



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE



FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

CURSO DE QUÍMICA

TRABALHO DE LICENCIATURA

**Avaliação da composição fitoquímica e actividade
antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de
*Strychnos spinosa***



Autor: Ismenio Alberto Abeda Nhaca

Maputo, Julho de 2015



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE



FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

CURSO DE QUÍMICA

TRABALHO DE LICENCIATURA

**Avaliação da composição fitoquímica e actividade
antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de
*Strychnos spinosa***

Autor: Ismenio Alberto Abeda Nhaca

Supervisor: Prof. Doutor François Munyemana

Maputo, Julho de 2015

*Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes,
polpa e casca da fruta de Strychnos spinosa*

DEDICATÓRIA

À minha família, especialmente à minha mãe Abda Augusto Nhaca, aos meus tios e a meu irmão António Maria da Conceição.

*Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de *Strychnos spinosa**

AGRADECIMENTOS

Ao meu supervisor, o Prof. Doutor François Munyemana, ao dr. Bonifácio Mause, a dr.^a Amélia Furvela, ao Sr. Basílio, a dr.^a Maria e a Dona Enelda que me acompanharam durante a realização deste trabalho.

A todos os professores do Departamento de Química que de forma directa ou indirecta contribuíram para a minha formação;

A minha mãe Abda pelo materno carinho, pelos marcantes sacrifícios feitos para a minha formação humana e académica;

Aos amigos, colegas e familiares que de forma directa e indirecta me apoiaram na realização do trabalho.

Um agradecimento especial vai dirigido aos amigos e colegas, Manuel, Bernardo, Gabriel, Uamusse, Mafuiane, Elija, Sambo, Mauaie, Chilengue, Neve e Sitóe.

A todos os outros que por alguma eventualidade não tenha mencionado, por todo o apoio que me deram.

Declaração sob compromisso de honra

Declaro que este trabalho de fim do curso é o resultado da minha investigação e nunca foi apresentado na sua essência para quaisquer fins, estando indicadas no texto e nas referências bibliográficas todas as fontes por mim consultadas.

Autor

.....

(Ismenio Alberto Abeda Nhaca)

Maputo, Julho de 2015

*Não te preocupes em ser um
cientista famoso, apenas
investigues! investigues!!!... Pois
dos seus trabalhos, a fama virá!!!*

(Onayxmenús)

*Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de *Strychnos spinosa**

RESUMO

A *Strychnos spinosa* é uma planta pertencente a família Loganiaceae, e é conhecida em Moçambique, especificamente no sul como *NSALA*. Ela cresce em locais com clima tropical e várias partes da árvore são usadas pela população rural, desde a raíz até as frutas, para tratar enfermidades e o fruto é tradicionalmente usado como alimento em África. A polpa do fruto é a parte comestível e é utilizada para produção de licores. O presente trabalho objectiva realizar estudo comparativo da composição fitoquímica e actividade antioxidante dos extractos das sementes, polpa e casca do fruto.

Os extractos brutos das sementes, casca e polpa foram obtidos por extracção com sohxlet, usando MeOH 70%, acetato de etilo e éter de petróleo como solventes. Os extractos obtidos foram submetidos a testes fitoquímicos de identificação de alcalóides, esteróides, taninos, saponinas, cumarinas, antraquinonas e resinas. Foi realizada a extracção selectiva de esteróides e sua caracterização cromatográfica recorrendo aos solventes e reagentes de identificação específicos. A avaliação da actividade antioxidante foi realizada usando o método de DPPH e o poder redutor. A determinação do teor de fenóis totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu. A determinação de flavonóides foi realizada por complexação com $AlCl_3$ seguida de análise por espectrofotometria de UV-Vis.

Os testes fitoquímicos mostraram a presença de alcalóides, flavonóides, taninos, esteróides/triterpenóides, antraquinonas e resinas nas sementes, polpa e casca. As cardenolidas são os esteróides identificados em todas as partes da fruta e as withanolidas não foram identificadas em nenhuma das 3 partes. A actividade antioxidante da polpa e das sementes é superior a da casca. Quanto ao teor de compostos fenólicos totais, a polpa e as sementes apresentam valores próximos e superiores ao da casca. O teor de flavonóides na polpa e na casca foi semelhante mas relativamente superior a das sementes.

A composição fitoquímica, a actividade antioxidante, o teor de alcalóides totais, de fenóis totais e de flavonóides dos extractos das sementes, polpa e casca da fruta de *Strychnos spinosa* mostram que as 3 partes podem ser aproveitadas para fins medicinais.

Índice Geral

1.	Introdução	1
2.	Objectivos	3
2.1.	Objectivo geral	3
2.2.	Objectivos específicos	3
3.	Metodologia	4
3.1.	Revisão bibliográfica.....	4
3.2.	Parte Experimental	4
4.	Revisão bibliográfica	5
4.1.	Descrição da Planta em estudo.....	5
4.1.1.	Descrição e Caracterização Taxonómica de <i>Strychnos spinosa</i>	5
4.1.2.	Distribuição.....	6
4.1.3.	Composição fitoquímica de plantas do género <i>Strychnos</i>	7
4.1.4.	Usos da <i>Strychnos spinosa</i> na medicina tradicional	10
4.1.5.	Actividades biológicas	10
4.1.5.1.	Actividade antibacteriana	10
4.1.5.2.	Actividade antiplasmodial	11
4.1.5.3.	Actividade analgésica	11
4.1.5.4.	Actividade antidiabética	11
4.1.5.5.	Actividade antiinflamatória	11
4.1.5.6.	Actividade antitripanossomal	11

Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de Strychnos spinosa

4.1.5.7.	Toxicidade	12
4.2.	Actividade antioxidante.....	12
4.2.1.	Métodos de avaliação da actividade antioxidante de produtos naturais	12
4.2.1.1.	Método DPPH.....	13
4.2.1.2.	Teste de descoloração de β -caroteno	13
4.2.1.3.	Método ABTS.....	14
4.2.1.4.	ORAC	14
4.2.1.5.	Poder redutor	15
4.2.1.6.	Determinação do teor de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu.....	15
4.2.1.7.	Determinação de teor de flavonóides	16
4.3.	Extracção e identificação de esteróides.....	17
5.	Parte Experimental.....	20
5.2.	Colheita e tratamento da amostra	20
5.3.	Extracção do material vegetal	21
5.4.	Ensaio qualitativos.....	22
5.4.1.	Identificação de Alcalóides.....	22
5.4.2.	Identificação de Antraquinonas	22
5.4.3.	Identificação de Cumarinas.....	22
5.4.4.	Identificação de Taninos	23
5.4.5.	Identificação de Flavonóides	23
5.4.6.	Identificação de Saponinas	23
5.4.7.	Identificação de Resinas	23

*Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes,
polpa e casca da fruta de Strychnos spinosa*

5.5.	Análise por cromatografia de camada fina.....	24
5.6.	Obtenção e fraccionamento da fracção de esteróides.....	25
5.7.	Extracção de alcalóides totais	27
6.	Apresentação dos Resultados.....	30
7.	Discussão de resultados	42
8.	Conclusões	45
9.	Recomendações.....	46

Índice de Tabelas

Tabela 1: Sequência de variação da polaridade dos solventes na extracção dos diferentes esteróides.....	17
Tabela 2: Alguns solventes usados na TLC para esteróides	17
Tabela 3: Reagentes de identificação de esteróides	18
Tabela 4: Cores observadas em alguns fitosteróis quando revelados com reagentes de Liebermann-Burchard e Salkowski.....	19
Tabela 5: Resultados dos testes fitoquímicos do extracto hidrometanólico das sementes, polpa e casca	30
Tabela 6: Resultados dos testes fitoquímicos do extracto Éter de petróleo das sementes, polpa e casca.....	30
Tabela 7: Resultados dos testes fitoquímicos do extracto Acetato de etilo das sementes, polpa e casca.....	31
Tabela 8: Resultados de testes de identificação de diferentes esteróides na polpa.....	32
Tabela 9: Resultados de testes de identificação de diferentes esteróides nas Sementes.....	32
Tabela 10: Resultados de testes de identificação de diferentes esteróides na Casca	33
Tabela 11: Rf' s dos esteróides nos extractos hidrometanólicos brutos.....	33
Tabela 12: Rf' s calculados dos alcalóides nos extractos hidrometanólicos brutos.....	34
Tabela 13: Teor de gorduras e alcalóides nas amostras	34
Tabela 14: Determinação da acção de captura do radical livre DPPH nas sementes	35
Tabela 15: Determinação da acção de captura do radical livre DPPH na polpa.....	35
Tabela 16: Determinação da acção de captura do radical livre DPPH na Casca.....	36
Tabela 17: Concentração necessária para a diminuição de DPPH a transmitância de 50%	37
Tabela 18: Concentrações e as respectivas absorvâncias do padrão (ácido gálico)	37
Tabela 19: Concentração de compostos fenólicos nas amostras	38
Tabela 20: Concentração de compostos fenólicos em mg EAG.....	39
Tabela 21: Concentração e absorvância do padrão (Rutina)	39
Tabela 22: Concentração de flavonóides nas amostras.....	40
Tabela 23: Concentrações das amostras em mg ER	40

*Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes,
polpa e casca da fruta de Strychnos spinosa*

Tabela 24: Concentração em mg equivalente ácido ascórbica	41
Tabela 25: Concentração e absorvância do padrão (Ácido ascórbico)	41

Índice de Figuras

Figura 1: <i>Fotografia da árvore da Strychnos spinosa</i>	5
Figura 2: <i>Ilustração do fruto de Strychnos spinosa aberta</i>	6
Figura 3: <i>Distribuição da Strychnos spinosa no sul da África</i>	6
Figura 4: <i>Fórmula estrutural de Saringosterol e 24-hidroperoxi-24-vinil-colesterol</i>	7
Figura 5: <i>Fórmula estrutural de Akagerina, 10-Hidroxiakagerina, e Kribina</i>	7
Figura 6: <i>Fórmulas estruturais dos esteróides identificados no óleo das sementes</i>	8
Figura 7: <i>Componentes do óleo das sementes e das folhas de Strychnos spinosa</i>	9
Figura 8: <i>Fórmula estrutural de ácido ursólico</i>	9
Figura 9: <i>Reacção entre um flavonóide e o radical livre DPPH</i>	13
Figura 10: <i>Estrutura de ABTS (2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico))</i>	14
Figura 11: <i>1) Geração de radicais peroxil e 2) a sua reacção com crocina</i>	15
Figura 12: <i>Reacção de Ácido gálico e molibdénio</i>	16
Figura 13: <i>Formação do complexo entre AlCl₃ com Flavonóides</i>	16
Figura 14: <i>Mapa de localização do distrito de Moamba</i>	20
Figura 15: <i>Imagem da estufa, casca, sementes e polpa da fruta de Strychnos spinosa</i>	21
Figura 16: <i>Sistema de extracção “soxhlet”</i>	21
Figura 17: <i>Identificação de algumas classes de esteróides</i>	24
Figura 18: <i>Obtenção da fase clorofórmica</i>	25
Figura 19: <i>Testes de presença de esteróides após a separação por Cromatografia de Coluna.</i> .	26
Figura 20: <i>Extracção de compostos lipofílicos e obtenção de alcalóides totais</i>	27

Abreviaturas e Símbolos

AAPH	2,2'-azobis (2-amidinopropano)
ABTS	2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
BS	Brassinosteróides
BU	Bufadienolidas
CA	Cardenolidas
CD ₅₀	Dosagem citotóxica
CE ₅₀	Concentração Efectiva
CU	Cucurbitacinas,
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazil
EAA	Equivalente de ácido ascórbico
EAG	Equivalente de ácido gálico
ER	Equivalente de rutina
ES	Ecdisteróides,
EtOAc	Acetato de etilo
Et ₂ O	Dietil Éter
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada ao espectrofotómetro de massa
IC ₅₀	Concentração Inibidor para 50% de população amostral
%m/m	Fracção massa (soluto) por massa (solução) em percentagem
MeOH	Metanol

Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de Strychnos spinosa

ORAC	Capacidade de absorção de oxigénio radical
PE	Ficoeritrina
ppm	Parte por milhão
%RSD	Desvio padrão relativo percentual
R	Réplica
σ	Desvio padrão
SA	Alcalóides Esteroidais
SS	Saponinas Esteroidais
UV-Vis	Ultravioleta visível
\bar{x}	Média aritmética
VS	“Vertebrate-type Steroids”
WI	Withanolidas

1. Introdução

Desde os tempos longínquos, a civilização humana usa partes de plantas (frutas, folhas e raízes) para o sustento alimentício, bem como para a prevenção e ou combate contra enfermidades (Almeida, 1993). Em Moçambique, há uma variedade de frutas nativas, que são fontes valiosas de vitaminas e minerais (Orwa *et al.*, 2009). O uso de frutas indígenas em Moçambique é bem notável nas aldeias, servindo como alimento, mas também para a produção de bebidas tradicionais. No caso da massala (*Strychnos spinosa*), os colectores botânicos consideram-na comestível. A polpa é também usada na produção de licor. A casca é usada especificamente na produção de instrumentos musicais, e as sementes até então não são reaproveitadas.

A fruta contribui significativamente para a dieta de muitas famílias, particularmente nas zonas rurais no tempo da fome, mas também fornece nutrientes essenciais e compostos bioactivos.

Ela pertence a um grupo de espécies de género *Strychnos* conhecidas por efeitos medicinais, mas também por produção de substâncias venenosas (Thongphasuk *et al.*, 2003).

Na medicina tradicional, várias partes da planta são largamente usadas contra enfermidades em quase todo o mundo. Ela possui actividade antidisentérica, analgésica, antitripanossomal, antiplasmodial e antihelmintica. Na África do sul por exemplo, a fruta verde de *Strychnos spinosa* é usada como antídoto para mordidas de cobras (Hedberg *et al.*, 1983). A fruta verde é considerada venenosa (Neuwinger, 1996).

