

CAPÍTULO 12

ANÁLISE INSTRUMENTAL EM PLANTAS MEDICINAIS



<https://doi.org/10.22533/at.ed.6411325230512>

Data de aceite: 22/09/2025

Vilma Bragas de Oliveira

INTRODUÇÃO

A utilização de plantas na prevenção e cura de moléstias, condicionadas a um processo de experimentação empírica que se vem desenvolvendo desde os tempos mais remotos, constitui a base da medicina popular. Esta vem sendo retomada, há algum tempo pela medicina natural, que procura aproveitar suas práticas dando-lhes respaldo científico e integrando-as num conjunto de princípios que visam, mais do que curar algumas doenças, restituir o homem à vida natural.¹

Atualmente, o que mais falta à medicina natural é uma avaliação científica, metódica e exata, que permitiria constatar as virtudes propaladas de certas ervas medicinais, bem como descobrir outras de suas propriedades benéficas.¹

Depois de concluído o processo de checagem das propriedades terapêuticas de uma planta, os cientistas têm como opção reproduzir artificialmente seu princípio ativo. Conhecida a molécula ou

as moléculas que compõem a substância, pode-se tentar sintetizá-la num laboratório. A elaboração do componente sintético permite que se evite a extração da planta para a produção do remédio, é como se o vegetal houvesse apenas oferecido a receita ou preparação do coquetel curativo.^{2,3}

Esse trabalho de identificação e posterior síntese, é porém, complexo e demorado. Na década de 70, descobriu-se que o Taxo, substância presente na planta *Taxus brevifolia*, tinha grande eficácia contra tumores, depois de anos de pesquisa, laboratórios conseguiram sintetizar seu princípio ativo, hoje já comercializado, assim vários medicamentos industrializados têm sido desenvolvidos a partir de plantas medicinais, com base nas indicações populares^{3,4}.

Aspectos gerais sobre o gênero *Manihot*

A planta conhecida como mandioca apresenta-se sob duas espécies do gênero *Manihot*, a mandioca brava (*M. esculenta*

ou *M. utilissima*) e a mandioca mansa (*M. dulcis* ou *M. aipi*) também chamada aipim ou macaxeira.⁵ A primeira, em estado bruto, contém ácido cianídrico em quantidades suficientes para torná-la venenosa, mesmo assim suas raízes são usadas para a extração da fécula (polvilho) usada industrialmente, ou na alimentação de animais depois de processada, e a segunda é usada na alimentação humana, cozida, frita ou assada.⁶

Descrição botânica da espécie *Manihot palmata* Muell Arg.

Taxonomia botânica segundo SCHULTZ⁷

DIVISÃO	Angiospermae
CLASSE	Dicotyledoneae
SUBCLASSE	Archichlamideae
ORDEM	Geranales
FAMÍLIA	Euphorbiaceae
GÊNERO	Manihot
ESPÉCIE	<i>Manihot palmata</i> Muell Arg.

Sinonímias populares

Aipim, macaxeira, mandioca–vassourinha, mandioca–mandi, pão-de- pobre.⁶

Descrição

Arbusto alto de 2 a 4m de altura; folhas longo pencioladas; flores amarelas ou violáceas, pequenas, com anteras compridas, dispostas em racimos; fruto cápsula subglobosa de 2-3 cm de longitude, com 3 lóculos, sem alas, contendo outras tantas sementes, esta planta fornece raízes tuberificadas, de comprimento e espessura muito variáveis, pouco azotadas, mas rica em fécula.⁸

Utilidades

As raízes constituem um alimento de uso geral em todo país, comidas com tempero de manteiga ou cobertas com calda de açúcar ou mel de abelha e até cruas. Sua fécula é muito utilizada para massa de pães, bolos e mingaus de bebê, são também boa forragem, assim como as folhas, e muito recomendadas para vacas e cabras leiteiras. A tapioca produzida a partir da *M. palmata* é uma das fontes mais baratas de calorias para a nutrição humana e alimentação animal.^{5,6,9}

Dados do cultivo

É uma planta bastante resistente à falta de água, mas não a frios intensos, ela prefere solo de argila-arenoso.⁶

Composição típica

- Análises realizadas em Campinas demonstraram a seguinte composição das folhas e os respectivos pecíolos forrageiros:⁹

ÚMIDO	matéria azotada	4,84%
	matéria graxa	2,10%
	matéria não azotada	7,49%
	matéria fibrosa	5,14%
	matéria mineral	1,53%
	matéria azotada	22,97%
	matéria graxa	9,95%
SECA	matéria não azotada	35,49%
	matéria fibrosa	24,38
	matéria mineral	7,25%

TABELA 01: Composição das folhas e respectivos pecíolos forrageiros

MATÉRIA MINERAL SECA	ácido fosfórico	10,48%
	óxido de potássio	28,86%
	óxido de cálcio	46,56%

TABELA 02: Minerais encontrados na matéria seca

- Composição das raízes da *M. palmata*

Amido	24%
Umidade	70%
Fibra	2%
Proteína	1%
Outros	3%

TABELA 03: Composição da raízes

Parâmetros comparativos entre a Manihot palmata (macaxeira) e Manihot esculenta (mandioca)

Em verdade, para alguns botânicos a nossa planta é apenas uma variedade da *Manihot esculenta*, para outros porém, constitui uma espécie distinta baseada principalmente na sua menor toxicidade, mas isto parece não bastar, pois está provado que alguma de

suas variedades hortícolas são tão venenosas quanto outras da *M. esculenta* e mais ainda que, conforme o caso, esta pode tornar-se inofensiva ao mesmo tempo que a nossa espécie pode tornar-se venenosa. Aliás, admiti-se que qualquer variedade de *M. palmata* plantada sucessivamente no mesmo terreno com rama procedente dessas mesmas plantações, torna-se sucessivamente e cada vez mais amarga, entretanto o lavrador experimentado, a simples inspeção visual, não confunde uma com a outra e o próprio monógrafo da família, na “Flora Brasiliensis”, não obstante conhecer bem todas estas particularidades fez a distinção aceita depois no “Index Kewensis”, e nós agora nada temos a fazer do que seguir esses dois monumentos da literatura botânica.⁸

Doenças bacterianas, fúngicas e viróticas

Esta planta é seriamente atacada pelas bactérias *Bacillus amylobacter* V.T. (podridão úmida) e *B. manihotis* Arraud-berthet; pelos fungos *Helminthosporium*, *Manihotis rangel*, pelo piolho *Aleurodes aipim* Goeldi, e *Microsporum de Rigidoporus Overum* e ainda pelos vírus Mosaico africano da mandioca, vírus latente americano da mandioca e pela famosa vassoura de Witches.⁹

OBJETIVOS

Geral

Realizar estudos fitoquímicos da raiz da espécie vegetal *M. palmata*, popularmente conhecida como macaxeira, procurando esclarecer quais de seus extratos e/ou frações são responsáveis pela estimulação da produção de auto-anticorpos para hemácias de camundongos, e de outras atividades possíveis a serem testadas.

