível do centro regulador do calor, reduzindo a concentração cerebral da prostaglandina E_2 através da sua acção sobre a COX, produzindo vasodilatação periférica e tendo como resultado um aumento do fluxo sanguíneo cutâneo, sudorese e perda de calor (Periyasamy *et al.*, 2011).

Ignacimuthu e Ayyanar (2009) reportam alguns compostos como ácidos gordos, flavonóides, polissacarídeos e triterpenos encontrados no género *Vernonia* como sendo os responsáveis pelo efeito antipirético. Entretanto, tanto quanto sabemos ainda não foi realizado nenhum estudo que tenha investigado especificamente o efeito de *V. polyanthes* sobre a produção de PGs.

Os resultados obtidos neste estudo também corroboram com o estudo de Zakaria *et al.* (2007) no qual compostos como os flavonóides e saponinas são sugeridos como actuando sinergicamente para exercer actividade farmacológica observada.

Calixto (2000) atribui efeito antipirético e analgésico de extractos de algumas plantas a compostos fenólicos tais como flavonóides e taninos encontrados nessas plantas.

5.5. ACTIVIDADE ANALGÉSICA

Os resultados do teste da actividade analgésica estão apresentados na tabela 13 e figura 23.

Tabela 13. Resultados do teste da actividade analgésica da casca de caule de *V. polyanthes*.

Agente terapêutico	Tempo de resposta ao estímulo térmico (s)				
	Medida inicial	30 minutos	60 minutos	90 minutos	120 minutos
Paracetamol	10,32	14,39	19,06	14,04	21,67
Ext. Etanólico – Maceração	13,67	25,75	42,02	55,04	55,04
Ext. Aquoso – Maceração	9,48	40,35	33,06	45,70	43,71
Ext. Etanólico – Soxhlet	12,01	67,00	47,73	40,05	46,57

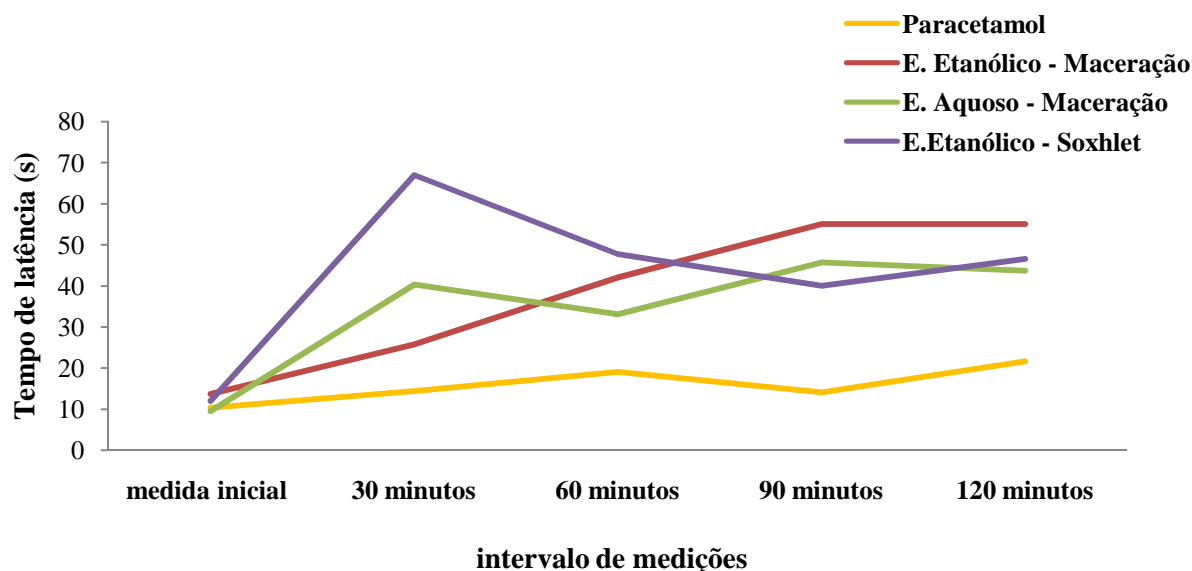


Figura 23. Representação gráfica dos resultados da avaliação da actividade analgésica de extractos de *V. polyanthes* em murganhos.