Alguns estudos evidenciaram a presença de flavonóides, que têm sido desde há muito, reconhecidos por possuírem propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, anti-alérgicas, hepatoprotectoras, anti-trombóticas, antivirais, e anti-cancerígenas (Middleton *et al.*, 2000).

Alguns esteróides e triterpenóides como ergosterol, colesterol, saringosterol, ácido ursólico e β -sitosterol, foram identificados na polpa e nas sementes. O β -sitosterol tem sido alvo de muitos estudos no combate ao cancro da próstata e é empregado nas indústrias alimentícias em substituição do colesterol (LDL) que provoca doenças cardiovasculares. Os alcalóides

*Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de *Strychnos spinosa**

identificados na planta são maioritariamente indólicos, mas a sua concentração na planta, é pouco expressiva.

No presente trabalho foi realizado o estudo fitoquímico preliminar nas sementes, polpa e casca da fruta *Strychnos spinosa* no âmbito de identificar os principais metabólitos secundários. Foi também determinada a actividade antioxidante, o teor de compostos fenólicos totais, o teor de flavonóides e o teor de alcalóides totais.

2. Objectivos

2.1. Objectivo geral

Avaliar a composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de *Strychnos spinosa*

2.2. Objectivos específicos

Realizar testes fitoquímicos qualitativos dos extractos das sementes, polpa e casca da fruta de *Strychnos spinosa*;

Determinar a actividade antioxidante dos extractos da polpa, sementes e casca da fruta de *Strychnos spinosa*;

Determinar o teor de compostos fenólicos totais, flavonóides e alcalóides totais nos extractos da polpa, sementes e casca da fruta de *Strychnos spinosa*.

Fazer uma análise comparativa de composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta da *Strychnos spinosa*.

3. Metodologia

A metodologia de realização do trabalho baseou-se na revisão bibliográfica e a parte experimental

3.1. Revisão bibliográfica

Baseou-se em consulta de livros, artigos de revistas científicas que tratassem do assunto em estudo, e com base nas informações obtidas em cada documento fez-se uma compilação e síntese de informações sobre a *Strychnos spinosa*, como é o caso das principais classes de compostos identificados e as respectivas actividades biológicas, as técnicas para a análise e isolamento dos principais fitoconstituintes do género e da espécie.

3.2. Parte Experimental

A parte experimental consistiu na preparação do material vegetal (as sementes, a polpa e a casca) para a extracção e obtenção dos extractos brutos usando soxhlet. Concluída a extracção realizou-se ensaios qualitativos e análises quantitativas.

4. Revisão bibliográfica

4.1. Descrição da Planta em estudo

4.1.1. Descrição e Caracterização Taxonómica de *Strychnos spinosa*

As espécies do género *Strychnos* estão distribuídas extensivamente por quase todo o mundo. Em Moçambique, encontram-se a *Strychnos spinosa* (Massala), a *Strychnos madagascariensis* (Kwakwa) e a *Strychnos henningsii* (Manono). No sistema de classificação botânico, o género *Strychnos*, encontra-se dividido em três grupos (Neuwinger 1994):

- 1) Um grupo da América Central e do sul, com 74 espécies
- 2) Outro grupo da Ásia, Austrália e Polinésia, com 44 espécies
- 3) Um grupo restante de 75 espécies.

Entre estas espécies, a *Strychnos spinosa* inclui-se no terceiro grupo. Ela é encontrada nas regiões Tropicais e sul da África



Reino: Plantae

Sub-reino: Viridiplantae

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Gentianales

Família: Loganiaceae

Género: Strychnos

Espécie: Strychnos spinosa

Figura 1: Fotografia da árvore da *Strychnos spinosa*

Fonte: Adaptado de Relatório sobre a disponibilidade, ecologia e sistemas de uso actual das plantas indígenas de Matutuíne Relatório sobre a disponibilidade, ecologia e sistemas de uso actual das plantas indígenas de Matutuíne.

Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de Strychnos spinosa

É um arbusto ou pequena árvore, com o tronco cinzento, ramos usualmente sem pêlos e com espinhos axilares curvos ou estreitos. As folhas são elípticas e quase circulares, verde-escuro brilhante na parte superior e verde opaco na parte inferior, com 3 a 5 veias da base e as margens onduladas. As flores são pequenas, de cor creme esverdeado e ocorrem nas extremidades dos ramos principais ou dos ramos laterais. Os frutos são largos (cerca de 12 cm de diâmetro), globosos, esféricos, amarelos a amarelos acastanhados quando maduros, de casca dura lenhosa.



Figura 2: *Ilustração do fruto de Strychnos spinosa aberta*

Fonte: *Própria*

4.1.2. Distribuição

A *Strychnos spinosa* tem uma vasta distribuição, ocorrendo desde o nível do mar até a uma elevação de cerca de 1500 m. Ocorre em matagais abertos, em florestas ribeirinhas, em florestas arenosas, e vegetação costeira.

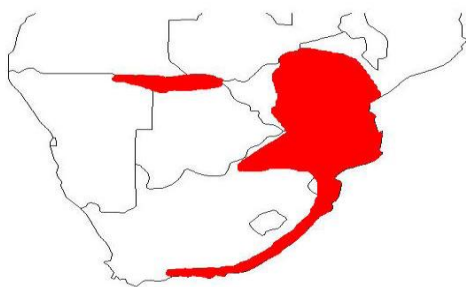


Figura 3: *Distribuição da Strychnos spinosa no sul da África*

Fonte: *Adaptado de van Wyk, et al 1997. Field Guide to Trees of Southern Africa.*

4.1.3. Composição fitoquímica de plantas do género *Strychnos*

No género *Strychnos*, alcalóides como alcalóides monoterpénicos, alcalóides-estricnina como “C-Toxiferina, C-dihidrotoxiferina, C-curarina e C-calebassina” podem ser encontrados. A planta medicinal conhecida como *Strychnos nux-vomica*, contém 1% de estricnina e 1,5% de brucina. Em contradição a isso na espécie *Strychnos spinosa*, o conteúdo de alcalóides totais é apenas cerca de 0,1% ou menos. O extracto clorofórmico das folhas mostrava-se isento de alcalóides, mas quatro triterpenóides e quatro esteróis foram identificados. Entre esses, identificou-se dois compostos com uma actividade antitripanosomal, ilustrados na figura 4, nomeadamente Saringosterol e 24-hidroperoxi-24-vinil-colesterol, (Hoet, *et al* 2007).

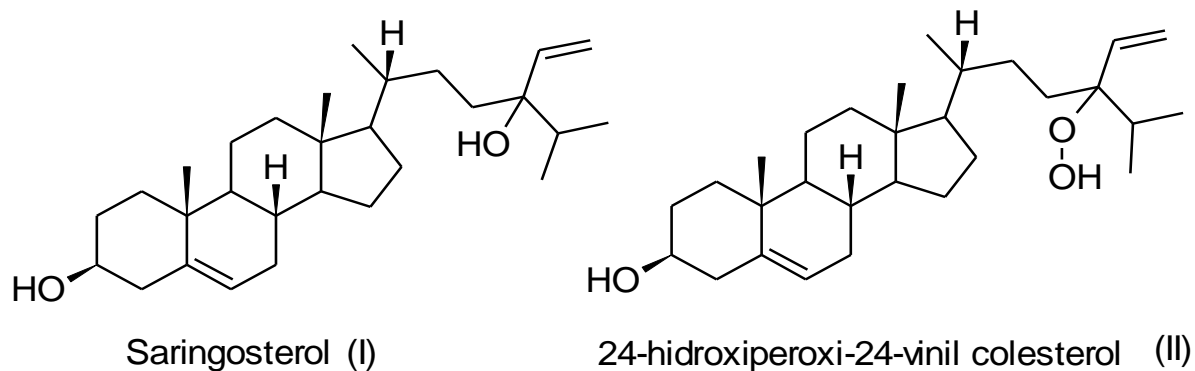


Figura 4: *Fórmula estrutural de Saringosterol e 24-hidroperoxi-24-vinil-colesterol*

Mas, em um trabalho anterior três alcalóides indol-monoterpenóides foram identificados nomeadamente: akagerina, 10-Hidroxiakagerina, e kribina, cujas estrutura estão ilustradas na figura 5 (Hoet *et al.*, 2007).

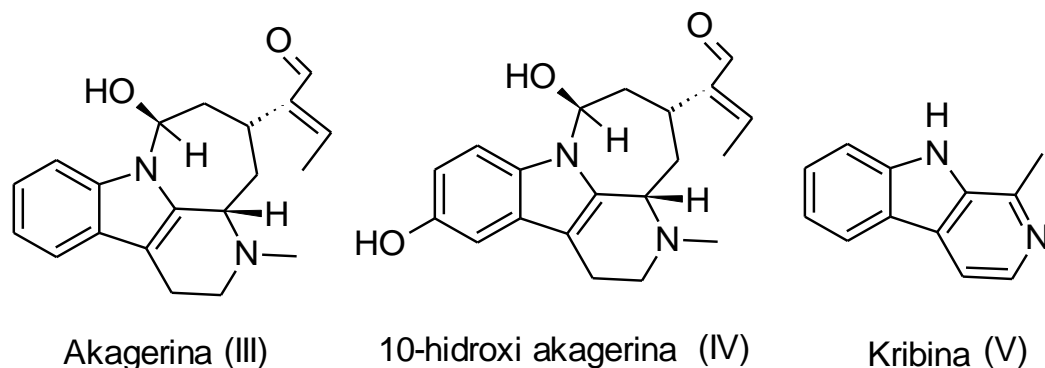


Figura 5: *Fórmula estrutural de Akagerina, 10-Hidroxiakagerina, e Kribina*

Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de *Strychnos spinosa*

Os estudos realizados por Bisset *et al.* (1971) sobre extractos de *Strychnos spinosa* revelaram um conteúdo de alcalóides relativamente baixo, cerca de 0,1%. Mas a partir da casca do caule de *Strychnos spinosa*, foram detectados dois novos alcalóides terciários, que foram identificados como 11-metoxi-diabolina e 12-hidroxi-11-Metoxidiabolina (Ohiri *et al.*, 1984).

A polpa contém cerca 0,0012% de alcalóides e pericarpo 0,009% (Neuwinger, 1994). Ohiri *et al.*, (1984) identificaram no óleo das sementes, esteróis e ácidos gordos que incluem β -sitosterol, estigmasterol, campesterol e colesterol, cujas estruturas estão ilustradas na figura 6.

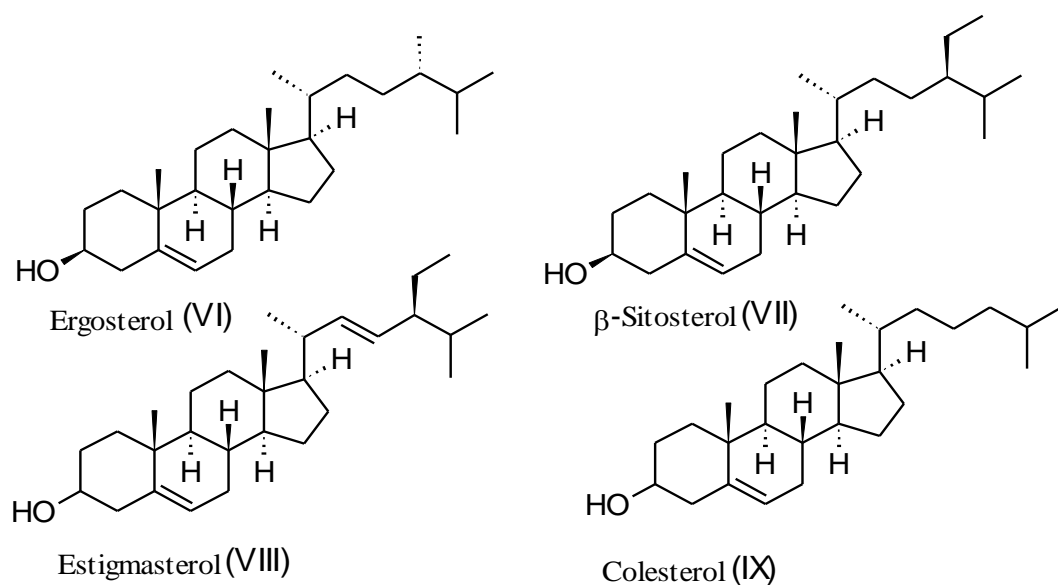


Figura 6: Fórmulas estruturais dos esteróides identificados no óleo das sementes

Do óleo essencial obtido por hidrodestilação das folhas de *Strychnos spinosa*, foram identificados 22 compostos, cujos principais foram: ácido palmítico (34,3%), linalol (16,0%) e E-fitol (6,7%) (Hoet *et al* 2006). Num outro estudo identificou-se a presença de α -amirina, ácido oléico, esteárico e linoléico no óleo das sementes, cujas respectivas estruturas estão apresentadas na figura 7.

Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de Strychnos spinosa

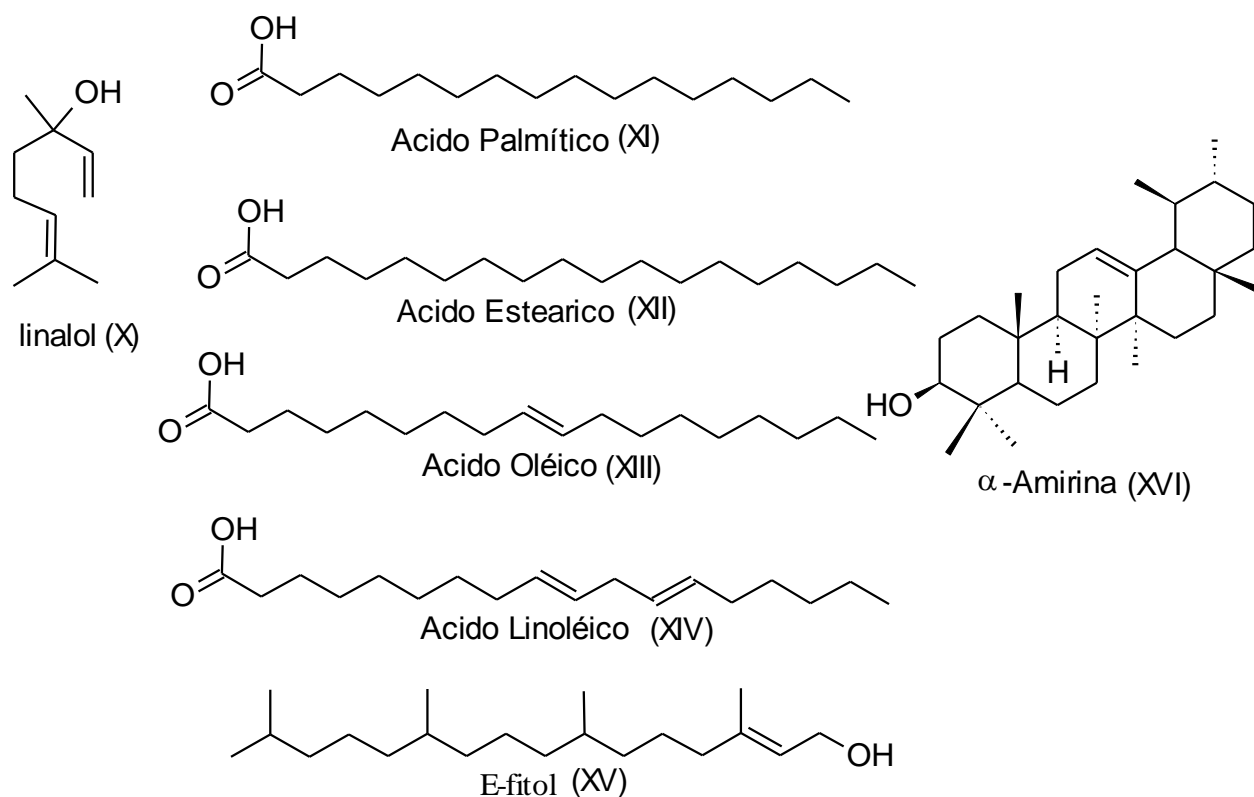


Figura 7: Componentes do óleo das sementes e das folhas de *Strychnos spinosa*

No pericárpio foi identificado um composto com actividade farmacológica, ácido ursólico (figura 8), usado contra a disenteria e redução da atrofia muscular.

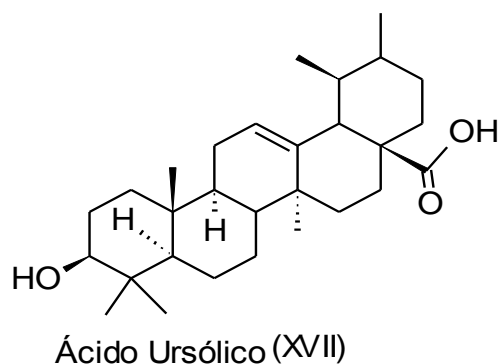


Figura 8: Fórmula estrutural de ácido ursólico

*Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de *Strychnos spinosa**

Estudos realizados por Isa *et al.* (2014) mostraram que nas folhas, o teor de flavonóides apresentava-se maior no extracto butanólico, em comparação aos extractos: aquoso, acetato de etilo e metanólica. No teste da actividade inibidora de lipoxigenase, a fracção de acetato de etilo deu bons resultados com IC₅₀ de 231.49 μ g/mL e o extracto de alcalóides totais deu cerca de 164.03 μ g/mL.

4.1.4. Usos da *Strychnos spinosa* na medicina tradicional

Em todas as áreas da África Oriental, onde a *Strychnos spinosa* se desenvolve, todas as partes da planta são usadas no tratamento de enfermidades, por exemplo na Gâmbia as folhas são usadas para a cobertura de feridas abertas, lavagem de feridas e de olhos; em Tanzânia, a seiva das folhas é usada contra picadas de cobras, mas é usada também para o fortalecimento de crianças, fazendo-as beber e banhando-as. A raiz em pó é aplicada contra queixas internas, como as do estômago, dos intestinos, contra a diarreia e contra vermes. Folhas pulverizadas são utilizadas contra a sífilis, e contra a loucura (uma mistura de folhas jovens e as fezes de um leão é colocada na cabeça raspada). No nordeste da Nigéria folhas e frutos são consumidos por mulheres para estimular a produção de leite materno (Lockett e Grivetti., 2000). Em um estudo etnobotânico feito em Gana, foi revelado que a *Strychnos spinosa* pode ser utilizada para o tratamento de malária (Asasa *et al.*, 2005).

4.1.5. Actividades biológicas

4.1.5.1. Actividade antibacteriana

O estudo realizado por Lockett *et al.* (2000) sobre a actividade antibacteriana de *Strychnos spinosa*, nos extractos de éter de petróleo, clorofórmio, alcoólico e aquoso, das folhas de *Strychnos spinosa*, sugere que os extractos aquosos podem ser explorados como agentes antimicrobianos, devido á presença de taninos, saponinas e flavonóides.

4.1.5.2. Actividade antiplasmodial

As raízes de *Strychnos spinosa* são usadas em África para o tratamento da malária, por possuir na sua composição, a cloroquina. O extracto de diclorometano obtido por decocção das folhas de *Strychnos spinosa*, tem actividade antiplasmodial. Este extracto foi avaliado *in vitro* e testado em *Plasmodium falciparum* (Frederich *et al.*, 2002).

4.1.5.3. Actividade analgésica

As folhas de *Strychnos spinosa* podem ser usadas para inibir a constrição abdominal causada pelo ácido acético. A actividade analgésica de *Strychnos spinosa* é encontrada nos extractos de diclorometano, extractos alcoólicos e aquoso das folhas (Patra *et al.*, 2008).

4.1.5.4. Actividade antidiabética

Em 1989 foi reportada uma actividade hipoglicémica de *Strychnos spinosa*. O extracto etanólico das partes aéreas da planta de *Strychnos spinosa* é usado para o tratamento de diabetes nas doses de 100 e 250 mg/kg por 3 semanas, testado em ratos (*Rattus norvegicus*).

4.1.5.5. Actividade antiinflamatória

Foram avaliadas as actividades anti-inflamatório nas folhas de *Strychnos spinosa*, e testada em ratos de raça *Wistar* de ambos sexos. Os resultados obtidos durante os estudos revelaram que os extractos de clorofórmio e o alcoólico das folhas desta planta são usados para o tratamento de edemas. O seu efeito anti-inflamatório é devido a presença de um flavonóide natural, a quercetina. (Patra *et al.*, 2008).

4.1.5.6. Actividade antitripanossomal

A decocção das folhas de *Strychnos spinosa* é usada tradicionalmente para tratar tripanossomiase africana. Foi relatada a actividade antitripanossomal nos extractos das folhas de *Strychnos spinosa*. Foram isolados triterpenóides e esteróides nas fracções de diclorometano e foram testados em *triptanosoma brucei* (Cunha *et al.*, 2003).

*Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de *Strychnos spinosa**

4.1.5.7. Toxicidade

Geralmente sugere-se a toxicidade de moléculas triterpénicas seja causada pela presença de dois átomos de Nitrogénio Quaternário ou um átomo de Nitrogénio quaternário e um átomo de Nitrogénio terciário protonado, respectivamente.

Os alcalóides tóxicos bloqueiam os gânglios, sendo antagonistas da acetilcolina. Eles reagem com o receptor de acetilcolina, causando um efeito relaxante dos músculos com estrias transversais. O efeito final é incapacidade de movimento e paralisia respiratória.

As substâncias tóxicas reagem apenas na forma parentérica. A absorção oral de substâncias tóxicas é muito lenta. Em todas as partes verdes de *Strychnos spinosa* o conteúdo de alcalóide é tão baixo, que intoxicações graves não devem ser esperadas, mas o extracto da casca do caule pode ser tóxico, de acordo com o estudo farmacológico feito com murganhos, o alcalóide 17-O-metilakagerina, deu convulsões clónicas e tónicas com um valor CD50 a 45,3 mg / kg. Num outro estudo teve-se o valor CD50 a 50 mg / kg (Rolfsen *et al.*, 1980).

4.2. Actividade antioxidante

Os processos de oxidação no meio biológico, fazem parte de processos vitais e notáveis no metabolismo celular. Contudo, esses processos dependendo do tipo de reacção, podem produzir radicais livres, de diferentes espécies, que estão directa e ou indirectamente associados a algumas doenças que fustigam a sociedade do mundo actual, enfermidades tais como: Arteriosclerose, doenças auto-imunes, cancro, diabete, inflamações, Doença de Parkinson, Artrite Reumática. As funções de Antioxidantes são de inibir ou retardar a oxidação de outras moléculas, limitando tanto a iniciação, ou a propagação de reacções em cadeia de oxidação. Os antioxidantes naturais são compostos fenólicos (tocoferóis, flavonóides, ácidos fenólicos), compostos de azoto (derivados de clorofila, alcalóides, aminoácidos, e aminas), carotenóides e ácido ascórbico (Govindarajan. *et al.*, 2005)

4.2.1. Métodos de avaliação da actividade antioxidante de produtos naturais

Estudos sobre os radicais livres e o desenvolvimento de novos métodos para a avaliação de actividade antioxidante têm aumentado consideravelmente nos últimos anos. Mas devido aos

diferentes tipos de radicais livres e as suas diferentes formas de acção em organismos vivos, é pouco provável o desenvolvimento de um único método universal simples e preciso para medir a actividade antioxidante. No entanto, as pesquisas para o teste mais rápido e mais eficiente gerou um grande número de métodos para avaliar a actividade de antioxidantes naturais, e que utilizam uma variedade de sistemas para gerar radicais livres (Alves *et al.*, 2010).

4.2.1.1. Método DPPH

Este método foi descrito pela primeira vez por Blois em 1958, e mais tarde foi ligeiramente modificado por numerosos pesquisadores. DPPH é um radical livre estável, que reage com compostos que podem doar um átomo de hidrogénio. O método baseia-se na eliminação de DPPH através da adição de espécies de radicais ou antioxidante que descoloram a solução de DPPH. O grau de alteração da cor é proporcional à concentração e potência dos antioxidantes. A actividade antioxidante é então, medida pela diminuição na absorção a 517 nm (Krishnaiah *et al.*, 2011). Este método é considerado, do ponto de vista metodológico, um dos mais fáceis, preciso e reprodutivo para avaliação da actividade antioxidante em sucos de frutas e extractos vegetais (Alves *et al.*, 2010). O método é influenciado pelo solvente e o pH das reacções.

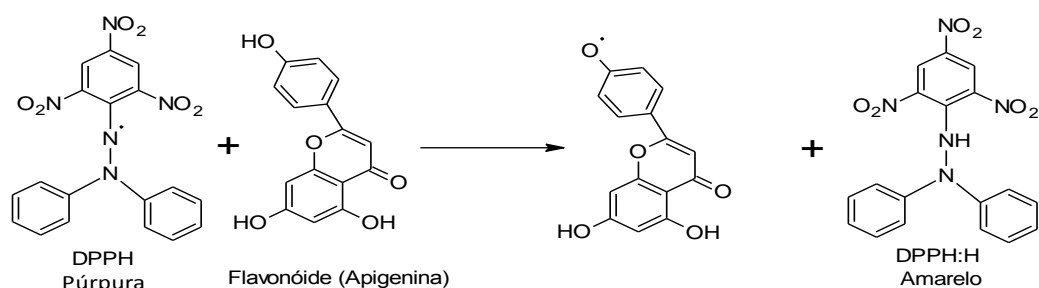


Figura 9: Reacção entre um flavonóide e o radical livre DPPH

4.2.1.2. Teste de descoloração de β -caroteno

O método de oxidação de ácido linoléico/ β -caroteno avalia a actividade inibidora de radicais livres gerados durante a peroxidação de ácido linoléico. O método baseia-se na descoloração ou (oxidação) de β -caroteno, induzido por produtos de degradação oxidativa de ácido linoléico.

*Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de *Strychnos spinosa**

Este método é apropriado para amostras de plantas (Kulisic *et al.*, 2004). O método consiste na perda da cor amarela do β -caroteno, devido a reacção com radicais formados pela oxidação de ácido linoléico quando está em emulsão. Na presença de um antioxidante, a descoloração do β -caroteno pode ser retardada. A reacção pode ser monitorizada por espectrofotometria a 470 nm.

4.2.1.3. Método ABTS

O 2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), vulgarmente chamado de ABTS, método desenvolvido por Rice-Evans e Miller, e foi então modificado por Reet Ai em 1990. A modificação baseia-se na activação de hidrogénio com peróxido de metamioglobina na presença de ABTS⁺ para produzir um catião radical. O método melhorado, gera um azul/verde ABTS⁺ cromóforo, através da reacção de ABTS e persulfato de potássio. E agora amplamente utilizado. Juntamente com o método de DPPH, o método ABTS é um dos ensaios de actividade antioxidante utilizado mais amplamente para amostras de plantas. A redução do catião radical ABTS na presença de antioxidantes doadores de hidrogénio é medida espectrofotometricamente a 734nm.