Específicos

Atualização permanente das informações bibliográficas.

Coleta do material vegetal correspondente às raízes da espécie a ser estudada com o propósito de posteriormente confirmar sua classificação botânica.

Preparo do material: descascagem, Trituração, pesagem e preparo dos extratos com solventes de diferentes polaridades.

Realização de ensaios biológicos nos extratos preparados para determinações de possíveis atividades microbiológicas. Estes ensaios biológicos serão realizados no Laboratório de Microbiologia da UFMA.

Realização do Screening Fitoquímico do extrato hidroalcoólico da espécie vegetal *M. palmata*

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Instrumentação

A instrumentação a ser utilizada neste trabalho foi a seguinte:

Equipamentos

- Moinho elétrico TECNAL, para cominuição da planta;
- Balança analítica digital MARTE, modelo AL-500, com precisão de 10^{-3} unidades;
- Estufa;
- Evaporador rotativo TECNAL, modelo TE-120, para evaporação do solvente.

3.1.2 Reagentes, sais e solventes

- Acetato de etila PA (VETEC).
- Álcool etílico absoluto (SANTA CRUZ).
- Álcool metílico PA (VETEC).
- Clorofórmio.
- Diclorometano PS (REAGEN).
- Hexano PA (VETEC).
- Iodo ressublimado.
- Sílica gel G 60 (ALDRICH) para o preparo das placas comparativas.
- Sílica gel 60 0,063-0,200mm, para cromatografia em coluna.
- Cloreto de bário dihidratado ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4)
- Ácido acético

Coleta e preparo do material

A *Manihot palmata* foi coletada às 9:00 horas na feira do João Paulo proveniente da Maioba em São Luis, no mês de setembro de 1999. A planta foi identificada pela Profª Ana Zélia no Herbário Ático Seabra sob nº de registro 1157. As raízes da planta coletada foram levadas ao Laboratório de Produtos Naturais (LPN) onde foram descascadas, cortadas em lascas e espalhadas sobre a bancada afim de que perdessem parte de sua umidade. Ali ela permaneceu aproximadamente 48 horas.

O material parcialmente seco foi levado à estufa sob 45°C por 24 horas e moído em moinho elétrico obtendo-se 1.366g de pó seco. Este apresentou um rendimento de 27,32% em relação ao peso total das raízes coletadas, aproximadamente 5Kg.

Obtenção do Extrato Metanólico

Para obtenção do Ext.MeOH foram adicionados aproximadamente 1.000g de pó em 2.000ml de álcool metílico, agitou-se e deixou-se a mistura à temperatura ambiente por 24 horas, agitando-se a cada 8 horas.

Totalizaram-se seis extrações, sempre obedecendo o mesmo intervalo de 24 horas, filtrando a vácuo e recuperando o solvente em evaporador rotativo a pressão reduzida para nova utilização. Ao final das seis extrações o extrato MeOH foi concentrado e conservado em frasco âmbar para evitar reações de fotólise e mantido em baixa temperatura no freezer.

O extrato MeOH concentrado a um volume total de 780ml apresentou-se de coloração amarela-parda, no qual foi realizada a determinação do peso seco e posteriormente foi submetido a fracionamento e a ensaios microbiológicos. Também foi realizado Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC),^{10,11} utilizando-se placas de vidro com sílica gel, preparadas no próprio LPN da UFMA. Página 18, figs.01 e 02.

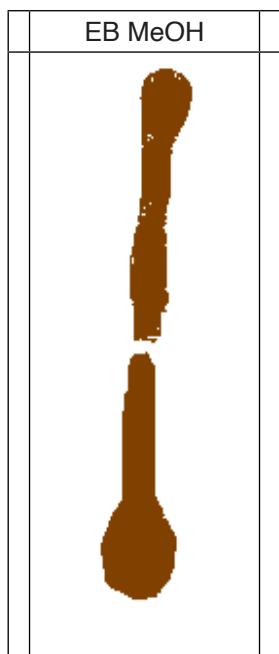


FIGURA 01: Cromatograma do Ext.MeOH usando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (8:2) revelado com vapores de iodo.

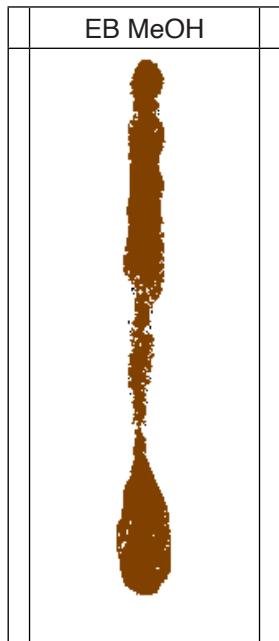


FIGURA 02: Cromatograma do Ext.MeOH usando como eluente Hex/AcOEt (7:3) revelado com vapores de iodo.

Determinação do peso seco

A determinação do peso seco do Ext.MeOH foi realizada submetendo-se 3 alíquotas de 1ml cada, a evaporação total do solvente, sob corrente de ar quente e mantidos posteriormente em dessecador. A seguir pesou-se as amostras em balança analítica, repetindo-se a pesagem por seis vezes, até a estabilização dos valores, calculando-se em seguida a média dos pesos das amostras^{10,11}. Peso médio das 3 alíquotas foi igual a 48,6mg/ml. O volume total do concentrado foi de 780ml fornecendo dessa forma um rendimento de 4,859%.

Fracionamentos

Dos 780ml de Ext.MeOH, separou-se algumas alíquotas para testar algumas formas de fracionamento.

Diferença de solubilidade

Em frasco tipo penicilina contendo 15ml do Ext.MeOH percebeu-se que uma massa de aspecto oleoso se depositava nas paredes do mesmo. Sendo assim, separou-se a parte solúvel em MeOH da insolúvel. A parte insolúvel foi solubilizada em hexano. Estas frações foram chamadas FRM e FRH.

