



FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
CURSO DE QUÍMICA AMBIENTAL

TRABALHO DE LICENCIATURA

**Análise fitoquímica e avaliação da actividade antioxidante  
dos extractos do fruto de *Tabernaemontana elegans***



---

**Autor:** Alexandre Jorge Muchanga

Maputo, Julho de 2024



FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
CURSO DE QUÍMICA AMBIENTAL

TRABALHO DE LICENCIATURA

## **Análise fitoquímica e avaliação da actividade antioxidante dos extractos do fruto de *Tabernaemontana elegans***



**Autor:** Alexandre Jorge Muchanga

---

**Supervisor:** Prof. Doutor François Munyemana

**Co-supervisores:** Mestre Amélia Furvela  
Mestre Isménio Nhaca

Maputo, Julho de 2024

# DEDICATÓRIA

Dedico este Trabalho à minha família, especialmente à minha Mãe

**Patrícia Paloma Sina Simão Chongo**

que me acompanha em todas questões académicas e sociais,  
desde o meu primeiro dia de vida até hoje.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar agradeço a Deus pela vida, amparo nos momentos difíceis e por me proporcionar a transformação de um sonho em realidade.

Um sincero e precioso agradecimento aos meus supervisores Prof. Doutor François Munyemana, Mestre Amélia Furvela e Mestre Isménio Nhaca pela grandeza do trabalho que têm desenvolvido, especialmente pelo extraordinário esforço, carinho e paciência que tiveram de me orientar aquando da execução deste trabalho.

Um agradecimento especial aos meus pais Jorge Alexandre Muchanga e Patrícia Paloma Sina Simão Bento Chongo, a todos os meus irmãos de sangue e ao meu avô Alexandre Muchanga, que sempre se sacrificaram e acreditaram em mim e em meus sonhos, o vosso apoio foi determinante para a obtenção desse nível.

Agradeço imensamente ao Mestre Silvestre Muiambo e ao Mestre Jaime Cumbe pela mestria, confiança e amizade que me proporcionaram sobre o ambiente laboratorial, aprendi muito.

Ao Mestre Miguel Ernesto e ao Mestre Paulo Cumbane pela mestria, ensinamentos e pelos conselhos, direciono os meus sinceros agradecimentos.

Aos meus tios Celso Jonas Machava e Gércio Jonas Machava vai o meu muito obrigado pela força e apoio que me concederam desde o primeiro dia da minha estadia na cidade de Maputo até hoje.

Aos meus colegas e amigos Rogério Matsinhe, Eugénio Tembe, Moisés António e Gerson Machel pela amizade, companheirismo e auxílio inigualáveis em todos os aspectos.

Aos meus colegas Artur Bila, Francisco Boane, Melvis Ussene, Tânia Manguenzi, Nasiah Gentivo, Deolinda Domingos, Nilsa Vicente e Aires Bulo agradeço bastante pela amizade e companhia que me fizeram durante a execução do curso.

Agradeço à Isabel Chichango e à Jovita Amadeu pelo companheirismo e cumplicidade.

Agradeço ao Instituto Superior de Ciências e Tecnologia de Moçambique (ISCTEM), pela disponibilização do laboratório de química.

Nada no mundo se compara à persistência. Nem o talento

Não há nada mais comum do que homens malsucedidos e com talento. Nem a genialidade

A existência de gênios não recompensados é quase um provérbio. Nem a educação

O mundo está cheio de pessoas negligenciadas, porém formadas. A persistência e determinação são, por si só, onipotentes.

*John Calvin Coolidge*

## **DECLARAÇÃO DE HONRA**

Eu, Alexandre Jorge Muchanga, declaro por minha honra que esta monografia é da minha autoria, nunca foi apresentada na sua essência para quaisquer fins e constitui fruto da minha investigação, elaborada com uso de recursos dos quais faço a devida indicação ao longo do texto e no capítulo de referências bibliográficas, todas as fontes por mim consultadas.

O autor

---

Alexandre Jorge Muchanga

Maputo, Julho de 2024

# ÍNDICE

|  |          |
|--|----------|
| ÍNDICE DE TABELAS.....   | X        |
| ÍNDICE DE FIGURAS.....   | XI       |
| ÍNDICE DE ANEXOS.....  | XII      |
| RESUMO.....  | XIII     |
| ABSTRACT.....  | XIV      |
| LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS .....  | XV       |
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>1</b> |
| 1.1. Objectivos .....  | 2        |
| 1.1.1. Objectivo geral.....  | 2        |
| 1.1.2. Objectivos específicos .....  | 2        |
| <b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>  | <b>3</b> |
| 2.1. Distribuição geográfica de <i>Tabernaemontana elegans</i> .....                       | 3        |
| 2.2. Descrição botânica e classificação taxonómica de <i>Tabernaemontana elegans</i> ..... | 3        |
| 2.3. Ecologia de <i>T. elegans</i> .....   | 5        |
| 2.4. Composição fitoquímica das plantas do género <i>Tabernaemontana</i> .....             | 5        |
| 2.4.1. Composição fitoquímica de <i>Tabernaemontana elegans</i> .....                      | 6        |
| 2.5. Actividades biológicas das espécies do género <i>Tabernaemontana</i> .....            | 8        |
| 2.5.1. Actividades biológicas de <i>T. elegans</i> .....                                   | 11       |
| 2.6. Antioxidantes .....   | 12       |
| 2.6.1. Doenças relacionadas ao estresse oxidativo no organismo humano.....                 | 13       |
| 2.6.2. Classificação de antioxidantes e principais fontes de antioxidantes naturais .....  | 13       |
| 2.6.3. Métodos de avaliação de actividade antioxidante.....                                | 14       |
| 2.6.4. Compostos fenólicos.....  | 15       |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.7. Extracção de compostos bioactivos das espécies vegetais ..... | 16        |
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>                                | <b>18</b> |
| 3.1. Colecta e preparação do material botânico .....               | 18        |
| 3.2. Solventes e reagentes químicos .....                          | 18        |
| 3.3. Preparação dos reveladores para TLC .....                     | 19        |
| 3.4. Preparação dos extractos .....                                | 20        |
| 3.4.1. Extractos brutos .....                                      | 20        |
| 3.4.2. Fracções do extracto bruto .....                            | 20        |
| 3.4.3. Fracção alcaloídica.....                                    | 20        |
| 3.5. Análise fitoquímica qualitativa .....                         | 23        |
| 3.5.1. Análise fitoquímica preliminar .....                        | 24        |
| 3.5.2. Análise fitoquímica por cromatografia de camada fina .....  | 25        |
| 3.5.3. Análise por GC-MS .....                                     | 27        |
| 3.6. Análise fitoquímica quantitativa .....                        | 27        |
| 3.6.1. Determinação do teor de fenóis totais.....                  | 27        |
| 3.6.2. Determinação do teor de flavonóides totais.....             | 28        |
| 3.6.3. Determinação do teor de carboidratos .....                  | 29        |
| 3.6.4. Determinação do teor de lípidos .....                       | 29        |
| 3.6.5. Determinação do teor de alcalóides .....                    | 30        |
| 3.7. Determinação de actividade antioxidante <i>in vitro</i> ..... | 31        |
| 3.7.1. Método de eliminação do radical DPPH.....                   | 31        |
| 3.7.2. Método de redução de ião férrico (FRAP).....                | 32        |
| 3.7.3. Método de redução do ácido fosfomolibdico.....              | 32        |
| <b>4. RESULTADOS .....</b>   | <b>34</b> |



|   |           |
|---|-----------|
| 4.1. Análise fitoquímica qualitativa .....  | 34        |
| 4.1.1. Análise fitoquímica preliminar .....   | 34        |
| 4.1.2. Análise fitoquímica por cromatografia em camada fina.....  | 35        |
| 4.1.3. Análise por GC-MS .....  | 39        |
| 4.2. Análise fitoquímica quantitativa .....   | 43        |
| 4.3. Actividade antioxidante <i>in vitro</i> .....  | 43        |
| 4.4. Correlação entre a actividade antioxidante e o teor de fenóis totais, flavonóides totais e alcalóides..... | 45        |
| 4.5. Análise estatística.....   | 45        |
| <b>5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS .....</b>  | <b>46</b> |
| 5.1. Análise fitoquímica.....   | 46        |
| 5.1.1. Análise fitoquímica qualitativa .....  | 46        |
| 5.1.2. Análise fitoquímica quantitativa .....   | 53        |
| 5.2. Correlação de Pearson.....   | 55        |
| 5.3. Actividade antioxidante <i>in vitro</i> .....  | 56        |
| 5.3.1. Método de eliminação do radical DPPH.....  | 56        |
| 5.3.2. Método de poder de redução do ião férrico (FRAP).....  | 56        |
| 5.3.3. Método de redução do ácido fosfomolíbico.....  | 57        |
| <b>6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....</b>   | <b>59</b> |
| 6.1. Conclusões .....   | 59        |
| 6.2. Recomendações.....   | 60        |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>  | <b>61</b> |
| <b>ANEXOS.....</b>  | <b>A</b>  |

## ÍNDICE DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1: Eluentes e reveladores utilizados na análise por TLC .....  | 26 |
| Tabela 2: Resultados da análise fitoquímica preliminar dos extractos brutos e fracções do fruto de <i>T. elegans</i> .....  | 34 |
| Tabela 3: Rfs da análise por TLC do EBPV e suas fracções do fruto de <i>T. elegans</i> .....  | 36 |
| Tabela 4: Rfs da análise por TLC do EBCM e suas fracções do fruto de <i>T. elegans</i> .....  | 37 |
| Tabela 5: Rfs da análise por TLC do EBPM e suas fracções do fruto de <i>T. elegans</i> .....  | 38 |
| Tabela 6: Rfs da análise por TLC do EBSM e suas fracções do fruto de <i>T. elegans</i> .....  | 38 |
| Tabela 7: Rfs da análise por TLC do EBCV e suas fracções do fruto de <i>T. elegans</i> .....  | 39 |
| Tabela 8: Alcalóides identificados na análise fitoquímica por GC-MS das fracções alcaloídicas de EBCV, EBCM e EBSM do fruto de <i>T. elegans</i> .....  | 40 |
| Tabela 9: Resultados da análise fitoquímica quantitativa dos fenóis totais, flavonóides totais, alcalóides, carboidratos e lípidos de EBCV, EBCM, EBPM e EBSM do fruto de <i>T. elegans</i> ... | 43 |
| Tabela 10: Resultados da actividade antioxidante dos extractos brutos e fracções alcaloídicas pelo método de DPPH.....  | 44 |
| Tabela 11: Resultados da actividade antioxidante dos extractos brutos pelo método FRAP.....   | 44 |
| Tabela 12: Resultados da actividade antioxidante das fracções alcaloídicas pelo método FRAP   | 44 |
| Tabela 13: Resultados da actividade antioxidante dos extractos brutos pelo método de redução do ácido fosfomolibdico .....  | 44 |
| Tabela 14: Resultados da actividade antioxidante das fracções alcaloídicas pelo método de redução do ácido fosfomolibdico .....   | 45 |
| Tabela 15: Valores dos coeficientes de correlação entre a actividade antioxidante e o teor de fenóis, flavonóides e alcalóides de EBCV, EBCM, EBPM e EBSM do fruto de <i>T. elegans</i> .....   | 45 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1: Mapa ilustrativo da distribuição mundial de <i>T. elegans</i> .....   | 3  |
| Figura 2: Ilustração de <i>T. elegans</i> .....   | 4  |
| Figura 3: Ilustração do fruto e folhas de <i>T. elegans</i> .....   | 5  |
| Figura 4: Ilustração estrutural dos alcalóides beta-carbolina identificados de <i>T. elegans</i> .....  | 7  |
| Figura 5: Ilustração estrutural de alguns alcalóides corinante identificados de <i>T. elegans</i> .....   | 7  |
| Figura 6: Ilustração de alguns alcalóides bisindólicos identificados de <i>T. elegans</i> .....   | 7  |
| Figura 7: Ilustração estrutural de alguns compostos fenólicos comuns.....   | 16 |
| Figura 8: Imagens ilustrativas da secagem da casca (A), polpa (C) e sementes (B) do fruto de <i>Tabernaemontana elegans</i> .....   | 18 |
| Figura 9: Imagens ilustrativas do processo de maceração da polpa verde (A) e partição do extracto aquoso com clorofórmio (B).....   | 21 |
| Figura 10: Imagem ilustrativa do processo de evaporação do solvente de extracção.....   | 21 |
| Figura 11: Fluxograma do processo de obtenção dos extractos brutos e suas fracções.....   | 22 |
| Figura 12: Fluxograma do processo de obtenção dos extractos secos de alcalóides.....  | 23 |
| Figura 13: Estruturas dos compostos identificados por GC-MS na fracção alcaloídica das sementes maduras.....  | 41 |
| Figura 14: Estruturas dos compostos identificados por GC-MS na fracção alcaloídica da casca verde (compostos 10 a 15) e na fracção alcaloídica da casca madura (compostos 13 a 15)..... | 42 |

## ÍNDICE DE ANEXOS

|  |          |
|--|----------|
| <b>Anexo A: correlação entre fenóis totais, flavonóides totais, alcalóides e actividade antioxidante .....</b> | <b>A</b> |
| <b>Anexo B: análise fitoquímica quantitativa .....</b>   | <b>G</b> |
| <b>Anexo C: actividade antioxidante.....</b>   | <b>U</b> |

## RESUMO

A *Tabernaemontana elegans* pertence à família *Apocynaceae* e é usada na medicina tradicional para o tratamento de diversas doenças, incluindo doenças pulmonares, doenças por infecção bacteriana e fúngica. Contudo, poucas investigações científicas visando determinar o potencial terapêutico do seu fruto foram publicadas até então. O objectivo do trabalho foi avaliar a composição fitoquímica e a actividade antioxidante *in vitro* dos extractos hidrometanólicos brutos e suas respectivas fracções de n-hexano, clorofórmio, acetato de etilo, n-butanol e resíduo aquoso, das sementes maduras, casca verde, casca madura, polpa verde e polpa madura do fruto de *Tabernaemontana elegans*.

As análises fitoquímicas qualitativa e quantitativa foram realizadas usando métodos padrão e a actividade antioxidante estimada por ensaios com 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), ácido fosfomolibdico e solução de ião férrico (FRAP).

A análise qualitativa revelou a presença de flavonóides e esteróides em todas as partes do fruto, alcalóides em todas excepto na polpa madura. Da análise por GC-MS das fracções alcaloídicas identificou-se 18 alcalóides, 9 nas sementes maduras, 6 na casca verde e 3 na casca madura. O extracto bruto das sementes maduras apresentou o maior teor de fenóis totais ( $46,002 \pm 0,327$  mgEAG/g) e lípidos ( $429,442 \pm 1,856$  mgEOS/g), o extracto bruto da casca verde apresentou o maior teor de flavonóides totais ( $26,521 \pm 2,027$  mgER/g) e alcalóides ( $27,592 \pm 1,590$  mgEE/g) e o extracto bruto da polpa madura apresentou maior teor de carboidratos ( $831,759 \pm 3,275$  mgEA/g). O extracto bruto da casca verde apresentou maior actividade antioxidante no ensaio com 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) ( $IC_{50} = 56,743 \pm 0,832$   $\mu$ g/mL) e com solução de ião férrico (FRAP) ( $71,083 \pm 2,847$   $\mu$ M equivalentes de  $Fe^{2+}$ ), enquanto o extracto bruto das sementes maduras apresentou maior actividade antioxidante no ensaio com ácido fosfomolibdico ( $16,069 \pm 1,387$   $\mu$ g/mL equivalentes de ácido ascórbico). As fracções alcaloídicas apresentaram maior actividade antioxidante no ensaio com solução de ião férrico e com ácido fosfomolibdico. As fracções alcaloídicas também apresentaram correlação muito forte entre o teor de alcalóides e a actividade antioxidante no ensaio com 1,1-difenil-2-picrilhidrazil e com solução de ião férrico. Os resultados sugerem que o fruto de *T. elegans* é promissor como fonte de antioxidantes, o que pode justificar o seu uso na medicina tradicional para o tratamento de cancro.

**Palavras-chave:** *Tabernaemontana elegans*, fitoquímica, fenóis, antioxidantes, alcalóides indólicos.

## ABSTRACT

*Tabernaemontana elegans* belongs to the *Apocynaceae* family and is used in traditional medicine for the treatment of various diseases, including lung diseases, bacterial and fungal infections. However, few scientific investigations aimed to determination of therapeutic potential of its fruit have been published so far. The aim of this work was to evaluate the phytochemical composition and the in vitro antioxidant activity of the crude hydromethanolic extracts and their respective fractions of n-hexane, chloroform, ethyl acetate, n-butanol, and aqueous residue, from ripe seeds, green bark, ripe bark, green pulp, and ripe pulp of the *Tabernaemontana elegans* fruit.

Qualitative and quantitative phytochemical analyses were performed using standard methods, and antioxidant activity was estimated by assays with DPPH, phosphomolybdic acid, and FRAP solutions.

Qualitative analysis revealed the presence of flavonoids and steroids in all parts of the fruit and alkaloids in all parts except on ripe pulp. GC-MS analysis of the alkaloidal fractions identified 18 alkaloids, 9 in ripe seeds, 6 in green bark and 3 in ripe bark. The crude extract of ripe seeds showed the highest levels of total phenols ( $46.002 \pm 0.327$  mgEGA/g) and lipids ( $429.442 \pm 1.856$  mgESO/g), the crude extract of green bark showed the highest levels of total flavonoids ( $26.521 \pm 2.027$  mgER/g) and alkaloids ( $27.592 \pm 1.590$  mgES/g), and the crude extract of ripe pulp showed a higher content of carbohydrates ( $831.759 \pm 3.275$  mgES/g). The crude extract of green bark showed higher antioxidant activity in the DPPH assay ( $IC_{50} = 56.743 \pm 0.832$   $\mu$ g/mL) and with FRAP solution ( $71.083 \pm 2.847$   $\mu$ M of  $Fe^{2+}$  equivalents), while the crude extract of ripe seeds showed higher antioxidant activity in the phosphomolybdic acid assay ( $16.069 \pm 1.387$   $\mu$ g/mL of ascorbic acid equivalents). The alkaloidal fractions showed higher antioxidant activity in the assay with ferric ion solution and with phosphomolybdic acid. The alkaloidal fractions also exhibited a very strong correlation between alkaloid content and antioxidant activity in the assay with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl and with ferric ion solution.

The results suggest that *T. elegans* fruit is promising as a source of antioxidants, which may justify its use in traditional medicine for cancer treatment.

**Keywords:** *Tabernaemontana elegans*, phytochemistry, phenols, antioxidants, indole alkaloids.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS

|                  |   |  |
|------------------|---|--|
| ÁA               | – | Ácido ascórbico  |
| AAc              | – | Ácido acético  |
| Abs              | – | Absorvância  |
| ABTS             | – | <i>2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)</i>     |
| Ác. Fosf.        | – | Ácido fosfomolíbico  |
| AcOEt            | – | Acetato de etilo   |
| Aq               | – | Aquoso/a   |
| CAT              | – | Catalase   |
| CIM              | – | Concentração inibitória mínima                                     |
| CUPRAC           | – | <i>Cupric reducing antioxidant capacity</i>                        |
| CV               | – | Coeficiente de variação  |
| DCM              | – | Diclorometano  |
| DP               | – | Desvio Padrão  |
| DPPH             | – | 1,1-Difenil-2-picrilhidrazil                                       |
| EB               | – | Extracto bruto   |
| EBCM             | – | Extracto bruto da casca madura                                     |
| EBCV             | – | Extracto bruto da casca verde                                      |
| EBPM             | – | Extracto bruto da polpa madura                                     |
| EBPV             | – | Extracto bruto da polpa verde                                      |
| EBSM             | – | Extracto bruto das sementes maduras                                |
| eq.              | – | Equivalente  |
| FACV             | – | Fracção alcaloídica da casca verde                                 |
| FACV             | – | Fracção alcaloídica da casca madura                                |
| FASM             | – | Fracção alcaloídica das sementes maduras                           |
| FRAP             | – | <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>                           |
| GC-MS            | – | <i>Gas chromatography-mass spectrometry</i>                        |
| IC <sub>50</sub> | – | Concentração inibitória de 50%                                     |
| LDL              | – | <i>Low-density lipoprotein</i>                                     |
| MeOH             | – | Metanol  |
| mgEA/g           | – | Miligramas equivalentes de amido por grama do extracto seco        |
| mgEAG/g          | – | Miligramas equivalentes de ácido gálico por grama do extracto seco |
| mgEE/g           | – | Miligramas equivalentes de estricnina por grama do extracto seco   |
| mgEOS/g          | – | Miligramas equivalentes de óleo de soja por grama do extracto seco |
| mgER/g           | – | Miligramas equivalentes de rutina por grama do extracto seco       |
| nBuOH            | – | n-Butanol  |
| nHex             | – | n-Hexano   |
| ORAC             | – | <i>Oxygen radical absorbance capacity</i>                          |
| Rf               | – | Factor de retenção   |
| SI               | – | <i>Selectivity index</i>   |
| SOD              | – | Superóxido dismutase   |
| TBARS            | – | <i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>                     |
| TLC              | – | <i>Thin-layer chromatography</i>                                   |
| TPTZ             | – | 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina                                   |
| TRAP             | – | <i>Total reactive antioxidant potential</i>                        |
| UV               | – | Ultravioleta   |
| UV-Vis           | – | Ultravioleta-Visível   |

# 1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais têm sido usadas por milhares de anos pelo mundo inteiro para prevenção e tratamento de vários tipos de enfermidades, assim como fonte de metabólitos biologicamente activos (Zimila *et al.*, 2020). A medicina tradicional continua a ser o sistema de saúde mais acessível, particularmente nas áreas rurais onde a cobertura dos sistemas de saúde é escassa, deficiente ou inexistente. Actualmente, 80% da população mundial depende de fitoterápicos para cuidar da saúde (Maridass e De Britto, 2008). Em Moçambique, no entanto, aproximadamente 90% da população em zonas rurais usa as plantas medicinais para saúde (Zimila *et al.*, 2020).

As espécies do género *Tabernaemontana* pertencem à família *Apocynaceae*, que compreende 110 espécies das quais 99 estão extensivamente distribuídas em África, Ásia, América do Norte, Ilhas do Pacífico e América do Sul, e 5 na China (Ping-tao *et al.*, 1995; Schmelzer e Gurib-Fakim, 2008). Em Moçambique, encontra-se principalmente a *Tabernaemontana elegans*, *Tabernaemontana ventricosa* e *Tabernaemontana stapfiana* (Da Silva *et al.*, 2004). Muitos estudos fitoquímicos e farmacológicos foram feitos no género *Tabernaemontana* e, de acordo com dados experimentais, todas as espécies investigadas são muito ricas em alcalóides indólicos e bisindólicos monoterpénicos. Além de alcalóides, foram identificados também terpenos, lactonas, compostos fenólicos, esteróides e triterpenóides (Naidoo *et al.*, 2021). Estes metabólitos possuem relação directa com a actividade farmacológica exibida pelas espécies deste género. Espécies como *Tabernaemontana crassa*, *Tabernaemontana catharinensis*, *Tabernaemontana divaricata* e *Tabernaemontana elegans* foram investigadas (Naidoo *et al.*, 2021; Schmelzer e Gurib-Fakim, 2008).

A *Tabernaemontana elegans* é muito usada na medicina tradicional Moçambicana, Sul-Africana, Zimbabueana e Tanzaniana. O látex é usado para prevenir sangramento, as raízes são usadas para tratar problemas pulmonares e dores do peito, as sementes e a casca do tronco são usadas para tratar problemas cardíacos e cancro, o fruto é usado para tratar cancro. Além de um possível efeito medicinal, a polpa do fruto maduro é fonte de alimentação em algumas regiões de Moçambique e Zimbabué (Schmelzer e Gurib-Fakim, 2008; Pallant *et al.*, 2012).