Neste estudo foi avaliado o efeito antinociceptivo (analgésico) dos extractos de *V. polyanthes* na dose de 500 mg.kg^{-1} , tendo-se usado o método da placa quente para aferir o efeito antinociceptivo em murganhos. A tabela 13 e figura 20, mostram os resultados obtidos, tendo-se verificado um efeito dos extractos de *V. polyanthes* sobre o tempo de latência para percepção da dor nos animais, manifestada pelo salto para fora do copo.

O extracto etanólico de *V. polyanthes* preparado por maceração na dose de 500 mg.kg^{-1} apresentou maior actividade antinociceptiva visto que o aumento do tempo de reacção do animal ao estímulo térmico nociceptivo nos animais tratados foi o mais longo, tendo o animal permanecido no copo aquecido, 13,67 segundos antes do tratamento e 55,04 segundos depois do tratamento. Este efeito foi semelhante para os extractos, etanólico obtido por Soxhlet (12,01 a 46,57 segundos) e o extracto aquoso (9,48 a 43,71 segundos). O controlo positivo (paracetamol) apresentou pouca actividade antinociceptiva, tendo sido observados os tempos de latência de 10,32 segundos antes do tratamento e 21,67 segundos depois do tratamento comparativamente ao efeito dos extractos embora o efeito antinociceptivo tenha sido verificado durante todo o tempo da análise (0 - 120 minutos).

Trinta minutos após a administração oral dos três extractos de *V. polyanthes* na dose de 500 mg.kg⁻¹ houve um aumento do tempo de latência ao estímulo térmico nociceptivo em todos os animais tratados em comparação com os animais do grupo de controlo. Os três extractos obtidos pelas duas técnicas apresentaram maior actividade analgésica em comparação com o paracetamol sobre tudo o extracto etanólico por maceração.

Segundo Farquhar-Smith (2007), a integração do estímulo nociceptivo ocorre devido à estimulação de fibras C de condução lenta, que apresentam terminais não capsulados de receptores térmicos e mecânicos e fibras do tipo A de condução rápida que induz ao reflexo de retirada da pata pela activação de termorreceptores e a latência do reflexo de retirada da pata ocorre por integração medular.

O estudo desenvolvido por Alves *et al.* (2012) mostrou que os extractos etanólicos preparados a partir de várias partes de *V. polyanthes* exercem um efeito analgésico aumentando o tempo de permanência dos animais sobre uma placa aquecida a ± 55 °C. Tal efeito foi atribuído a compostos provenientes do metabolismo secundário da planta tais como saponinas e flavonóides que têm a capacidade de inibir a produção de prostaglandinas e acções de outras substâncias que sensibilizam os receptores da dor aos estímulos mecânicos, químicos e térmicos.

O extracto etanólico obtido pelo método de Soxhlet exibiu na primeira medição (30 minutos após tratamento) o seu maior efeito antinociceptivo tendo-se verificado um decréscimo da sua actividade nas restantes medições. Este facto pode ser explicado por provavelmente o extracto ter pouca quantidade do princípio activo com actividade analgésica que, após sua administração, é possivelmente rapidamente absorvido, distribuído, metabolizado e excretado.

5.6. ACTIVIDADE ANTITRIPANOSSÓMICA

Os resultados do teste da actividade antitripanossómica estão apresentados na tabela 14, demonstram que o extracto etanólico de *V. polyanthes* na dose 500 mg.kg⁻¹, obtido pelo método de maceração, não foi eficaz frente ao *T. congolense* em murganhos uma vez que os animais, embora tratados, morreram em decorrência da parasitémia alta - na ordem de 5+ na escala de Murray *et al.* (1983) - que apresentavam.

O aceturato de diminazene na dose de 3,5 mg.kg⁻¹ dose única, eliminou a parasitemia, tendo-se verificado cura de todos os animais do grupo de controlo, 7 dias após o tratamento, altura em que todos os animais foram humanamente sacrificados através da administração duma anestesia terminal com éter.

Tabela 14. Resultados da actividade antitripanossómica do macerado etanólico.