Ambas frações foram submetidas a CCDC, cujos cromatogramas são mostrados na Fig.03, p.20.

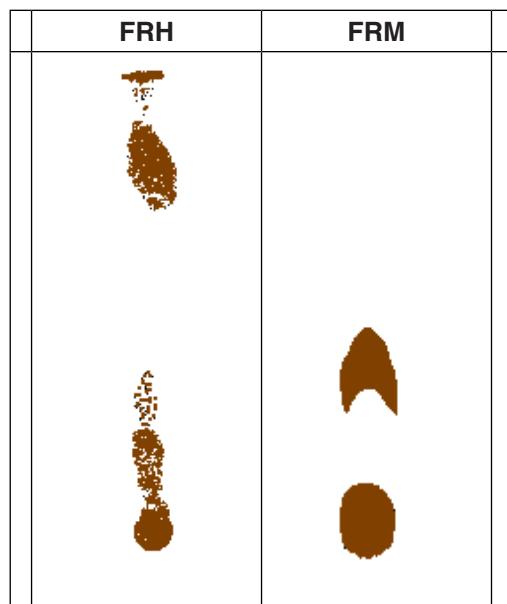


FIGURA 03: Cromatograma da FRM e FRH usando como eluente Hex/AcOEt (9:1) revelado com vapores de iodo.

Como pode se observar, a fração FRM não foi adequadamente eluída, foi então necessário aumentar a polaridade afim de que esta fosse melhor eluída. Fig.04, p.20.

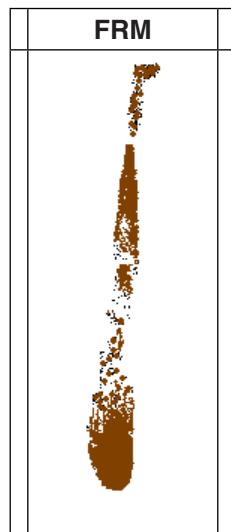


FIGURA 04: Cromatograma da FRM usando como eluente Hex/AcOEt (1:1) revelado com vapores de iodo.

Partição $CHCl_3/H_2O$

2,157g do Ext.MeOH devidamente concentrados em evaporador rotativo, foram dissolvidos em 40ml de clorofórmio e a solução foi colocada em funil de separação, a esta juntou-se 20ml de água destilada, após agitação, deixou-se em repouso por 5 dias em decantação. Após este tempo observou-se a formação de fases muito concentradas e adicionou-se a esta mais 30ml de H_2O e 60ml de $CHCl_3$ mantendo-se a proporção inicial 2:1. Foi separada a fração clorofórmica correspondente à fase inferior.

Este processo foi realizado três vezes, obtendo-se três frações clorofórmicas de pesos 0,758g, 0,543g, e 0,370g, que foram denominadas FRC_1 , FRC_2 , FRC_3 .

Estas três frações foram submetidas a CCDC, e os cromatogramas são mostrados na Fig.05, p.21.

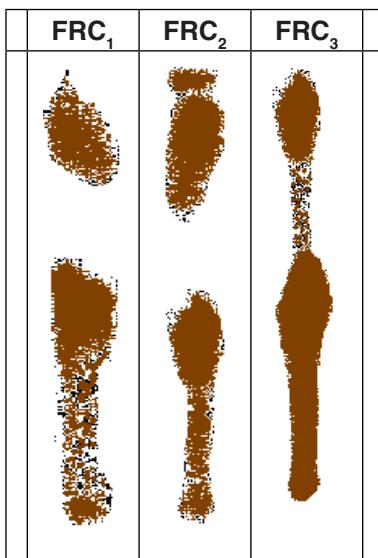


FIGURA 05: Cromatograma das FRC_1 , FRC_2 , FRC_3 usando como eluente Hex/AcOEt (9:1) revelado com vapores de iodo.

A partir da análise visual dos cromatogramas destas frações decidiu-se reuni-las, pois apresentaram feição cromatográfica semelhante, resultando apenas na FRC. Fig.06, p.22.

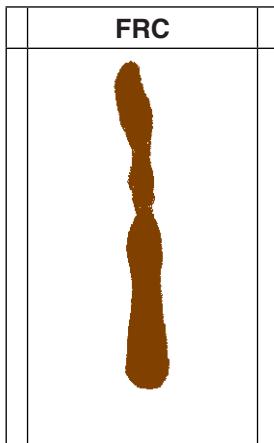


FIGURA 06: Cromatograma da FRC usando como eluente Hex/AcOEt (9:1) revelado com vapores de iodo.

A fase aquosa foi separada em duas frações, FRA_1 e FRA_2 , que ainda não foram trabalhadas e permanecem acondicionadas em freezer.

A fração FRC devidamente concentrada foi pesada e apresentou um rendimento de 77,46% em relação a massa total de Ext.MeOH utilizada na partição.

Coluna Cromatográfica (CC)

2,349g do Ext.MeOH devidamente concentrados, foram submetidos a fracionamento em Coluna Cromatográfica (CC) de sílica gel, utilizando como eluentes, solventes concentrados em ordem crescente de polaridade, os quais foram: 200ml de hexano, 150ml de acetato de etila e 150 ml de clorofórmio.

Convém mencionar que foi desnecessário a aplicação de um outro solvente de polaridade maior, como o metanol, visto que nada mais estava sendo arrastada ao final dos 150ml de $CHCl_3$.

Através da CC foram recolhidas 6 alíquotas, sendo 1 (uma) com hexano, 3 (três) com acetato de etila e 2 (duas) com clorofórmio.

Com cada grupo de frações foi realizada CCDC, cujo melhor resultado é mostrado nas figuras 07 da p.24 e 08 da p.25.

A análise visual dos cromatogramas permitiu a reunião das três alíquotas em acetato de etila e também das duas alíquotas em clorofórmio.

O resultado da reunião das alíquotas é resumido na Tabela 04, p.24.

SOLVENTE	ALÍQUOTA	IDENTIFICAÇÃO
Hexano	FR01	FR01
Acetato de Etila	$FRAc_1 + FRAc_2 + FRAc_3$	$FRAc$
Clorofórmio	$FRCI_1 + FRCI_2$	$FRCI$

TABELA 04: Reunião das alíquotas obtidas através da CC do Ext.MeOH.