Muitos estudos fitoquímicos e farmacológicos sobre as raízes e folhas e alguns sobre a casca do caule de *Tabernaemontana elegans* foram realizados (Fouche *et al.*, 2021; Luo *et al.*, 2011; Mansoor *et al.*, 2009a; Mansoor *et al.*, 2009b; Netshiluvhi, 1996; Pallant *et al.*, 2012; Paterna *et al.*, 2016; Steenkamp *et al.*, 2007; Van Der Heijden *et al.*, 1986), conforme será detalhado nas próximas secções. Entretanto, poucos estudos sobre o seu fruto foram publicados.

Uma compreensão da associação entre os usos medicinais e os componentes activos presentes no fruto de *Tabernaemontana elegans*, seria de suma importância para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas mais eficazes para uma ampla gama de doenças que assolam os seres humanos. No entanto, apesar da sua comprovada importância farmacológica na medicina tradicional, a base científica responsável pelas propriedades curativas do fruto de *Tabernaemontana elegans* ainda falta na literatura. Portanto, o presente trabalho tem como objectivo identificar os metabólitos biologicamente activos e avaliar as propriedades antioxidantes *in vitro* dos extractos hidrometanólicos e suas fracções do fruto de *Tabernaemontana elegans*.

## **1.1. Objectivos**

### **1.1.1. Objectivo geral**

Analisar a composição fitoquímica e avaliar a actividade antioxidante *in vitro* dos extractos hidrometanólicos do fruto de *Tabernaemontana elegans* e suas fracções.

### **1.1.2. Objectivos específicos**

Realizar análise fitoquímica qualitativa dos extractos brutos de casca verde, casca madura, polpa verde, polpa madura e sementes maduras do fruto de *T. elegans* e suas fracções;

Determinar o teor de fenóis totais, flavonóides, alcalóides, carboidratos e lípidos dos extractos brutos da casca verde, casca madura, polpa madura e sementes maduras do fruto de *T. elegans*;

Determinar a actividade antioxidante *in vitro* dos extractos brutos de casca verde, casca madura, polpa madura e sementes maduras do fruto de *T. elegans* e suas fracções, por diferentes métodos;

Estabelecer uma relação entre a actividade antioxidante dos extractos brutos e fracções e a composição fitoquímica quantitativa.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Distribuição geográfica de *Tabernaemontana elegans*

As espécies do género *Tabernaemontana* estão extensivamente distribuídas por quase todo o mundo. O género compreende 110 espécies, 99 estão distribuídas em África, Ásia, América do Norte, Ilhas do Pacífico e América do Sul. 5 das espécies são encontradas na China e 18 em África, sendo 15 delas distribuídas maioritariamente em Madagáscar (Ping-tao *et al.*, 1995; Schmelzer e Gurib-Fakim, 2008). Em Moçambique, encontra-se a *Tabernaemontana elegans*, a *Tabernaemontana ventricosa* e a *Tabernaemontana stapfiana*. A *T. elegans* é nativa da África Oriental tropical até África do Sul e Suazilândia. Ela é mais comumente encontrada ao longo das margens dos rios, em florestas costeiras e em florestas de savana (Da Silva *et al.*, 2004), conforme mostra a figura 1.

#### Nomes vernaculares de *T. elegans*:

Zulo: umKhahlwana/umKhadlu

Tsonga: Catchlo/Nkatcho

Shona: Muchanga

Português: Árvore do sapo

Inglês: Toad tree

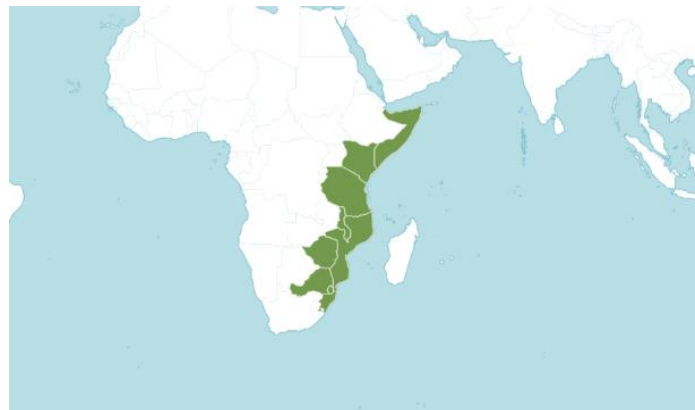


Figura 1: Mapa ilustrativo da distribuição mundial de *T. elegans*.

Fonte: <https://www.gbif.org>

### 2.2. Descrição botânica e classificação taxonómica de *Tabernaemontana elegans*

A *Tabernaemontana elegans*, também antigamente designada *Conopharyngia elegans* ou *Leptopharyngia elegans*, é uma espécie arbustiva ou pequena árvore. A casca é bronzeada, cortiça

e profundamente fissurada. Todas as partes da planta não têm pêlos e quando danificadas produzem látex branco leitoso. As folhas são opostas, elípticas, coriáceas, verde escuro brilhante, geralmente sem pêlos em ambas as superfícies, com 12-23 veias laterais de cada lado da nervura central, rectas, mas curvadas perto da margem. As flores apresentam-se como corimbos frondosos, corola branca, creme ou amarelo pálido, docemente perfumadas. A imagem de *T. elegans* é mostrada na tabela 1. Os frutos apresentam-se em pares espalhados de vagens obliquamente ovóides, bicudas, cada uma com até 8 cm, glaucas ou verdes, cobertas por verrugas marrons pálidas. Cada inflorescência consiste em muitas flores brancas e perfumadas e é suportada por um pedúnculo de 30 a 50 mm de comprimento (Schmelzer e Gurib-Fakim, 2008).

Os frutos apresentam-se em pares e são subglobosos, com casca verde coberta por verrugas pálidas. Cada fruto tem 60 a 70 mm de comprimento e 40 a 50 mm de largura, com duas cristas laterais e uma dorsal. São coriáceas a lenhosas, com uma parede de 5 a 15 mm de espessura. Quando maduras, elas abrem-se de um lado, muitas vezes ainda na árvore, exibindo a polpa amarelada no interior, como mostra a figura 2. Cada fruto com a sua casca verde e verrugosa assemelha-se a um sapo, dando origem ao nome comum de árvore de sapo. Incrustadas na polpa amarela estão numerosas sementes marrons escuras de 14 a 17 mm de comprimento e 7 a 9 mm de largura (Schmelzer e Gurib-Fakim, 2008).



Reino: Plantae

Filo: Tracheophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Gentianales

Família: Apocynaceae

Género: Tabernaemontana Plum. Ex L.

Espécie: Tabernaemontana elegans stapf

Figura 2: Ilustração de *T. elegans*.

Fonte: <https://www.randomharvest.co.za>

A figura 2 ilustra o fruto e folhas de *T. elegans*. Conforme descrito acima, quando o fruto amadurece abre-se de modo a expor a sua polpa adsorvida nas sementes:



Figura 3: Ilustração do fruto e folhas de *T. elegans*.

Fonte: <https://tsevele.co.mz>

### **2.3. Ecologia de *T. elegans***

A *T. elegans* é caducifólia, perdendo a maior parte das suas folhas durante o inverno. A polpa madura do fruto é consumida por pessoas, macacos, babuínos, rinocerontes, calaus e barbets-de-orelha-branca. As sementes germinam prontamente e é uma planta de crescimento relativamente rápido. Faz parte da vegetação sucessional precoce em savana subtropical e floresta costeira ao longo da costa leste da África Austral. Foi registada entre os arbustos que são os primeiros a colonizar campos de algodão não cultivados em Moçambique (Schmelzer e Gurib-Fakim, 2008).

### **2.4. Composição fitoquímica das plantas do género *Tabernaemontana***

As espécies do género *Tabernaemontana* detêm um conteúdo profusamente alto de alcalóides, geralmente exibindo actividade farmacológica. Além disso, os alcalóides indólicos e bisindólicos monoterpénicos são as principais classes de alcalóides dentro do género. Mais de 67 espécies foram investigadas para alcalóides indólicos, onde se isolou 470 e, destes, aproximadamente 240 possuem bases estruturalmente diferentes (Silveira *et al.*, 2017; Marinho *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 1990) citados por (Naidoo *et al.*, 2021). Outros compostos incluem lactonas, esteróides, compostos fenólicos, triterpenos/triterpenóides e fitoesteróis (Pallant *et al.*, 2012).

### 2.4.1. Composição fitoquímica de *Tabernaemontana elegans*

Pallant e colaboradores (2012) avaliaram a composição fitoquímica da casca da raiz. O extracto hidroetanólico bruto indicou a presença de alcalóides, óleos essenciais, compostos fenólicos e esteróides/esteróis. A análise por GC-MS do extracto bruto e da fracção alcaloídica indicou a presença de dois compostos principais que juntos representaram mais de 75% de todos os compostos. Esses compostos, identificados com mais de 90% de certeza por comparação com o banco de dados do NIST, foram os alcalóides indólicos dregamina (éster metílico do ácido 20 $\alpha$ ,19,20-diidro-3-oxovobasan-17-óico) e voacangina (éster metílico do ácido 12-metoxiibogamina-18-carboxílico). A dregamina e a voacangina também foram identificadas em outras espécies do género *Tabernaemontana*, e a dregamina já foi isolada noutras partes de *T. elegans* (Van der Heijden *et al.*, 1986; Naidoo *et al.*, 2021). No mesmo extracto isolou-se os alcalóides bisindólicos tabernaelegantina e conoduramina (Schmelzer e Gurib-Fakim, 2008). Verificou-se que o extracto hidroetanólico bruto da casca da raiz contém uma alta concentração de alcalóides (1,2% m/m) (Pallant *et al.*, 2012).

Ferreira e Paterna (2019) efectuaram uma extracção ácido-base ao extracto metanólico das raízes de modo a obter a fracção alcaloídica e, posteriormente, essa fracção foi particionada com diclorometano e com acetato de etilo e, devido ao facto de a fracção de diclorometano ter apresentado um poder citotóxico muito elevado, submeteu-se a um estudo fitoquímico e detectou-se a presença de alcalóides bisindólicos à base do esqueleto “vobasinil-iboga” denominados (19'S)-hidroxitabernaelegantina A, 3'-oxotabernaelegantina C, 3'-oxotabernaelegantina D, (3'R)-hidroxitabernaelegantina C, tabernaelegantina C, tabernaelegantina A, tabernaelegantinina A, tabernaelegantina D e tabernaelegantinina B, alguns deles mostrados na figura 6.

O estudo da fracção alcaloídica do extracto metanólico das folhas de *T. elegans* permitiu o isolamento de três alcalóides indólicos derivados da beta-carbolina, denominados tabernina A, tabernina B e tabernina C (Mansoor *et al.*, 2009a), que são mostrados na figura 4. Também se isolou do mesmo extracto alcalóides do tipo Corinante denominados elegantina A, dregamina, tabernaemontanina e vobasina (Ferreira e Paterna, 2019), alguns deles mostrados na figura 5.

Em uma cultura de calos do tronco de *T. elegans*, Van der Heijden e colaboradores (1986) isolaram 14 alcalóides indólicos que são a 3-oxo-isovoacangina, isovoacangina, 3-(R/S)-hidroxi-

isovoacangina, 3-(R/S)-hidroxicoronaridina, isositsiriquina, geissoschizol, tabernaemontanina, vobasina, vobasinol, aparicina, 16-hidroxi-16,22-dihidroaparicina, tubotaiwina, 3-(R/S)-hidroxicoronodurina e monogagaína.

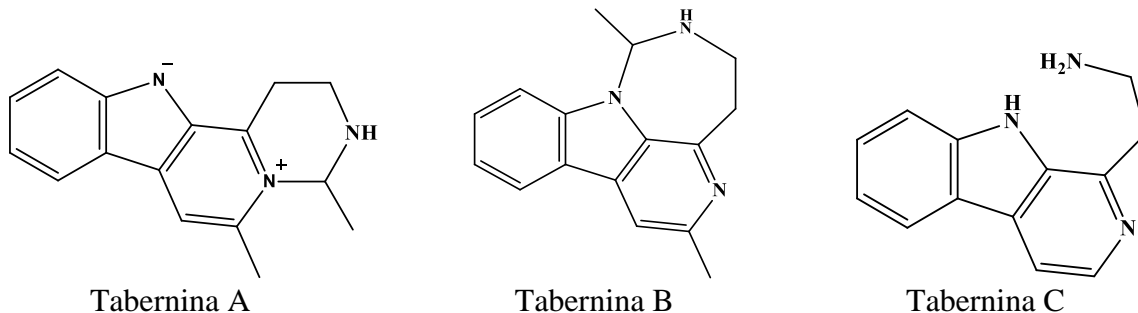
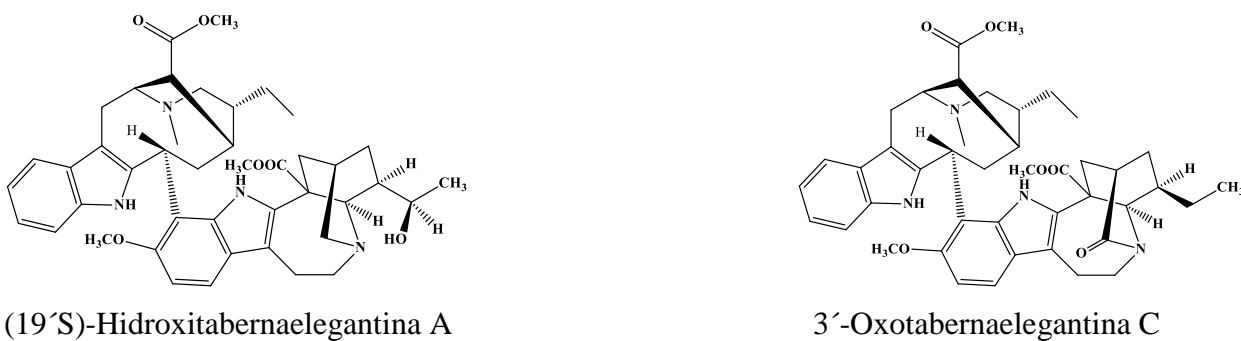


Figura 4: Ilustração estrutural dos alcalóides beta-carbolina identificados de *T. elegans*

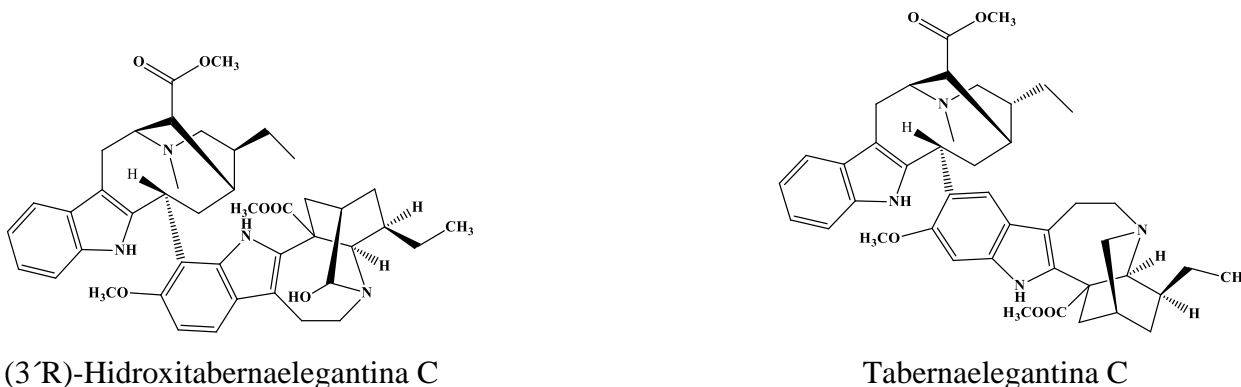


Figura 5: Ilustração estrutural de alguns alcalóides corinanthe identificados de *T. elegans*



(19'S)-Hidroxitabernaelegantina A

3'-Oxotabernaelegantina C



(3'R)-Hidroxitabernaelegantina C

Tabernaelegantina C

Figura 6: Ilustração de alguns alcalóides bisindólicos identificados de *T. elegans*

## **2.5. Actividades biológicas das espécies do género *Tabernaemontana***

Durante séculos, várias espécies do género *Tabernaemontana* como *T. divaricata*, *T. catharinensis*, *T. crassa* e *T. elegans* têm sido explorados na medicina tradicional e popular para o tratamento e prevenção de doenças e enfermidades, como dor de garganta, hipertensão, dor abdominal e doenças pulmonares. Uma variedade de compostos químicos extraídos de muitas partes das espécies do género *Tabernaemontana* contêm alcalóides, que exibem actividades biológicas, como antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, anticolinesterásica, antineurodegenerativa, anticancerígena, antidiabética, antiofídica, larvicida, anti-hipertensiva, cicatrização de feridas, analgésica e muitas outras actividades (Naidoo *et al.*, 2021).

Na medicina tradicional dos países da África Austral, *Tabernaemontana elegans* e *Tabernaemontana ventricosa* são espécies muito usadas. A *Tabernaemontana ventricosa* é usada como analgésico, na redução da febre e apresenta actividade antiamebiana. O látex é usado para tratar feridas e dores dos olhos. As sementes e as raízes são usadas para tratar problemas de nervosismo e pressão arterial (Naidoo *et al.*, 2021; Schmelzer e Gurib-Fakim, 2008). A *Tabernaemontana elegans* é usada para muitos fins. O látex coagulado é usado para prevenir o sangramento. O látex coagulado ou raiz pulverizada misturados com vaselina são aplicados como um hemostático. A maceração da raiz actua como um purgativo e a maceração das suas cinzas é bebida para tratar a tuberculose e dor de estômago. O pó da raiz queimada misturado com sal e água é usado na lavagem vaginal para tratar a menorrágia, infertilidade e doenças venéreas. As sementes, casca do tronco e raiz são usadas pelo povo Wabondei e Wadigo da Tanzânia para o tratamento de problemas cardíacos e a casca da raiz ou frutos são usados para tratar o câncer. A decocção da raiz é considerada afrodisíaca em Zimbábue (Schmelzer e Gurib-Fakim, 2008) e é aplicada na lavagem de feridas e tomada como remédio para tratar doenças pulmonares e dores do peito pelas tribos Sul-Africanas VaVenda e Zulu (Pallant *et al.*, 2012). Em Moçambique, na província de Gaza, distrito de Guijá, o caule junto com a casca faz parte de um pot-pourri de material vegetal usado para tratar doenças pulmonares (informação popular não publicada).

### **Actividade antioxidante**

A espécie mais estudada dentro do género em relação a esta actividade é a *T. catharinensis*. Usando o método do ácido tiobarbitúrico, Bolignon e Athayde (2012) investigaram a actividade antioxidante do extracto bruto das folhas e suas fracções, onde tiveram o IC<sub>50</sub> de 6,71 ± 0,19 µg/mL na fracção de acetato de etilo e 26,15 ± 0,08 µg/mL na fracção de n-butanol. No mesmo estudo, usando o método de DPPH, tiveram o IC<sub>50</sub> de 4,64 ± 1,25 mg/mL na fracção de acetato de etilo e 27,78 ± 0,98 mg/mL na fracção de n-butanol. Nicola e colaboradores (2013) investigaram a actividade antioxidante da fracção alcaloídica e do extracto etanólico das folhas e caule, tendo o IC<sub>50</sub> igual a 37,18 µg/mL para a fracção alcaloídica e 74,69 µg/mL para o extracto etanólico. Outras partes da planta que exibem actividade antioxidante são ramos, raízes, tronco, casca do tronco e o fruto (Naidoo *et al.*, 2021). Outras espécies incluem *T. divaricata*, onde as folhas, flores, raízes, o caule e o látex testaram positivo, *T. heyneana*, onde as folhas e o caule testaram positivo e *T. corymbosa*, onde as folhas, raízes e o caule testaram positivo (Naidoo *et al.*, 2021).

### **Actividade antifúngica**

Singh e colaboradores (2011) investigaram a actividade antifúngica de compostos biologicamente activos de *T. divaricata*. Um composto comum dentro do género *Tabernaemontana*, coronaridina, foi identificado e isolado de *T. divaricata*. No estudo, a coronaridina apresentou fraca actividade antifúngica contra *Penicillium chrysogenum*, comparável com a nistatina cuja concentração inibitória mínima (CIM) é 9,8–14,0 mg/mL. Por outro lado, Bolignon e Athayde (2012) investigaram as fracções de diclorometano e n-butanol do extracto etanólico de folhas de *T. catharinensis*. A fracção de diclorometano apresentou actividade contra as cepas fúngicas *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. neoformans*, *S. cerevisiae*, *A. flavus* e *A. fumigatus*, com CIM variando de 31,25 a 1000 mg/mL.

### **Actividade antiviral**

Bolignon e Athayde (2012) avaliaram as fracções de diclorometano, acetato de etilo e n-butanol do extracto etanólico da casca do caule de *T. catharinensis*. Os extractos e fracções exibiram actividade antiviral substancial no herpes-vírus simples tipo 1 (HSV-1) em contraste com o aciclovir (IC<sub>50</sub> igual a 1,5 mg/mL). Além disso, foi observada actividade antiviral significativa das



fracções de diclorometano e acetato de etilo. As fracções de diclorometano e acetato de etilo da casca do caule apresentaram IC<sub>50</sub> de 2,62 e 2,88 µg/mL, enquanto que as fracções das folhas apresentaram IC<sub>50</sub> de 0,6 e 2,21 µg/mL. Sugere-se que compostos biologicamente activos como esteróides, terpenóides e fenóis, encontrados nas fracções de diclorometano, acetato de etilo e n-butanol são responsáveis pela actividade antiviral (Naidoo *et al.*, 2021).

### **Actividade antibacteriana**

Gindri e colaboradores (2011) investigaram a actividade antibacteriana do extracto etanólico bruto das folhas de *T. catharinensis* e suas fracções. Os extractos e as fracções foram testados contra várias cepas bacterianas, como *S. aureus*, *Aeromonas sp.*, *Micrococcus sp.*, *P. mirabilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa* e os resultados foram comparáveis com os dos antibióticos ampicilina (CIM de 8,0 mg/mL), cefoperazona (CIM de 16,0 mg/mL) e imipeném (CIM de 0,06 mg/mL). Os resultados foram positivos contra *Micrococcus sp.*, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa* (valores CIM de 31,3, 62,5 e 62,5 mg/mL, respectivamente).

### **Actividade anticancerígena e citotoxicidade**

Muitas espécies do género *Tabernaemontana* foram investigadas e os resultados foram positivos para a maioria das espécies investigadas (Naidoo *et al.*, 2021). Figueiredo e colaboradores (2010) relataram a citotoxicidade dos extractos das raízes e das folhas de *T. salzmannii* em células de leucemia humana (THP-1). Neste estudo, nove alcalóides foram isolados, mas apenas dois, isovoacangina e voacangina, apresentaram extensa morte de células cancerígenas com um IC<sub>50</sub> de 52,11 e 61,40 µM, respectivamente. Muitos dos alcalóides isolados de várias espécies de *Tabernaemontana* são frequentemente usados para tratar uma variedade de tipos de câncer, como câncer da mama, câncer do pulmão, câncer do ovário e câncer de cólon (Naidoo *et al.*, 2021).

Pergher e colaboradores (2019) avaliaram as propriedades anticancerígenas de alcalóides indólicos de *T. catharinensis*. No estudo, foram identificados e isolados seis compostos, sendo eles 16-epiafinina, 12-metoxi-Nb-metil-voachalotina, afinisina, voachalotina, coronaridina hidroxindolina e ibogamina. Os alcalóides indólicos isolados foram testados *in vitro* contra várias linhagens celulares, incluindo células tumorais A375 (linha celular de melanoma) e A549 (células epiteliais basais alveolares humanas adenocarcinómicas) e células vero não tumorais (células

epiteliais renais de macaco verde Africano). A fracção contendo afinisina demonstrou toxicidade contra A375, com IC<sub>50</sub> de 11,73 µg/mL, podendo ser um agente quimioterapêutico para células de melanoma A375.