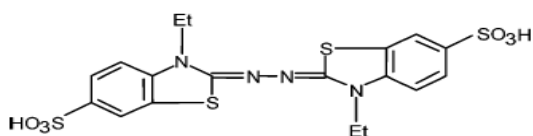


Figura 10: Estrutura de ABTS (2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico))

4.2.1.4. ORAC

O radical peroxil é um oxidante comumente encontrado em substratos biológicos. É o menos reactivo dos radicais OH[•], tendo uma meia-vida de segundos a nanossegundos (Alves *et al.*, 2010). A ORAC (Capacidade de absorção de oxigénio radical) utiliza β -ficoeritrina como um oxidável substrato protéico, e 2,2' -azobis (2-amidinopropano) (AAPH), como um peroxilo gerador de radicais, ou um Cu²⁺-H₂O₂ como um sistema gerador de radicais hidroxilo e utiliza uma área sob a curva (AUC) para a técnica de quantificação, combinando tanto a percentagem de inibição e a duração do tempo de inibição para a acção de radicais livres em uma única

Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de *Strychnos spinosa*

quantidade. (Krishnaiah *et al.*, 2011). Um exemplo típico desse tipo de reacção é ilustrado na figura 11.

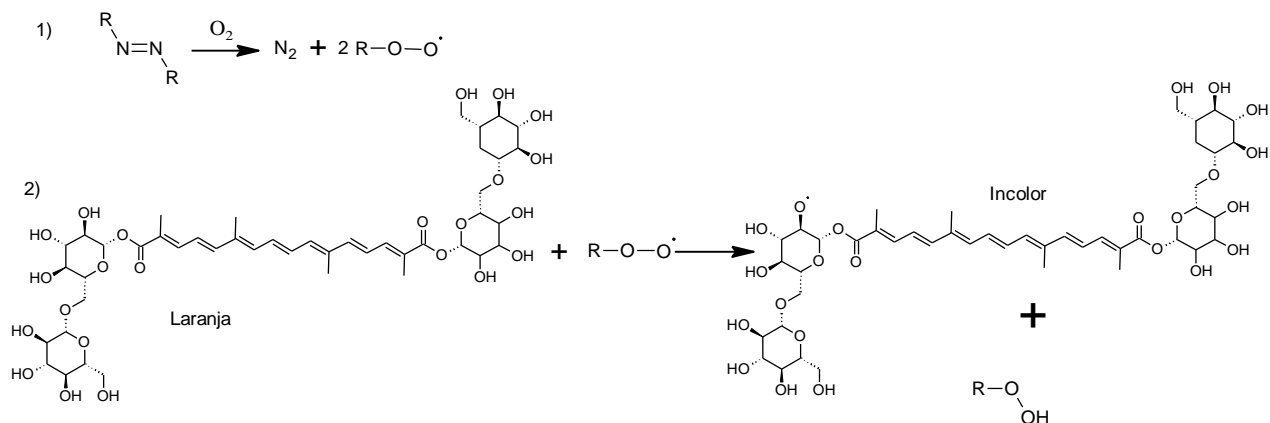


Figura 11: 1) Geração de radicais peroxil e 2) a sua reacção com crocina

4.2.1.5. Poder redutor

Neste ensaio, a cor da solução teste, altera-se para azul esverdeado a azul Prússia, dependendo da potência da amostra em questão. A presença dos redutores na solução, causa a redução do complexo à forma ferrosa. O poder redutor observa-se pela doação directa de electrões na redução do ferricianeto de potássio $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ a ferrocianeto de potássio $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. O produto visualiza-se pela adição de iões Fe^{3+} , que após a reacção de redução, forma o complexo azul Prússia, correspondente a $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$, que é quantificado por medida de absorvância a 720nm.

4.2.1.6. Determinação do teor de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu

Consiste numa mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico que, em contacto com agentes redutores como os compostos fenólicos em meio básico, se oxidam formando complexos de molibdênio e tungstênio azuis, cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras através de um espectrofotômetro UV/VIS. Quanto mais intensa a coloração, maior o conteúdo de fenólicos nos extractos e/ou fracção testada. O ácido gálico é

*Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de *Strychnos spinosa**

usado como um padrão para a curva de calibração. O conteúdo fenólico total é expresso em mg de ácido gálico equivalente (EAA). A Figura 12 mostra a reacção de ácido gálico com molibdénio, um dos componentes do reagente de Folin-Ciocalteu.

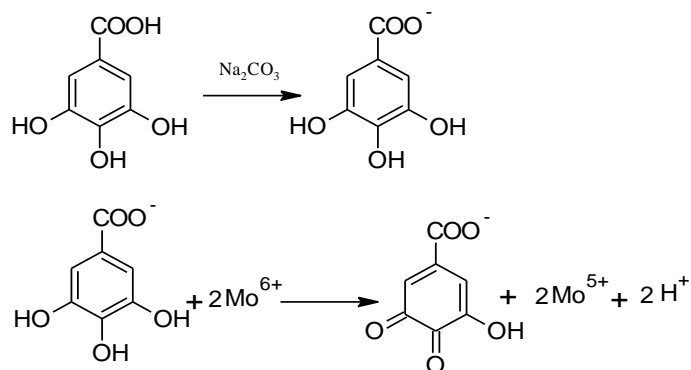


Figura 12: *Reacção de Ácido gálico e molibdénio*

4.2.1.7. Determinação de teor de flavonóides

O teste para a determinação do conteúdo de flavonóides, baseia-se na formação de um anel estável de seis membros, proveniente da reacção de AlCl_3 , com flavonóides. A formação do complexo entre o alumínio e flavonóides provoca um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção quando analisado por espectrofotometria de UV-Vis. Desta maneira, é possível determinar a quantidade de flavonóides evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos que invariavelmente acompanham os flavonóides nos tecidos vegetais, pois estes apresentam comprimentos de onda bastante inferiores se comparados com o complexo flavonóide-Alumínio.

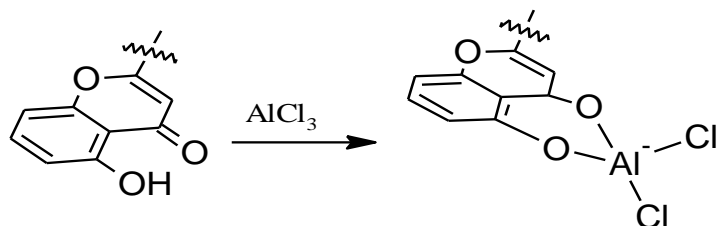


Figura 13: *Formação do complexo entre AlCl_3 com Flavonóides*

4.3. Extracção e identificação de esteróides

Considerando a diversidade estrutural dos esteróides, vários estudos foram realizados, com vista a encontrar sistemas de solventes que possibilitassem a extracção dos esteróides duma forma selectiva, bem como reagentes de identificação específica. Nas Tabelas 1-4 são ilustrados alguns sistemas de solventes e reagentes de identificação que são usados no estudo desses metabólitos secundários (Monika *et al.* 2008)

Tabela 1: Sequência de variação da polaridade dos solventes na extracção dos diferentes esteróides

Polaridade do solvente	Esteróides
Não polar	BS (esteres, gorduras), BU, CA (geninas), Vs
Moderadamente Polar	BS, CU, ES, SA, WI
Polar -Bem Polar	BS (glicosídeos), CA (glicosídeos), ES (glicosídeos/sulfatos), SS

BU-Bufadienolidas, **BS**-Brassinosteróides, **CA**-Cardenolidas, **CU**-Cucurbitacinas, **ES**-Ecdisteróides, **SA**-Alcalóides Esteroidais, **SS**-Saponinas Esteroidais, **VS**-Vertebrate-type Steroids, **WI** - Withanolidas

Tabela 2: Alguns solventes usados na TLC para esteróides

Fase estacionária	Sistema de solventes	Tipo de esteróides
Sílica Gel	Hexano-Et ₂ O	VS
	Tolueno-EtOAc	CA, CU
	CHCl ₃ -MeOH	CA, WI, ES, SA, SS
	CH ₂ Cl ₂ -MeOH97:3	VS
	CHCl ₃ -MeOH-Formamida 93:6:1	CA
	EtOAc-MeOH-H ₂ O 81:11:8	BU

*Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de *Strychnos spinosa**

	EtOAc-MeOH 97:3	CA
	CHCl ₃ -MeOH-H ₂ O 14:6:1	SS, SA
Sílica modificada	MeOH-H ₂ O 7:3	CU, ES, WI

Tabela 3: Reagentes de identificação de esteróides

Reagente de identificação	Esteróide
ZnS-contendo sílica	ES, CA, WI, VS
Anisaldeído	ES, SS
H ₂ SO ₄	ES, SA, SS
SbCl ₃	BU, SA, WI
Vanilina-95%, EtOH-H ₂ SO ₄	CA, ES, SS, VS
CloraminaT-H ₂ SO ₄	SA, VS
Carbazole-H ₂ SO ₄	VS
Ácido 3,5-dinitrobenzóico em etanol	CA
CeSO ₄ em H ₂ SO ₄	CA
(NH ₄) ₂ CO ₃ (indução a fluorescência)	ES
2,4-dinitrofenilhidrazina	ES
Reagente de Dragendorff	WI, SA
4-(4-dinitrobenzl) piridina	WI

BU-Bufadienolidas, **BS**-Brassinosteróides, **CA**-Cardenolidas, **CU**-Cucurbitacinas, **ES**-Ecdisteróides, **SA**-Alcaloides Esteroidais, **SS**-Saponinas Esteroidais, **VS**- “Vertebrate-type Steroids ”, **WI** - Withanolidas

Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de Strychnos spinosa

Tabela 4: Cores observadas em alguns fitosteróis quando revelados com reagentes de Liebermann-Burchard e Salkowski

	Reagente de Liebermann-Burchard	Reagente de Salkowski
Colesterol	Vermelha rosada	Vermelho sangue, depois ácido sulfúrico fluorescente verde
Ergosterol	Verde	-----
β -Sitosterol	Azul, depois verde	Vermelha
Estigmasterol	Violeta, depois azul.	Laranja

5. Parte Experimental

5.2. Colheita e tratamento da amostra

As frutas de *Strychnos spinosa* (*massala*) foram colhidas no bairro de Chiboene, localidade de Mahulane, distrito de Moamba na província de Maputo.



Figura 14: Mapa de localização do distrito de Moamba

Fonte: www.google.co.mz/maps/place/Moamba acedido aos 09/4/15

As frutas foram partidas, separou-se a casca e retirou-se as sementes da polpa.

As sementes retiradas da fruta, foram deixadas secar durante 15 dias ao ar livre. A amostra seca foi conduzida para a trituração. O mesmo procedimento foi realizado para a casca.

*Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de *Strychnos spinosa**

A polpa retirada da fruta, foi levada para a secagem na estufa durante 2 dias, a uma temperatura de 25° C, formando uma massa pastosa que em seguida foi triturada para formar partículas em pó.



Figura 15: *Imagem da estufa, casca, sementes e polpa da fruta de *Strychnos spinosa**

5.3. Extracção do material vegetal

A extracção nas sementes, polpa e casca foi conduzida pelo método de Soxhlet, usando como solventes MeOH 70%, acetato de etilo e éter de petróleo.

50 g de sementes, polpa e casca em pó, separadamente, foram colocadas em cartuchos e submetidas a extracção por soxhlet com 200 mL do sistema de solventes constituído por MeOH 70% por 7 horas, fez-se o mesmo para extractos de solventes: éter de petróleo e acetato de etilo.

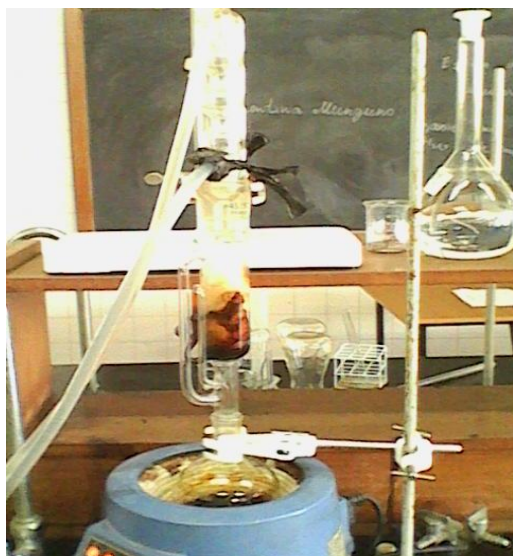


Figura 16: *Sistema de extracção “soxhlet”*

5.4. Ensaio qualitativos

Dentre as várias classes de metabólitos secundários, foram realizados testes para a identificação de alcalóides, cumarinas, taninos, flavonóides, saponinas, resinas, antraquinonas, esteróides e triterpenóides nas sementes, polpa e casca da *Strychnos spinosa*

5.4.1. Identificação de Alcalóides

Dilui-se 2.0 mL de extracto com 3.0 mL de água destilada, adicionou-se 2.0 mL de solução de HCl (ácido clorídrico) e aqueceu-se a mistura por 10 minutos. Arrefeceu-se, filtrou-se, dividiu-se o filtrado em três de tubos de ensaio e colocou-se algumas gotas do Reagente de Mayer, Drangendoff e Wagner nos tubos com os respectivos extractos.

5.4.2. Identificação de Antraquinonas

Colocou-se num tubo de ensaio, 2.0 mL do extracto e adicionou-se 5.0 mL de clorofórmio e agitou-se. Deixou-se em repouso por 15 minutos. Recolheu-se a fase clorofórmica e dividiu-a em dois tubos de ensaio.

No primeiro tubo, colocou-se 1.0 mL de solução aquosa de NaOH a 5%.

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

No segundo tubo, adicionou-se 1.0 mL de solução de acetato de magnésio a 5 % em metanol. A coloração roxa indica a presença de antraquinonas livres.

5.4.3. Identificação de Cumarinas

Em um tubo de ensaio colocou-se 2.0 mL do extracto, tapou-se com papel de filtro impregnado em solução 10% de NaOH e levou-se ao banho de água a 100° C por alguns minutos. Removeu-se o papel de filtro e examinou-se sob luz UV. A fluorescência amarela indica a presença de cumarinas.