Tratamento	Animal	Controlo da parasitemia			
		Antes do tratamento		Depois do tratamento	
		4º dia	6º dia	8º dia	11º dia
Macerado etanólico	1	1+	4+	5+	Morto
	2	2+	4+	5+	Morto
	3	Negativo	3+	5+	Morto
	4	Negativo	3+	4+	5+
Tryponil® - Controlo +	1	3+	5+	Negativo	Negativo
	2	1+	4+	Negativo	Negativo
	3	2+	5+	Negativo	Negativo
DMSO a 10%	1	Negativo	3+	5+	Morto
	2	2+	4+	5+	Morto
	3	3+	5+	Morto	Morto

Estudo conduzido por Fournet *et al.* (1993) no qual avaliaram os efeitos anti-*T. cruzi* de nove alcalóides bisbenzilisoquinolínicos, seis alcalóides demonstraram ser 100% efectivos contra aquele parasita que, embora tenha características distintas do *T. congolense*, incluindo o seu ciclo de vida e a patogenia, pertence ao mesmo género. Os alcalóides que demonstraram actividade tripanocida no estudo de Fournet *et al.* (1993) incluíam a cocsolina (23), dafnandrina (24) e dafnolina (25), isolados da *Albertisia* cf. *A. papuana* Becc (Menispermaceae); limacina (26), obtida de *Caryomeneolivascens*; girocarpina (27), isolados de *Gyrocarpus americanus* e isochondrodendrina (28), oriundo de *Curarea candicans*.

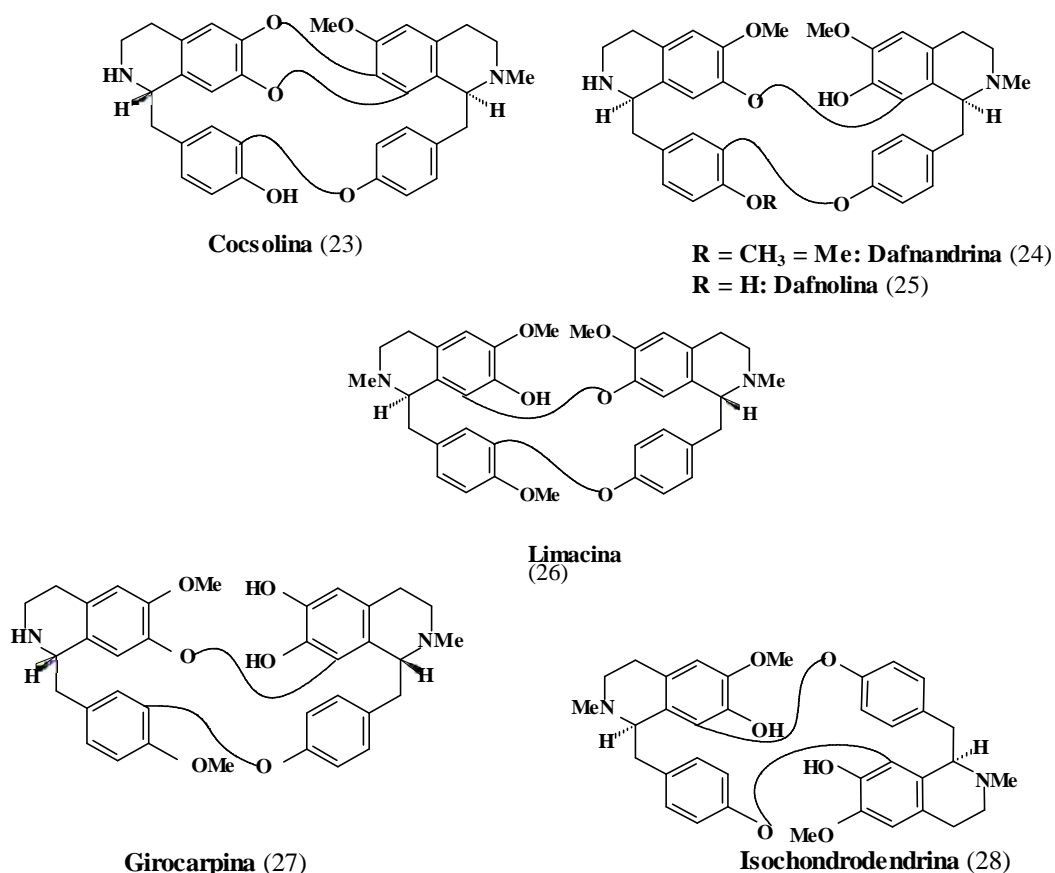


Figura 24. Alcalóides com actividade anti-*Trypanosoma cruzi*.

Nascimento *et al.* (2004) avaliaram as actividades tripanomicidas *in vitro* de compostos isolados das plantas; *Mikania stipulacea* e *Mikania hoehnei* as quais demonstraram actividade anti-*T. cruzi* tendo reduzido o número de parasitas em 61,7, 62,8 e 69,4% nas concentrações de 100, 250 e 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente.