### **2.5.1. Actividades biológicas de *T. elegans***

#### **Actividade anticancerígena e citotoxicidade**

A citotoxicidade do extracto etanólico bruto e fracção alcaloídica da casca da raiz foi determinada em fibroblastos dérmicos humanos normais, linfócitos, hepatócitos HepG2 (ATCC HB 8065) e macrófagos THP1 (ATCC TIB 2.2) usando dois ensaios diferentes que são o Ensaio MTT e o Ensaio de Absorção de Vermelho Neutro, onde obteve-se resultados positivos nos dois tipos de ensaio e para todas as amostras analisadas (Pallant *et al.*, 2012).

#### **Actividade antimicrobiana**

Pallant e colaboradores (2012) avaliaram a actividade antimicrobiana do extracto etanólico bruto e da fracção alcaloídica da casca da raiz de *T. elegans* contra as bactérias gram-positivas *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (NHLS 363) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600), as micobactérias *M. tuberculosis* H37RV (ATCC 25177), *M. tuberculosis* (MRC 3366) e *M. smegmatis* (ATCC 14468), e as gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027). A ampicilina, ciprofloxacina e isoniazida foram os antibióticos de controlo. As concentrações foram 1,052 mg/mL, 512 µg/mL e 0,1 µg/mL para o extracto bruto, fracção alcaloídica e isoniazida, respectivamente. Os resultados foram positivos para as bactérias gram-positivas e micobactérias em todas as amostras analisadas e das gram-negativas apenas a *Escherichia coli* (ATCC 35218) testou positiva para a amostra da fracção alcaloídica.

Em um outro estudo, os alcalóides Tabernina A, B e C, elegantina A, dregamina, tabernaemontantina e vobasina foram avaliados quanto à actividade de indução de apoptose em células de hepatoma humano HuH-7. O seu potencial antineoplásico foi avaliado usando ensaios de exclusão do corante azul de tripano após exposição de células HuH-7 de hepatoma humano a diferentes concentrações de cada composto. Além disso, os estudos de indução de apoptose incluíram a avaliação morfológica por coloração Hoeschst e ensaios de actividade do tipo caspase-

3. Os resultados mostraram que a tabernaemontanina e a vobasina são alcalóides anticancerígenos promissores nas células do hepatoma HuH-7 (Mansoor *et al.*, 2009a; Mansoor *et al.*, 2009b).

Para validar o uso dos extractos da raiz de *T. elegans* na medicina tradicional Africana para tratar o câncer, um ensaio citotóxico preliminar foi realizado com o extracto metanólico bruto e suas fracções alcaloídicas de diclorometano e acetato de etilo. O potencial citotóxico foi avaliado em HCT116, cólon SW620 e linhagens de células hepáticas HEPG2, usando o ensaio MTS. O extracto metanólico bruto e ambas as fracções mostraram actividade citotóxica significativa contra as três linhagens celulares. No entanto, a fracção de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> exibiu a citotoxicidade mais elevada. A concentração de 1 µg/mL, após 72 h de tratamento celular, inibiu 54, 43 e 59% do crescimento celular em HCT116, cólon SW620 e linhagens de células hepáticas HEPG2, respectivamente (Ferreira e Paterna, 2019).

### **Actividade antiplasmodial e antimalárica**

Bapela e colaboradores (2018) avaliaram a actividade antiplasmodial das cascas do caule de *T. elegans*. Eles fizeram a extracção usando o sistema de solventes DCM:MeOH 1:1, depois fizeram extracção ácido-base do extracto e obtiveram duas fracções, a fracção alcaloídica e a fracção neutra, que foram submetidas à triagem antiplasmodial. A fracção alcaloídica demonstrou actividade antiplasmodial mais elevada (IC<sub>50</sub> de 0,06 µg/mL) com o SI (índice de selectividade) igual à 47,8 em comparação com a fracção neutra (IC<sub>50</sub> de 6,05 µg/mL) e SI igual à 4,1. A bioactividade observada é atribuível aos alcalóides indólicos, que estão concentrados na fracção alcaloídica. Na tentativa de identificar os alcalóides indólicos e determinar as suas respectivas actividades antiplasmodiais, a fracção alcaloídica foi submetida à cromatografia em coluna. O fraccionamento e a purificação subsequentes da fracção alcaloídica permitiram o isolamento de dois compostos, dregamina e tabernaemontanina.

## **2.6. Antioxidantes**

De acordo com Sucupira e colaboradores (2012), os antioxidantes são substâncias que, em baixas concentrações, retardam ou previnem a oxidação do substrato. Tendo em vista os organismos vivos, os antioxidantes são substâncias que a baixas concentrações atenuam os processos oxidativos celulares, impedindo a oxidação exagerada. Existem algumas lacunas em relação aos antioxidantes, tais como a inexistência de recomendação para cada antioxidante, falta de

padronização quanto ao real valor antioxidante dos alimentos e falta de possíveis efeitos tóxicos na administração de elevadas doses desses compostos.

### **2.6.1. Doenças relacionadas ao estresse oxidativo no organismo humano**

Alguns dos problemas associados ao estresse oxidativo são: sistema imunológico prejudicado (risco aumentado ao ataque por doenças infecciosas), cancro, diabetes, condições de auto-imunidade como espondilite anquilosante e reumatóide, doenças respiratórias, doenças oculares, doença de Alzheimer e esquizofrenia (Temple, 2000).

### **2.6.2. Classificação de antioxidantes e principais fontes de antioxidantes naturais**

Os antioxidantes podem ser classificados em sintéticos e em naturais. Além disso, os antioxidantes podem ser classificados em endógenos e exógenos de acordo com suas fontes, em enzimáticos e não enzimáticos de acordo com seus efeitos e, por fim, em hidrossolúveis e lipossolúveis. Os antioxidantes naturais são substâncias que existem nos alimentos e diminuem as taxas das suas reações de degradação, entre outras funções. Os antioxidantes naturais são geralmente derivados de fontes vegetais e a sua actividade varia dependendo de espécies de plantas, métodos de extracção e/ou de processamento e condições de cultivo. Eles são encontrados em microorganismos, em alguns tecidos animais e em quase todas as plantas. Antioxidantes naturais, especialmente de frutas vermelhas, laranjas e legumes de cor púrpura, têm uma actividade antioxidante elevada. Laranjas, limões, mirtilos, morangos, ameixas, feijão vermelho e flores de brócolis contêm grande quantidade de antioxidantes e foram incorporados em muitas dietas alimentares. Como grupos antioxidantes naturais mais importantes, podemos listar tocoferóis e tocotrienóis, ácido ascórbico, flavonóides, carotenóides e ácidos fenólicos (Zehiroglu e Sarikaya, 2019).

O sistema de defesa antioxidante humano está equipado com antioxidantes enzimáticos, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase, antioxidantes hidrofílicos como urato, ascorbato, glutathione (GSH) e flavonóides e antioxidantes lipofílicos como tocoferóis, carotenóides e ubiquinol. Os antioxidantes não enzimáticos contêm subgrupos, os principais são vitaminas, cofatores enzimáticos, minerais, peptídeos, ácidos fenólicos e compostos nitrogenados (Zehiroglu e Sarikaya, 2019).

### 2.6.3. Métodos de avaliação de actividade antioxidante

A actividade antioxidante pode ser expressa por meio de vários métodos, alguns deles são a remoção de radicais peroxil (ORAC – *oxygen radical absorbance capacity* e TRAP – *total reactive antioxidant potential*), a capacidade de redução do ião metálico (FRAP – *ferric reducing antioxidant power* e CUPRAC – *cupric reducing antioxidant capacity*), a capacidade de remoção de radical orgânico (ABTS – *2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)* e DPPH – *1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl*), a quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídeos (TBARS – *thiobarbituric acid reactive substances* e LDL – *low-density lipoprotein*) e co-oxidação do  $\beta$ -caroteno (Sucupira *et al.*, 2012).

Os métodos FRAP, ABTS, DPPH e ORAC são mais utilizados para determinar a capacidade antioxidante *in vitro*. O método de branqueamento de  $\beta$ -caroteno, que avalia o nível de inibição dos radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico, também é bastante conhecido (Sucupira *et al.*, 2012).

#### Método do radical DPPH

É um método químico, aplicado para determinar a capacidade antioxidante de um composto em sequestrar radicais livres, sendo um dos mais utilizados, pois ele é considerado um método rápido, prático e com boa estabilidade. O DPPH é um radical de nitrogénio orgânico, estável, de cor violeta, que possui absorção na faixa de 515-520 nm. A redução do DPPH é monitorada pelo decréscimo da absorvância durante a reacção e isso ocorre na presença de um doador de hidrogénio ou electrão, onde a intensidade de absorção diminui e a solução com o radical perde cor, tornando-se amarela, de acordo com o número de electrões capturados, ou seja, quando o electrão desemparelhado do átomo de nitrogénio no DPPH recebe electrões ou hidrogénios provenientes de compostos antioxidantes, ocorre a mudança de cor (Sucupira *et al.*, 2012).

O método de DPPH tem sido muito utilizado para avaliar a capacidade antioxidante de frutas. O método apresenta vantagens quando os antioxidantes analisados são mais solúveis em solventes orgânicos e, por ser um radical livre estável, está disponível comercialmente, o que evita a sua geração por distintas formas (como ocorre com o método de ABTS), além de facilitar o seu uso (Sucupira *et al.*, 2012).

### **Método FRAP (poder de redução do ião férrico)**

O método FRAP também é utilizado para medir a capacidade antioxidante de frutos. Em pH baixo, a redução de um complexo férrico de tripiridiltriazina ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) à forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ), que possui coloração azul intensa, pode ser monitorada medindo a mudança na absorção a 593 nm. A reacção não é específica pois qualquer meia-reacção que tem um potencial redox mais baixo, sob as condições da reacção, do que o da meia-reacção férrica/ferrosa induzirá o ião férrico a ião ferroso. O aumento da absorvância, portanto, está directamente relacionado ao poder redutor combinado ou total dos antioxidantes doadores de electrões presentes na mistura reaccional (Benzie e Strain, 1999; Sucupira *et al.*, 2012).

### **Método de ácido fosfomolibdico**

É um método espectrofotométrico desenvolvido para a determinação quantitativa da capacidade antioxidante. O ensaio é baseado na redução de Mo (VI) a Mo (V) pelos antioxidantes e a subsequente formação de um complexo verde de fosfato/Mo (V) em meio ácido, que mostra absorção máxima a 695 nm (Prieto *et al.*, 1999).

#### **2.6.4. Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos são a maior classe dos fitoquímicos alimentares do metabolismo secundário. A sua fórmula química contém pelo menos um anel fenólico. Existe grande variedade de compostos fenólicos, classificados em dois grupos, flavonóides e não flavonóides. Estes compostos são considerados os antioxidantes mais activos nos vegetais, sendo encontrados com muita frequência (Cheynier, 2012; Sucupira *et al.*, 2012).

De acordo com Sucupira e colaboradores (2012), os compostos fenólicos são multifuncionais como antioxidantes, pois actuam de várias formas. Eles podem actuar:

- ✚ Combatendo os radicais livres através da doação de um átomo de hidrogénio de um grupo hidroxilo (OH) da sua estrutura aromática, que possui a capacidade de suportar um electrão desemparelhado através do deslocamento deste ao redor de todo o sistema de electrões da molécula;
- ✚ Quelando metais de transição, como o  $\text{Fe}^{2+}$  e o  $\text{Cu}^+$ ;
- ✚ Interrompendo a reacção de propagação dos radicais livres na oxidação lipídica;

- ✚ Modificando o potencial redox do meio;
- ✚ Reparando a lesão das moléculas atacadas por radicais livres.

Os compostos fenólicos apresentam-se amplamente distribuídos entre as distintas partes das plantas, porém a sua maior concentração está nos frutos, nas hortaliças e em seus derivados. Frutas e hortaliças, além de fornecerem componentes importantes para desempenharem funções básicas do organismo como, por exemplo, ácido ascórbico,  $\beta$ -caroteno e ácido fólico, são fontes de compostos bioactivos directamente associados à prevenção de doenças. As moléculas típicas de antioxidantes são derivadas das formas isoméricas dos polifenóis e flavonas, isoflavonas, flavonóis, catequinas, cumarinas, ácidos fenólicos e outras substâncias encontradas nos vegetais (Cheynier, 2012; Sucupira *et al.*, 2012). Alguns compostos fenólicos são apresentados na figura 7.

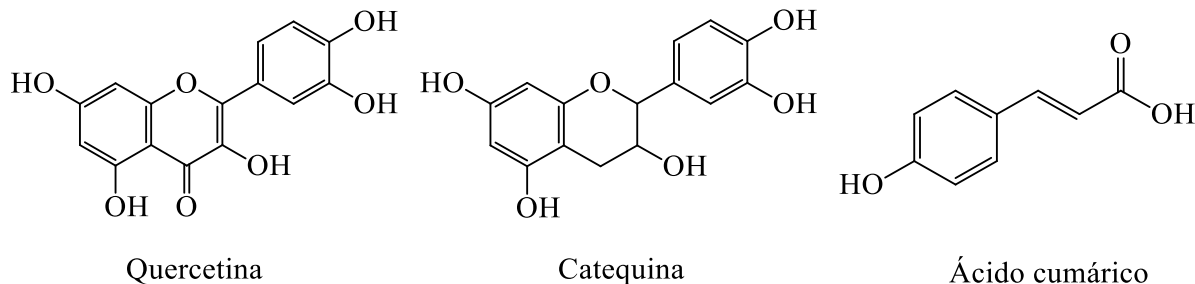


Figura 7: Ilustração estrutural de alguns compostos fenólicos comuns

## 2.7. Extracção de compostos bioactivos das espécies vegetais

De acordo com Dai e Mumper (2010) e Waksmundzka-Hajnos e colaboradores (2008), os extractos vegetais são misturas complexas de diferentes substâncias com distintas propriedades físicas e químicas. Para a sua separação, aplica-se um processo de extracção adequado, isto é, um processo que contempla bom rendimento, facilidade de uso, eficiência, reprodutibilidade e ampla aplicabilidade. Devido a um bom cumprimento dos requisitos citados anteriormente, as extracções por solventes são os procedimentos mais comumente usados na preparação dos extractos de vegetais e outros produtos naturais. O rendimento da extracção química depende do tipo de solvente, tempo e temperatura de extracção, razão amostra-solvente, bem como da composição química e características físicas das amostras. Os materiais vegetais podem conter compostos fenólicos que variam de simples (por exemplo, ácidos fenólicos e antocianinas) a substâncias altamente polimerizadas (por exemplo, taninos) em diferentes quantidades. Além disso, os compostos fenólicos também podem estar associados a outros componentes vegetais, como

carboidratos e proteínas. Portanto, não existe um procedimento de extração universal adequado para a extração de todos os compostos fenólicos em materiais vegetais, e isso aplica-se a outros fitoquímicos do metabolismo secundário.

Em diversos registos científicos da literatura consultada sobre as espécies do género *Tabernaemontana*, verificou-se que os extractos hidroalcoólicos à base de metanol e etanol, que são extractos polares obtidos pelos métodos de maceração e extração por soxhlet, foram os mais utilizados para a realização dos ensaios químicos de prospecção e de actividades biológicas.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Colecta e preparação do material botânico

Os frutos foram colectados no distrito de Guijá, na localidade de Cifo, na penúltima semana de Agosto de 2022 e foram transportados de Guijá até Maputo em transporte rodoviário. Após a chegada, separou-se a polpa das sementes e fatiou-se as cascas. As cascas e a polpa foram deixadas a secar na estufa a 30°C durante 2 dias, depois foram retiradas da estufa e deixadas à temperatura ambiente durante 30 dias, sem interacção directa com a luz do sol. As sementes foram deixadas a secar na mesa à temperatura ambiente durante 45 dias, sem interacção directa com a luz do sol, conforme mostram as imagens da figura 8. As cascas, a polpa e as sementes foram trituradas usando almofariz e pistilo. Todas as operações de preparação da amostra foram realizadas no laboratório de produtos naturais do Departamento de Química, na Faculdade de Ciências da Universidade Eduardo Mondlane.

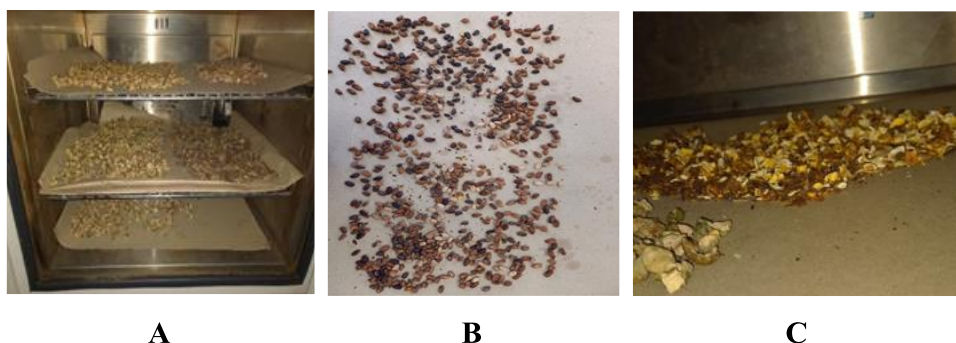


Figura 8: Imagens ilustrativas da secagem da casca (A), polpa (C) e sementes (B) do fruto de *Tabernaemontana elegans*.

#### 3.2. Solventes e reagentes químicos

Todos os solventes e reagentes usados para a extracção, fraccionamento e ensaios analíticos foram adquiridos na sua forma pura em laboratórios de referência a partir de fornecedores locais.

O ácido ascórbico (99,5%), 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) (85%) e ácido gálico (98%) foram obtidos da Sigma-Aldrich, África do Sul. A rutina (97%), 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) ( $\geq 98\%$ ) e o reagente Folin-Ciocalteu foram adquiridos da Acros Organics (África do Sul), Alfa Aesar (Alemanha) e LNS labs (África do Sul), respectivamente.

### 3.3. Preparação dos reveladores para TLC

Todos os métodos de preparação são descritos por Waksmundzka-Hajnos e colaboradores (2008).

**Reagente de Kedde:** mistura-se 5 mL de uma solução de ácido 3,5-dinitrobenzóico 3% em etanol previamente preparada com 5 mL de NaOH 2N;

**Reagente de Ehrlich:** mistura-se 1 g de p-dimetilaminobenzaldeído com 50 mL de HCl 36% e 50 mL de etanol. Depois de pulverizar a placa, aquece-se a placa durante 5-10 min a 100°C;

**Reagente de Liebermann-Burchard:** adiciona-se cuidadosamente 5 mL de anidrido acético e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado a 50 mL de etanol absoluto, em um recipiente mergulhado no gelo. Depois de pulverizar a placa, aquece-se a placa durante 5-10 min a 100°C;

**Reagente de Dragendorff:**

Solução A: dissolve-se 0,85 g de nitrato de bismuto básico em 10 mL de ácido acético glacial e 40 mL de água com aquecimento; Solução B: dissolve-se 8,0 g de iodeto de potássio em 30 mL de água. Mistura-se as soluções A e B na proporção de 1:1 e, em seguida, adiciona-se ao ácido acético glacial e água na proporção 1:2:10;

**Reagente de vanilina-ácido sulfúrico:**

Solução A: solução etanólica de ácido sulfúrico a 10%; Solução B: vanilina etanólica a 1%. Pulveriza-se a placa com 10 mL da solução A e imediatamente de seguida com 10 mL da solução B. Aquece-se a placa a 110°C durante 5-10 min;

**Reagente de hidróxido de potássio:** dissolve-se 5-10 g de KOH em 10 mL de água destilada e essa solução é depois dissolvida em etanol a 96%. A avaliação pode ser feita tanto pela pulverização como pelo mergulho da placa na solução e a detecção pode ser feita com ou sem aquecimento da placa;

**Reagente de Carl-Price:** prepara-se uma solução de cloreto de antimónio (III) 20% em clorofórmio. Aquece-se a placa durante 5-10 min a 100°C.

### **3.4. Preparação dos extractos**

#### **3.4.1. Extractos brutos**

A extracção nas cascas e nas polpas foi conduzida por maceração em recipientes de vidro, com solução hidrometanólica a 70% durante 72 horas, com renovação diária do solvente, como mostra a figura 9. As sementes, antes da maceração, foram desengorduradas em Soxhlet usando n-hexano durante 10 horas, o resíduo foi deixado secar ao ar livre durante 2 horas e depois foi submetido ao processo de maceração descrito acima.

#### **3.4.2. Fracções do extracto bruto**

Uma parte do extracto bruto foi suspensa em água destilada e submetida a uma extracção líquido-líquido (partição), cujo procedimento é mostrado na figura 9, usando um sistema sequenciado em ordem crescente de polaridade dos seguintes solventes: n-hexano, clorofórmio, acetato de etilo e n-butanol. O fluxograma que ilustra o processo de obtenção dos extractos brutos e suas fracções é mostrado na figura 11.

Para cada parte do fruto, 50 g foram colocados em recipiente de vidro e adicionou-se 200 mL do solvente de extracção. As soluções foram concentradas no vaporizador rotativo e obteve-se os extractos brutos, como mostra a figura 10. Uma parte do extracto bruto foi redissolvida com 100 mL de água destilada, adicionada ao funil de separação e particionada duas vezes com cada 100 mL de n-hexano, clorofórmio e acetato de etilo. No caso do n-butanol, ao invés de 100 mL particionou-se duas vezes com 50 mL. Em cada processo da partição, agitou-se a mistura e deixou-se em repouso durante 30 minutos. No desengorduramento por Soxhlet, 50 g das sementes foram desengordurados com 200 mL de n-hexano.

Os extractos e suas fracções foram concentrados em rotavapor R-210, banho de água B-491 e bomba do vácuo V-700, conforme ilustra a figura 10. As fracções aquosas foram concentradas em banho de água.

#### **3.4.3. Fracção alcaloídica**

Para a obtenção da fracção alcaloídica, seguiu-se o procedimento descrito por Pallant e colaboradores (2012). Dissolveu-se 0,2 g de cada extracto em 100 mL da solução aquosa de ácido

acético a 4% e particionou-se com n-hexano (3x35 mL). Descartou-se a fracção de n-hexano e basificou-se a fracção ácida para pH 10 com amónia a 25%. Particionou-se a solução basificada com clorofórmio (3x35 mL), recolheu-se a fracção clorofórmica, concentrou-se no vaporizador rotativo e obteve-se o resíduo (alcalóides). Esse resíduo foi dissolvido em metanol de modo a obter uma solução a 500 µg/mL de cada resíduo. O fluxograma que ilustra o processo de obtenção das fracções alcaloídicas é mostrado na figura 12.

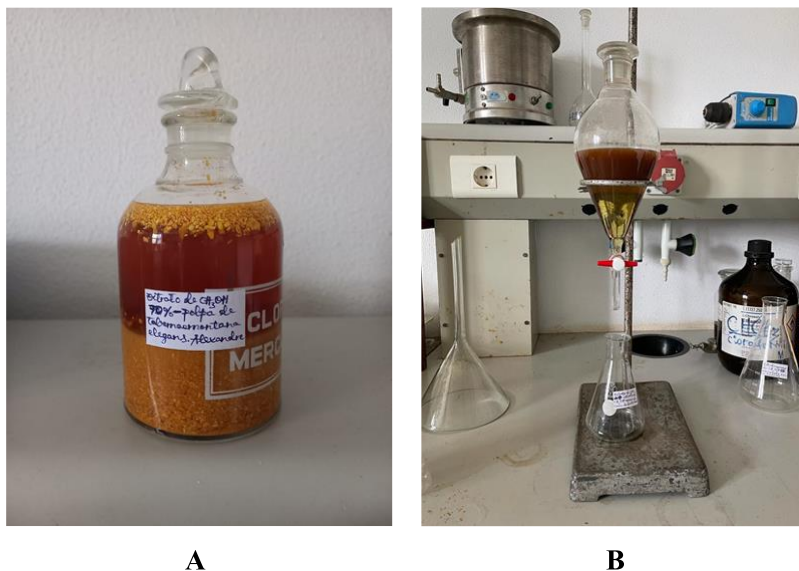


Figura 9: Imagens ilustrativas do processo de maceração da polpa verde (A) e partição do extracto aquoso com clorofórmio (B).