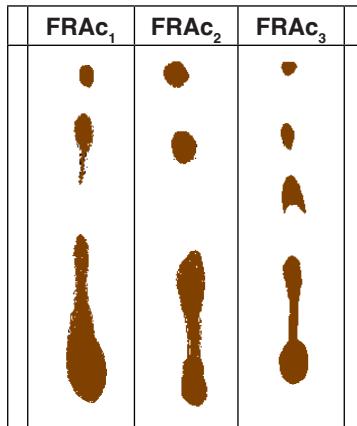


FIGURA 07: Cromatograma das FRAc₁, FRAc₂, FRAc₃ usando como eluente Hex/AcOEt (9,5:0,5) revelado com vapores de iodo.

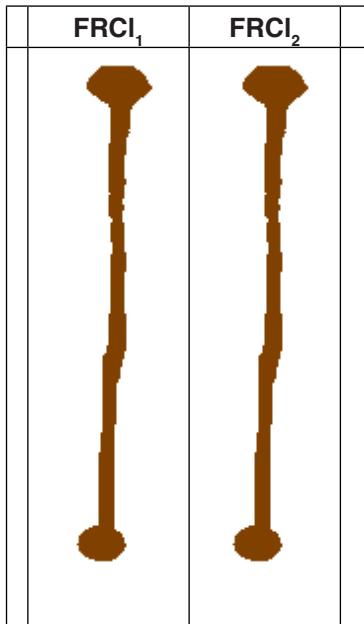


FIGURA 08: Cromatograma das FRCI_1 , FRCI_2 usando como eluente Hex/AcOEt (1:1) revelado com vapores de iodo.

Posteriormente foi realizada CCDC com as três frações resultantes, cujos cromatogramas são mostrados nas Figuras 09, p.25; 10 ,p.26 e 11, p.26.

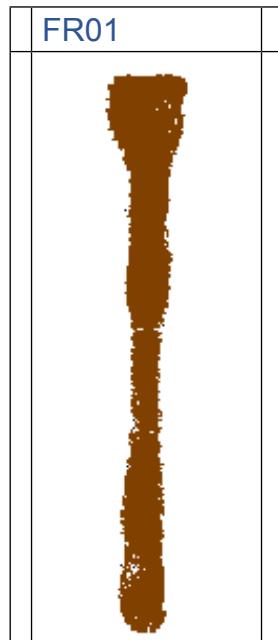


FIGURA 09: Cromatograma da FR01 usando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (8:2) revelado com vapores de iodo.

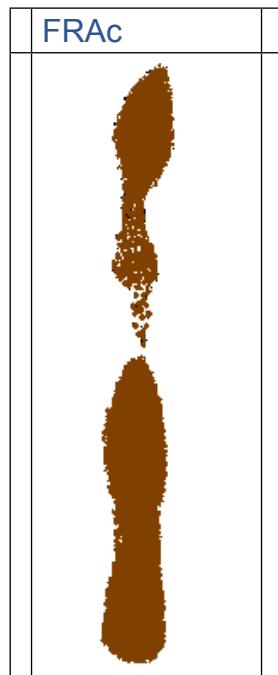


FIGURA 10: Cromatograma da FRAc usando como eluente Hex/AcOEt (9:1) revelado com vapores de iodo.

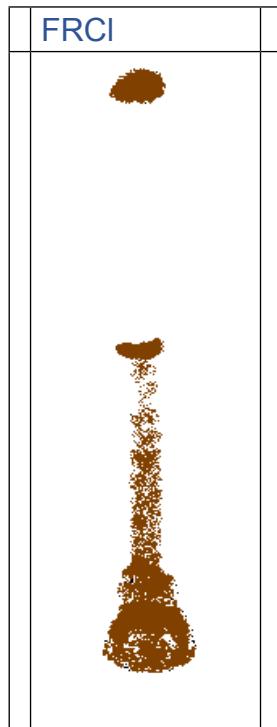


FIGURA 11: Cromatograma da FRCI usando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (8:2) revelado com vapores de iodo.

SCREENING FITOQUÍMICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS RAÍZES DA ESPÉCIE *M. palmata*

O Extrato hidroalcoólico foi preparado a partir de 200g de pó seco, adicionados a 500ml de uma solução 70% de álcool etílico, agitando-se e permanecendo em repouso por 72 horas. Filtrou-se à vácuo e foi concentrado até metade do volume.¹¹

De posse do extrato hidroalcoólico realizou-se seguidos testes para a determinação de:

Heterosídeos	Esteróides
Fenóis	Triterpenos
Taninos	Saponinas
Antocianinas	Ácidos fixos fortes
Antocianidinas	Resinas
Flavonóides	Catequinas
Leucoantocianidinas	Flavanonas

A tabela 05 mostra os resultados obtidos pelo screening fitoquímico do extrato hidroalcoólico da *M.palmata*.

Heterosídeos cianogênicos	-
Fenóis	-
Taninos	-
Antocianinas, antocianidinas e flavonóides	-
Leucoantocianidinas	-
Catequinas e flavanonas	-
Esteróides e triterpenos	x
Saponinas	-
Ácidos fixos fortes	-
Resinas	x

X = positivo

- = negativo

TABELA 05: Resultados obtidos pelo Screening fitoquímico do extrato hidroacoólico da espécie *M. palmata*

Teste para detecção de ácido cianídrico

Os glicosídeos cianogênicos, liberam por hidrólise, ácido cianídrico ou prússico, um dos tóxicos mais ativos que a química conhece.

Todas as mandiocas, sejam consideradas bravas ou mansas, contém maior ou menor teor de um glicosídeo cianogênico chamado manihotoxina que é quimicamente idêntica à linamarina, Fig.12, p.29. Este tóxico está presente em todas as partes da planta, principalmente nas folhas e nas raízes.