5.4.4. Identificação de Taninos

Em um tubo de ensaio colocou-se 2.0 mL de extracto e adicionou-se 5 gotas de solução alcoólica de cloreto férrico a 10%. Após algumas horas há formação de coloração azul que indica possível presença de taninos hidrolisáveis, e a coloração verde de taninos condensados (Barbosa *et al.*, 2004).

5.4.5. Identificação de Flavonóides

A 2.0 mL de extracto num tubo de ensaio. Adicionou-se quatro fragmentos de fitas de magnésio na solução e posteriormente quatro gotas de ácido clorídrico concentrado (Barbosa *et al.*, 2004). A presença de flavonóides determina-se pela ocorrência de reacção mudando a cor da substância para vermelho ou castanha.

5.4.6. Identificação de Saponinas

A 2.0 mL de extracto adicionou-se 5.0 mL de água fervente, arrefeceu-se, agitou-se vigorosamente e deixou-se em repouso por 20 minutos. A formação de espuma é indicativo da presença de saponinas.

5.4.7. Identificação de Resinas

Em 2.0 mL de extracto, adicionou-se 4.0 mL de etanol e ajustou-se o pH a 4.0. Desta solução retirou-se 3.0 mL e colocou-se em um tubo de ensaio e adicionou-se 6.0 mL de água destilada. Aqueceu-se por alguns minutos. A ocorrência de um precipitado floculoso indica a presença de resinas.

5.4.8. Identificação de Triterpenos/esteróides

A 2.0 mL de extracto hidrometanólico, adicionou-se 5.0 mL de clorofórmio, agitou-se vigorosamente, deixou-se repousar, e separou-se as fases. Em seguida, filtrou-se a fase clorofórmica e transferiu-se para 6 tubos. No primeiro, adicionando-se 1.0 mL de anidrido acético e agitando levemente. Posteriormente, adicionou-se 1.0 mL de ácido sulfúrico pelas paredes do tubo (Matos, 1997). A presença de esteróides identifica-se quando ocorre mudança na

*Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de *Strychnos spinosa**

cor da substância para vermelho-escuro e castanho na parte inferior, o que caracteriza a presença de triterpenóides. No segundo adicionou-se 1.0 mL de solução de sulfato de céσιο em ácido sulfúrico para revelação de cardenolidas, no terceiro adicionou-se 1.0 mL de reagente de Dragendorff para revelação de alcalóides esteroidais e withanolidas, no quarto adicionou-se algumas gotas de ácido sulfúrico que revela os ecdisteróides, alcalóides esteroidais e saponinas esteroidais, no quinto adicionou-se 3 gotas de vanilina para revelação de cardenolidas, ecdisteróides, saponinas esteroidais e vertebrate-type-steroids, no sexto adicionou-se uma solução de cloramina-T em ácido sulfúrico para revelação de alcalóides esteroidais e “vertebrate-type-steroids” .



Figura 17: *Identificação de algumas classes de esteróides*

5.5. Análise por cromatografia de camada fina

Para a identificação dos fitoconstituintes do extracto hidrometanólico e fracção clorofórmica, recorreu-se a cromatografia de camada fina. Os extractos hidrometanólicos das sementes, polpa, e casca foram aplicados numa placa cromatográfica de sílica gel, e como fase móvel usou-se os sistemas de solventes: Tolueno: Acetato de etilo: Ácido acético Glacial nas seguintes proporções 6,0:1,5:0,1 e Tolueno: acetato de etilo: Metanol: Amoníaco 25% (30:30:15:1). Para a revelação usou-se: o reagente de Dragendorff, vapores de iodo e solução de ácido sulfúrico em metanol. No último caso, depois de pulverizar as placas, as placas cromatográficas foram submetidas ao aquecimento a 100°C na estufa.

5.6. Obtenção e fraccionamento da fracção de esteróides

Para obtenção da fracção bruta de esteróides baseou-se no procedimento sequencial apresentado na figura 18, partindo do extracto hidrometanólico bruto. Após a sua obtenção, seguiu-se o fraccionamento por cromatografia em coluna, monitorada por análise cromatográfica em camada fina.

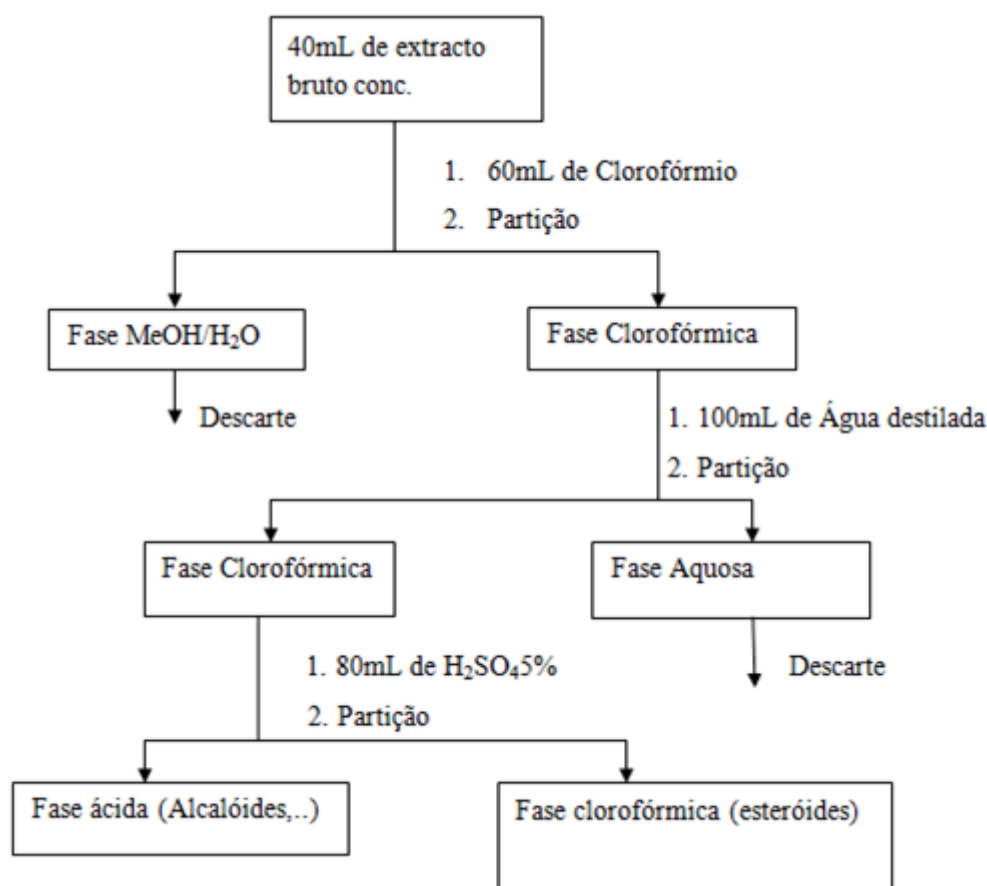


Figura 18: Obtenção da fase clorofórmica

A fracção clorofórmica foi fraccionada por cromatografia em coluna usando a Sílica gel como fase estacionária e o sistema de solventes: Tolueno / acetato de etilo em ordem crescente de polaridade.

*Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de *Strychnos spinosa**

10 mL do extracto clorofórmico das sementes foram misturados a 10 g de sílica gel e em seguida triturados num almofariz até a formação dum sistema homogéneo. Na coluna previamente lavada, pôs-se um pouco de algodão no fundo e de seguida, a sílica gel até que o comprimento da coluna chegasse a 14cm tendo em conta que o diâmetro da coluna era de 3cm. Passou-se o sistema de solventes para empacotar a sílica. A mistura homogénea da sílica e extracto bruto foi colocada na coluna sobre a sílica empacotada e passou-se o sistema de solventes da fase móvel para o fraccionamento. Seguiu-se o mesmo procedimento cromatográfico para fraccionar componentes da polpa e da casca.

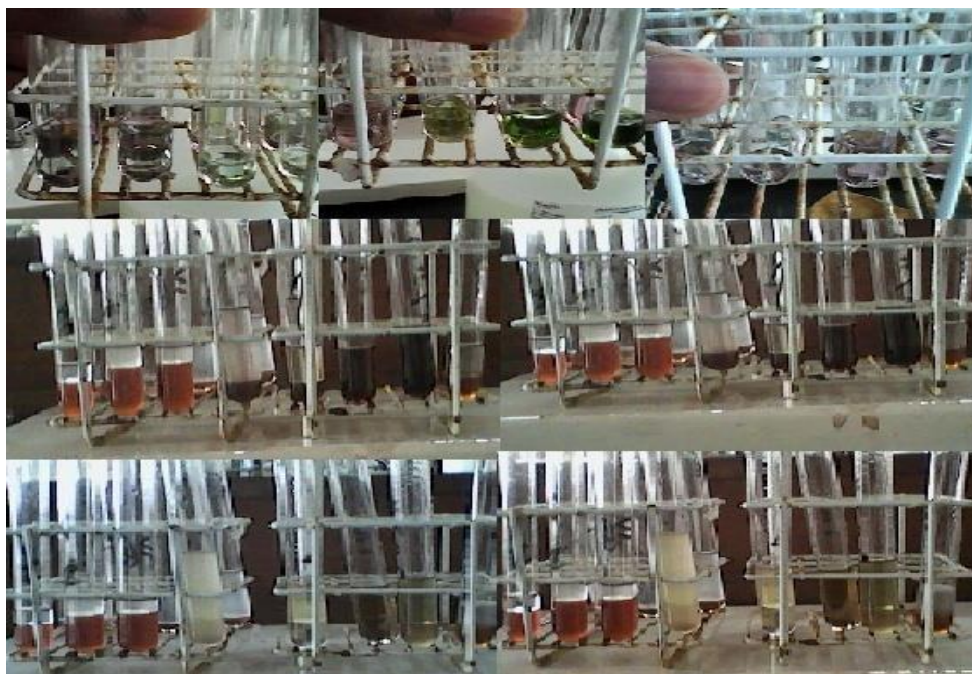


Figura 19: *Testes de presença de esteróides após a separação por Cromatografia de Coluna.*

5.7. *Extracção de alcalóides totais*

A extracção e quantificação de alcalóides, bem como a de gorduras, foram conduzidas seguindo o procedimento sequencial ilustrado na figura 20.

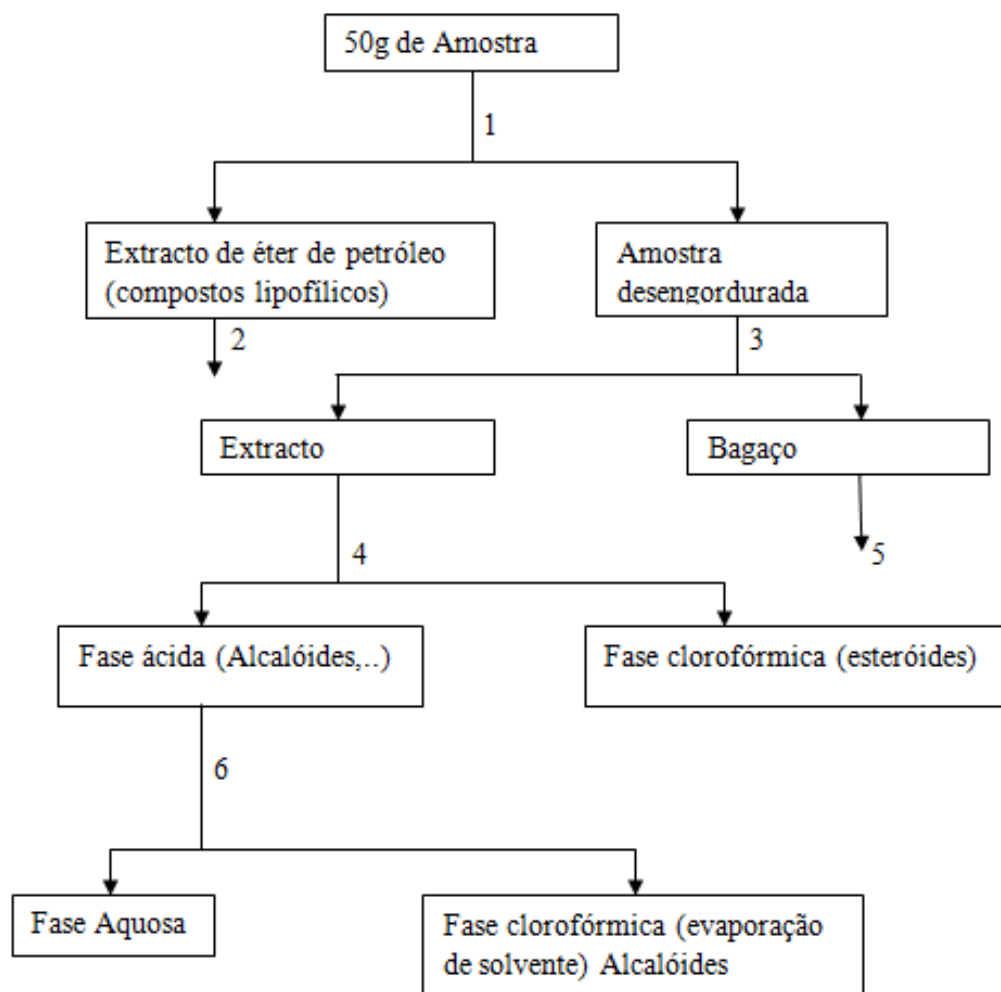


Figura 20: *Extracção de compostos lipofílicos e obtenção de alcalóides totais*

Legenda:

1. Extracção por soxhlet, com éter de petróleo por 7 horas
2. Evaporação do solvente e medição da massa do extracto

3. Alcalinização da amostra com solução aquosa de Ca(OH)_2 a 10% PH=11, homogeneizou-se a mistura, triturando durante 2 horas, e deixou-se secar durante 2 dias
Extracção com clorofórmio, usando soxhlet durante 5 horas
4. Partição com solução aquosa de H_2SO_4 a 5% m/m
5. Descarte
6. Neutralização com solução aquosa de NaOH a 5% m/m e partição com clorofórmio

5.8. Preparação de amostras para análise de actividade antioxidante

5.8.1. Determinação da acção de captura de radical livre DPPH

A avaliação da acção de captura de radicais livres usando o DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil), baseia-se no método descrito por Cavin *et al.* (1998), com modificações. Uma solução de DPPH 4×10^{-3} % foi adicionada às amostras vegetais nas concentrações descritas na tabela 26. A absorvância do DPPH nas soluções foi determinada em um espectrofotómetro a 517 nm após 30 minutos. Para cada uma das concentrações da solução teste em análise seguiu-se a sequência ilustrada na tabela 26 (Anexos), obtendo-se a absorvância de cada amostra nas diferentes concentrações. Os valores obtidos foram graficados na forma de % de decréscimo da transmitância de DPPH em função da concentração da solução teste, onde se determinou a concentração necessária para diminuir em 50% a transmitância do DPPH, ou seja, a concentração efectiva 50 % (CE_{50}). O método foi usado para a análise da actividade antioxidante de extractos hidrometanólicos das amostras vegetais.