Figura 10: Imagem ilustrativa do processo de evaporação do solvente de extracção

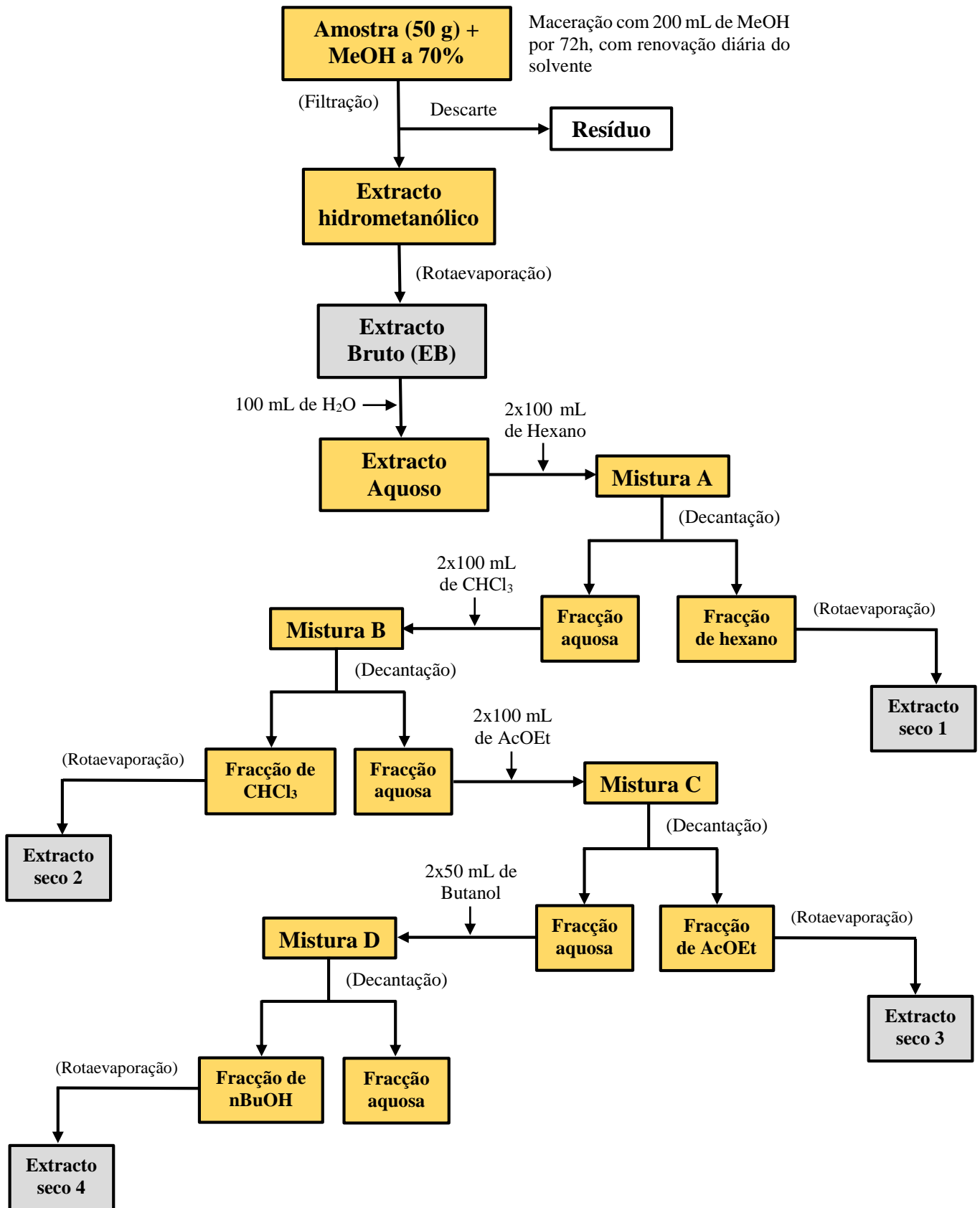


Figura 11: Fluxograma do processo de obtenção dos extractos brutos e suas fracções

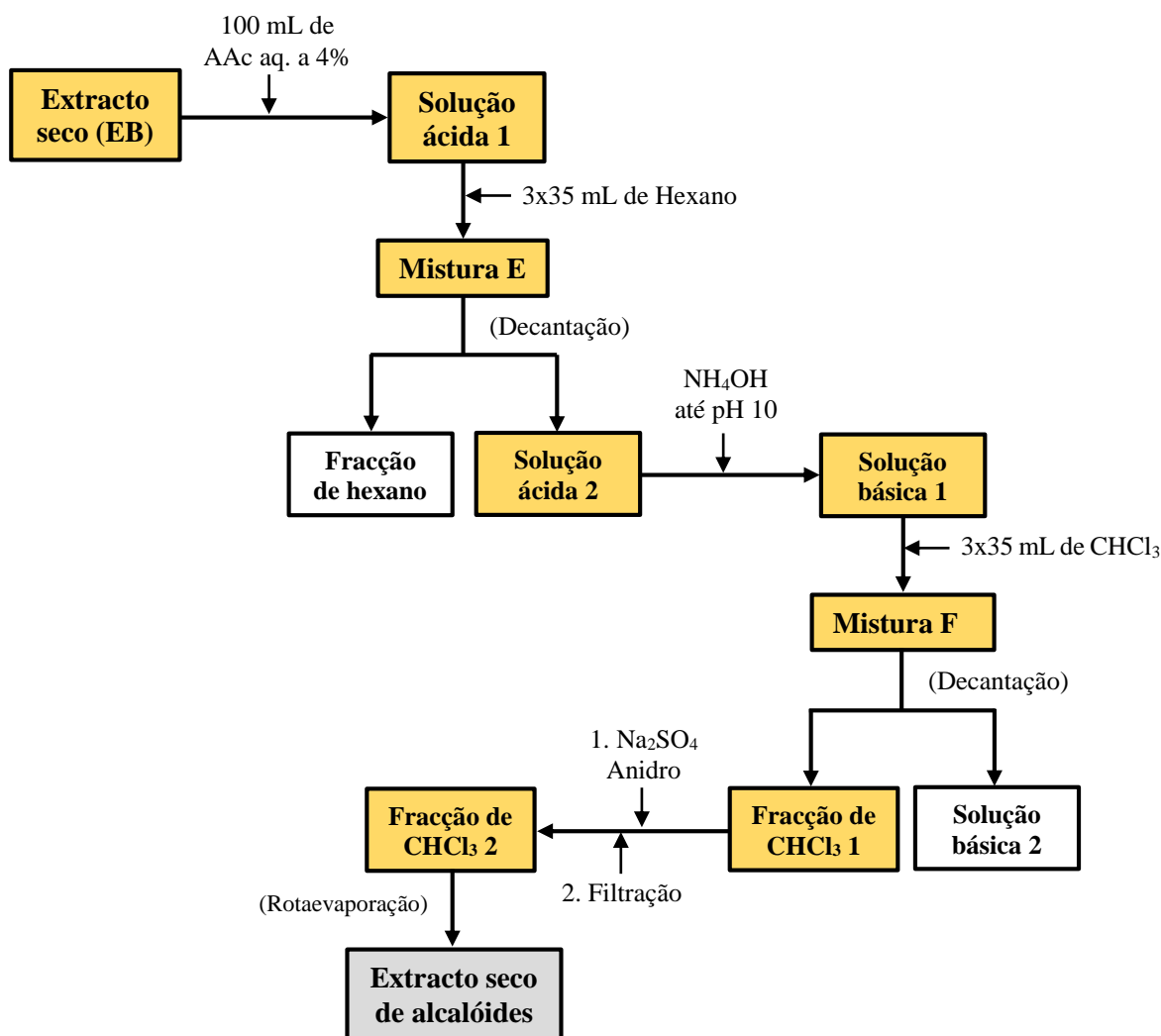


Figura 12: Fluxograma do processo de obtenção dos extractos secos de alcalóides

**Legenda:** a cor dourada indica componentes do processo geral, a cor cizenta indica produtos desejados de cada processo e a cor branca indica os resíduos de cada processo.

### 3.5. Análise fitoquímica qualitativa

As análises fitoquímicas qualitativas foram realizadas para a identificação de alcalóides, antraquinonas, cumarinas, taninos, flavonóides, saponinas, triterpenóides, bufadienolidas, brassinolidas, glicósidos cardíacos, esteróides, lignanas, iridóides e acetogeninas nos extractos brutos e fracções de casca verde, casca madura, polpa verde, polpa madura e sementes maduras do fruto *T. elegans*.

### **3.5.1. Análise fitoquímica preliminar**

A análise fitoquímica preliminar foi feita para identificação de antraquinonas, taninos, saponinas, flavonóides e glicósidos cardíacos.

#### **Identificação de antraquinonas**

Em tubo de ensaio contendo 2 mL do extracto clorofórmico adicionou-se 2 mL de solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$  a 10%. A formação de cor roxa indica a presença de antraquinonas (Reacção de Borntrager) (Sorescu *et al.*, 2018).

#### **Identificação de taninos**

Em tubo de ensaio contendo 2 mL de extracto adicionou-se 2 mL de solução etanólica de cloreto férrico a 5% e agitou-se vigorosamente a mistura. A formação de cor azul escura indica possível presença de taninos hidrolisáveis, e a formação de cor verde escura indica possível presença de taninos condensados (Sorescu *et al.*, 2018).

#### **Identificação de flavonóides**

Em tubo de ensaio contendo 2 mL de extracto adicionou-se quatro fragmentos de fitas de magnésio na solução e posteriormente quatro gotas de ácido clorídrico concentrado. A formação de cor vermelha ou castanha indica presença de flavonóides (Barbosa *et al.*, 2004).

#### **Identificação de saponinas**

Em tubo de ensaio contendo 2 mL de extracto adicionou-se 5 mL de água destilada e agitou-se vigorosamente a mistura durante 15 minutos. A formação de espuma persistente com pelo menos 1 cm de altura indica a presença de saponinas (Sorescu *et al.*, 2018).

#### **Identificação de glicósidos cardíacos**

Em tubo de ensaio contendo 5 mL do extracto adicionou-se 2 mL de ácido acético glacial, 4 gotas da solução aquosa de cloreto férrico a 5% e 1 mL de ácido sulfúrico a 98%. O aparecimento de um anel de cor castanha nas interfaces superiores da solução e de um anel de cor púrpura nas interfaces inferiores indica a presença de glicósidos cardíacos (Sorescu *et al.*, 2018).

### 3.5.2. Análise fitoquímica por cromatografia de camada fina

A análise fitoquímica por cromatografia de camada fina (TLC) foi realizada para identificação de alcalóides, antraquinonas, cumarinas, flavonóides, triterpenóides, esteróides, bufadienolidas, glicósidos cardíacos, brassinolidas, lignanas, iridóides e acetogeninas seguindo os métodos descritos por Ahmad e colaboradores (2017), Kanwar e colaboradores (2017) e Waksmundzka-Hajnos e colaboradores (2008). Usou-se placas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> e placas de alumina 150 F<sub>254</sub> neutra, impregnadas sobre chapas de alumínio e algumas sobre vidro. Os sistemas de eluição e os reveladores usados estão apresentados na tabela 1.

Os extractos e fracções foram dissolvidos em metanol. Em cada placa, os pontos de aplicação foram marcados com lápis a 2 cm da esquerda para direita (linha horizontal), 1 cm de baixo para cima (linha vertical) e entre uma distância de 1,5-2 cm para cada ponto na placa cromatográfica. Em cada ponto foram colocados cerca de 10 µL do extracto usando tubos capilares. Após o desenvolvimento das placas na câmara cromatográfica contendo os respectivos sistemas de eluentes, as mesmas foram secadas à temperatura ambiente e de seguida pulverizadas na cabine de pulverização (TLC Spray Cabinet II), com os respectivos reveladores. As cromatoplasas para a revelação de triterpenóides, esteróides, glicósidos cardíacos, brassinolidas, iridóides, bufadienolidas e lignanas foram aquecidas a 100°C entre 5 e 10 minutos.

Na cromatografia de camada fina dos flavonóides eluíu-se a placa de Sílica gel 60 F<sub>254</sub> com fase móvel composta por AcOEt:Piridina:Água:MeOH (16:4:2:1) e a placa de Alumina 150 F<sub>254</sub> neutra com fase móvel composta por CHCl<sub>3</sub>:MeOH (9:3), cuja diferenciação é mostrada pelos expoentes 1 e 2 em cada placa.



Tabela 1: Eluentes e reveladores utilizados na análise por TLC

| Classe de metabólitos       | Fase móvel   | Fase estacionária  | Revelador químico   | Faixa de detecção   |
|-----------------------------|--|--|---|---|
| Alcalóides                  | Tolueno:Acetona:EtOH:<br>NH <sub>4</sub> OH a 25% (20:20:3:1)  | Sílica gel 60<br>F <sub>254</sub>  | Reagente de Dragendorff, seguido por NaNO <sub>2(aq)</sub> a 10 %                     | Visível   |
| Antraquinonas               | Tolueno: AcOEt:MeOH (80:12:2) na primeira direcção e DCM: Éter de petróleo (2:3) na segunda                                | Alumina 150<br>F <sub>254</sub> neutra   | Não aplicado  | 366 nm  |
| Cumarinas                   | MeOH <sub>(aq)</sub> 10%:HCOOH <sub>(aq)</sub> 1% (1:1) para primeira direcção e Éter diisopropílico para a segunda        | Sílica gel 60<br>F <sub>254</sub>  | Solução de KOH 5% em etanol   | 366 nm  |
| Flavonóides                 | AcOEt: Piridina:Água:MeOH (16:4:2:1) e CHCl <sub>3</sub> :MeOH (9:3)   | Sílica gel 60<br>F <sub>254</sub> <sup>1</sup> e Alumina 150<br>F <sub>254</sub> neutra <sup>2</sup> | Reagente de Vanilina-HCl a 5%   | 254 e 366 nm  |
| Triterpenóides e Esteróides | CHCl <sub>3</sub> :MeOH:NH <sub>4</sub> OH 1% (2:4:1)  | Sílica gel 60<br>F <sub>254</sub>  | Reagente de Vanilina-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> e reagente de Liebermann-Burchard | Visível   |
| Bufadienolidas              | AcOEt:MeOH:H <sub>2</sub> O (20:3:2)   | Alumina 150<br>F <sub>254</sub> neutra   | Reagente de Carr-Price  | Visível   |
| Glicósidos cardíacos        | CHCl <sub>3</sub> :MeOH:H <sub>2</sub> O (16:4:1)  | Sílica gel 60<br>F <sub>254</sub>  | Reagente de Kedde   | Visível   |
| Brassinolidas               | CHCl <sub>3</sub> :Acetona (3:2 v/v)   | Alumina 150<br>F <sub>254</sub> neutra   | Reagente de Liebermann-Burchard   | Visível   |
| Lignanas                    | CHCl <sub>3</sub> :MeOH (1:1) na primeira direcção e CHCl <sub>3</sub> :MeOH:Tolueno:NH <sub>3</sub> (10:6:3:1) na segunda | Alumina 150<br>F <sub>254</sub> neutra   | Vapor de iodo e solução de ácido sulfúrico a 10 % em metanol                          | Visível (Iodo) e 254 nm (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) |
| Iridóides                   | n-Butanol:Água (9:1)   | Sílica gel 60<br>F <sub>254</sub>  | Reagente de Vanilina-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                                   | Visível   |
| Acetogeninas                | AcOEt:Éter de petróleo (2:3)   | Sílica gel 60<br>F <sub>254</sub>  | Reagente de Ehrlich   | Visível   |

Legenda: expoente 1 – eluição com AcOEt:Piridina:Água:MeOH (16:4:2:1) e expoente 2 – eluição com CHCl<sub>3</sub>:MeOH (9:3).

### **3.5.3. Análise por GC-MS**

A análise por GC-MS foi realizada para as frações alcalóidicas usando o GC-MS Agilent 7820A e seguiu-se a metodologia descrita por Pallant e colaboradores (2012), com pequenas modificações. O hélio foi usado como gás de arraste em um fluxo constante, e a razão de divisão de injeção foi de 50:1. A temperatura do injetor foi 280°C. A temperatura da coluna foi programada para subir de 80°C para 310°C a 10°C/min por 23 min, depois mantida a 310°C por 7 min (o tempo total de corrida foi 30 min). O modo de aquisição seleccionado para espectrometria de massa foi o modo scan, com uma faixa de scan de 35-550 Da e um limite de 100 contagens por segundo (cps). O atraso do solvente foi de 4 minutos, temperatura do quadrupolo 150°C, com a temperatura da linha de transferência ajustada para 280°C. A cromatografia gasosa e os parâmetros de espectrometria de massa, colecta e análise de dados foram realizados pela Agilent Chemstation.

## **3.6. Análise fitoquímica quantitativa**

A análise fitoquímica quantitativa foi realizada para a determinação de alcalóides, fenóis totais, flavonóides totais, alcalóides, carboidratos e lípidos nos extractos brutos da casca verde, casca madura, polpa madura e sementes maduras do fruto de *T. elegans*. As absorvâncias foram lidas no espectrofotómetro UV/Vis JENWAY 6850.

### **3.6.1. Determinação do teor de fenóis totais**

A determinação do teor de fenóis totais presentes nos extractos foi realizada de acordo com o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, conforme descrito por Amorim e colaboradores (2012), com pequenas modificações. Para a análise dos extractos, 500 µL de extracto na concentração de 1 mg/mL em metanol foram colocados separadamente em balões de 10 mL. Em seguida, 500 µL de reagente de Folin-Ciocalteu a 10% (v/v) foram adicionados, agitou-se vigorosamente e deixou-se em repouso por 5 min à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 1 mL de solução de carbonato de sódio a 7,5% (m/v) e fez-se o volume com água destilada. Deixou-se a solução em repouso no escuro à temperatura ambiente durante 2 horas, depois leu-se as absorvâncias das soluções azuis formadas a 760 nm no espectrofotómetro.

Todos os ensaios foram feitos em 3 repetições e o teor de fenóis totais calculado como média ± desvio padrão da média e expresso em miligramas equivalentes de ácido gálico (mgEAG) por

grama de extracto seco, calculados através da equação da curva de calibração do padrão deste ácido, traçada usando a metodologia proposta por Amorim e colaboradores (2012) e Zimila e colaboradores (2020), com pequenas modificações.

Para a construção da curva de calibração, diluiu-se 100, 200, 300, 500 e 1000  $\mu\text{L}$  de uma solução estoque de ácido gálico a 100 mg/L para um volume final de 10 mL, onde se adicionou na mesma solução, 500  $\mu\text{L}$  do reagente de Folin-Ciocalteu a 10% (v/v) e 1 mL da solução de carbonato de sódio a 7,5% (m/v) seguindo o procedimento semelhante ao da amostra. Estas soluções apresentam concentrações de 1, 2, 3, 5 e 10 mg/L. Após 2 horas, as absorvâncias das soluções foram lidas a 760 nm contra um branco real (solução contendo a amostra e outros reagentes, excepto o complexante) preparado para cada extracto. Usando o mesmo procedimento, os brancos reais foram preparados pela mistura de 500  $\mu\text{L}$  de extracto a 1 mg/mL com 1 mL da solução de carbonato de sódio a 7,5% (m/v), perfazendo as soluções com água destilada para 10 mL. Todos os ensaios foram feitos em 3 repetições e as médias usadas para a construção da curva de calibração por regressão linear.

### **3.6.2. Determinação do teor de flavonóides totais**

Misturou-se sequencialmente 2 mL de extracto a 2 mg/mL em metanol, 500  $\mu\text{L}$  de ácido acético aquoso a 60% (v/v), 2 mL da solução etanólica de piridina a 20% (v/v) e 1 mL da solução metanólica de  $\text{AlCl}_3$  a 5% (m/v), em um balão volumétrico de 10 mL, onde se fez os volumes com solução aquosa de metanol a 80%. As soluções foram homogeneizadas e incubadas à temperatura ambiente durante 30 min e leu-se as absorvâncias a 420 nm no espectrofotómetro. Preparou-se uma solução estoque do padrão (rutina) através da dissolução de 10 mg de rutina com 100 mL de metanol e tomou-se 100, 200, 500 e 1000  $\mu\text{L}$  da solução para preparar as soluções padrão seguindo o procedimento anterior. As concentrações finais foram de 1, 2, 5, 10 e 20 mg/L. Todos os ensaios foram feitos em 3 repetições e o teor de flavonóides calculado como média  $\pm$  desvio padrão da média e expresso em miligramas equivalentes de rutina (mER) por grama do extracto seco, calculado através da equação da curva de calibração. Preparou-se brancos reais contendo 2 mL do extracto a 2 mg/mL e todos os outros reagentes, excepto a solução metanólica de  $\text{AlCl}_3$  a 5% (m/v), usando o mesmo procedimento.

### **3.6.3. Determinação do teor de carboidratos**

A determinação do teor de carboidratos presentes nos extractos foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico de Ácido sulfúrico-UV/Vis, conforme descrito por Albalasmeh e colaboradores (2013), com pequenas modificações. Dissolveu-se 100 mg de extracto com uma solução constituída de acetona, água destilada e metanol (3:2:1), contendo algumas gotas de ácido clorídrico concentrado, durante 2 horas á temperatura ambiente. Tomou-se 1 mL da solução e adicionou-se em tubo de ensaio, misturou-se com 3 mL de ácido sulfúrico concentrado, homogeneizou-se a mistura durante 30 segundos no Vortex e ajustou-se a concentração para 110 mg/L com água destilada, sendo o volume final de 5 mL. A solução resultante foi arrefecida no gelo durante 2 minutos e a absorvância foi medida a 315 nm no espectrofotómetro.

Preparou-se soluções padrão de amido a partir da dissolução de 100 mg em 50 mL de água destilada fervente contendo 5 mL de HCl 2,5 N, por 30 minutos, transferiu-se a solução arrefecida para um balão de 100 mL, perfez-se o volume com água destilada e a concentração final foi de 1000 mg/L. Preparou-se soluções com concentrações de 10, 20, 40, 70 e 100 mg/L usando o procedimento usado para o extracto, tendo como branco uma solução preparada seguindo o procedimento anterior excepto que no lugar de ácido sulfúrico adicionou-se 3 mL de água.

### **3.6.4. Determinação do teor de lípidos**

A determinação do teor de lípidos presentes nos extractos foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico Sulfo-Fosfo-Vanilina (SPV), conforme descrito por Men e colaboradores (2019), com pequenas modificações. Extraiu-se 100 mg de extracto com 10 mL da solução Clorofórmio:Metanol (1:1). O sobrenadante foi colectado por centrifugação (6000 rpm, 12 minutos), misturado com 6 mL de água destilada e centrifugado novamente (6000 rpm, 12 minutos). Para a medição do teor de lípidos, transferiu-se a camada clorofórmica para um tubo de ensaio e evaporou-se o clorofórmio a 90°C durante 20 minutos, depois adicionou-se 1,12 mL de ácido sulfúrico a 98% e a solução foi incubada a 90°C durante 20 minutos. Levou-se 50 µL dessa solução e adicionou-se 13 mL do reagente de Vanilina-Ácido fosfórico para o desenvolvimento da cor. Após a redução da temperatura até temperatura ambiente por 10 minutos, mediu-se a absorvância a 530 nm no espectrofotómetro.

Para a construção da curva de calibração, preparou-se uma solução estoque de óleo de soja pela dissolução de 100 mg em 100 mL de clorofórmio e tomou-se 100, 200, 400, 600 e 800  $\mu\text{L}$  dessa solução para o procedimento descrito anteriormente. O volume final das soluções foi de 8 mL e as concentrações foram 12,5, 25, 50, 75 e 100  $\mu\text{g/mL}$ . O branco foi preparado da mesma forma, substituindo a amostra por água destilada.

A solução de Vanilina-Ácido fosfórico foi preparada a partir da dissolução de 0,1 g de Vanilina em 16,7 mL de água destilada, depois misturou-se com 66,7 mL de ácido ortofosfórico a 85%. A solução resultante foi armazenada à temperatura ambiente.