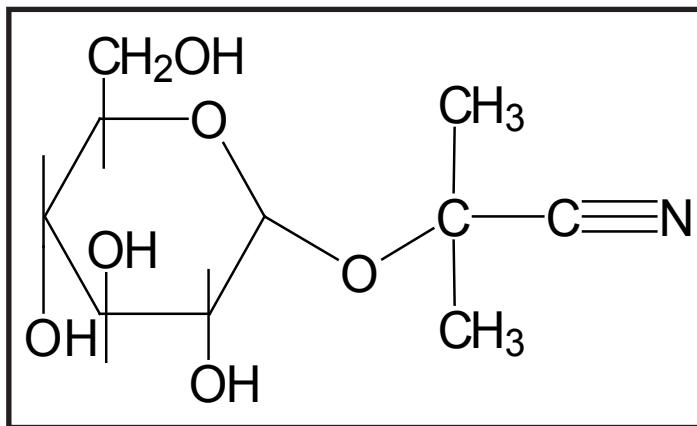


FIGURA 12: Fórmula estrutural da Linamarina

Sendo assim, foi conveniente a realização do teste laboratorial para detecção do ácido cianídrico no extrato bruto MeOH da *M. palmata*.¹²

Convém lembrar que o princípio tóxico é termo-instável e volátil, visto que não será supreendente que os testes dêem negativos pois o Ext.MeOH já foi submetido ao aquecimento e exposto ao ambiente.

Num tubo de ensaios foram colocados 2ml do Ext.MeOH, 1ml de água e 4 gotas de clorofórmio. Este tubo foi vedado com uma rolha de cortiça que tinha suspensa uma tira de papel ligeiramente umedecida no reagente indicador de ácido cianídrico de modo a ficar livre no interior do tubo.

Em presença de ácido cianídrico o papel tornaria vermelho, visto que isto não aconteceu, constata-se que o teste é negativo.

Este teste será repetido a partir de um extrato obtido do pó e sem aquecimento.

ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

Procedimentos microbiológicos

Os ensaios microbiológicos foram realizados no extrato metanólico da *M. palmata* no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Maranhão.

Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados para os testes microbiológicos são aqueles recomendados por Bauer-Kirby, como ágar Mueller-Hinton e caldo Mueller-Hinton.¹³

Ágar Mueller-Hinton

O ágar Mueller-Hinton é o meio de cultura utilizado para o isolamento de microrganismos. A composição do meio é a seguinte:

Extrato de carne 300,0g

Ácidos casamino 17,5g

Amido solúvel 1,5g

Ágar 17,0g

Para a reidratação do meio dissolveu-se 19,0g do meio desidratado em 500ml de água destilada e homogeneizou-se. Aqueceu-se e agitou-se com freqüência. Ferveu-se durante 1 minuto. Autoclavou-se a 121°C durante 15 minutos. Depois de resfriado a temperatura aproximada de 50°C distribuiu-se em placas de Petri de 90mm de diâmetro.¹³

Caldo Mueller-Hinton

O caldo Mueller-Hinton é empregado para se verificar a suscetibilidade de antimicrobianos, através do método de diluição em tubo. É utilizado ainda para o preparo

do inóculo bacteriano. Para a preparação deste meio de cultivo, utilizou-se a seguinte composição:

Extrato de carne 300,0g

Ácidos de casamino 17,5g

Amido solúvel 1,5g

Para a reidratação do meio suspendeu-se 21g do meio em 100ml de água destilada e se aqueceu para dissolvê-lo. Distribuiu-se em tubos de acordo as quantidades desejadas e autoclavou-se por 15 minutos a 121°C.¹³

Microrganismos utilizados

Os microrganismos utilizados neste trabalhos foram obtidos da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia-UFMA.

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 0598099
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Salmonella typhi*

Os microrganismos foram mantidos a 4°C em ágar Mueller-Hinton, em tubos inclinados. Vinte e quatro horas antes dos ensaios, os microrganismos foram repicados para caldo Mueller-Hinton, e incubados a 37°C.

Na primeira fase da pesquisa de atividade antimicrobiana trabalhou-se com a cepa de *S. aureus* no método de difusão em ágar. Preparou-se inóculo deste microrganismo com cerca de 106 unidades formadoras de colônia (CFU) por ml, equivalente à turvação do padrão nº 5 da escala de Padrão de MacFarland. Este padrão é preparado adicionando-se 0,6ml de BaCl₂ (1,175% p/v) a 99,4ml de H₂SO₄ 0,36N. Em seguida, volume de 5ml é colocado em tubo de tampa rosqueável e de mesma dimensão dos tubos utilizados na preparação do inóculo em caldo, a fim de que as comparações de turvação sejam compatíveis.

A técnica utilizada para a preparação do inóculo é a recomendada pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards.¹⁴

Com uma alça microbiológica de platina tocou-se a superfície de quatro colônias de aspecto similar, que se desenvolveram bem isoladas em um meio de ágar Mueller-Hinton. Transferiu-se este inóculo para um tubo contendo 5,0ml de caldo Mueller-Hinton;

Incubou-se a cultura a 37°C até que a turvação do meio fosse equivalente a do padrão nº 5 de MacFarland. Com o auxílio de iluminação adequada realizou-se a leitura comparativa do tubo padrão com os inóculos preparados.

Susceptibilidade antimicrobiana

Os testes de susceptibilidade antimicrobiana medem a capacidade de um antibiótico ou outro agente antimicrobiano ou antifúngico inibir o crescimento microbiano ou fúngico *in vitro*. Esta capacidade pode ser estimada pelo método de difusão em ágar.

Método de difusão em ágar na atividade antimicrobiana¹³

O procedimento seguido foi o seguinte:

Colocou-se assepticamente 20ml de ágar Mueller-Hinton fundido em placa de Petri esterilizada;

Esperou-se solidificar e escavou-se três poços de 10 mm de diâmetro;

Diluiu-se em caldo Mueller-Hinton o inóculo preparado em 6.3 na proporção de 1:1;

Semeou-se o microrganismo com o auxilio de swab estéril até as bordas dos poços;

Introduziu-se em dois poços, assepticamente, 100mL do extrato;

No terceiro poço adicionou-se 100mL de metanol;

Esperou-se tempo suficiente para que a suspensão se difundisse e incubou-se a 37°C.

As placas foram examinadas após 24 horas.

Método Pour Plate¹⁴

Colocou-se assepticamente em placa de Petri 1ml do extrato metanólico bruto;

Adicionou-se cerca de 9ml de ágar Mueller-Hinton fundido e resfriado;

Misturou-se a amostra com o ágar através de movimentos circulares da placa;

Esperou-se solidificar e colocou-se em estufa a 37°C por 24 horas.

Resultados dos testes microbiológicos

Método de difusão em ágar

Os resultados obtidos no método de difusão em ágar encontram-se representados na Tabela 06.