5.8.2. Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos foi determinado de acordo com o método descrito por Anagnostopoulou *et al.* (2006) utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. A cada 0.5 mL de uma solução de extracto hidrometanólico da amostra vegetal, foram adicionados 5.0 mL de água destilada e 0.25 mL de reagente de Folin-Ciocalteu. Após três minutos foi adicionado 1.0 mL de solução saturada de Na_2CO_3 e a solução foi deixada em repouso por uma hora. As absorvâncias destas soluções foram determinadas em um espectrofotómetro a 725 nm. Como branco utilizou-

se uma solução preparada conforme o procedimento descrito acima. Um aparecimento da coloração azul-escuro é o indicativo da presença de compostos fenólicos na amostra testada. Foi construída uma curva de calibração com solução padrão de ácido gálico, nas concentrações descritas na tabela 27 (Anexos). O teor de compostos fenólicos totais foi expresso em equivalente de ácido gálico (EAG).

5.8.3. Determinação do conteúdo de flavonóides

A determinação do conteúdo de flavonóides baseia-se no método descrito por Woisky e Salatino (1998). A 0.5 mL da amostra vegetal foram adicionados 2.5 mL de etanol e 0.5 mL de uma solução de AlCl_3 2 %. Após uma hora de repouso, foram feitas as leituras das absorvâncias das misturas, em um espectrofotómetro UV/VIS a 415 nm. Como branco, foi utilizada uma solução preparada conforme o procedimento acima, sem a adição da solução de AlCl_3 . Um aparecimento de coloração verde fluorescente é indicativo da presença de flavonóides. O procedimento foi efectuado para o extracto hidrometanólico e acetato de etilo das amostras vegetais.

5.8.4. Determinação do poder redutor

O ensaio para a análise da actividade antioxidante através da determinação do potencial redutor baseia-se no método de Price e Butler, proposto por Waterman e Mole (1994), com adaptações. Em 0.5 mL de extracto hidrometanólico da amostra vegetal, adicionou-se 8.5 mL de água desionizada e 1.0 mL de uma solução de FeCl_3 0.1 mol.L^{-1} . Após três minutos adicionou-se 1.0 mL de uma solução de ferricianeto de potássio 0.08 mol.L^{-1} e, após 15 minutos, foram feitas as leituras das absorvâncias das misturas em espectrofotómetro a 720 nm. O aparecimento da cor azul da Prússia é indicativo de potencial redutor. Como branco, foi utilizada uma solução preparada conforme o procedimento acima, sem amostra vegetal. Foi construída uma curva de calibração utilizando solução de ácido ascórbico nas concentrações descritas na tabela 29 (Anexos). O potencial redutor das amostras foi expresso em equivalente de ácido ascórbico (EAA).

6. Apresentação dos Resultados

6.2. Resultados de testes fitoquímicos preliminares

A análise fitoquímica preliminar dos extractos brutos das sementes, polpa e casca do fruto de *Strychnos spinosa* revelou as classes de compostos apresentados nas tabelas 5, 6 e 7.

Tabela 5: Resultados dos testes fitoquímicos do extracto hidrometanólico das sementes, polpa e casca

Metabólitos Secundários	Resultados		
	Sementes	Polpa	Casca
Alcalóides	+	+	+
Flavonóides	+	+	+
Taninos	+	+	+
Esteróides/ triterpenóides	+	+	+
Antraquinonas	+	-	+
Cumarinas	-	-	-
Saponinas	-	-	-
Resinas	+	+	+

(+): *Positivo*, (-): *Negativo*

Tabela 6: Resultados dos testes fitoquímicos do extracto Éter de petróleo das sementes, polpa e casca

Metabólitos Secundários	Resultados		
	Sementes	Polpa	Casca
Alcalóides	-	-	+
Flavonóides	-	-	+

Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de Strychnos spinosa

Taninos	-	-	+
Esteróides/ triterpenóides	+	+	+
Antraquinonas	+	-	+
Cumarinas	-	-	-
Saponinas	-	-	-
Resinas	-	-	+

(+): *Positivo*, (-): *Negativo*

Tabela 7: Resultados dos testes fitoquímicos do extracto Acetato de etilo das sementes, polpa e casca

Metabólitos Secundários	Resultados		
	Sementes	Polpa	Casca
Alcalóides	-	-	-
Flavonóides	+	+	+
Taninos	+	+	+
Esteróides/ triterpenóides	+	+	+
Antraquinonas	+	+	+
Cumarinas	-	-	-
Saponinas	-	-	-
Resinas	+	+	+

(+): *Positivo*, (-): *Negativo*

Nas tabelas 8, 9 e 10 são apresentados os resultados revelados nos testes de identificação de esteróides nos extractos das sementes, polpa e casca da fruta de *Strychnos spinosa*

Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de Strychnos spinosa

Tabela 8: Resultados de testes de identificação de diferentes esteróides na polpa

Reagentes de identificação	Tipos de esteróides					
	CA	ES	SA	SS	VS	WI
CeSO ₄ em H ₂ SO ₄	+					
Dragendorff			-			-
H ₂ SO ₄		+	+	+		
Vanilina	+	+		+	+	
Cloramina-T em H ₂ SO ₄			+		+	

(+): *Positivo*, (-): *Negativo*, **CA-Cardenolidas**, **ES-Ecdisteróides**, **SA-Alcalóides Esteroidais**, **SS-Saponinas Esteroidais**, **VS- “Vertebrate-type Steroid”**, **WI - Withanolidas**

Tabela 9: Resultados de testes de identificação de diferentes esteróides nas Sementes

Reagentes de identificação	Tipos de esteróides					
	CA	ES	SA	SS	VS	WI
CeSO ₄ em H ₂ SO ₄	+					
Dragendorff			-			-
H ₂ SO ₄		+	+	+		
Vanilina	+	+		+	+	
Cloramina-T em H ₂ SO ₄			+		+	

(+): *Positivo*, (-): *Negativo*, **CA-Cardenolidas**, **ES-Ecdisteróides**, **SA-Alcalóides Esteroidais**, **SS-Saponinas Esteroidais**, **VS- “Vertebrate-type Steroid”**, **WI - Withanolidas**

*Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de *Strychnos spinosa**

Tabela 10: Resultados de testes de identificação de diferentes esteróides na Casca

Reagentes de identificação	Tipos de Esteróides					
	CA	ES	SA	SS	VS	WI
CeSO ₄ em H ₂ SO ₄	+					
Dragendorff			-			-
H ₂ SO ₄		+	+	+		
Vanilina	+	+		+	+	
Cloramina-T em H ₂ SO ₄			-		-	

(+): **Positivo**, (-): **Negativo**, **CA**-Cardenolidas, **ES**-Ecdisteróides, **SA**-Alcaloides Esteroidais, **SS**-Saponinas Esteroidais, **VS**-Vertebrate-type Steroids, **WI** - Withanolidas

6.3. Resultados de cromatografia em camada fina

A cromatografia em camada fina como um dos métodos de prospecção de abundância de metabólitos secundários, apresentou uma visão da fitoconstituição dos extractos, cujos resultados estão apresentados nas tabelas 11 e 12, correspondentes aos alcalóides e esteróides dos extractos das sementes, polpa e casca.

Tabela 11: Rf' s dos esteróides nos extractos hidrometanólicos brutos

	Sementes			Polpa			Casca		
	VI	VAN	MS	VI	VAN	MS	VI	VAN	MS
1	0.165	0.0625	0.26	0.165	0.197	0.145	0.165	0.51	0.35
2	0.26	0.13	0.39	0.25	0.26	0.27	0.38		0.40
3	0.39	0.197	0.56	0.34	0.35	0.6	0.41		0.7
4	0.8	0.567	0.8	0.439	0.54		0.7		
5	0.86	0.6		0.54	0.6		0.78		
6	0.96	0.75		0.6					

VI-Vapores de iodo, *VAN*-Vanilina sulfúrica, *MS*-solução de metanol em ácido sulfúrico a 10%

Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de Strychnos spinosa

Tabela 12: Rf' s calculados dos alcalóides nos extractos hidrometanólicos brutos

	Sementes		Polpa		Casca	
	VI	DG	VI	DG	VI	DG
1	0,48	0,68	0,53	0,68	0,64	0,64
2	0,53	0,81	0,68	0,81		
3	0,62	0,87	0,81	0,87		
4	0,73					
5	0,81					

VI-Vapores de iodo, DG-Dragendorff

6.4. Determinação de teor de gorduras e de alcalóides

Na tabela 13 estão apresentados os resultados inerentes ao teor de gorduras e de alcalóides nas sementes, polpa e casca

Tabela 13: Teor de gorduras e alcalóides nas amostras

Sementes							
	R1	R2	R3	\bar{x}	σ	%RSD	%
Teor de gorduras	0.5385	0.5375	0.5394	0.5385	9.50E-04	0.177	1.077
Teor de alcalóides	0.0028	0.0024	0.0034	0.0029	5.03E-04	17.558	0.006
Polpa							
	R1	R2	R3	\bar{x}	σ	%RSD	%
Teor de gorduras	0.0150	0.0162	0.0138	0.0150	1.20E-03	8.0E+00	0.030
Teor de alcalóides	0.0010	0.0011	0.0010	0.0010	5.77E-05	5.6E+00	0.002
Casca							
	R1	R2	R3	\bar{x}	σ	%RSD	%
Teor de gorduras	0.6612	0.6499	0.6728	0.6613	1.15E-02	1.73E+00	1.323
Teor de alcalóides	0.0144	0.0141	0.0144	0.0143	1.73E-04	1.21E+00	0.029

%RSD- Desvio de padrão relativo percentual

R₁,R₂,R₃ - Número de Réplicas, \bar{x} -Média, σ -Desvio de padrão,

Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de Strychnos spinosa

6.5. Determinação de actividade antioxidante

A análise da actividade antioxidantes, bem como o teor de flavonóides e esteróides estão apresentados nas tabelas 14-21.

Tabela 14: Determinação da acção de captura do radical livre DPPH nas sementes

Réplicas	Transmitância			Média	Conc. da amostra em g/mL
1	59.3	59.6	59.62	59.5	0.01
2	76.9	76.8	76.9	76.9	0.005
3	88.9	87.9	88.6	88.5	0.00125
4	100.2	100.1	100.3	100.2	0.0003
5	104.8	104.5	104.7	104.7	7.8E-05

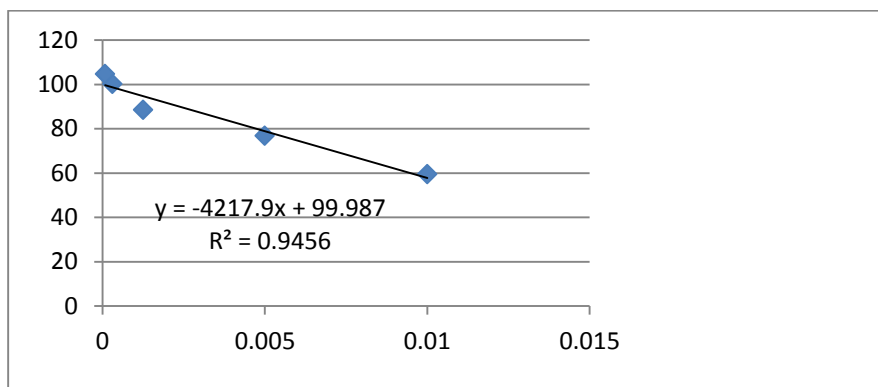


Gráfico1: Curva de calibração para as sementes

Tabela 15: Determinação da acção de captura do radical livre DPPH na polpa

Réplicas	Transmitância%			Média	Conc. da amostra em g/mL
1	24.1	24.1	24.2	24.1	0.01
2	45.4	44.9	45.9	45.4	0.005
3	73.3	72.2	74.3	73.3	0.00125
4	86.9	87.1	86.6	86.9	0.0003
5	97.5	97.2	99.0	97.9	7.8E-05

Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de Strychnos spinosa

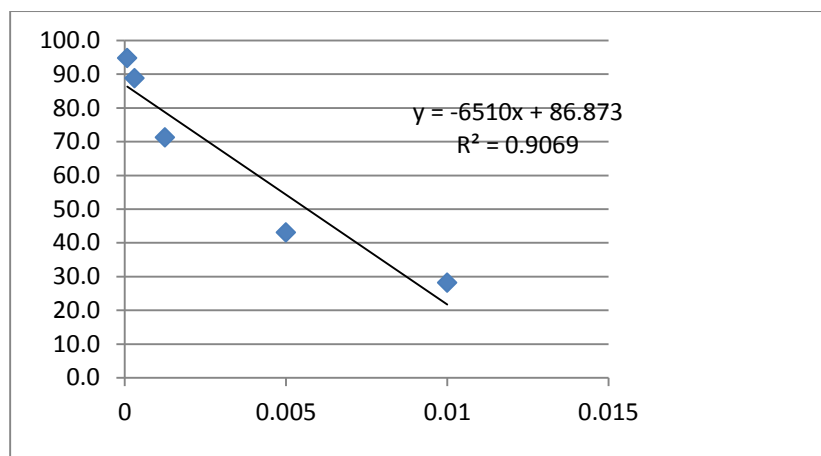


Gráfico2: Curva de calibração para a polpa

Tabela 16: Determinação da acção de captura do radical livre DPPH na Casca

Réplicas	Transmitância%			Média	Conc. da amostra em g/mL
1	28.2	28.1	28.2	28.2	0.01
2	43.0	42.9	43.1	43.0	0.005
3	71.3	71.2	71.4	71.3	0.00125
4	88.9	88.5	90.0	88.8	0.0003
5	94.9	94.9	94.8	94.9	7.8E-05

Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de Strychnos spinosa

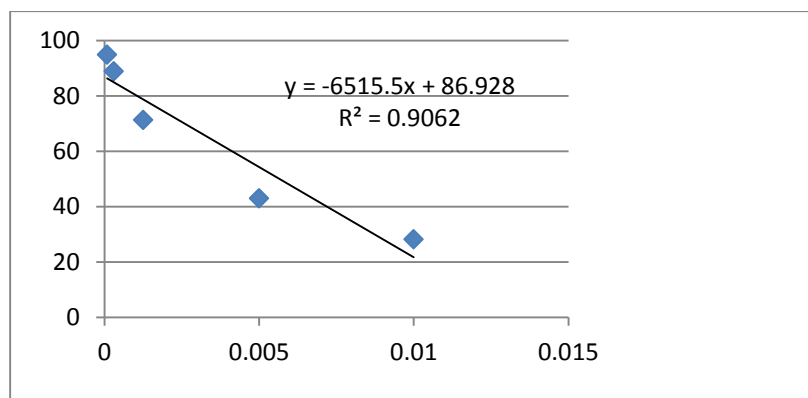


Gráfico3: Curva de calibração para a casca

Tabela 17: Concentração necessária para a diminuição de DPPH a transmitância de 50%

	Concentração	Amostra
1	0.0118	Sementes
2	0.0048	Polpa
3	0.0057	Casca

Os resultados relativos a determinação do teor de compostos fenólicos estão ilustrados nas tabelas 18, 19 e 20.

Tabela 18: Concentrações e as respectivas absorvâncias do padrão (ácido gálico)

<i>Padrão (Acido Gálico)</i>			
Replicas	Conc. Preparada g/mL	Conc. Lida no UV-Vis g/mL	Absorvância
1	0.06	0.0044	2.738
2	0.02	0.0014	1.352
3	0.008	0.00059	0.777
4	0.004	0.00029	0.280

Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de Strychnos spinosa

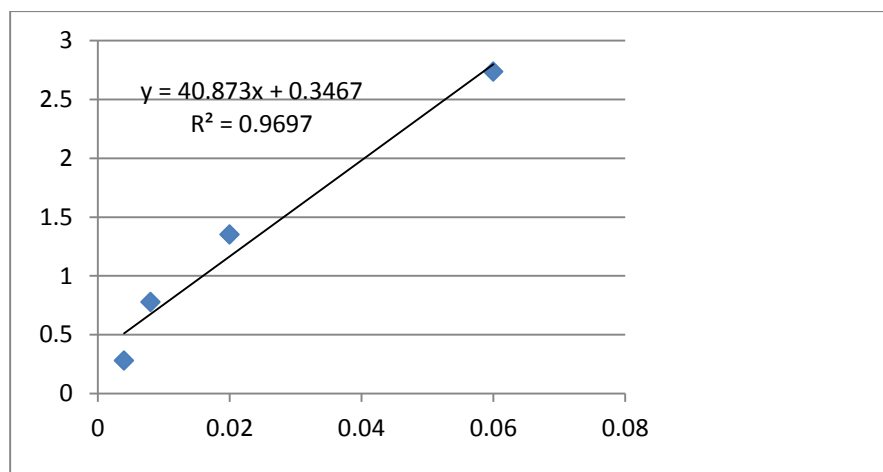


Gráfico 4: Curva de calibração de ácido gálico

Tabela 19: Concentração de compostos fenólicos nas amostras

Réplicas	Sementes	Polpa	Casca
1	0.021	0.025	0.025
2	0.022	0.024	0.023
3	0.021	0.025	0.024
4	0.020	0.026	0.024
5	0.022	0.023	0.023
6	0.020	0.024	0.024
7	0.021	0.024	0.025
8	0.021	0.025	0.023
\bar{x}	0.021	0.025	0.024
$\bar{x} \pm tc/2 * \sqrt{\frac{s}{n}}$	0.021±0.002	0.025±0.003	0.024±0.002
%RSD	3.5997	3.7789	3.4954
σ	0.000756	0.000926	0.000835

Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de Strychnos spinosa

Tabela 20: Concentração de compostos fenólicos em mg EAG

Amostras	Conc. preparada g/mL	Concentração lida g/mL	Concentração na amostra em mg EAG/g
Sementes	0.02	0.021	1057.010 ± 100.668
Polpa	0.02	0.025	1252.753 ± 150.330
Casca	0.02	0.024	1216.051 ± 101.338

Os resultados ilustrados nas tabelas 21, 22 e 23 são relativos a quantificação de flavonóides, cujas concentrações finais são expressadas em equivalente de rutina.

Tabela 21: Concentração e absorvância do padrão (Rutina)

Réplicas	Conc. de rutina em (ppm)	Absorvância
1	5	0.057
2	10	0.123
3	25	0.256
4	50	0.542

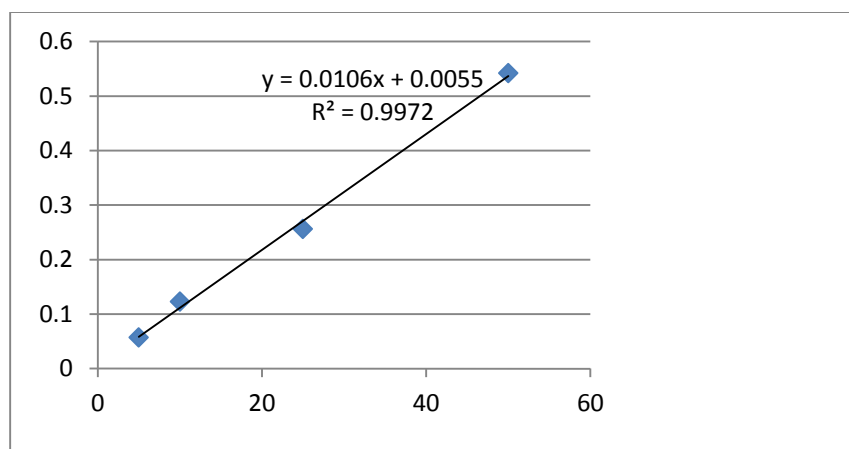


Gráfico5: Curva de calibração da rutina

Tabela 22: Concentração de flavonóides nas amostras

Réplicas	Sementes	Polpa	Casca
1	0.138	0.186	0.188
2	0.137	0.187	0.189
3	0.138	0.188	0.187
4	0.136	0.188	0.187
5	0.139	0.189	0.188
6	0.139	0.188	0.189
7	0.138	0.187	0.187
8	0.138	0.187	0.188
\bar{x}	0.138	0.188	0.188
$\bar{x} \pm tc/2 * \sqrt{\frac{s}{n}}$	0.138±0.003	0.188±0.003	0.188±0.002
%RSD	0.7188	0.4938	0.4442
Σ	0.000991	0.000926	0.000835

Tabela 23: Concentrações das amostras em mg ER

Extracto	Concentração em mg ER/g	
	MeOH 70%	Acetato de etilo
Sementes	0.138±0.003	12.075±0.263
Polpa	0.188±0.003	13.475±0.215
Casca	0.188±0.002	13.425±0.143

Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de Strychnos spinosa

Os dados da determinação do poder redutor estão ilustrados nas tabelas 24, 25 e 26.

Tabela 24: Concentração em mg equivalente ácido ascórbica

Réplicas	Sementes	Polpa	Casca
1	126.06	266.25	50.03
2	125.66	265.08	54.63
3	124.94	264.66	51.23
4	125.66	268.50	49.50
5	125.83	267.88	50.03
6	125.66	266.25	50.56
7	125.76	266.84	50.03
8	125.68	264.52	49.05
\bar{x}	125.66	266.25	50.63
$\bar{x} \pm tc/2 * \sqrt{\frac{s}{n}}$	125.66±1.12	266.25±3.98	50.63±5.58
%RSD	0.2548	0.5490	3.4386
Σ	0.320176	1.461768	1.741024

Tabela 25: Concentração e absorvância do padrão (Ácido ascórbico)

Réplicas	Ácido ascórbico em ppm	Absorvância
1	150	0.464
2	525	0.484
3	800	0.496
4	1000	0.500

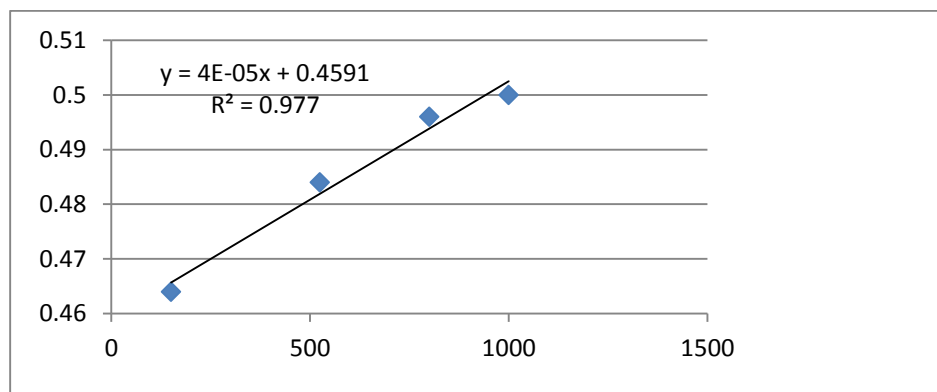


Grafico6: Curva de calibração de ácido ascórbico

7. Discussão de resultados

A composição de metabólitos secundários nas três partes da fruta da planta estudada é similar, porém com ligeiras diferenças, os dados relativos aos extractos das sementes e polpa vão de acordo com dados reportados por Neuwinger (1994) e Guambe (2012) respectivamente.

No extracto hidrometanólico, foram identificados: alcalóides, flavonóides, taninos, esteróides/triterpenóides e resinas nas sementes, polpa e casca, as antraquinonas são encontradas apenas nas sementes e casca. No extracto de éter de petróleo, só os esteróides/triterpenóides encontram-se nas três partes analisadas da fruta, os alcalóides, flavonóides, taninos e resinas foram encontrados só na casca. No extracto de acetato de etilo, os alcalóides não foram identificados em nenhuma das três amostras. Segundo Guambe (2012), na polpa encontram-se saponinas, contudo no presente trabalho não foram encontradas as saponinas e cumarinas em nenhum dos extractos, seja nas sementes, polpa ou casca. Tal facto pode resultar de vários factores como por exemplo tempo e condições de armazenamento das amostras, tratamento da amostra, condições de extracção, condições climáticas e morfologia do solo no qual as plantas estão submetidas durante o seu desenvolvimento.

De acordo com Gyan *et al.* (2013), é possível a identificação de esteróides de uma forma geral, usando uma solução de metanol em ácido sulfúrico a 10%. Na cromatografia em camada fina de extracto hidrometanólico das amostras vegetais, encontraram-se 4 manchas referentes a compostos de natureza esteroideal/triterpénica, com as colorações: castanho claro (Rf 0.26), castanho (Rf 0.39), verde-escuro (Rf 0.56) e vermelho (Rf 0.80) no extracto das sementes, 3 manchas no extracto da polpa, com as colorações: castanho-escuro (Rf 0.15), castanho (Rf 0.27), violeta (Rf 0.60) e 3 manchas no extracto da casca, com as colorações: castanho (Rf 0.35), rosa (Rf 0.40) e violeta (Rf 0.70). Um componente evidenciou-se nas sementes e casca, com a mesma coloração (castanha) apresentando Rf's próximos 0.39 e 0.35 respectivamente.

Para identificação de alcalóides na cromatografia de camada fina, foi usado o reagente de Dragendorff como revelador, onde a aparição da cor castanha indica a presença de alcalóides. Três manchas de características alcalóidicas foram encontradas nas sementes com os Rf's (0.68;

*Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de *Strychnos spinosa**

0.81; 0.87). Na polpa foram encontrados três manchas com os Rf's (0.68; 0.81; 0.87), as manchas de natureza alcaloídica observadas na polpa são semelhantes a das sementes, o que indica que alguns alcalóides encontrados na polpa também encontram-se nas sementes. E na casca, apenas um alcalóide foi identificado com o Rf 0.64.

De acordo com Monika *et al.* (2008), é possível usando reagentes específicos, diferenciar os diferentes tipos de esteróides. A identificação dos esteróides: cardenolidas, Ecdisteróides e saponinas esteroidais revelaram o mesmo resultado nas sementes, polpa e casca. Mas no caso das saponinas esteroidais, uma vez não encontradas as saponinas no teste de identificação de saponinas, deve ter havido um falso positivo, por interferência de outros esteróides que dão a mesma coloração na presença dos reveladores usados. As cardenolidas foram identificadas em todas partes da fruta, mas os alcalóides esteroidais e as withanolidas não foram encontradas em nenhuma das partes analisadas da fruta da planta.