### **3.6.5. Determinação do teor de alcalóides**

A determinação do teor de alcalóides presentes nos extractos foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico do complexo de verde de bromocresol-alcalóides conforme descrito por Tiwari e colaboradores (2016), com pequenas modificações. Transferiu-se 4 mL da solução hidrometanólica do extracto a 2 mg/mL para um funil de separação, adicionou-se 5 mL da solução tampão de fosfato (pH = 4,7) e 5 mL da solução de verde de bromocresol a  $10^{-4}$  mol/L. O complexo formado (de cor amarela) foi extraído com 5 mL de clorofórmio, cuja fracção foi transferida à um balão volumétrico de 10 mL que depois foi preenchido com clorofórmio. O branco foi preparado seguindo o procedimento anterior com a excepção de que não se adicionou a solução de bromocresol verde. A absorvância do complexo contido no clorofórmio foi medida a 470 nm.

Preparou-se 5 soluções do padrão (estricnina) a diferentes concentrações a partir da solução estoque de estricnina de 100 ppm preparada pela dissolução de 10 mg de estricnina em 100 mL de água destilada. Da solução estoque da estricnina, tirou-se 0,5, 1, 1,5, 2 e 2,5 mL e transferiu-se para 5 funis de separação, separadamente. Para cada funil adicionou-se 5 mL da solução tampão de fosfato (pH = 4,7) e 5 mL da solução de bromocresol verde. O complexo formado na mistura foi extraído com clorofórmio, sendo a fracção clorofórmica colectada em balão volumétrico de 10 mL que depois foi preenchido com clorofórmio. A análise espectrofotométrica foi feita a 470 nm.

### **3.7. Determinação de actividade antioxidante *in vitro***

A actividade antioxidante *in vitro* foi determinada usando o método de descoloração do radical DPPH, método de redução do ião férrico e método de redução do ácido fosfomolíbico, nos extractos brutos da casca verde, casca madura, sementes maduras e suas fracções alcaloídicas e no extracto bruto da polpa madura, do fruto de *T. elegans*. As absorvâncias foram lidas no espectrofotómetro UV/Vis JENWAY 6850.

#### **3.7.1. Método de eliminação do radical DPPH**

A actividade antioxidante pelo método de descoloração do radical DPPH foi determinada conforme descrito por Senguttuvan e colaboradores (2014), com pequenas modificações.

#### **Procedimentos para a avaliação da actividade dos extractos brutos e fracções alcaloídicas**

Misturou-se 1 mL da solução de DPPH recentemente preparada a partir da dissolução de 6 mg de DPPH em 50 mL de metanol (120 µg/mL) com diferentes volumes (50, 300, 500, 700 e 1000 µL) dos extractos brutos na concentração de 1 mg/mL, em tubos de Eppendorf. Para as soluções alcaloídicas na concentração de 500 µg/mL, no lugar de 1 mL da solução de DPPH adicionou-se 3 mL e depois seguiu-se o procedimento descrito acima. Os volumes finais foram ajustados para 5 mL com metanol e as novas concentrações foram 10, 60, 100, 140 e 200 µg/mL. As soluções foram incubadas por 30 minutos no escuro à temperatura ambiente. O decréscimo da absorvância das soluções foi medido a 517 nm e os dados foram usados para determinar a percentagem de inibição. A solução de controle foi preparada usando o procedimento acima, sem o extracto bruto.

#### **Procedimentos para a avaliação da actividade do padrão (ácido ascórbico)**

Preparou-se uma solução estoque de 100 µg/mL de ácido ascórbico através da dissolução de 10 mg em 100 mL de metanol. Dessa solução tirou-se diferentes volumes (50, 100, 150, 250 e 500 µL) e adicionou-se em tubos de Eppendorf contendo 2 mL da solução de DPPH a 120 µg/mL, os volumes foram ajustados para 5 mL com metanol (as novas concentrações foram 1, 2, 3, 5 e 10 µg/mL) e seguiu-se o procedimento descrito para os extractos. A solução de controle foi preparada usando o procedimento acima, sem o padrão.

### **3.7.2. Método de redução de ião férrico (FRAP)**

A actividade antioxidante pelo método de redução de ião férrico foi determinada conforme descrito por Benzie e Strain (1999) e Zimila e colaboradores (2020). Preparou-se a solução FRAP pela mistura sequenciada de 25 mL da solução tampão acetato 300 mM a pH 3,6 (1 litro de solução aquosa de 3,1 g de acetato de sódio trihidratado e 16 mL de ácido acético), 2,5 mL da solução alcoólica de cloreto férrico anidro 20 mM (0,325 g de  $\text{FeCl}_3$  em 100 mL de etanol) e 2,5 mL da solução de TPTZ 10 mM (0,312 g de TPTZ em 100 mL de ácido clorídrico 40 mM).

#### **Procedimentos para a avaliação da actividade dos extractos brutos e fracções alcaloídicas**

Misturou-se diferentes volumes (50, 300, 500 e 700  $\mu\text{L}$ ) dos extractos brutos na concentração de 1 mg/mL e (50, 300, 500, 700 e 1000  $\mu\text{L}$ ) das soluções alcaloídicas a 500  $\mu\text{g/mL}$ , separadamente, com 2,7 mL de reagente FRAP, em tubos de Eppendorf. Os volumes finais foram ajustados para 5 mL com metanol e as novas concentrações foram 10, 60, 100 e 140  $\mu\text{g/mL}$  para extractos brutos e 5, 30, 50, 70 e 100  $\mu\text{g/mL}$  para soluções alcaloídicas. As soluções foram incubadas no banho de água por 30 minutos no escuro a 37°C e as absorvâncias foram lidas a 595 nm.

#### **Procedimentos para a avaliação da actividade do padrão ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )**

Preparou-se uma solução estoque de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a 1mM através da dissolução de 6,95 mg em 25 mL de metanol. Tomou-se diferentes volumes da solução (50, 100, 150, 250 e 500  $\mu\text{L}$ ) e adicionou-se em tubos de Eppendorf, depois adicionou-se 2,7 mL da solução FRAP e fez-se o volume para 10 mL com água destilada. As novas concentrações foram 5, 10, 15, 25 e 50  $\mu\text{M}$  e seguiu-se o procedimento descrito para as amostras. O branco foi preparado usando o procedimento acima, sem o padrão.

### **3.7.3. Método de redução do ácido fosfomolibdico**

A actividade antioxidante pelo método de redução de ácido fosfomolibdico foi determinada conforme descrito por Zimila e colaboradores (2020), com algumas modificações. Preparou-se a solução do ácido fosfomolibdico através da dissolução de 0,4 g de ácido fosfomolibdico em 100 mL de água destilada.

### **Procedimentos para a avaliação da actividade dos extractos brutos, fracções alcaloídicas e padrão (ácido ascórbico)**

Misturou-se diferentes volumes (50, 300, 500 e 700  $\mu\text{L}$ ) dos extractos brutos na concentração de 1 mg/mL e (50, 300, 500, 700 e 1000  $\mu\text{L}$ ) das soluções alcaloídicas a 500  $\mu\text{g/mL}$ , separadamente, com 3 mL da solução de ácido fosfomolibdico em tubos de Eppendorf. Os volumes finais foram ajustados para 5 mL com água destilada e as novas concentrações foram 10, 60, 100 e 140  $\mu\text{g/mL}$  para os extractos brutos e 5, 30, 50, 70 e 100  $\mu\text{g/mL}$  para as soluções alcaloídicas. As soluções foram incubadas por 90 minutos a 95°C no banho de água e as absorvâncias das soluções na temperatura ambiente foram medidas a 695 nm. O ácido ascórbico nas concentrações 1, 2, 3, 5, 12,5, 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$  foi usado como padrão. O branco consistiu em toda a mistura reaccional e metanol, excepto o extracto e ou o padrão.



## 4. RESULTADOS

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos na análise fitoquímica qualitativa e quantitativa e na avaliação da actividade antioxidante dos extractos brutos e suas fracções.

### 4.1. Análise fitoquímica qualitativa

#### 4.1.1. Análise fitoquímica preliminar

Os resultados dos testes fitoquímicos dos extractos brutos e suas respectivas fracções da casca verde, casca madura, polpa verde, polpa madura e sementes maduras do fruto de *T. elegans* são apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Resultados da análise fitoquímica preliminar dos extractos brutos e fracções do fruto de *T. elegans*

| Extracto            | Antraquinonas | Flavonóides | Glicósidos cardíacos | Taninos | Saponinas |
|---------------------|---------------|-------------|----------------------|---------|-----------|
| <b>Casca verde</b>  |               |             |                      |         |           |
| EB                  | -             | +           | +                    | +       | +         |
| nHex                | -             | -           | -                    | -       | -         |
| CHCl <sub>3</sub>   | -             | +           | +                    | +       | -         |
| AcOEt               | -             | +           | -                    | +       | -         |
| nBuOH               | -             | +           | -                    | -       | +         |
| Aq                  | -             | -           | -                    | -       | +         |
| <b>Casca madura</b> |               |             |                      |         |           |
| EB                  | -             | +           | +                    | +       | +         |
| nHex                | -             | -           | +                    | -       | -         |
| CHCl <sub>3</sub>   | -             | +           | +                    | -       | -         |
| AcOEt               | -             | +           | +                    | +       | -         |
| nBuOH               | -             | +           | -                    | -       | +         |
| Aq                  | -             | +           | -                    | -       | +         |

| <b>Polpa verde</b>      |   |   |   |   |   |  |
|-------------------------|---|---|---|---|---|--|
| EB                      | - | + | - | + | + |  |
| nHex                    | - | - | - | - | - |  |
| CHCl <sub>3</sub>       | - | + | - | + | - |  |
| AcOEt                   | - | + | - | + | - |  |
| nBuOH                   | - | + | - | + | + |  |
| Aq                      | - | + | - | - | + |  |
| <b>Polpa madura</b>     |   |   |   |   |   |  |
| EB                      | - | + | - | + | - |  |
| nHex                    | - | - | - | - | - |  |
| CHCl <sub>3</sub>       | - | + | - | - | - |  |
| AcOEt                   | - | + | - | + | - |  |
| nBuOH                   | - | - | - | - | - |  |
| Aq                      | - | - | - | - | - |  |
| <b>Sementes maduras</b> |   |   |   |   |   |  |
| EB                      | - | + | - | - | + |  |
| nHex                    | - | - | - | - | - |  |
| CHCl <sub>3</sub>       | - | + | - | - | - |  |
| AcOEt                   | - | - | - | - | - |  |
| nBuOH                   | - | + | - | - | + |  |
| Aq                      | - | - | - | - | + |  |

**Legenda:** (-) – resultado negativo; (+) – resultado positivo; EB – extracto bruto; nHex – hexano; CHCl<sub>3</sub> – clorofórmio; AcOEt – acetato de etilo; nBuOH – butanol; Aq – aquoso

#### 4.1.2. Análise fitoquímica por cromatografia em camada fina

Os resultados da análise fitoquímica por cromatografia de camada fina dos extractos hidrometanólicos brutos e suas respectivas fracções da casca verde, casca madura, polpa verde, polpa madura e sementes maduras do fruto de *T. elegans* estão resumidos nas tabelas 3 a 7, onde se apresenta os respectivos Rfs dos metabólitos secundários detectados. Os alcalóides se revelaram pelo aparecimento de manchas alaranjadas após a adição do reagente de Dragendorff, onde algumas tornaram-se intensamente castanhas após a adição da solução aquosa de NaNO<sub>2</sub> a 10 %.

Os triterpenos e esteróides revelaram-se pelo aparecimento de manchas violetas, rosas esverdeadas, rosas e rosa-violetas com o reagente de Vanilina-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e manchas azuis e castanhas com o reagente de Liebermann-Burchard. Os glicósidos cardíacos revelaram-se pelo aparecimento de manchas violetas avermelhadas com o reagente de Kedde. As brassinólidas revelaram-se pelo aparecimento de manchas amarelas e violetas com o reagente de Liebermann-Burchard. As bufadienólidas revelaram-se pelo aparecimento de manchas rosas e verdes com o reagente de Carr-Price. As lignanas se revelaram pelo aparecimento de manchas azuis e violetas na luz UV a 254 nm, reveladas com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% em metanol. Tais manchas foram comparadas e confirmadas com as cromatoplacas submetidas ao vapor de iodo, onde apareceram manchas castanhas. Os flavonóides revelaram-se pelo aparecimento de manchas vermelhas roxeadas a 254 e 366 nm, reveladas com o reagente de Vanilina-HCl a 5%.

Tabela 3: Rfs da análise por TLC do EBPV e suas fracções do fruto de *T. elegans*

| Rfs da polpa verde          |                                     |      |                                     |                   |                   |                   |  |
|-----------------------------|-------------------------------------|------|-------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--|
| Classes                     | EB                                  | nHex | CHCl <sub>3</sub>                   | AcOEt             | nBuOH             | Aq                |  |
| Alcalóides                  | 0,87                                | 0,94 | 0,94                                | -                 | -                 | -                 |  |
|                             | 0,69                                |      | 0,84                                |                   |                   |                   |  |
|                             | 0,61                                |      | 0,74                                |                   |                   |                   |  |
|                             | 0,10                                |      | 0,14                                |                   |                   |                   |  |
| Flavonóides                 | 0,86 <sup>1</sup> 0,67 <sup>2</sup> | -    | 0,86 <sup>1</sup> 0,67 <sup>2</sup> | 0,86 <sup>1</sup> | 0,68 <sup>2</sup> | 0,61 <sup>2</sup> |  |
|                             | 0,79 <sup>1</sup> 0,38 <sup>2</sup> |      | 0,79 <sup>1</sup> 0,36 <sup>2</sup> |                   |                   |                   |  |
|                             | 0,95 <sup>2</sup>                   |      | 0,95 <sup>2</sup>                   |                   |                   |                   |  |
|                             | 0,59 <sup>2</sup>                   |      |                                     |                   |                   |                   |  |
| Triterpenóides e esteróides | 0,90                                | -    | 0,90                                | 0,61              | 0,82              | 0,77              |  |
|                             | 0,82                                |      |                                     |                   |                   |                   |  |
|                             | 0,77                                |      |                                     |                   |                   |                   |  |
|                             | 0,61                                |      |                                     |                   |                   |                   |  |
| Brassinólidas               | 0,96                                | -    | 0,90<br>0,09                        | -                 | -                 | -                 |  |
| Bufadienólidas              | 0,94                                | -    | 0,92                                | -                 | -                 | -                 |  |
|                             | 0,64                                |      | 0,64                                |                   |                   |                   |  |
|                             | 0,12                                |      | 0,12                                |                   |                   |                   |  |
| Glicósidos cardíacos        | -                                   | -    | -                                   | -                 | -                 | -                 |  |
| Lignanas                    | -                                   | -    | -                                   | -                 | -                 | -                 |  |
| Acetogeninas                | -                                   | -    | -                                   | -                 | -                 | -                 |  |
| Antraquinonas               | -                                   | -    | -                                   | -                 | -                 | -                 |  |
| Iridóides                   | -                                   | -    | -                                   | -                 | -                 | -                 |  |
| Cumarinas                   | -                                   | -    | -                                   | -                 | -                 | -                 |  |

Tabela 4: Rfs da análise por TLC do EBCM e suas frações do fruto de *T. elegans*

| Rfs da casca madura            |  |      |                   |                                     |                                     |                   |
|--------------------------------|--|------|-------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------|
| Classes                        | EB                                     | nHex | CHCl <sub>3</sub> | AcOEt                               | nBuOH                               | Aq                |
| Alcalóides                     | 0,88                                   | 0,25 | 0,86              | 0,86                                | 0,86                                | -                 |
|                                | 0,80                                   |      | 0,78              | 0,78                                | 0,80                                |                   |
|                                | 0,32                                   |      | 0,23              | 0,23                                | 0,23                                |                   |
|                                | 0,14                                   |      |                   |                                     |                                     |                   |
| Flavonóides                    | 0,86 <sup>1</sup> 0,95 <sup>2</sup>    | -    | 0,53 <sup>1</sup> | 0,86 <sup>1</sup> 0,95 <sup>2</sup> | 0,88 <sup>1</sup> 0,95 <sup>2</sup> | 0,30 <sup>1</sup> |
|                                | 0,79 <sup>1</sup> 0,61 <sup>2</sup>    |      |                   | 0,79 <sup>1</sup> 0,62 <sup>2</sup> | 0,79 <sup>1</sup> 0,61 <sup>2</sup> |                   |
|                                | 0,67 <sup>1</sup> 0,67 <sup>2</sup>    |      |                   | 0,67 <sup>1</sup> 0,67 <sup>2</sup> | 0,67 <sup>1</sup> 0,67 <sup>2</sup> |                   |
|                                | 0,62 <sup>1</sup> 0,25 <sup>2</sup>    |      |                   | 0,63 <sup>1</sup> 0,25 <sup>2</sup> | 0,62 <sup>1</sup> 0,25 <sup>2</sup> |                   |
|                                | 0,54 <sup>1</sup>                      |      |                   | 0,32 <sup>1</sup>                   | 0,53 <sup>1</sup>                   |                   |
|                                | 0,31 <sup>1</sup><br>0,26 <sup>1</sup> |      |                   |                                     |                                     |                   |
| Triterpenóides<br>e esteróides | 0,76                                   | -    | 0,76              | 0,56                                | -                                   | 0,69              |
|                                | 0,69                                   |      | 0,51              |                                     |                                     |                   |
|                                | 0,56                                   |      |                   |                                     |                                     |                   |
|                                | 0,51                                   |      |                   |                                     |                                     |                   |
| Brassinolidas                  | -                                      | -    | -                 | -                                   | -                                   | -                 |
| Bufadienolidas                 | 0,94                                   | -    | 0,43              | 0,43                                | -                                   | -                 |
|                                | 0,44                                   |      |                   |                                     |                                     |                   |
| Glicósidos<br>cardíacos        | -                                      | 0,98 | 0,66              | 0,99                                | -                                   | -                 |
|                                |  |      |                   | 0,95                                |                                     |                   |
|                                |  |      |                   | 0,73                                |                                     |                   |
|                                |  |      |                   | 0,63                                |                                     |                   |
| Lignanas                       | 0,93 e 0,69                            | -    | 0,93 e 0,68       | 0,91 e 0,68                         | -                                   | -                 |
|                                | 0,87 e 0,66                            |      | 0,87 e 0,66       | 0,87 e 0,65                         |                                     |                   |
|                                | 0,77 e 0,63                            |      | 0,75 e 0,63       | 0,77 e 0,62                         |                                     |                   |
|                                | 0,73 e 0,81                            |      | 0,73 e 0,81       | 0,73 e 0,81                         |                                     |                   |
| Acetogeninas                   | -                                      | -    | -                 | -                                   | -                                   | -                 |
| Antraquinonas                  | -                                      | -    | -                 | -                                   | -                                   | -                 |
| Iridóides                      | -                                      | -    | -                 | -                                   | -                                   | -                 |
| Cumarinas                      | -                                      | -    | -                 | -                                   | -                                   | -                 |

Tabela 5: Rfs da análise por TLC do EBPM e suas frações do fruto de *T. elegans*

| Rfs da polpa madura         |                      |      |                   |                   |       |      |
|-----------------------------|----------------------|------|-------------------|-------------------|-------|------|
| Classes                     | EB                   | nHex | CHCl <sub>3</sub> | AcOEt             | nBuOH | Aq   |
| Alcalóides                  | -                    | -    | -                 | -                 | -     | -    |
| Flavonóides                 | 0,38 <sup>1</sup>    | -    | 0,39 <sup>1</sup> | 0,40 <sup>1</sup> | -     | -    |
| Triterpenóides e esteróides | 0,88<br>0,70<br>0,55 | 0,70 | 0,88              | -                 | -     | 0,55 |
| Brassinolidas               | -                    | 0,95 | 0,93              | -                 | -     | -    |
| Bufadienolidas              | 0,94<br>0,72         | -    | 0,94<br>0,70      | -                 | -     | -    |
| Glicósidos cardíacos        | -                    | -    | -                 | -                 | -     | -    |
| Lignanas                    | 0,81 e 0,58          | -    | 0,81 e 0,59       | 0,82 e 0,59       | -     | -    |
| Acetogeninas                | -                    | -    | -                 | -                 | -     | -    |
| Antraquinonas               | -                    | -    | -                 | -                 | -     | -    |
| Iridóides                   | -                    | -    | -                 | -                 | -     | -    |
| Cumarinas                   | -                    | -    | -                 | -                 | -     | -    |

Tabela 6: Rfs da análise por TLC do EBSM e suas frações do fruto de *T. elegans*

| Rfs das sementes maduras    |  |      |  |                            |                   |    |
|-----------------------------|--|------|--|----------------------------|-------------------|----|
| Classes                     | EB                                     | nHex | CHCl <sub>3</sub>                      | AcOEt                      | nBuOH             | Aq |
| Alcalóides                  | 0,97<br>0,88<br>0,76<br>0,05           | 0,97 | 0,97<br>0,88                           | -                          | -                 | -  |
| Flavonóides                 | 0,94 <sup>1</sup><br>0,77 <sup>1</sup> | -    | 0,94 <sup>1</sup><br>0,77 <sup>1</sup> | -                          | 0,77 <sup>1</sup> | -  |
| Triterpenóides e esteróides | -                                      | -    | -                                      | -                          | -                 | -  |
| Brassinolidas               | -                                      | -    | -                                      | -                          | -                 | -  |
| Bufadienolidas              | 0,61                                   | -    | 0,63                                   | 0,63                       | 0,63              | -  |
| Glicósidos cardíacos        | -                                      | -    | -                                      | -                          | -                 | -  |
| Lignanas                    | 0,96 e 0,69<br>0,79 e 0,34             | -    | 0,96 e 0,69                            | 0,96 e 0,69<br>0,79 e 0,34 | -                 | -  |
| Acetogeninas                | -                                      | -    | -                                      | -                          | -                 | -  |
| Antraquinonas               | -                                      | -    | -                                      | -                          | -                 | -  |
| Iridóides                   | -                                      | -    | -                                      | -                          | -                 | -  |
| Cumarinas                   | -                                      | -    | -                                      | -                          | -                 | -  |

Tabela 7: Rfs da análise por TLC do EBCV e suas fracções do fruto de *T. elegans*

| Rfs da casca verde          |                                     |                   |                                     |                   |                   |      |
|-----------------------------|-------------------------------------|-------------------|-------------------------------------|-------------------|-------------------|------|
| Classes                     | EB                                  | nHex              | CHCl <sub>3</sub>                   | AcOEt             | nBuOH             | Aq   |
| Alcalóides                  | 0,87                                | -                 | 0,84                                | -                 | -                 | -    |
|                             | 0,81                                |                   | 0,76                                |                   |                   |      |
|                             | 0,20                                |                   | 0,20                                |                   |                   |      |
|                             | 0,15                                |                   | 0,15                                |                   |                   |      |
| Flavonóides                 | 0,86 <sup>1</sup> 0,95 <sup>2</sup> | 0,89 <sup>2</sup> | 0,86 <sup>1</sup> 0,94 <sup>2</sup> | 0,94 <sup>2</sup> | 0,94 <sup>2</sup> | -    |
|                             | 0,79 <sup>1</sup> 0,83 <sup>2</sup> |                   | 0,79 <sup>1</sup> 0,89 <sup>2</sup> | 0,89 <sup>2</sup> |                   |      |
|                             | 0,62 <sup>2</sup>                   |                   | 0,62 <sup>2</sup>                   |                   |                   |      |
| Triterpenóides e esteróides | 0,92                                | 0,04              | 0,73                                | 0,92              | 0,92              | 0,80 |
|                             | 0,80                                | 0,22              |                                     |                   |                   | 0,64 |
|                             | 0,73                                |                   |                                     |                   |                   |      |
|                             | 0,64                                |                   |                                     |                   |                   |      |
|                             | 0,22                                |                   |                                     |                   |                   |      |
|                             | 0,04                                |                   |                                     |                   |                   |      |
| Brassinolidas               | 0,95                                | -                 | 0,94                                | 0,06              | -                 | -    |
|                             |                                     |                   | 0,20                                |                   |                   |      |
|                             |                                     |                   | 0,16                                |                   |                   |      |
|                             |                                     |                   | 0,05                                |                   |                   |      |
| Bufadienolidas              | -                                   | -                 | 0,88                                | -                 | -                 | -    |
|                             |                                     |                   | 0,59                                |                   |                   |      |
| Glicósidos cardíacos        | -                                   | -                 | 0,78                                | -                 | -                 | -    |
|                             |                                     |                   | 0,68                                |                   |                   |      |
|                             |                                     |                   | 0,63                                |                   |                   |      |
| Lignananas                  | 0,74 e 0,41                         | -                 | 0,74 e 0,40                         | 0,74 e 0,41       | -                 | -    |
| Acetogeninas                | -                                   | -                 | -                                   | -                 | -                 | -    |
| Antraquinonas               | -                                   | -                 | -                                   | -                 | -                 | -    |
| Iridóides                   | -                                   | -                 | -                                   | -                 | -                 | -    |
| Cumarinas                   | -                                   | -                 | -                                   | -                 | -                 | -    |

**Legenda:** EB – extracto bruto; nHex – hexano; AcOEt – acetato de etilo; nBuOH – butanol; Aq – aquoso; (-) – resultado negativo; expoente 1 – Rfs da eluição com AcOEt: Piridina: Água: MeOH (16:4:2:1) e expoente 2 – Rfs da eluição com CHCl<sub>3</sub>: MeOH (9:3).