O *T. congolense* geralmente é mais virulento do que *T. vivax* e consequentemente os animais infectados com este parasita desenvolvem tolerância para *T. vivax* mais prontamente e facilmente do que para *T. congolense* (Stephen, 1986).

Apesar de *V. polyanthes* não ter apresentado nenhuma actividade antitripanossómica é importante realçar que as plantas têm sido usadas como fontes contra vários parasitas causadores de enfermidades nos animais.

6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Com base nos resultados deste estudo verificou-se que *V. polyanthes* possui fitoconstituintes com actividade antipirética, analgésica e antimicrobiana, sendo que:

- a) Os extractos provenientes das duas técnicas de extracção apresentam metabólitos secundários que incluem flavonóides, esteróides/triterpenóides, saponinas, taninos e antraquinonas os quais estão associados com as diversas acções terapêuticas observadas.
- b) Os três extractos da planta revelaram boa actividade antibacteriana frente a bactérias de Gram+, fraca actividade frente a bactérias Gram- e nenhuma actividade frente ao fungo *Candida sp.*
- c) Em relação à actividade farmacológica, conclui-se igualmente que os extractos de *V. polyanthes* têm valor terapêutico como agentes antipiréticos e analgésicos e possuem actividade mais intensa, embora de duração mais curta do que o paracetamol.
- d) Para actividade antiparasitária, conclui-se que o extracto de *V. polyanthes* testado não apresenta nenhuma actividade contra *T. congolense*.

Dados os resultados bastante positivos e o potencial da *V. polyanthes* como agente terapêutico alternativo para diversas enfermidades humanas e animais, recomenda-se a realização de estudos adicionais para isolamento e caracterização dos fitoconstituintes da planta e determinação da actividade farmacológica de cada classe de molécula ou de combinações de diversas moléculas, contribuindo dessa forma para a preparação de novos fármacos.

Além do estudo mais aprofundado das actividades antimicrobianas, analgésica e antipirética de *V. polyanthes*, recomenda-se também que seja feito um estudo para aferir a actividade antiparasitária dos extractos preparados a partir das várias partes da planta.

Recomenda-se ainda a realização dum estudo de toxicidade da planta, com vista a definir as doses seguras para uso tanto em animais como nos seres humanos, particularmente para tratamento de dor e febres.

REFERÊNCIAS

- Acosta, G. J. A. (2008). *Alcaloides y Compuestos Nitrogenados*. Universidade de Antioquia, Medellín. Pp.6-15.
- Alberani, V., Pietrangeli, P. D. C., Mazza, A. M. R. (1990). *The use of grey literature in health sciences: a preliminary survey*. Bulletin of the Medical Library Association 78(4): 358-363.
- Alonso, J. R. (2008). *Fitomedicina: curso para profissionais da área da saúde*. São Paulo: Pharmabooks, 195p.
- Alves, M. S., Pinho, J. J. G., Pinto, M. A. O., Ribeiro, A., Silva, J. B., Sousa, O. V., Temponi, V. S., Vieira, G. V. (2012). *Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of Ethanol Extract from Vernonia polyanthes Leaves in Rodents*. Journal Molecular Science, vol 13, 3887-3899p.
- Bandeira, S., Bolnick, D., Barbosa, F. (2006). *Flores Nativas do Sul de Moçambique*; UEM, Departamento de Biologia, 1ª Edição, Maputo. pp 56 – 57.
- Barbastefano, V. *Actividade Antiulcerogênica da Vernonia polyantes Less*. Anais da XVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental- FESBE. v. 2. 2003. Disponível em: www.fesbe.org.br/v2 Acessado em 02/11/2015.
- Benfatti, A. C., Barbastefano, V., Rodrigues, J., Rinaldo, D., Brito, A. R. M. S., Vilegas, W. (2007). *Estudo fitoquímico do Extracto Clorofórmico das Folhas de Vernonia polyanthes Less., (Asteraceae)*. 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.
- Braga, F. G., Bouzada, M. L. M., Fabri, R. L., Matos, M. O., Moreira, F. O., Scio, E., Coimbra E. S. (2007). *Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil*. Journal of Ethnopharmacology, vol 111, n.2, p. 396-402.