O teor de gorduras na casca 1.3226 % foi relativamente superior ao das sementes 1.077% e polpa 0.03, % bem como o teor de alcalóides que foi 0.006, 0.002, 0.029 % respectivamente.

O teor de alcalóides totais vai de acordo com valores reportados na literatura, onde o teor de alcalóides na planta tem sido menor que 0.1%, o teor de alcalóides nas sementes é menor comparativamente ao reportado na literatura (0.009%). Porém no caso das sementes, as diferenças devem-se ao facto de, na literatura, ter se quantificado os alcalóides usando apenas o pericárpio, enquanto no presente trabalho analisou-se a semente inteira. Esse facto, condiz com vários estudos realizados em sementes da fruta de *Strychnos spinosa*, bem como de várias plantas, onde os alcalóides são normalmente encontrados no pericárpio.

A casca apresentou um conteúdo de alcalóides relativamente superior a das sementes e a da polpa. A quantidade de alcalóides na polpa, é muito baixa, confirmando que possibilidade de intoxicação pelo mesmo seja improvável (Rolfsen *et al.*, 1980), por outro lado o teor de gorduras também é muito baixo apenas 0.030%.

Na determinação de actividade antioxidante, foram usados os métodos DPPH e Poder reductor. Analisando a actividade antioxidante com DPPH, a polpa e a casca mostraram-se bem eficazes, contra a formação de radicais livres, apresentando uma concentração de 0.0048 e 0.0057 g/mL,

*Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de *Strychnos spinosa**

em relação as sementes 0.0118 g/mL. Contudo o poder redutor, mostrou diferenças significativas entre as sementes, polpa e casca, sendo que a polpa apresentava-se com maior poder redutor 266.25 ± 3.98 mg EAA/g, em seguida as sementes 125.66 ± 1.12 mg EAA e por fim a casca 50.63 ± 5.58 mg EAA.

Quanto a composição de flavonóides, a concentração desses metabólitos na polpa e na casca foi semelhante 0.188 ± 0.003 e 0.188 ± 0.002 mg ER/g para extracto hidrometanólico e 13.475 ± 0.215 mg ER/g e 13.425 ± 0.143 mg ER/g para o extracto de acetato de etilo respectivamente, valores relativamente superiores aos das sementes 0.138 ± 0.003 mg ER/g no extracto hidrometanólico e 12.075 ± 0.263 mg ER/g no extracto de acetato de etilo, explicitando o facto da quantidade de flavonóides ser expressiva no extracto de acetato de etilo em comparação ao extracto hidrometanólico. O estudo realizado por Isa *et al.* (2014), mostra que nas folhas de *Strychnos spinosa*, a quantidade de flavonóides no extracto de n-butanol é 128.87 ± 2.96 mg EQ/g.

Os compostos fenólicos foram quantificados pelo método de Folin-Ciocalteu, onde as amostras das sementes, polpa e casca deram 1057.010 ± 100.668 mg EAG/g, 1252.753 ± 150.330 mg EAG/g, 1216.051 ± 101.338 mg EAG/g.

Analisados os dados da determinação de poder redutor, teor de flavonóides e teor de compostos fenólicos totais por ANOVA UNIMODAL a um nível de confiança de 95%, revelou-se uma diferença significativa nas três partes da fruta.

O facto da casca apresentar um poder redutor relativamente baixo em comparação as outras partes da planta, tendo em conta que na composição de compostos fenólicos, flavonóides deu resultados não muito distantes das sementes e polpa, pode ser explicado pelo facto do complexo de ferro, ser reduzido por vitamina C, alguns açucares, etc., para além dos compostos fenólicos e flavonóides.

8. Conclusões

Os testes fitoquímicos qualitativos e quantitativos realizados possibilitaram a identificação de metabólitos secundários existentes nas amostras da fruta de *Strychnos spinosa*, bem como a sua quantificação. As sementes, a polpa e a casca possuem alcalóides, flavonóides, resinas, antraquinonas, taninos, e esteróides.

A casca, bem como as outras partes da fruta de *Strychnos Spinosa* apresentam-se como fonte interessante de diversos metabólitos secundários.

Na casca, predomina uma grande quantidade e variedade de metabólitos secundários, tendo dado valores elevados quase em todas as análises. O teor de compostos com actividades antioxidantes difere entre as três partes da fruta analisadas.

A quantidade de alcalóides totais é muito baixa na polpa (0,002%).

A polpa como suplemento alimentício, pode ser uma boa fonte de compostos com actividade antioxidante, dada a presença expressiva de compostos fenólicos, flavonóides e também a vitamina c.

Os metabólitos secundários identificados têm propriedades de interesse para o uso farmacológico, facto esse, que confere a *Strychnos Spinosa* um lugar no grupo das plantas terapêuticas.

9. Recomendações

Recomenda-se:

- ✚ Que se façam estudos sobre a actividade biológica da fruta, especialmente para sementes e a casca, com vista o seu aproveitamento e uso como terapêutico.

- ✚ Que se façam estudos no âmbito de identificar os alcalóides, esteróides e compostos fenólicos presentes nas sementes, polpa e casca.

- ✚ Que se façam também mais estudos sobre outras partes da planta, como o caule, as raízes e as folhas, bem como a fruta verde.

- ✚ Que se façam estudos sobre outras plantas do género *Strychnos* encontradas em Moçambique, como *Strychnos madagascariensis* (*Kwakwa*), *Strychnos henningsii* (*Manono*).

Referências bibliográficas

Anagnostopoulou, M. A., Kefalas, P., Papageorgiou, V. P., Assimopoulou, A. N., Boskou, D. D. (2006). Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). *Food Chemistry*. 14:6820-6826.

Asasa A, Oteng-Yeboah A. A., Odamtten G. T., Simmonds M. S. (2005) Ethnobotanical study of some Ghanaian antimalarial plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 2: 273-9

Barbosa, Wagner L. R., Quignard E., Tavares, Esabel C. C., Pinto, Lucianna do N. Oliveira, Franciêlda Q. O., Rodson M. (2004). *Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extractos Vegetais*. UFPA. Belém-PA. Vol.4.

Bhawani S. A., Sulaiman O. (2010). Thin-Layer Chromatographic Analysis of Steroid. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 9 (3): 301-313.

Bisset, N. G., Phillipson J. D. (1971).The African species of *Strychnos* Part II. *The Alkaloids Lloydia*. 34:1-6

Cavin, A., Hostettmann, K., Dyatmyko, W., Potterat, O. (1998). *Planta Medica*. 64:393-396

Cunha, W. R., Martins, C., Ferreira, D. D., Crotti, A. F. M., Lopes, N. P., Albuquerque, S. (2003). *Planta Medica*. 69:470-472.

DI Stasi, L. C.(1996). *Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar*. São Paulo: UNESP.

Fracaro, S.N., Deconto, I., Nakashima, T.(2004). *Potencial de toxicidade reprodutiva do extracto de Tillandsia usneoides Linnaeus, 1762 (barba-de-pau) em coelhas gestantes*. Tese de Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná-Curitiba, 60pp.

Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de Strychnos spinosa

Frederich, M., Jacquier, M. J., Thepenier, P., De Mol, P., Tits, M., Philippe, G., Delaude, C., Angenot, L., Zeches-Hanrot, M., (2002). Antiplasmodial activity of alkaloids from various *Strychnos* species. *Journal of Natural Products*. **65**:1381-1386.

Govindarajan R., Vijayakumar M., Pushpangadan P. (2005). Antioxidant approach to disease management and the role of 'Rasayana' herbs of Ayurveda, *Journal of Ethnopharmacology*. **99**: 165-178

Hoet, S., Pieters, L., Muccioli, G. G. (2007). Antitrypanosomal activity of triterpenoids and sterols from the leaves of *Strychnos spinosa* and related compounds. *Journal of Natural Products*. **70**: 1360

Hoet, S., Stevigny, C., Herent M. F., Quetin-Leclerc J.(2006). Antitrypanosomal compounds from the leave essential oil of *Strychnos spinosa*. *Planta Medica*.**5**: 480-2

Lockett, C. T., Grivetti, L. E. (2000). Food related behaviour during drought: A study of rural Fulani. *North eastern Nigeria. Int Journal of Food Science Nutrition*. **51**(2): 91-1007

Madzimure J., Nyahangare E., Hamudikuwanda H., Hove T., Belmain S., Stevenson P., Mvumi B.(2013).Efficacy of *Strychnos spinosa* (Lam.) and *Solanum incanum* L. aqueous fruit extracts against cattle ticks. *Journal of science daily*. **45**(6):1341-7

Matos, F. J. A. (1997). *Introdução à Fitoquímica Experimental*. 2a ed. Fortaleza edições UFC. 141 pp.

Monika W., Joseph S., Teresa K., (2008). *The Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*. Volume 99.

Neuwinger, H. D. (1994). *Afrikanische Arzneipflanzen und Jagdgifte WGV Stuttgart*. 539 pp.

Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de Strychnos spinosa

Ohiri, F. C., Verpoorte R., Svendsen A. B. (1984). 12-Hydroxy-II-methoxy-diabolin: A new alkaloid from *Strychnos spinosa*. *Planta Medica*. **50** (5): 446-7

Orwa, C., Mutua A., Kindt R. R., Jamnadass, Simons A. (2009). *Agroforestry Base de dados: uma referência árvore e guia de selecção*. Versão 4.0.

Rolfesen W. N. A., Olaniyi A. A. (1980). New tertiary alkaloids of *Strychnos decussata* Lloydia. *Journal of Natural Products*. **43**: 97-102

Silva, K.L. & Cechinel filho, V. (2002) Plantas do gênero Bauhinia: composição química e potencial farmacológico. *Química Nova*: 449-454

Simões, C. Marcos, O. (2001). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3 ed. Porto Alegre: Ed. UFSC.

Thongphasuk, P., Suttisri, R., Bavovada, R. and Verpoorte, R. (2003). Alkaloids and a pimarane diterpenoid from *Strychnos vanprukii*. *Phytochemistry*. **64**: 897-901.

Waterman, P. G. & Mole, S. (1994). Analysis of Phenolic Plant Metabolites. *Blackwell Scientific Publications*, 238.

Anexos

Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de Strychnos spinosa

Preparação de reagentes

Reagente de Mayer:

Misturaram-se 1,36 g HgCl₂ / 60 mL de água e 5 g de KI / 10 mL de água. Diluiu-se a 100 mL.

Reagente de Dragendorff:

Solução A: dissolveu-se 1,7 g de nitrato de bismuto (III) e 20 g de ácido tartárico em 80 mL de água.

Solução B: dissolveu-se 16 g de iodeto de potássio em 40 mL de água.

Reagente: misturaram-se partes iguais de A e B.

Solução de cloreto férrico:

1. Preparou-se uma solução 5% de cloreto férrico em etanol.
2. Preparou-se uma solução de 0.1 M em água destilada

Solução de ferricianeto de potássio

Preparou-se um a solução de 0.08 M em MeOH.

Reagente de Liebermann- Burchard:

Misturou-se 10 mL de anidrido acético e duas gotas de ácido sulfúrico concentrado.

Reagente de Salkowski: Ácido sulfúrico concentrado.

Reagente de Bornträger:

Preparou-se uma solução de NaOH a 5% em água.

Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de Strychnos spinosa

Tabelas

Tabela 26: Procedimento usado para a determinação da acção de captura do radical livre DPPH

Replicas	Volume em mL			Conc. Da Amostra vegetal em g/mL
	DPPH	MeOH	Amostra	
1	2	1	1	0.04
2	2	1	1	0.02
3	2	1	1	0.01
4	2	1	1	0.005
5	2	1	1	0.0025
Branco	2	2	0	0

Efectuou-se o procedimento para o extracto das sementes, polpa e casca.

Tabela 27: Procedimento usado para a determinação de teor de compostos fenólicos totais

Replicas	Volume em (mL)				Conc. de acido gálico em g/mL
	Folin-ciocalteu	H ₂ O	Na ₂ CO ₃	Acido gálico	
1	0.25	5	1	0.5	0.06
2	0.25	5	1	0.5	0.02
3	0.25	5	1	0.5	0.008
4	0.25	5	1	0.5	0.004
Branco	0.25	5.5	1	0	0

O mesmo procedimento foi usado para a análise das amostras de sementes, polpa e casca, preparadas a uma concentração de 0.04 g/mL.

Avaliação da composição fitoquímica e actividade antioxidante das sementes, polpa e casca da fruta de Strychnos spinosa

Tabela28: Procedimento usado para a determinação de teor de flavonóides

Replicas	Volume em (mL)			Conc. de rutina preparada (ppm)
	AlCl ₃	ETOH	Rutina	
1	0.5	2.5	0.5	5
2	0.5	2.5	0.5	10
3	0.5	2.5	0.5	25
4	0.5	2.5	0.5	50
Branco	0.5	3	0	0

O mesmo procedimento foi usado para a análise das amostras de sementes, polpa e casca, preparadas a uma concentração de 0.04 g/mL.

Tabela 29: Procedimento usado para a determinação do poder redutor

Replicas	Volume em mL				Conc. de acido ascórbico preparada (ppm)
	FeCl ₃	H ₂ O	K ₄ [Fe(CN) ₆]	Acido ascórbico	
1	1	8.5	1	0.5	150
2	1	8.5	1	0.5	525
3	1	8.5	1	0.5	800
4	1	8.5	1	0.5	1000
Branco	1	9	1	0	0

O mesmo procedimento foi usado para a análise das amostras de sementes, polpa e casca, preparadas a uma concentração de 0.04 g/mL.