BACTÉRIAS	Ext.MeOH	Solvente ^a
<i>S. aureus</i>	-	-
<i>E. coli</i>	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-
<i>Salmonella typhi</i>	-	-

^a = metanol

- = não houve inibição

TABELA 06: Atividade antibacteriana do extrato metanólico bruto de *M. palmata* pelo método de difusão em ágar

Método Pour Plate

A Tabela 07 ilustra os resultados de inibição obtidos pelo método Pour Plate.

BACTÉRIAS	Ext.MeOH	Solvente ^a
<i>S. aureus</i>	-	-
<i>E. coli</i>	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-
<i>Salmonella typhi</i>	-	-

^a = metanol

- = não houve inibição

TABELA 07: Atividade antibacteriana do extrato metanólico bruto de *M. palmata* pelo método Pour Plate

Fracionamento do Ext.MeOH através de Coluna Cromatográfica

Pelos testes realizados com três tipos de fracionamento, foi evidenciado que o melhor método a adotar seria a coluna cromatográfica, visto que, esta proporcionou o fracionamento do EBM em várias frações e com polaridades diversas. É conveniente lembrar que as quantidades utilizadas nos primeiros fracionamentos foram muito reduzidas e que estas não seriam suficientes para continuarmos particionando-as. Sendo assim foi necessário a realização de nova coleta, novas extrações e a realização de uma nova coluna cromatográfica utilizando-se gradientes de polaridades. Nesta foram utilizados 21,42g de EBM, obtendo-se as seguintes frações. Ver tab 8, p. 37.

SOLVENTE	PROPORÇÃO	FRAÇÕES COLETADAS
Hex	100%	01-02
Hex/AcOet	9:1	03
Hex/AcOet	8:2	04-05
Hex/AcOet	7:3	06-07
Hex/AcOet	6:4	08-10
Hex/AcOet	1:1	11-13
AcOet/Hex	6:4	14-15
AcOet/Hex	7:3	16-17
AcOet/Hex	8:2	18
AcOet/Hex	9:1	19-20
AcOet	100%	21-23
CHCl ₃	100%	24-25
MeOH	100%	26-27

TABELA 08: Frações obtidas na Coluna Cromatográfica utilizando-se gradiente de polaridade em ordem crescente.

Nestas frações foi realizada CCDC, a qual revelou algumas com feições cromatográficas semelhantes, as quais foram reunidas, resultando assim em dez frações. Ver tab.9, p.37.

FRAÇÕES REUNIDAS	IDENTIFICAÇÃO
01-04	01
05	05
06	06
07-10	07
11-16	11
17-18	17
19-22	19
23-25	23
26	26
27	27

TABELA 09: Reunião de frações a partir das feições cromatográficas semelhantes.

As frações 17, 19, e 23 se mostraram parcialmente insolúveis em hexano. Estas foram separadas por lavagem com hexano e identificadas como sendo frações 17ISH, 19ISH e 23ISH. Estas frações foram solubilizadas em metanol e após algum tempo de imersão em MeOH, a fração 17ISH apresentou a formação de cristais que foram lavados com uma mistura de Hex/AcOet (1:1) e solubilizados em MeOH. Em CCDC esta apresentou a seguinte feição cromatográfica (Fig. 13). Esta fração foi denominada 17ISH'($m=4$ mg).

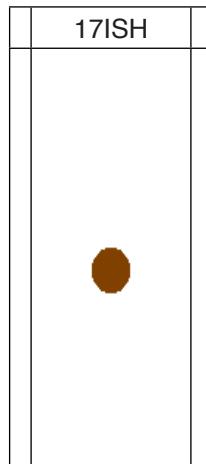


FIGURA 13: Cromatograma da fração 17ISH usando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9,5:0,5) revelado com vapores de iodo.

As frações 07 e 11 se mostraram parcialmente insolúveis em hexano a frio. Dessa forma procedeu-se a uma separação por lavagem com hexano a frio, resultando nas frações 07SH e 11SH. Nestas foi realizada CCDC e merece maior destaque a placa cromatográfica da fração 07SH ($m=93\text{mg}$), Fig. 14, p. 39.

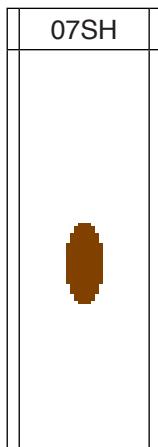


FIGURA 14: Cromatograma da fração 07SH usando como eluente Hex/AcOet (8:2) revelado com vapores de iodo.

A fração 27 que foi retirada da coluna com metanol, foi a que apresentou maior massa, aproximadamente 11g. Desta foram separadas 6g e realizada uma nova coluna utilizando-se gradientes de polaridade a partir do clorofórmio, levando-se em consideração que esta é uma fração considerada polar. Assim foram coletadas várias frações com polaridades diferentes. Ver tab.10,p.39.

SOLVENTE	PROPORÇÃO	FRAÇÕES COLETADAS
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	9,5:0,5	01-14
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	9:1	15-20
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	8,5:1,5	21-25
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	8:2	27-31
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	7:3	32-36
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	1:1	37-41
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	4:6	42-53
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	3:7	54-59
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	2:8	60-65
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	1:9	66-71
MeOH	100%	72-92

TABELA 10: Frações coletadas em CC da Fração 27.

Destas frações foi realizada CCDC, a qual nos permitiu reunir algumas frações de acordo com as feições cromatográficas apresentadas. Ver tab.11,p.40.

FRAÇÕES REUNIDAS	IDENTIFICAÇÃO
01-02	01
03-12	12
13-24	24
25-32	32
33-41	41
42	42
46	46
50	50
51-92	92

TABELA 11: Reunião de frações da CC da fração 27.

De acordo com a CCDC das frações 46 e 50 decidiu-se proceder a uma lavagem com um solvente de polaridade inferior ao metanol. Inicialmente foi testado o hexano e não houve limpeza satisfatória, então foi tentado com acetato de etila e o resultado obtido é mostrado no cromatograma seguinte, Fig. 15, p. 41.