- Calixto, J. B. (2000). *Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines* (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal Medical Biology Research*, vol 33, p.179-189.
- Cunha, A. (2005). *Farmacognosia e Fitoquímica*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Duraisankar, M., Ravichandran, V. (2012). *Antipyretic Potential of Polyherbal Ayurvedic Products*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, vol 5 (2), 146 –150.
- Eddy, N. B., Leimbach, D. (1953). *Synthetic analgesics*. II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 107: 208-209.
- Enoch, D. A., Birkett, C. I., Ludlam, H. A. (2007). *Non-fermentative Gram negative bacteria*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol 29 (supl 3), p. S33-41.
- Evans, W.C. (2000). “*Trease and Evans -Pharmacognosy*“, 15^a ed. Saunders Ltd, Edinburgh.
- Farquhar-Smith, W. P. (2007). *Anatomy, physiology and pharmacology of pain. Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, vol 9, p. 3-7.
- Fontenelle, R. O. Morais, S. M., Brito, E. H., Kerntopf, M. R., Brilhante, R. S., Cordeiro, R. A., Nascimento, N. R., Tomé, A. R. (2007). *Chemical Composition, Toxicological Aspects and Antifungal Activity of Essential Oil from Lippia Sidoides Cham*. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, vol 59, N.5, P.934-940.
- Fournet, A., Muñoz, V., Roblot, F., Hocquemiller, R., Cave, A., Gantier, J. C. (1993). *Antiprotozoal activity of dehydrozaluzein C, a sesquiterpene lactone isolated from Munnozia maronii (Asteraceae)*. *Phytotherapy Research*, 7: 111-115.
- Gaspar, F. (2014). *Plantas medicinais recolhidas nos mercados*. Disponível em <http://www.jornal.domingo.co.mz/index.php/nacional/2051>. Acesso em 29/09/2015.

- Hagerman, A., Butler, L. G. (1981). *The specificity of proanthocyanidin-protein interactions*. Journal of Biology and Chemistry, vol 256, p. 4494-4497.
- Hemingway, R.W., Conner, A. H., Branham, S. J. (1989). Adhesives from renewable resources. Washington: American Chemical Society, p. 155-171.
- Holt, J. G., Krieg, N. K., Sneath. P. H. A., Starley, J. T., Williams, S. T. (2000). *Bergeys Manual of determinative bacteriology*. 9^a ed. Philadelphia, USA: Lippindoff Willians e Wiekins. 789p.
- Ignacimuthu, S e Ayyanar, M. (2009). *Herbal medicines for wound healing among tribal people in Southern India: Ethno Botanical and scientific evidences*. International Journal of Applied Research in Natural Products, 2 (3): 29-42.
- Jorgetto, G. V, Boriolo, M. F. G., Silva, L. M., Nogueira, D. A., José, T. D. S., Ribeiro, G. E. (2011). *Ensaio de actividade antimicrobiana in vitro e mutagênica in vivem com extracto de Vernonia polyanthes Less (Assa-peixe)*. Revista do Instituto Adolfo Lutz. São Paulo; 70 (1): 53-61.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., Mobley, H. L. (2004). *Pathogenic Escherichia coli*. Nature Reviews Microbiology, 2: 123-140,
- Koenig, J. (1993). *Registo de nomes vernaculares de plantas em Moçambique*. UEM, Departamento de Biologia, Maputo - Moçambique, 2-93.
- Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C., Winn, W. C. (2001). *Diagnóstico Microbiológico*. 5^a ed, Medsi, São Paulo.
- Koster, R., Anderson, M., Beer, E. J. (1959). *Acetic acid for Analgesic Screening*. Procedure, vol 18, P. 412-416.
- Kotiranta, A., Kari, L. A., Haapasalo, M. (2000). *Epidemiology and pathogenesis of bacillus cereus infections*. Microbes and infection, 2: 189-198.