#### 4.1.3. Análise por GC-MS

Os resultados da análise fitoquímica por GC-MS das fracções alcaloídicas dos extractos brutos da casca verde, casca madura e sementes maduras do fruto de *T. elegans* são apresentados na tabela 8. As estruturas dos compostos da tabela 8 são apresentadas nas figuras 13 e 14.

Tabela 8: Alcalóides identificados na análise fitoquímica por GC-MS das frações alcaloídicas de EBCV, EBCM e EBSM do fruto de *T. elegans*

| Fracção alcaloídica das sementes maduras |  |                         |   |                   |
|--|--|-------------------------|---|-------------------|
| Composto                                 | Nome   | Tempo de retenção (min) | Fórmula molecular   | Área relativa (%) |
| 1  | Éster metílico do ácido 4-demetil-3-oxovobassan-17-óico  | 21,946                  | C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>                 | < 3,87            |
| 2  | Ibogamina  | 22,312                  | C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub>                                | 3,87              |
| 3  | Éster metílico do ácido (2 $\alpha$ , 3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 12 $\beta$ , 19 $\alpha$ , 20R)-2,20-cicloaspidospermidina-3-carboxílico              | 22,632                  | C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                 | 88,41             |
| 4  | Acetato de Sarpagan-17-ol  | 22,883                  | C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                 | 15,56             |
| 5  | 16,17,19,20-tetradehidrocuroano  | 22,975                  | C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub>                                | Vestigial         |
| 6  | Éster metílico do ácido [2S-(2 $\alpha$ , 4 $\alpha$ , 5E)]-5-etilideno-2-[3-(2-hidroxi-etil)-1H-indol-2-il]- $\alpha$ -metileno-4-piperidinoacético | 23,226                  | C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>                 | < 3,87            |
| 7  | Éster metílico do ácido 12-metoxiibogamina-18-carboxílico  | 24,609                  | C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>                 | 7,68              |
| 8  | 2-[4-(4-Metoxifenil)-3-fenilpirazol-1-il]-1H-benzoimidazol   | 24,929                  | C <sub>23</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O                              | < 3,87            |
| 9  | 1'-Carboetoxi-1'-ciano-1 $\beta$ , 2 $\beta$ -dihidro-17 $\beta$ -hidroxicicloprop(1,2)androsta-1,4,6-trien-3-ona                                    | 25,787                  | C <sub>24</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>4</sub>                               | < 3,87            |
| Fracção alcaloídica da casca verde       |  |                         |   |                   |
| 10                                       | 2-Metoxi-1-Naftalenamina   | 13,591                  | C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> NO  | Vestigial         |
| 11                                       | 2,7-Difenil-1,6-dioxopiridazino[4,5:2',3']pirrolo[4',5'-d]piridazina   | 15,031                  | C <sub>20</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub>                 | Vestigial         |
| 12                                       | 2-Miristinoilpanteteína  | 17,923                  | C <sub>25</sub> H <sub>44</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S               | Vestigial         |
| 13                                       | 9-(2',2'-Dimetilpropanoilhidrazono)-3,6-dicloro-2,7-bis-[2-(dietilamino)-etoxi]fluoreno  | 20,449                  | C <sub>30</sub> H <sub>42</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> | 10,39             |
| 14                                       | Éster metílico do ácido (20 $\alpha$ )-19,20-dihidro-3-oxovobasan-17-oico  | 25,329                  | C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>                 | 57,82             |
| 15                                       | 5-Etoxi-2-[5-(4-metoxifenil)pirimidin-4-il]fenol   | 27,135                  | C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>                 | 21,08             |
| Fracção alcaloídica da casca madura      |  |                         |   |                   |
| 13                                       | 9-(2',2'-Dimetilpropanoilhidrazono)-3,6-dicloro-2,7-bis-[2-(dietilamino)-etoxi]fluoreno  | 20,449                  | C <sub>30</sub> H <sub>42</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> | 5,22              |
| 14                                       | Éster metílico do ácido (20 $\alpha$ )-19,20-dihidro-3-oxovobasan-17-oico  | 25,261                  | C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>                 | 51,72             |
| 15                                       | 5-Etoxi-2-[5-(4-metoxifenil)pirimidin-4-il]fenol   | 27,135                  | C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>                 | 16,66             |

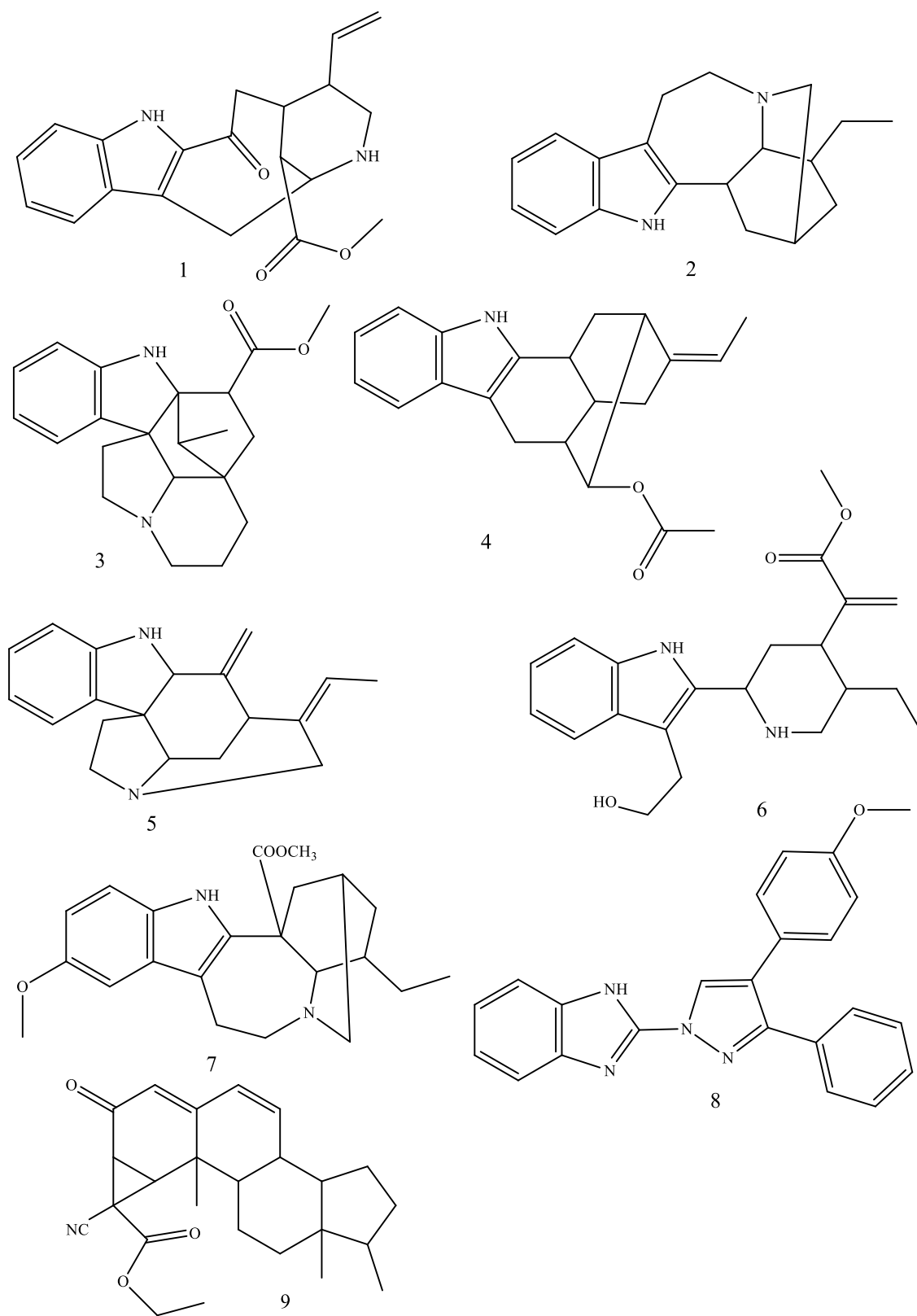


Figura 13: Estruturas dos compostos identificados por GC-MS na fracção alcaloídica das sementes maduras



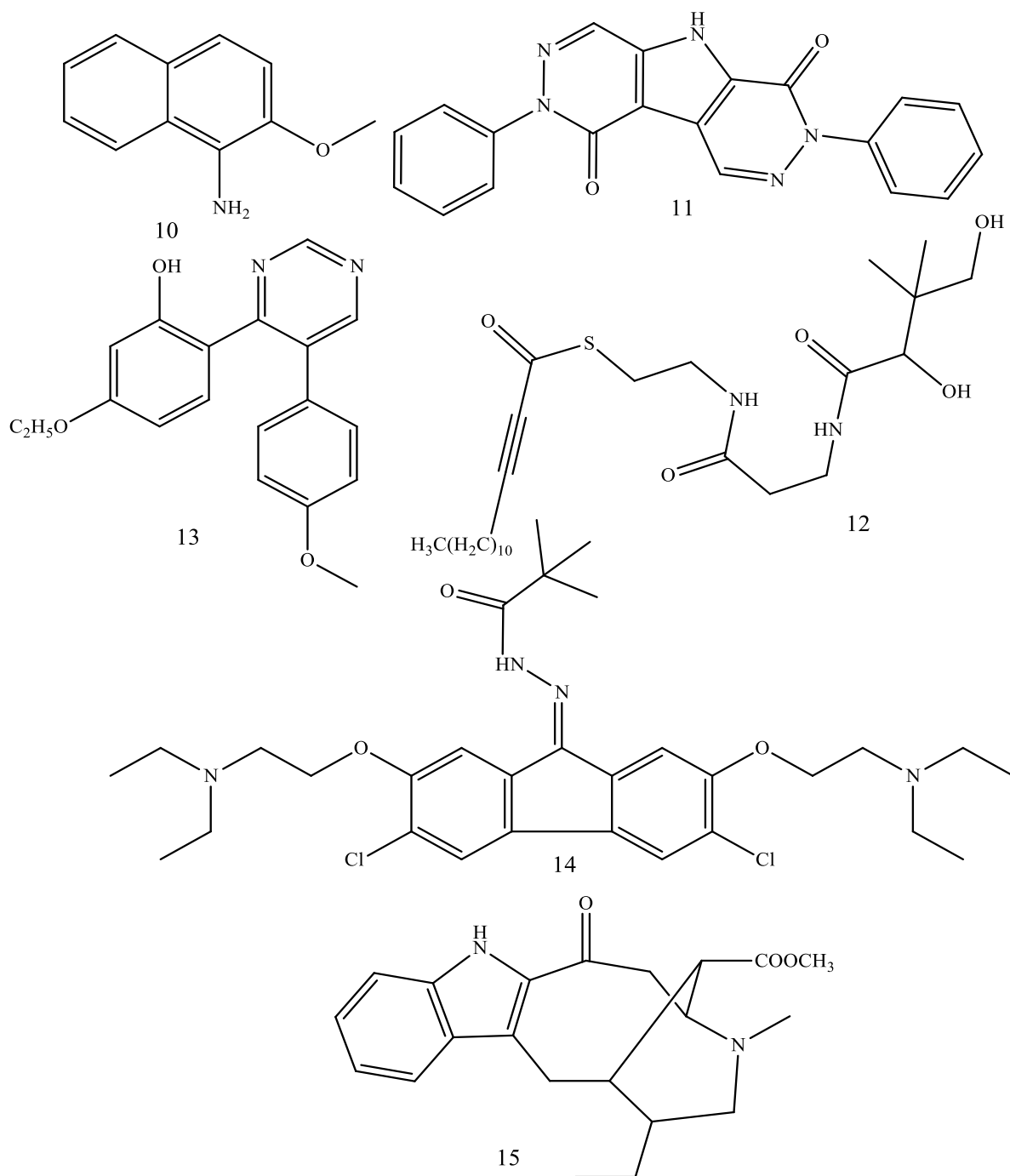


Figura 14: Estruturas dos compostos identificados por GC-MS na fracção alcalóidica da casca verde (compostos 10 a 15) e na fracção alcalóidica da casca madura (compostos 13 a 15)

## 4.2. Análise fitoquímica quantitativa

Os resultados da análise fitoquímica quantitativa obtidos na determinação de fenóis totais, flavonóides totais, alcalóides, carboidratos e lípidos nos extractos brutos da casca verde, casca madura, polpa madura e sementes maduras do fruto de *T. elegans* são apresentados na tabela 9. Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três repetições.

Tabela 9: Resultados da análise fitoquímica quantitativa dos fenóis totais, flavonóides totais, alcalóides, carboidratos e lípidos de EBCV, EBCM, EBPM e EBSM do fruto de *T. elegans*

| Classes                     | EBCV                             | EBCM                             | EBPM                             | EBSM                            |
|-----------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| Fenóis Totais (mgEAG/g)     | 38,468 $\pm$ 0,193 <sup>a</sup>  | 25,125 $\pm$ 0,183 <sup>b</sup>  | 21,091 $\pm$ 0,196 <sup>c</sup>  | 43,002 $\pm$ 0,327 <sup>d</sup> |
| Flavonóides Totais (mgER/g) | 26,521 $\pm$ 2,027 <sup>a</sup>  | 18,208 $\pm$ 1,212 <sup>b</sup>  | 9,609 $\pm$ 0,290 <sup>c</sup>   | 24,640 $\pm$ 1,430 <sup>a</sup> |
| Alcalóides (mgEE/g)         | 27,592 $\pm$ 1,590 <sup>a</sup>  | 13,214 $\pm$ 1,337 <sup>b</sup>  | -                                | 23,129 $\pm$ 0,582 <sup>c</sup> |
| Carboidratos (mgEA/g)       | 456,474 $\pm$ 2,516 <sup>a</sup> | 185,454 $\pm$ 2,500 <sup>b</sup> | 831,759 $\pm$ 3,275 <sup>c</sup> | 440,196 $\pm$ 4,03 <sup>d</sup> |
| Lípidos (mgEOS/g)           | 271,114 $\pm$ 1,030 <sup>a</sup> | 281,436 $\pm$ 0,498 <sup>b</sup> | 251,012 $\pm$ 4,839 <sup>c</sup> | 429,442 $\pm$ 1,86 <sup>d</sup> |

**Legenda:** EBCV – extracto bruto da casca verde; EBCM – extracto bruto da casca madura; EBPM – extracto bruto da polpa madura; EBSM – extracto bruto das sementes maduras; mgEAG/g – miligrama equivalente de ácido gálico por grama de extracto seco; mgER/g – miligrama equivalente de rutina por grama de extracto seco; mgEE/g – miligrama equivalente de estricnina por grama de extracto seco; mgEOS/g – miligrama equivalente de óleo de soja por grama de extracto seco; mgEA/g – miligrama equivalente de amido por grama de extracto seco.

As médias seguidas por letras diferentes em cada linha são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

## 4.3. Actividade antioxidante *in vitro*

Os resultados da actividade antioxidante *in vitro* determinados pelo método de DPPH, método FRAP e método de redução do ácido fosfomolibdico nos extractos brutos da casca verde, casca madura, sementes maduras e suas fracções alcaloídicas e no extracto bruto da polpa madura, do fruto de *T. elegans* são apresentados nas tabelas 10, 11, 12, 13 e 14. Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média de três repetições.

Tabela 10: Resultados da actividade antioxidante dos extractos brutos e fracções alcaloídicas pelo método de DPPH

| Amostra         | IC <sub>50</sub> (µg/mL)     |
|-----------------|------------------------------|
| EBCV            | 56,743 ± 0,832 <sup>a</sup>  |
| EBCM            | 112,481 ± 1,841 <sup>b</sup> |
| EBPM            | 80,561 ± 1,280 <sup>c</sup>  |
| EBSM            | 83,791 ± 0,309 <sup>d</sup>  |
| FACV            | 76,438 ± 0,104 <sup>e</sup>  |
| FACM            | 75,912 ± 0,265 <sup>e</sup>  |
| FASM            | 75,041 ± 0,076 <sup>e</sup>  |
| Ácido Ascórbico | 3,324 ± 0,011                |

Tabela 11: Resultados da actividade antioxidante dos extractos brutos pelo método FRAP

| µg/mL do extracto | µM equivalentes de Fe <sup>2+</sup> |                             |                             |                             |
|-------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                   | EBCV                                | EBCM                        | EBPM                        | EBSM                        |
| 10                | 22,065 ± 0,365 <sup>a</sup>         | 7,270 ± 0,359 <sup>b</sup>  | 22,043 ± 3,557 <sup>a</sup> | 15,647 ± 0,229 <sup>c</sup> |
| 60                | 44,790 ± 0,530 <sup>a</sup>         | 19,697 ± 0,131 <sup>b</sup> | 43,573 ± 2,125 <sup>a</sup> | 23,580 ± 0,101 <sup>c</sup> |
| 100               | 60,418 ± 0,567 <sup>a</sup>         | 25,815 ± 0,508 <sup>b</sup> | 49,100 ± 0,278 <sup>c</sup> | 45,815 ± 0,287 <sup>d</sup> |
| 140               | 71,083 ± 2,847 <sup>a</sup>         | 29,355 ± 0,927 <sup>b</sup> | 60,167 ± 1,409 <sup>c</sup> | 53,187 ± 0,281 <sup>d</sup> |

Tabela 12: Resultados da actividade antioxidante das fracções alcaloídicas pelo método FRAP

| µg/mL do extracto | µM equivalentes de Fe <sup>2+</sup> |                             |                             |
|-------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                   | FACV                                | FACM                        | FASM                        |
| 5                 | 15,272 ± 0,043 <sup>bc</sup>        | 15,525 ± 0,318 <sup>b</sup> | 14,932 ± 0,054 <sup>c</sup> |
| 30                | 50,058 ± 0,010 <sup>a</sup>         | 50,793 ± 0,209 <sup>b</sup> | 51,535 ± 0,013 <sup>c</sup> |
| 50                | 73,495 ± 0,013 <sup>a</sup>         | 73,365 ± 0,555 <sup>a</sup> | 72,862 ± 0,027 <sup>a</sup> |
| 70                | 86,442 ± 0,058 <sup>a</sup>         | 87,908 ± 0,969 <sup>b</sup> | 88,588 ± 0,043 <sup>b</sup> |

Tabela 13: Resultados da actividade antioxidante dos extractos brutos pelo método de redução do ácido fosfomolibdico

| µg/mL do extracto | µg/mL equivalentes de Ácido Ascórbico |                            |                             |                             |
|-------------------|---------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                   | EBCV                                  | EBCM                       | EBPM                        | EBSM                        |
| 10                | 2,756 ± 0,185 <sup>a</sup>            | 3,154 ± 0,112 <sup>b</sup> | 3,228 ± 0,125 <sup>b</sup>  | 3,171 ± 0,240 <sup>b</sup>  |
| 60                | 4,667 ± 0,117 <sup>a</sup>            | 4,542 ± 0,094 <sup>a</sup> | 5,375 ± 0,031 <sup>b</sup>  | 8,402 ± 0,257 <sup>c</sup>  |
| 100               | 5,536 ± 0,145 <sup>a</sup>            | 4,954 ± 0,249 <sup>b</sup> | 7,540 ± 0,071 <sup>c</sup>  | 12,134 ± 0,308 <sup>d</sup> |
| 140               | 6,684 ± 0,016 <sup>a</sup>            | 5,308 ± 0,139 <sup>b</sup> | 10,138 ± 0,871 <sup>c</sup> | 16,069 ± 1,387 <sup>d</sup> |

Tabela 14: Resultados da actividade antioxidante das fracções alcaloídicas pelo método de redução do ácido fosfomolibdico

| $\mu\text{g/mL}$ do extracto | $\mu\text{g/mL}$ equivalentes de Ácido Ascórbico |                      |                      |
|------------------------------|--|----------------------|----------------------|
|                              | FACV   | FACM                 | FASM                 |
| 5                            | $2,864 \pm 0,012^a$                              | $3,051 \pm 0,151^a$  | $2,960 \pm 0,019^a$  |
| 30                           | $10,172 \pm 0,034^a$                             | $10,121 \pm 0,148^a$ | $8,848 \pm 0,043^b$  |
| 50                           | $16,303 \pm 0,055^a$                             | $16,494 \pm 0,037^a$ | $13,577 \pm 0,025^b$ |
| 70                           | $19,231 \pm 0,033^a$                             | $19,053 \pm 0,182^a$ | $17,692 \pm 0,151^b$ |

**Legenda:** EBCV – extracto bruto da casca verde; EBCM – extracto bruto da casca madura; EBPM – extracto bruto da polpa madura; EBSM – extracto bruto das sementes maduras; FACV – fracção alcaloídica da casca verde; FACM – fracção alcaloídica da casca madura; FASM – fracção alcaloídica das sementes maduras.

As médias seguidas por letras diferentes em coluna (tabela 10) e em cada linha (tabelas 11 a 14) são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4. Correlação entre a actividade antioxidante e o teor de fenóis totais, flavonóides totais e alcalóides

Tabela 15: Valores dos coeficientes de correlação entre a actividade antioxidante e o teor de fenóis, flavonóides e alcalóides de EBCV, EBCM, EBPM e EBSM do fruto de *T. elegans*

| Método    | Coeficiente de correlação |                |                    |                |            |                |
|-----------|---------------------------|----------------|--------------------|----------------|------------|----------------|
|           | Fenóis totais             |                | Flavonóides totais |                | Alcalóides |                |
|           | r                         | R <sup>2</sup> | r                  | R <sup>2</sup> | r          | R <sup>2</sup> |
| DPPH      | -0,4697                   | 0,2207         | -0,3720            | 0,1384         | -0,9804    | 0,9611         |
| FRAP      | 0,3666                    | 0,1344         | 0,2153             | 0,0463         | 0,9911     | 0,9823         |
| Ác. Fosf. | 0,5037                    | 0,2537         | 0,1187             | 0,0141         | 0,3271     | 0,1070         |

**Legenda:** r – coeficiente de correlação de Pearson; R<sup>2</sup> – coeficiente de determinação.

#### 4.5. Análise estatística

Todos os resultados da análise fitoquímica quantitativa e da actividade antioxidante foram submetidos ao tratamento estatístico no Minitab® 21 e os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média de três repetições. A significância das diferenças entre as médias foi avaliada a 95% de nível de confiança pelo teste post-hoc de comparação múltipla de Tukey.