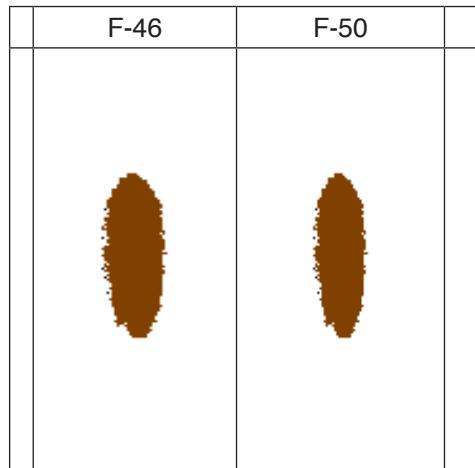


FIGURA 15: Cromatograma das frações F-46 e F-50 usando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (4:6 e 1% Ácido acético) revelado com vapores de iodo.

As Frações 07SH, 17ISH, F-46 e F-50 encontram-se em fase de elucidação estrutural, para o qual foram enviadas amostras à Central Analítica da UFC - CENAUREMN, para o registro de espectros.

Confirmação da Presença de Glicosídeos Cianogênicos

Como proposto pelo item 5 deste relatório, o teste para detecção de ácido cianídrico com indicação em papel de ácido pícrico foi repetido utilizando-se o pó, e as raízes frescas da planta.

Assim foram colocados em dois tubos de ensaio, 2g de amostra do pó e 2g de raízes descascadas e trituradas. Os tubos foram vedados com rolhas de cortiça que tinham suspensas tiras de papel ligeiramente umedecidas no reagente indicador de ácido cianídrico, como descrito no item 5 deste trabalho.

O tubo contendo amostra de pó resultou negativo, o que era previsto, visto que este também já houvera sofrido aquecimento em estufa e exposição ao meio. Enquanto que o tubo contendo amostra de raízes frescas, após aproximadamente vinte minutos, deu teste positivo para glicosídeo cianogênico, como descrito na literatura.

ENSAIOS BIOLÓGICOS

Metodologia – Determinação do Número de Células Formadoras de Placas (PFC)

Os camundongos tratados ou não com o extrato bruto metanólico de mandioca, foram sacrificados 48h após o tratamento, para retirada do baço e obtenção do soro. O baço foi macerado em tamis e as suspensões celulares obtidas, foram homogeneizadas e transferidas para tubos cônicos com o auxílio de uma seringa de 3ml. À cada 100ml das suspensões celulares individuais foram adicionadas:

- 25ml de hemácias de carneiro ou de camundongos á 25% em BSS.
- 50ml de complemento de cobaia.
- 250ml de Bacto-ágar (á 0,5%) após fervura tripla e adição de 150ml de DEAE-dextran.

O conteúdo dos tubos foi homogeneamente distribuído em placas de Petri e o número de células secretoras de anticorpos foi avaliado após a incubação por 4h á 37°C, e 18h á 4°C em amostras individuais testadas em triplicata.

A Significância entre as médias dos diferentes grupos, foi estabelecida pelo teste T Student.

Teste biológico do EBM de Manihot palmata Muell Arg

A atividade auto-estimuladora, ou seja, a produção de anticorpos auto-reativos estimulada pela macaxeira foi avaliada em animais não tratados ou que receberam 48h antes do ensaio 200mg, ip. do extrato bruto metanólico desta planta.

A figura 16 mostra que o pré tratamento com 200mg, ip. do extrato bruto metanólico de macaxeira induziu um aumento significativo no número de células secretoras de auto-anticorpos para hemácias de camundongo (MRBC), quando comparados ao grupo controle.

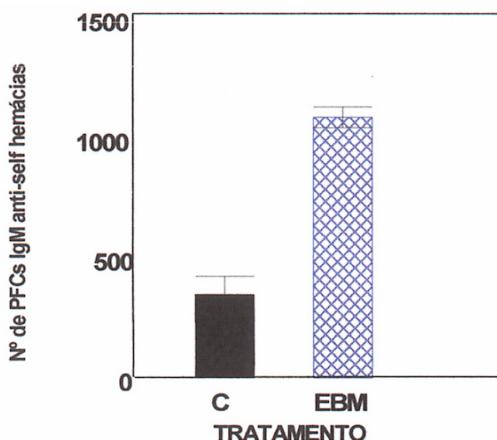


FIGURA 16. Quantificação da produção de anticorpos anti-self hemácias no baço de camundongos não tratados (C) ou tratados com 200mg, ip. de extrato bruto metanólico de macaxeira (EBM). Os animais C3H/Hepas(10/grupo) foram avaliados, individualmente, 48h após o tratamento. Os resultados referem-se a $\bar{x} \pm s.d.$

Teste biológico da fração 07SH

Esta Fração foi testada biologicamente pelo mesmo método citado anteriormente e os resultados não mostraram atividade para esta fração. Com esta foram tentadas duas doses diferentes afim de confirmar o resultado, ou seja, 5mg/Kg e 10mg/Kg e em nenhum destas doses o resultado se mostrou positivo.

As frações F-46 e F-50 encontram-se em fase de testes.

Atualizações bibliográficas

Em recentes pesquisas bibliográficas realizadas neste trabalho para atualização dos dados obtidos a respeito da espécie vegetal em estudo, foram constatadas a ausência de trabalhos realizados com esta planta e ainda divergências no que diz respeito a sua taxonomia vulgar, ou seja, em trabalhos publicados sobre a espécie vegetal *Manihot esculenta* Crantz, foi adotado a sinonímia popular, macaxeira, referente a *Manihot palmata* Muell Arg^{15,16}.

Durante esta pesquisa foram constatados isolamentos de metabólitos secundários para a espécie *M. esculenta* (a parente mais próxima da *M. palmata*). Além da Linamarina e do Lotastraulin que são os glicosídeos cianogênicos mais abundantes nas raízes desta planta, foram isolados ainda, o 2-((6-O-(-D-apiofuranosil)--D-glucopiranosil)oxi)-2-metilbutanenitrila, os glicosídeos não cianogênicos, (2S)-((6-O-(-D-apiofuranosil)--D-

glucopiranosil)oxi) butano, 2-((6-O-(D-apiofuranosil)--D-glucopiranosil)oxi) propano e Etil-D-glucopiranosideo, estes compostos foram isolados através do extrato etanólico. Entre os compostos isolados podemos citar ainda os flavonóides glicosilados presentes nas folhas desta planta, o Kaempferol-3-O-rutinosideo, e a Quercetina-3-O-rutinosideo.¹⁷

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Sobre a identificação botânica

Tendo em vista que a espécie estudada é aquela que não necessita ser submetida a nenhum preparo específico para seu consumo, pois apresenta concentração significativamente menor de glicosídeo cianogênico que a sua “prima” (*M. esculenta*), foi que se achou necessário e obrigatório a correta identificação da espécie que se pretendia estudar, esta então é *M. palmata* (macaxeira).