- Krog, M., Falcão, M. P., Olsen, C.S. (2006). *Medicinal plant markets and trade in Maputo, Mozambique*. Forest & Landscape Working Papers. 16p.
- Lorenzi, H. (2000). *Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas*. 3ª ed, Nova Odessa: instituto plantarum 608p. il. Inclui índice de nomes científicos e populares..
- Luciane, K. (2015). *Química, Meio ambiente e Edificações*. Consultado em sorolucianekawa.blogspot.com acessado no dia 19/01/2015.
- Ives, A. R. F. (2012). *Doenças alimentares de origem bacteriana*. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto.
- Mello, J. P. C., Santos, S. C., Simões, C. M. O., Schenckel, E. P. (2001). *Em Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3ª ed, UFSC: Porto Alegre.
- Miguel, A., Andrade, J. B. (1989). *Rapid quantification of the polycyclic Aromatic hydrocarbons in atmospheric aerosols by direct HPLC separation after ultrasonic acetonitrile extraction*. International Journal of Environment Analytical Chemistry, vol.35, P. 35-41.
- Murray, M., Truil, J. C. M., Turner, D. A., Wissocq. (1983). *Animal Health Livestock Productivity and Trypanotolerance: Network Training Manual*. International Livestock Centre for Africa, Addis Ababa, Ethiopia.
- Nascimento, A. M., Chaves, J. S., Albuquerque, S., Oliveira, D. C. R. (2004). *Trypanocidal properties of Mikania stipulacea and Mikania hoehnei isolated terpenoids*. Fitoterapia 75: 381-384.
- NCCLS (National Committee For Clinical Laboratory Standards) Reference Method For Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing Of Yeasts. NCCLS Document M-27,A2.

Wayne Pa. 2002. Disponível em: [Http://www. Anvisa. Gov. Br/ Reblas/R eblas/ Publicações](Http://www.Anvisa.Gov.Br/Reblas/R_eblas/Publicações). Terapia Antifungica Pdf Acesso em: 02/10/2008.

- Periyasamy, G., Upal, K. M., Gupta, M. (2011). *Antipyretic potential of Galega pupurea root*. International Research Journal of Pharmacy, 2 (11): 151-152.
- Pinto, G. A. S. (2003). *Produção de Tanase por Aspergillus niger*. 213f. Tese (Doutorado) -UFRJ, Rio de Janeiro.
- Ribereau-Gayon, P. (1968). *Les Composes Phenoliques des Vegetaux*. Paris: Dunod.
- Rodrigues, V.E .G., Carvalho, D. A. (2001). *Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande* . Minas Gerais. Ciência Agrotecnia. (25): 102-123.
- Ross, J. A., Kasum, C. M. (2002). *Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects and safety*. Annual Review Nutrition. 22:19-34.
- Salunkhe, D. K., Chavan, J. K., Kadan, S. S. (1990). *Dietary tannins: consequences and remedies*. Boca Raton: CRC Press. 200p.
- Sanguinetti. E. M. (1989). *Plantas Que Curam*, 2ªed. Porto Alegre, Rs: Editora Rigel.
- Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Gosmann, G., Mello, J. C. P., Mentz. L. A., Petrovick, P. R. (2001). *Farmacognosia da Planta ao medicamento*, 3ª ed, editor da UFSC, Porto Alegre, 833 p.
- Souza, F. A., Sena, J., Maranhão, L. T., Oliveira, C. M. R., Guimarães, A. T. B. (2008). *Caracterização fitoquímica preliminar de infusões populares obtidas das partes de Vernonia polyanthes Less*. Revista Brasileira de Farmacologia. 89(1): 24-27.
- Stephen, L. E. (1986). *Trypanosomosis. A Veterinary Perspective*, Pergamon Press.Press Oxford 551pp.

- Sudberry, P., Gow, N., Berman, J. (2004). *The Distinct Morphogenic States of Candida Albicans*. Trends in Microbiology, 12 (7): 317-324.
- Vanegas, H., Schaible, H. G. (2001). *Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord*. Progress in Neurobiology, vol 64, p. 327-363.
- Winn, W. Jr., Allen, S. D., Janda, W. M., Koneman, E. W., Procop. G., Schreckenberger, P. C., Woods, G. (2008). *Diagnóstico Microbiológico* 6ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Zakaria, Z., Loo, Y. W., Rahman, N. I. A., Ayub, A. H. A., Mohd. Roslan Sulaiman, M. R., Gopalan, H. K. (2007). *An Antinociceptive, Anti-Inflammatory and Antipyretic property of the aqueous extract of Bauhiniapurpurea leaves in experimental animals*. Medical Principles and Practice, 16: 443-449.
- Zygmunt, W. A., Browder, H. P., Tavormina, P. A. (1967). *Lytic Action of Lysostaphin on Susceptible and Resistant Strains of Staphylococcus Aureus*. Canadian Journal of Microbiology, vol 13, P. 845-853.