## 5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

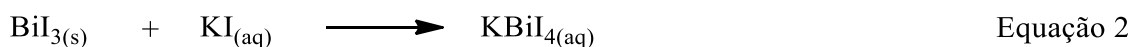
### 5.1. Análise fitoquímica

#### 5.1.1. Análise fitoquímica qualitativa

As análises fitoquímicas preliminares e por TLC dos extractos hidrometanólicos brutos e suas respectivas fracções, do fruto de *T. elegans*, revelaram a presença de algumas classes de metabólitos secundários de interesse farmacológico.

Neste estudo, a cromatografia de camada fina (TLC) revelou a presença de 4, 3, 4 e 4 manchas alaranjadas com o reagente de Dragendorff e manchas castanhas com a subsequente pulverização com solução aquosa de  $\text{NaNO}_2$  a 10%, nos extractos hidrometanólicos brutos e suas fracções da casca verde, casca madura, polpa verde e sementes maduras, respectivamente. 3 valores de factor de retenção ( $R_f$ ) no EBCV são semelhantes aos valores obtidos no EBCM, o que sugere a presença de mesmos alcalóides e ou mesmo tipo de alcalóides. O mesmo é válido para 3 valores de  $R_f$  no EBCV e no EBPV, 2 no EBCV e no EBSM, 2 no EBCM e no EBPV, 2 no EBCM e no EBSM e 2 no EBPV e no EBSM. A sugestão final é de que existem alcalóides em comum na casca verde, casca madura, polpa verde e sementes maduras do fruto de *T. elegans*. Todas as manchas observadas no EBCV foram apenas observadas na fracção de clorofórmio. Uma das manchas observadas no EBCM foi identificada em todas as fracções, excepto na fracção aquosa, e as outras foram identificadas nas fracções clorofórmica, acetato de etilo e n-butanol. Todas as manchas observadas no EBPV e no EBSM foram identificadas na fracção clorofórmica e 1 na fracção de n-hexano. Uma situação curiosa aconteceu no extracto bruto e fracções das sementes maduras, uma mancha não apareceu mais na placa nas tentativas de reprodução dos resultados partindo do mesmo concentrado do extracto, e a mesma mancha não foi revelada nas fracções, sugerindo tratar-se de um alcalóide pouco estável. O aparecimento de cor alaranjada e castanha com os reagentes de revelação mencionados anteriormente vai de acordo com o previsto por Waksmundzka-Hajnos e colaboradores (2008) e Ahmad e colaboradores (2017). Além disso, a natureza química dos compostos que apresentam a coloração alaranjada é explicada por Raal e colaboradores (2020), que explicam a química do reagente de Dragendorff, preparado a partir da dissolução de oxinitrato de bismuto ( $\text{Bi}_6\text{O}_4(\text{HO})_4(\text{NO}_3)_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) em uma solução ácida diluída (frequentemente de ácido acético ou ácido tartárico) e a subsequente mistura dessa com uma solução concentrada de iodeto

de potássio (KI). A formação do reagente é descrita pelas equações 1 e 2, onde na equação 1 ocorre a formação do BiI<sub>3</sub>, um precipitado escuro, que depois reage com excesso de iões iodeto (I<sup>-</sup>) e forma o complexo castanho-claro solúvel tetraiodobismutato de potássio (KBiI<sub>4</sub>).



A formação do precipitado entre o reagente de Dragendorff e os alcalóides pode ser explicada com base nas equações 3 e 4. A equação 3 reflecte o processo natural que ocorre de modo a formar sal de amónio, pois muitos alcalóides nas plantas existem na forma de sais de amónio. A equação 4 reflecte a formação do precipitado entre o reagente de Dragendorff e os alcalóides. Dependendo da natureza do alcalóide, o precipitado pode apresentar coloração amarela, laranja e castanha (Raal *et al.*, 2020).



Nos compostos fenólicos, o teste fitoquímico preliminar revelou a presença de flavonóides em todas as partes do fruto de *T. elegans*. A presença de flavonóides em todas as partes do fruto foi confirmada por TLC, onde se eluiu com as soluções AcOEt:piridina:água:metanol (16:4:2:1) e CHCl<sub>3</sub>:MeOH (9:3). Todas as manchas observadas no EBCV foram observadas na fracção clorofórmica, 1 na fracção de n-hexano, 2 na fracção de acetato de etilo e 1 na fracção de n-butanol. Todas as manchas observadas no EBCM foram observadas na fracção de acetato de etilo e na fracção de n-butanol, na fracção clorofórmica e na fracção aquosa observou-se apenas 1 mancha. Todas as manchas observadas no EBPV foram observadas apenas na fracção clorofórmica, nas fracções subsequentes observou-se apenas 1 mancha em cada uma delas. A mancha observada no EBPM foi observada também na fracção clorofórmica e na fracção de acetato de etilo. Quanto às manchas observadas no EBSM, elas foram todas apenas observadas na fracção clorofórmica e 1 na fracção de n-butanol. Duas das manchas observadas no EBCV e no EBCM para ambos os sistemas de eluição, 2 e 3 no EBCV e no EBPV e 1 no EBCM e no EBSM, possuem o mesmo valor de R<sub>f</sub>, sugerindo serem os mesmos flavonóides. As colorações das manchas observadas que sugerem a atribuição dos picos aos flavonóides foram amarela escura, verde, azul e vermelha, e a cor vermelha resulta da reacção entre a vanilina e os flavonóides catéquicos em meio ácido,

conforme descrito por Waksmundzka-Hajnos e colaboradores (2008). Os resultados obtidos sugerem a presença de vários tipos de flavonóides e as suas respectivas afinidades químicas (polaridade) para com os solventes orgânicos.

A razão de se ter eluído com duas soluções de eluição diferentes é o facto de os flavonóides glicosídicos serem facilmente eluídos com o sistema de eluição AcOEt:piridina:água:metanol (16:4:2:1 v/v) e os flavonóides não polares e apolares serem facilmente eluídos com o sistema de eluição pouco polar CHCl<sub>3</sub>:MeOH (9:3 v/v), conforme descrito por Waksmundzka-Hajnos e colaboradores (2008).

Além dos flavonóides, as lignanas são outra classe dos compostos fenólicos revelada por TLC. As manchas observadas nos extractos EBCV, EBCM e EBPM foram todas observadas nas suas respectivas fracções clorofórmica e de acetato de etilo. Quanto ao EBSM, todas as manchas foram observadas na fracção de acetato de etilo e 1 na fracção clorofórmica. O EBPV e suas fracções não apresentaram manchas no vapor de iodo, sugerindo ausência de lignanas. De todas as manchas observadas nos extractos, apenas uma, observada no EBCM e no EBSM, apresentou valores de R<sub>f</sub> semelhantes, o que sugere que de todas elas apenas duas são da mesma lignana. A revelação foi feita usando dois reveladores que são a solução metanólica de ácido sulfúrico a 10% e o vapor de iodo, respectivamente. Com o primeiro revelador as manchas consideradas, sob lâmpada UV a 254 nm, apresentaram uma coloração azul-violeta e com o segundo revelador apresentaram uma coloração castanha. As cores observadas nas manchas com os dois reveladores estão de acordo com aquelas previstas por Waksmundzka-Hajnos e colaboradores (2008).

Para a detecção dos triterpenóides no geral aplica-se o reagente vanilina-ácido sulfúrico, que dá coloração azul, azul-violeta ou amarela. Apenas os triterpenos, os esteróides e as cucurbitacinas dão cor quando se usa o reagente de Liebermann-Burchard, onde apresentam cor azul, verde, rosa, castanha e amarela na luz visível. Os glicósidos cardíacos (cardenólidas) dão cores na gama de azul a violeta avermelhada com o reagente de Kedde. Os triterpenos e os esteróides dão cor rosa roxa e violeta avermelhada com o cloreto de antimónio (III) (reagente de Carl-Price). Não existem muitos reagentes selectivos para a revelação dos compostos destas categorias, por isso a fase móvel tem um papel decisivo em relação à classe a ser detectada. As bufadienólidas são reveladas pelo reagente de Carr-Price, porque o que determina a natureza delas é a fase móvel pois ela depende

das propriedades químicas das bufadienolidas, que são ligeiramente diferentes das propriedades das outras classes dentro da mesma categoria (Waksmundzka-Hajnos *et al.*, 2008). O mesmo acontece com as brassinolidas, que são detectadas com o reagente de Liebermann-Burchard (Kanwar *et al.*, 2017).

Nas manchas sobre triterpenóides e esteróides reveladas nos extractos hidrometanólicos brutos, duas do EBCM e duas do EBPM apresentaram Rfs semelhantes. As manchas do EBCV foram observadas em todas as suas fracções, mas nenhuma das fracções apresentou todas. As manchas do EBCM foram observadas apenas nas fracções clorofórmica, de acetato de etilo e aquosa. As manchas do EBPM foram observadas apenas nas fracções de n-hexano, clorofórmica e aquosa. As manchas do EBPV foram observadas nas fracções clorofórmica, de acetato de etilo, n-butanólica e aquosa, mas nenhuma das fracções apresentou todas as manchas. As manchas reveladas apresentaram colorações correspondentes à faixa espectral rosa com o reagente de Vanilina-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e azul com o reagente de Liebermann-Burchard, concordando com o previsto por Waksmundzka-Hajnos e colaboradores (2008).

As brassinolidas foram reveladas pelo reagente de Liebermann-Burchard e identificadas na casca verde, polpa verde e na polpa madura. Os EBCV e EBPV revelaram apenas uma mancha, amarela e violeta, respectivamente. Os outros extractos brutos não apresentaram manchas características, mas as fracções do EBPM apresentaram. Ademais, a fracção clorofórmica do EBCV apresentou 3 manchas verdes e duas rosas e a fracção de acetato de etilo apresentou uma mancha verde, a fracção clorofórmica do EBPV apresentou duas manchas amarelas, a fracção de n-hexano e a fracção de acetato de etilo do EBPM também apresentaram uma mancha amarela com Rfs semelhantes. As cores das manchas são semelhantes à aquelas obtidas por Kanwar e colaboradores (2017). Dois valores de Rf identificados na casca verde são semelhantes a dois valores identificados na polpa verde e um identificado na polpa madura, sugerindo tratar-se do mesmo brassinolida ou de estruturas quimicamente semelhantes. As bufadienolidas foram reveladas com o reagente de Carr-Price e foram identificadas no EBCM, EBPV, EBPM e EBSM. Quanto ao EBCV, duas manchas foram identificadas na sua fracção clorofórmica, sugerindo a presença de bufadienolidas, embora não tenham sido identificadas no extracto bruto. A mancha identificada no EBCM foi identificada nas suas fracções clorofórmica e de acetato de etilo, as manchas identificadas no EBPV e no EBPM foram também identificadas na fracção clorofórmica e a mancha observada no EBSM foi



identificada nas fracções clorofórmica, de acetato de etilo e n-butanólica. Uma mancha do EBPV apresentou Rf semelhante ao de uma mancha observada no EBSM, sugerindo tratar-se de bufadienólidas estruturalmente semelhantes. Todas as manchas observadas apresentaram coloração rosa, com à excepção de uma que foi verde, sendo ambas as cores consideradas indicadoras da presença de bufadienólidas de acordo com Waksmundzka-Hajnos e colaboradores (2008).

Os glicósidos cardíacos foram revelados com o reagente de Kedde e identificados na fracção clorofórmica do EBCV e nas fracções de n-hexano, clorofórmica e de acetato de etilo do EBCM. Dois valores de Rf de manchas identificadas na fracção clorofórmica do EBCV são semelhantes aos valores de Rf de manchas identificadas nas fracções de EBCM, sugerindo tratar-se de glicósidos cardíacos estruturalmente semelhantes. Duas das três manchas identificadas na fracção clorofórmica do EBCV apresentaram coloração verde e a outra rosa. As manchas das fracções do EBCM apresentaram as mesmas cores e mais uma castanha. Os resultados obtidos estão de acordo com o previsto por Waksmundzka-Hajnos e colaboradores (2008).

Nos testes fitoquímicos preliminares, há maior probabilidade de obtenção de resultados falso-positivos do que nos testes por TLC. Esse fenómeno pode dever-se à presença de compostos diferentes que podem reagir no teste de análise fitoquímica preliminar, dando resultado falso-positivo, o que não acontece na TLC, pois a técnica de TLC possui maior selectividade e limite de detecção em relação ao método colorimétrico clássico, que trabalha com uma matriz muito complexa da amostra (Waksmundzka-Hajnos *et al.*, 2008).

Dentre todas as classes investigadas, acetogeninas, cumarinas, antraquinonas e iridóides não foram detectadas nos extractos brutos ou suas fracções. Pallant e colaboradores (2012) realizaram estudo fitoquímico nas cascas da raíz de *T. elegans* e tiveram resultado positivo em relação à presença de cumarinas, alcalóides, óleos essenciais, esteróides, flavonóides e outros fenóis, divergindo dos resultados obtidos no presente trabalho em relação á presença de cumarinas. Os alcalóides indólicos são a subclasse fitoquímica predominante não somente nas espécies do género *Tabernaemontana* mas também na família *Apocynaceae*, exibindo diversas e variadas actividades farmacológicas (Bapela *et al.*, 2018; Ferreira e Paterna, 2019; Mansoor *et al.*, 2009a; Mansoor *et*

*al.*, 2009b; Naidoo *et al.*, 2021; Pallant *et al.*, 2012; Paterna *et al.*, 2016; Pergher *et al.*, 2019; Schmelzer e Gurib-Fakim, 2008).

A fracção clorofórmica apresentou o maior número de metabólitos secundários, enquanto a fracção aquosa residual apresentou o menor número. A fraca presença dos metabólitos secundários observada na fracção aquosa remanescente pode ter sido influenciada pelo longo processo de separação líquido-líquido, durante o qual grande parte dos metabólitos foi extraída pelos solventes precedentes, mas também podendo ter dado origem a eventuais degradações. Além disso, sendo o ponto de ebulição da água relativamente alto, a concentração da fracção foi de difícil obtenção, o que pode ter aumentado a probabilidade de formação de produtos indesejáveis, bem como a decomposição ou isomerização de compostos presentes na mesma fracção (Jones e Kinghorn, 2005).

### **Análise qualitativa por GC-MS**

A análise por GC-MS foi realizada para as fracções alcaloídicas do EBCV, EBCM e EBSM e revelou 6, 3 e 9 compostos nitrogenados, respectivamente. Foram identificados no total 15 compostos nitrogenados estruturalmente diferentes, pois os 3 compostos identificados na FACM também foram identificados na FACV, conforme mostram as figuras 13 e 14. Os compostos 7 e 15, que são éster metílico do ácido 12-metoxiibogamina-18-carboxílico e éster metílico do ácido (20 $\alpha$ )-19,20-dihidro-3-oxovobasan-17-óico, comumente designados de voacangina e dregamina, respectivamente, já foram identificados como alcalóides majoritários nas cascas da raiz de *T. elegans* (Ferreira e Paterna, 2019; Pallant *et al.*, 2012). A dregamina também foi isolada das folhas de *T. elegans* (Van Beek *et al.*, 1984; Van Der Heijden *et al.*, 1986). Os compostos 1, 2 e 7, éster metílico do ácido 4-demetil-3-oxovobassan-17-óico (perivina), ibogamina e voacangina, foram identificados nas folhas, caule e sementes de *Tabernaemontana dichotoma*, respectivamente (Perera *et al.*, 1985). A perivina também já foi isolada das raízes de *Tabernaemontana holstii* por Kingston e colaboradores (1977) e das folhas de *Catharanthus lanceus* e em algumas partes de *Catharanthus roseus* por Farnsworth e colaboradores (1963). A voacangina também foi isolada de *Tabernaemontana salzmännii*, *Tabernaemontana catharinensis*, *Tabernaemontana angulata*, *Tabernaemontana hystrix*, *Tabernaemontana heterophylla* e *Tabernaemontana laeta* (Marinho *et al.*, 2016). O composto 3, éster metílico do ácido (2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,12 $\beta$ ,19 $\alpha$ ,20R)-2,20-

cicloaspidospermidina-3-carboxílico (vindolinina), foi também isolado das folhas de *Catharanthus lanceus* por Maloney e colaboradores (1968), que também citaram que anteriormente ele foi isolado de *Catharanthus roseus*. O composto 4, acetato de sarpagan-17-ol, também designado de normaculina B, foi isolado de *Rauvolfia bahiensis* por Kato e colaboradores (2002). De referir que os géneros *Catharanthus* e *Rauvolfia* fazem parte também da família *Apocynaceae*, sustentando o que já foi afirmado quanto á composição fitoquímica convergente em relação aos alcalóides dentro dessa família. Muitos desses alcalóides foram identificados em diversas espécies não só dentro dessa família, como acontece também com *Tabernanthe* e *Voacanga*, mas também dentro do género. Do género *Tabernanthe*, o alcalóide mais marcante é a ibogaína, isolado da *Tabernanthe iboga* e, do género *Voacanga*, o alcalóide mais marcante é a voacangina, isolado da *Voacanga africana* (Schmelzer e Gurib-Fakim, 2008).

Mais de 67 espécies do género *Tabernaemontana* foram investigadas para alcalóides indólicos, onde se isolou 470 e, destes, aproximadamente 240 possuem bases estruturalmente diferentes. Devido à semelhanças estruturais notadas nos alcalóides isolados, concluiu-se que os alcalóides indólicos são a principal classe de alcalóides dentro do género (Silveira *et al.*, 2017; Marinho *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 1990) citados por (Naidoo *et al.*, 2021).

Todos os alcalóides indólicos são biogeneticamente derivados do triptofano e, portanto, contêm dois átomos de nitrogénio, um dos quais está contido dentro da parte de cinco membros do núcleo indol. Em alguns casos, nomeadamente os alcalóides farmacologicamente importantes, como a quinina, o anel de cinco membros é expandido pela inclusão de um carbono extra e os alcalóides são quimicamente classificados como quinolinas em vez de índoles, embora as suas origens biogénicas sejam as mesmas (Waksmundzka-Hajnos *et al.*, 2008).

Alguns dos alcalóides identificados nesse trabalho pertencem aos três tipos principais de alcalóides indólicos reconhecidos pela maioria dos químicos de produtos naturais, embora sejam conhecidos vários outros alcalóides indólicos que não se ajustam perfeitamente nessas três categorias. As três categorias principais são os índoles simples que são formados a partir de triptofano sem a adição de outras fracções C-esqueléticas, os congéneres triptamina-aminoácido encontrados particularmente em fungos como ergot (por exemplo, ergotamina), e o maior grupo, onde o esqueleto do triptofano está ligado a uma unidade monoterpénica derivada do iridóide

secologanina. Devido aos diferentes rearranjos da porção iridóide após a conjugação, três grupos principais deste tipo de alcalóide indol são geralmente reconhecidos, sendo estes o tipo Corynanthe (compostos 1 e 15), o tipo Iboga (compostos 2 e 7) e o tipo Aspidosperma (composto 3). Em alguns casos dois tipos estão ligados entre si para formar bisindóis (Waksmundzka-Hajnos *et al.*, 2008).

Uma incrível variedade de estruturas pertencentes a este grupo foi determinada nos últimos 50 anos e todos eles surgem de uma condensação do tipo Mannich entre a triptamina e a secologanina, com subsequente rearranjo dos componentes iridóides. Estes alcalóides são frequentemente encontrados em diversos géneros das famílias *Apocynaceae*, *Loganiaceae* e *Rubiaceae* das *Gentianales*, sendo o tipo Iboga restrito para a *Apocynaceae* (Waksmundzka-Hajnos *et al.*, 2008).

### **5.1.2. Análise fitoquímica quantitativa**

Os resultados da análise fitoquímica quantitativa dos extractos de *T. elegans* para fenóis totais, flavonóides totais, alcalóides, carboidratos e lípidos estão resumidos na Tabela 9.

#### **Compostos fenólicos**

O teor de fenóis totais em todos os extractos variou de  $21,091 \pm 0,196$  a  $43,002 \pm 0,327$  mgEAG/g do extracto seco. O EBPM exibiu a menor quantidade de fenóis totais em comparação com os demais extractos e o EBSM exibiu a maior quantidade. O teor de fenóis totais em todos os extractos diminuiu na seguinte ordem: EBSM > EBCV > EBCM > EBPM.

O teor de flavonóides totais em todos os extractos variou de  $9,609 \pm 0,290$  a  $26,521 \pm 2,027$  mgER/g do extracto seco. O EBPM exibiu a menor quantidade de flavonóides totais em comparação com os demais extractos e o EBCV exibiu a maior quantidade. O teor de flavonóides em todos os extractos decresceu na seguinte ordem: EBCV > EBSM > EBCM > EBPM.

Os compostos fenólicos são principalmente encontrados na casca de frutos e nas sementes. A maioria das sementes contém grande quantidade de óleos polinsaturados e antioxidantes fenólicos necessários para proteger os ácidos gordos poliinsaturados do óleo contra a autooxidação até à próxima safra. Durante o processamento das sementes oleaginosas, antioxidantes menos polares são co-extraídos com o óleo, enquanto antioxidantes mais polares insolúveis no solvente de

extracção permanecem. Essa é a razão mais presumível do facto de haver muita quantidade de fenóis totais nas sementes (Harborne e Williams, 2000; Oksana *et al.*, 2012).

Os flavonóides são os principais responsáveis pela protecção das plantas contra a luz ultravioleta. Assim, a casca verde apresentou o maior teor de flavonóides totais presumivelmente porque é mais propensa à radiação ultravioleta em comparação com a polpa e as sementes (Harborne e Williams, 2000). A razão de a casca verde conter maior teor de flavonóides em comparação com a casca madura deve-se à protecção do processo de frutificação. A frutificação refere-se ao estado em que uma planta é capaz de florescer, produzir frutos e também levá-los à maturidade. O fruto maduro não precisa mais de protecção rigorosa outrora prestada durante o processo de frutificação, por isso alguns flavonóides protectores podem ser metabolizados (Nelson e Cox, 2014).

### **Alcalóides**

O teor de alcalóides totais em todos os extractos variou de  $13,214 \pm 1,337$  a  $27,592 \pm 1,590$  mgEE/g do extracto seco. O EBCM exibiu a menor quantidade de alcalóides em comparação com os demais extractos e o EBCV exibiu a maior quantidade. O teor de alcalóides em todos os extractos decresceu na seguinte ordem: EBCV > EBSM > EBCM.

Acredita-se que o sabor amargo dos alcalóides actua como um impedimento alimentar aos mamíferos, insectos e microorganismos, pois muitas vezes estão concentrados em partes da planta vulneráveis a ataques (Waksmundzka-Hajnos *et al.*, 2008). Podemos associar o maior teor de alcalóides na casca verde e nas sementes devido à maior necessidade de protecção até à maturidade no caso da casca verde e protecção da continuidade da espécie no caso das sementes (Marinho *et al.*, 2016; Naidoo *et al.*, 2021; Waksmundzka-Hajnos *et al.*, 2008).

### **Lípidos**

O teor de lípidos em todos os extractos variou de  $251,012 \pm 4,839$  a  $429,442 \pm 1,856$  mgEOS/g do extracto seco. O EBPM exibiu a menor quantidade de lípidos em comparação com os demais extractos e o EBSM exibiu a maior quantidade. O teor de lípidos em todos os extractos decresceu na seguinte ordem: EBSM > EBCM > EBCV > EBPM.

As sementes dos frutos são compostas por água, proteínas, carboidratos, lípidos, cinzas, fibras e minerais. A composição química das sementes é determinada por factores genéticos, ambientais e agronómicos e varia de acordo com a espécie (origem botânica). Os lípidos representam uma parcela significativa da composição química das sementes de frutos. Descobriu-se que o teor de óleo das sementes de frutos varia de 1,1 a 1,9% (em sementes de abacate) para 78,9% (em sementes de limão) enquanto na maioria das sementes de frutos, o teor de óleo é próximo de um terço do seu peso seco (Alves *et al.*, 2020). O óleo é uma forma concentrada de energia e as sementes precisam de reservas de energia para germinar e crescer nas primeiras fases de desenvolvimento, antes que possam produzir sua própria energia por meio da fotossíntese, sendo essa uma das razões para o acúmulo de quantidades significativas de óleo nas sementes (Nelson e Cox, 2014).