Sobre os fracionamentos

Foram obtidas várias frações de polaridades diferentes pelas técnicas de partição, diferença de solubilidade e coluna cromatográfica, que posteriormente em etapas futuras deste projeto serão submetidas a fracionamentos mais detalhados, visto que os realizados nesta fase tiveram caráter experimental e foram realizados em quantidades mínimas, suficientes para a confirmação da eficácia dos métodos a serem adotados.

Através de nova coluna cromatográfica foi possível o aparente isolamento de quatro frações, que se encontram em fase de elucidação estrutural.

Sobre os ensaios microbiológicos

As informações populares e científicas não dão conta de atividade antibacteriana para *M. palmata*. Todavia, o Laboratório de Produtos Naturais da UFMA tem como protocolo de bioensaios testar atividade antimicrobiana de espécies em estudo neste laboratório. Tanto no ensaio de difusão em ágar quanto na técnica Pour Plate não se observou qualquer efeito inibitório sobre as bactérias testadas. Utilizou-se, nesses bioensaios, espécies bacterianas reconhecidamente de importância para a patologia humana, não apresentando o extrato metanólico bruto de *M. palmata* ação sobre essas bactérias.

Sobre os testes biológicos

De acordo com os testes realizados foi possível a constatação da atividade auto-estimuladora para o EBM de *M. palmata*, mas não para a fração 07SH.

Sobre as recentes pesquisas bibliográficas

Estas pesquisas só vieram confirmar os equívocos que acontecem entre a taxonomia botânica e a vulgar da *Manihot esculenta* Crantz (mandioca) e a *Manihot palmata* Muell Arg (macaxeira), e ainda confirmar a não existência de publicações a respeito da planta em estudo neste trabalho, pelo menos nas bases de dados mais citadas, como o Chemical Abstrat, Biothecnology, Bio Medline, BIREME, e outros que foram consultados nesta pesquisa bibliográfica.

CONCLUSÃO

- Através da identificação botânica e do levantamento bibliográfico desta espécie, foi possível uma melhor distinção entre a espécie que realmente se pretendia estudar (*M. palmata*) e a espécie comumente identificada como sendo ela (*M. esculenta*)
- A espécie vegetal estudada apresenta-se fisicamente muito parecida com a *M. esculenta*, mas possui menor quantidade do glicosídeo cianogênico, e ainda seu aspecto físico é passível de diferenciação com a outra espécie.
- Os testes fitoquímicos indicam a presença de esteróides, triterpenos e resinas nas raízes da *M. palmata*.
- O teste para detecção de glicosídeo cianogênico resultou negativo, o que era de se esperar devido ao aquecimento aplicado, porém, foram repetidos com o pó desta planta e com raízes frescas. Destes o primeiro se mostrou negativo como previsto por causa do seu aquecimento e o segundo positivo como descrito literariamente.
- Os ensaios microbiológicos para atividade antimicrobiana resultaram negativos, pois não houve nenhuma inibição no crescimento dos microorganismos.
- Os testes biológicos realizados com o EBM de *Manihot palmata* se mostrou positivo para a atividade auto-estimuladora de produção de anticorpos auto reativos enquanto que a fração 07SH se mostrou negativo para esta atividade.
- As pesquisas bibliográficas mais recentes realizadas em diversos bancos de dados revelaram a inexistência de trabalhos publicados a respeito da planta em estudo, mas apresentam publicações de sua parente mais próxima a *M. esculenta*.

REFERÊNCIAS

1. ALZUGARAY, D; ALZUGARAY, C. **As plantas que curam**. São Paulo: Três Livros e fascículos (1993).

2. PLANTAS CURATIVAS NASCIDAS EM LABORATÓRIO. Capturado em 18 de fev.2000. On line. Disponível na internet no endereço <http://www.estado.com.br/edicao/especial/plantas/jui4.html>
3. PLANTAS MEDICINAIS. Capturado em 25 de fev. 2000. On line. Disponível na internet no endereço http://www.jbrj.gov.br/arboreto/pl_medic.htm
4. PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERAPIA. Capturado em 18 de fev.2000. On line. Disponível na internet no endereço http://orbita.starmedia.com/~mara_danusa/
5. **BARSA**, Enciclopédia britânica do Brasil. Publicações LTDA. São Paulo, v.10. p. 321 (1998).
6. **MIRADOR**, Enciclopédia internacional. São Paulo, v.13. p.7191 (1995).
7. SCHULTZ, A. **Introdução à botânica sistemática**. 4º ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (1984).
8. CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional v.5 (1984).
9. AIPIM. Capturado em 25 de fev. 2000. On line. Disponível na internet no endereço <http://www.ciagri.usp.br/planmedi/pm1007.htm>
10. COLLINS, C. H.; Braga, G. L. **Introdução e métodos cromatográficos**. 3º ed. Campinas. Editora UNICAMP (1988).
11. MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: Edições UFC (1988).
12. MATOS, F. J. A., SOUZA, M. P. e SOUZA, T. T. **Marcha sistemática de abordagem fitoquímica**. Rev. Bras. Farm. 1971.
13. GIESBRECHT, A. M. **Atividade antibiótica de produtos naturais**. São Paulo, 1980. (Tese de Livre Docência. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).
14. KONEMAN, A. et al. "**Diagnóstico microbiológico**". 2ªed. São Paulo: Panamericana, 1993. 730p.
15. CAROTENÓIDE E ATIVIDADE PRÓ VITAMINA A DE FOLHAS DE HORTALIÇAS CONSUMIDAS NO NORTE DO BRASIL. Capturado em 22 de jul.2000. On line. Disponível na internet <http://www.bireme.com.br>.
16. USO DE UMA MULTIMISTURA COMO SUPLEMENTACAO ALIMENTAR: ESTUDO EM RATOS. Capturado em 31 de jul.2000. On line. Disponível na internet <http://www.usp.br/sibi/>
17. CYANOGENIC AND NON-CYANOGENIC GLYCOSIDES FROM MANIHOT ESCULENTA. Capturado em 22 de jul. 2000. On line. Disponível na internet http://www.chemweb.com/databases/bel/badisplay.exe?jcode=belabs&action=search&search_data=manihot&search_file=abs&max=10.