### **Carboidratos**

O teor de carboidratos em todos os extractos variou de  $831,759 \pm 3,275$  a  $185,454 \pm 2,500$  mgEA/g do extracto seco. O EBCM exibiu a menor quantidade de carboidratos em comparação com os demais extractos e o EBPM exibiu a maior quantidade. O teor de lípidos em todos os extractos decresceu na seguinte ordem: EBPM > EBCV > EBSM > EBCM. Os carboidratos são as biomoléculas mais abundantes e exercem muitas funções no organismo dos seres vivos, como armazenamento e transporte de energia (Waksmundzka-Hajnos *et al.*, 2008). Com isso, concluiu-se que o EBPM é uma boa fonte de energia e, julgando pelos resultados da análise fitoquímica qualitativa, não representa riscos à saúde porque não possui alcalóides, taninos, saponinas nem glicósidos cardíacos, que são factores antinutricionais dos alimentos (Harborne e Williams, 2000; Waksmundzka-Hajnos *et al.*, 2008).

### **5.2. Correlação de Pearson**

De acordo com as correlações de Pearson que são mostradas na tabela 15 observou-se uma distinção das mesmas pela sua magnitude (fortes e fracas). Mukaka (2012) afirma que existe uma escala de valores absolutos para o coeficiente de correlação de Pearson, em que, se o valor de *r* estiver entre 0,00 – 0,19 a correlação é muito fraca, entre 0,20 – 0,39 é fraca, entre 0,40 – 0,59 é moderada, entre 0,60 – 0,79 é forte e entre 0,80 – 1,0 é muito forte.

### **5.3. Actividade antioxidante *in vitro***

Os resultados da actividade antioxidante *in vitro* dos extractos brutos e das fracções alcaloídicas de *T. elegans* estão resumidos nas tabelas 10 a 14. Após a aplicação do teste de Tukey a 95% de nível de confiança, a actividade antioxidante entre os extractos brutos e as fracções alcaloídicas foi significativamente diferente nos três métodos.

#### **5.3.1. Método de eliminação do radical DPPH**

Os resultados da actividade antioxidante pelo método de DPPH encontram-se na tabela 10. O EBCM apresentou a percentagem de inibição ( $IC_{50}$ ) mais baixa e o EBCV apresentou  $IC_{50}$  mais elevado. Os valores de  $IC_{50}$  nos extractos brutos aumentaram na seguinte ordem: EBCV < EBPM < EBSM < EBCM. Isso significa que a actividade antioxidante diminuiu na seguinte ordem: EBCV > EBPM > EBSM > EBCM. Esta tendência é divergente à tendência do teor de fenóis totais e também à dos flavonóides, mas convergente à tendência do teor de alcalóides, no caso do EBCV, EBCM e EBSM. Isso gerou a necessidade de verificar se os alcalóides presentes nesses extractos possuem poder antioxidante, por isso fez-se extracção ácido-base para isolar os alcalóides e validar o seu poder antioxidante. No estudo, todas as fracções alcaloídicas apresentaram actividade antioxidante mais elevada em comparação com a do EBPM, EBSM e EBCM, ficando apenas atrás da actividade antioxidante do EBCV. A FACV e a FACM apresentaram valores de  $IC_{50}$  semelhantes e ligeiramente maiores que o valor da FASM. As figuras A1, A2 e A3, em conjunto com a tabela 15, mostram a correlação entre a actividade antioxidante pelo método de DPPH e os teores de fenóis totais, flavonóides totais e alcalóides, respectivamente. Nessas figuras, pode-se ver que a correlação com o teor de fenóis totais é moderada, com o teor de flavonóides totais é fraca, contrariamente ao que acontece com o teor de alcalóides, onde a correlação é muito forte.

#### **5.3.2. Método de poder de redução do ião férrico (FRAP)**

Os resultados da actividade antioxidante pelo método de poder de redução do ião férrico encontram-se nas tabelas 11 e 12. Assim como no método de DPPH, o EBCV apresentou a maior actividade antioxidante e o EBCM a menor, em termos de  $\mu M$  equivalentes de  $Fe^{2+}$ . Os valores de  $\mu M$  equivalentes de  $Fe^{2+}$  nos extractos brutos aumentaram na seguinte ordem: EBCM < EBSM < EBPM < EBCV. Esses valores reflectem a ordem decrescente da actividade antioxidante obtida

pelo método de DPPH, que é: EBCV > EBPM > EBSM > EBCM. As fracções alcalóidicas de EBCV, EBCM e EBSM apresentaram valores de  $\mu\text{M}$  equivalentes de  $\text{Fe}^{2+}$  semelhantes entre si e superiores aos valores obtidos nos extractos brutos. As figuras A4, A5 e A6, em conjunto com a tabela 15, mostram a correlação entre a actividade antioxidante pelo método de FRAP e os teores de fenóis totais, flavonóides totais e alcalóides, respectivamente. Nessas figuras, pode-se ver que a correlação com o teor de fenóis totais e flavonóides totais é fraca, contrariamente ao que acontece com o teor de alcalóides, onde a correlação é muito forte.

### 5.3.3. Método de redução do ácido fosfomolibdico

Os resultados da actividade antioxidante pelo método de poder de redução do ácido fosfomolibdico encontram-se nas tabelas 13 e 14. Contrariamente aos resultados dos dois métodos anteriores, neste método o EBSM apresentou a maior actividade antioxidante e o EBCM a menor, em termos de  $\mu\text{g/mL}$  equivalentes de ácido ascórbico. Os valores de  $\mu\text{g/mL}$  equivalentes de ácido ascórbico nos extractos brutos aumentaram na seguinte ordem: EBCM < EBCV < EBPM < EBSM. Esses valores reflectem a seguinte ordem decrescente da actividade antioxidante: EBSM > EBPM > EBCV > EBCM. As fracções alcalóidicas de EBCV e EBCM apresentaram valores de  $\mu\text{g/mL}$  equivalentes de ácido ascórbico semelhantes entre si e ligeiramente maiores ao valor da FASM. As figuras A7, A8 e A9, em conjunto com a tabela 15, mostram a correlação entre a actividade antioxidante pelo método de ácido fosfomolibdico e os teores de fenóis totais, flavonóides totais e alcalóides, respectivamente. Nessas figuras, pode-se ver que a correlação com o teor de fenóis totais é moderada, com o teor de flavonóides totais é muito fraca e com o teor de alcalóides é fraca.

Os compostos fenólicos são considerados os mais importantes antioxidantes de materiais vegetais. Constituem um dos principais grupos de compostos que actuam como antioxidantes primários. A actividade antioxidante dos compostos fenólicos baseia-se na sua capacidade de doar átomos de hidrogénio aos radicais livres. Eles possuem propriedades estruturais ideais para eliminação de radicais livres. Diferentes relatos são encontrados na literatura, segundo os quais alguns autores sugeriram correlação entre a actividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos, e outros não encontraram tal correlação. A falta de correlação forte entre o teor de fenóis totais e flavonóides totais e a actividade antioxidante confirma que eles não são os únicos contribuintes na actividade antioxidante (Sulaiman *et al.*, 2011). De facto, no método de DPPH e no método de poder de



redução do íon férrico, observou-se uma correlação muito forte entre o teor de alcalóides e a actividade antioxidante. A forte correlação entre o teor de alcalóides com a actividade antioxidante sugere uma influência muito mais forte dos alcalóides em relação aos compostos fenólicos na actividade pelos dois métodos, revelando a importância farmacológica dos alcalóides do fruto de *T. elegans*. Essa sugestão é reforçada pelo facto de as fracções alcaloídicas apresentarem maior actividade antioxidante em relação aos extractos brutos pelo método FRAP.

Nicola e colaboradores (2013) investigaram a actividade antioxidante da fracção alcaloídica e do extracto etanólico das folhas e caule de *T. catharinensis* pelo método de DPPH e encontraram um  $IC_{50}$  igual a 37,18  $\mu\text{g/mL}$  para a fracção alcaloídica e 74,69  $\mu\text{g/mL}$  para o extracto etanólico. Esses resultados confirmam a natureza antioxidante dos alcalóides encontrados nesse género.

No método de poder de redução do ácido fosfomolibdico, a falta de correlação da actividade antioxidante com o teor de fenóis totais, flavonóides totais e alcalóides confirma que eles não são os únicos contribuintes na actividade antioxidante por esse método. Prieto e colaboradores (1999) afirmam que o método de poder de redução do ácido fosfomolibdico é sensível a antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos e permite avaliar a capacidade antioxidante total de uma mistura complexa de compostos. Isso justifica a razão da falta de correlação, porque o método é sensível a uma gama de antioxidantes de diferentes naturezas, dando pouco destaque a classes singulares.

O tipo e a quantidade de compostos fenólicos e a presença de antioxidantes não fenólicos também podem contribuir para a actividade antioxidante dos extractos. Antioxidantes não-fenólicos, como vitamina C, vitamina E e beta-caroteno também podem ser responsáveis pela actividade antioxidante (Sulaiman *et al.*, 2011).

A actividade antioxidante de *T. elegans* no geral ainda não foi muito investigada. O único estudo reportado foi feito por Pallant e Steenkamp (2008), onde avaliaram a actividade antioxidante do extracto aquoso da raiz de *T. elegans* usando o método de eliminação do radical anião ABTS. O extracto apresentou actividade antioxidante fraca, com valor de capacidade antioxidante equivalente de Trolox de 0,07 mg/mL.

Dos alcalóides identificados, alguns já foram investigados sobre a actividade antioxidante. A vindolinina apresentou actividade antioxidante com  $IC_{50}$  de 165,5  $\mu\text{M}$  pelo método de DPPH (Macáková *et al.*, 2019) e a voacangina, na concentração de 1 mg/mL, pelo método de DPPH, apresentou percentagem de inibição de 78% (Marinho *et al.*, 2016).

## 6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

### 6.1. Conclusões

Os resultados da análise fitoquímica qualitativa permitem concluir que os extractos brutos de todas as partes do fruto contêm fenóis e flavonóides. A casca verde, a casca madura, as sementes maduras e a polpa madura contêm lignanas. A casca verde, a casca madura, a polpa verde e a polpa madura contêm triterpenóides e esteróides, enquanto que as sementes maduras contêm somente esteróides. A casca verde, a casca madura, as sementes maduras e a polpa verde contêm alcalóides e saponinas. As antraquinonas, acetogeninas, cumarinas e os iridóides não foram detectados. A maioria dos metabólitos presentes foram identificados na fracção clorofórmica.

Os resultados da análise fitoquímica quantitativa permitem concluir que o extracto bruto das sementes maduras contém maior teor de fenóis e de lípidos, o extracto bruto da casca verde contém maior teor de flavonóides e de alcalóides e o extracto bruto da polpa madura contém maior teor de carboidratos.

Os resultados da avaliação da actividade antioxidante pelos métodos de redução de radical DPPH, redução do ácido fosfomolibdico e redução de ião férrico permitem concluir que o extracto bruto da casca verde possui maior actividade antioxidante quanto à redução do DPPH e do ião férrico e o extracto bruto das sementes maduras possui maior actividade antioxidante quanto à redução do ácido fosfomolibdico. As fracções alcaloídicas possuem maior actividade antioxidante em relação aos extractos brutos quanto à redução do ácido fosfomolibdico e do ião férrico.

Na correlação entre os teores de fenóis totais, flavonóides totais e alcalóides com a actividade antioxidante pelos 3 métodos, conclui-se que existe uma correlação muito forte entre o teor de alcalóides e o poder de redução do DPPH e do ião férrico. Esse facto permite concluir também que a participação dos alcalóides na actividade antioxidante dos extractos brutos pelos 2 métodos é muito importante. Nos outros casos a correlação, em média, é fraca.

Julgando pelos resultados, conclui-se que todas as partes do fruto de *T. elegans* apresentam propriedades antioxidantes, podendo oferecer protecção contra radicais livres, além de ser uma importante e promissora fonte de antioxidantes naturais.

## 6.2. Recomendações

Recomenda-se:

- O estudo da actividade antimicrobiana das fracções alcalóidicas de extractos hidrometanólicos brutos da casca verde, casca madura, polpa madura e sementes maduras do fruto de *T. elegans*;
- O estudo fitoquímico do látex e do óleo das sementes de *T. elegans*;
- A obtenção dos extractos e fracções de *T. elegans* usando outros solventes ou técnicas de extracção;
- O estudo toxicológico que forneça um embasamento científico para o uso seguro dos extractos desta espécie.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad, I., Kurniawan, A. e Mu'im, A. (2017). Screening of extraction method for alkaloid enrichment of *Peperomia pellucida* (L.) kunth. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10(7), 214–219. <http://dx.doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i7.18246>
- Albalasmeh, A. A., Berhe, A. A. e Ghezzehei, T. A. (2013). A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers*, 97(2), 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.072>
- Alves, E., Simoes, A. e Domingues, M. R. (2020). Fruit seeds and their oils as promising sources of value-added lipids from agro-industrial byproducts: oil content, lipid composition, lipid analysis, biological activity and potential biotechnological applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1305–1339. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1757617>
- Amorim, E. L. C., Castro, V. T. N. de A., Melo, J. G., Correa, A. J. C. e Sobrinho, T. José da S. P. (2012). Standard Operating Procedures (SOP) for the Spectrophotometric Determination of Phenolic Compounds Contained in Plant Samples. *Intech*, 3, 48–66. <http://dx.doi.org/10.5772/51686>
- Bapela, M. J., Heyman, H., Meyer, J. J. M. e Senejoux, F. (2018). HNMR-based metabolomics of antimalarial plant species traditionally used by Vha-Venda people in Limpopo Province, South Africa and isolation of antiplasmodial compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, 157, 370–373. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.07.022>
- Barbosa, Wagner L. R., Quignard E., Tavares, Esabel C. C., Pinto, Lucianna do N. Oliveira, Franciêlda Q. O. e Rodson, M. (2004). *Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extractos Vegetais*, (4<sup>a</sup>). Revista Científica da UFPA. Belém, Pará.
- Benzie, I. F. F. e Strain, J. J. (1999). Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay: Direct Measure of Total Antioxidant Activity of Biological Fluids and Modified Version for Simultaneous Measurement of Total Antioxidant Power and Ascorbic Acid Concentration. *Methods in enzymology*, 299, 15-27.

- Bolignon, A. A. e Athayde, M. L. (2012). Phytochemical Investigation and Cytotoxic Properties of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. Cultivated in Brazil. *Research Journal of Phytochemistry*, 6, 127–131. <https://doi.org/10.3923/rjphyto.2012.127.131>
- Cheynier, V. (2012). Phenolic compounds: From plants to foods. *Phytochemistry Reviews*, 11(2), 153–177. <https://doi.org/10.1007/s11101-012-9242-8>
- Da Silva, M. C., Izidine, S. e Amude, A. B. (2004). A preliminary checklist of the vascular plants of Mozambique (Report No. 30). Southern African Botanical Diversity Network.
- Dai, J. e Mumper, R. J. (2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, 15, 7313–7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- Farnsworth, N. R., Loub, W. D. e Blomster, R. N. (1963). Studies on *Catharanthus lanceus* (Vinca lancea) I. Isolation of Leurosine, Perivine and Yohimbine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1, 1534–1537.
- Ferreira, M. J. U. e Paterna, A. (2019). Monoterpene indole alkaloids as leads for targeting multidrug resistant cancer cells from the African medicinal plant *Tabernaemontana elegans*. *Phytochemical Revision*, 18, 971–987. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09615-1>
- Figueiredo, E. R., Vieira, I. J. C., de Souza, J. J., Braz-Filho, R., Mathias, L., Kanashiro, M. M. e Côrtes, F. H. (2010). Isolation, identification and antileukemic activity of the monoterpene indole alkaloids from *Tabernaemontana salzmannii* A. DC., Apocynaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(5), 675–681. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010005000019>
- Fouche, G., Africa, S., Adenubi, O., Leboho, T., Khosa, M. C., McGaw, L. J., Naidoo, V., Wellington, K. W. e Eloff, J. N. (2021). Corrigendum: Acaricidal activity of the aqueous and hydroethanolic extracts of 15 South African plants against *Rhipicephalus turanicus* and their toxicity on human liver and kidney cells. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 88, 1-7.
- Gindri, A. L., Bolignon, A. A., Mario, D. N., Athayde, M. L., Brum, T. F., Frohlich, J. K. e Alves, S. H. (2011). Potencial antimicrobiano do extrato bruto e fracções das folhas de

- Tabernaemontana catharinensis* A. DC. *Revista Contexto e Saúde*, 10(20), 1213–1216.
- Harborne, J. B. e Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55, 481–504.
- Jones, W. P. e Kinghorn, A. D. (2005). Extraction of plant secondary metabolites. *Methods in Molecular Biology*, 20(2), 323–351. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1\\_13/COVER](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_13/COVER)
- Kanwar, M. K., Bajguz, A., Zhou, J. e Bhardwaj, R. (2017). Analysis of Brassinosteroids in Plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 36, 1002–1030. <https://doi.org/10.1007/s00344-017-9732-4>
- Kato, L., Braga, R. M., Koch, I. e Kinoshita, L. S. (2002). Indole alkaloids from *Rauvolfia bahiensis* A. DC., *Apocynaceae*. *Phytochemistry*, 60(3), 315–320. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00122-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00122-X)
- Kingston, D. G. I., Li, B. T. e Ionescu, F. (1977). Plant anticancer agents III: Isolation of indole and bisindole alkaloids from *Tabernaemontana holstii* roots. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66(8), 1135–1138. <https://doi.org/10.1002/jps.2600660821>
- Luo, X., Mulhovo, S., Pires, D., Aínsa, J. A., Gracia, B., Duarte, A., Anes, E. e Ferreira, M. U. (2011). Antimycobacterial evaluation and preliminary phytochemical investigation of selected medicinal plants traditionally used in Mozambique. *Journal of Ethnopharmacology*, 137, 114–120. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.04.062>
- Macáková, K., Afonso, R., Saso, L. e Mladěnka, P. (2019). Free Radical Biology and Medicine The influence of alkaloids on oxidative stress and related signaling pathways. *Free Radical Biology and Medicine*, 134, 429–444. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.026>
- Maloney, E. M., Fong, H. H. S., Farnsworth, N. R., Blomster, R. N. e Abraham, D. J. (1968). Isolation of Vindolinine from *Catharanthus lanceus*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2, 1035–1036.
- Mansoor, T. A., Molnár, J., Ramalheite, C., Mulhovo, S. e Ferreira, M. J. U. (2009). Tabernines A–C , Beta-Carbolines from the Leaves of *Tabernaemontana elegans*. *Journal of Natural*

*Products*, 72(6), 1147–1150.

- Mansoor, T. A., Ramalho, R. M., Mulhovo, S., Rodrigues, C. M. P., José, M. e Ferreira, U. (2009). Induction of apoptosis in HuH-7 cancer cells by monoterpene and  $\beta$ -carboline indole alkaloids isolated from the leaves of *Tabernaemontana elegans*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19(15), 4255–4258. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.05.104>
- Maridass, M e De Britto, A. J. (2008). Origins of Plant Derived Medicines. *Ethnobotanical Leaflets*, 12, 373–387.
- Marinho, F. F., Simões, O. A., Barcellos, T. e Moura, S. (2016). Brazilian *Tabernaemontana* genus: Indole alkaloids and phytochemical activities. *Fitoterapia*, 114, 127–137. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.09.002>
- Men, T. T., Thanh, N. Q. C., Yen, N. D. H., Binh, T. D. e Trang, D. T. X. (2019). A simple spectrophotometric method for quantifying total lipids in plants and animals. *Can Tho University Journal of Science*, 11(2), 106–110. <https://doi.org/10.22144/ctu.jen.2019.030>
- Naidoo, C. M., Naidoo, Y., Dewir, Y. H., Murthy, H. N., El-Hendawy, S. e Al-Suhaibani, N. (2021). Major Bioactive Alkaloids and Biological Activities of *Tabernaemontana* Species (Apocynaceae). *Plants*, 10, 1–27. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/plants10020313>
- Nelson, D. L. e Cox, M. M. (2014). *Princípios de Bioquímica de Lehninger* (6<sup>a</sup>). W.H.Freeman and Company. Nova Iorque.
- Netshiluvhi, T. R. (1996). Aspects of seed propagation of commonly utilised medicinal trees Kwazulu-Natal [Master thesis, University of Kwazulu-Natal]. Foundation for Research Development.
- Nicola, C., Salvador, M., Gower, A. E., Moura, S. e Echeverrigaray, S. (2013). Chemical constituents antioxidant and anticholinesterasic activity of *Tabernaemontana catharinensis*. *The Scientific World Journal*, 2013, 1–4. <https://doi.org/10.1155/2013/519858>
- Oksana, S., Marian, B., Mahendra, R. e Bo, S. H. (2012). Plant phenolic compounds for food, pharmaceutical and cosmetics production. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(13),

2526-2539. <https://doi.org/10.5897/JMPR11.1695>

Pallant, C. A., Cromarty, A. D. e Steenkamp, V. (2012). Effect of an alkaloidal fraction of *Tabernaemontana elegans Stapf* on selected micro-organisms. *Journal of Ethnopharmacology*, 140, 398–404. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.01.036>

Pallant, C. A. e Steenkamp, V. (2008). *In vitro* bioactivity of Venda medicinal plants used in the treatment of respiratory conditions. *Human and Experimental Toxicology*, 27(11), 859–866. <https://doi.org/10.1177/0960327108099526>

Paterna, A., Ferreira, M. U., Gomes, S. E., Borralho, P. M., Mulhovo, S. e Rodrigues, C. M. P. (2016). Vobasinyl-Iboga Alkaloids from *Tabernaemontana elegans*: Cell Cycle Arrest and Apoptosis-Inducing Activity in HCT116 Colon Cancer Cells. *Journal of Natural Products*, 79, 2624–2634. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00552>

Perera, P., Sandberg, F., Van Beek, T. A. e Verpoorte, R. (1985). Alkaloids of stem and root bark of *Tabernaemontana dichotoma*. *Phytochemistry*, 24(9), 2097–2104. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83130-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83130-1)

Pergher, D., Picolotto, A., Rosales, F. P., Machado, G. K., Cerbaro, F. A., França, T. R., Salvador, M., Roesch-ely, M., Tasso, L., Figueiredo, G. J. e Moura, S. (2019). Antinociceptive and antioxidant effects of extract enriched with active indole alkaloids from leaves of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. *Journal of Ethnopharmacology*, 239, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111863>

Ping-tao, L., Leeuwenberg, A. J. M. e Middleton, D. J. (1995). *Apocynaceae. Flora of China*, 16, 143-188.

Prieto, P., Pineda, M. e Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 341, 337–341. <https://doi.org/http://www.idealibrary.com>

Raal, A., Meos, A., Hinrikus, T., Heinämäki, J., Romāne, E., Gudienė, V., Jakštas, V., Koshovi, O., Kovaleva, A., Fursenco, C., Chiru, T. e Nguyen, H. T. (2020). Dragendorff's reagent:



- Historical perspectives and current status of a versatile reagent introduced over 150 years ago at the University of Dorpat, Tartu, Estonia. *Pharmazie*, 75(7), 299–306. <https://doi.org/10.1691/ph.2020.0438>
- Schmelzer, G. H. e Gurib-Fakim, A. (2008). *Plant Resources of Tropical Africa 11(1)*. Medicinal Plants. PROTA Foundation, Wageningen, Netherlands/Backhuys Publishers.
- Senguttuvan, J., Paulsamy, S. e Karthika, K. (2014). Phytochemical analysis and evaluation of leaf and root parts of the medicinal herb, *Hypochoeris radicata* L. for *in vitro* antioxidant activities. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(1), 8359–8367. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C1030>
- Singh, B., Sharma, R. A. e Vyas, G. K. (2011). Antimicrobial, Antineoplastic and Cytotoxic Activities of Indole Alkaloids from *Tabernaemontana divaricata* (L.) R. Br. *Current Pharmaceutical Analysis*, 7, 125–132.
- Sorescu, A. A., Nuta, A., Ion, R. M. e Iancu, L. (2018). Qualitative Analysis of Phytochemicals from *Sea Buckthorn* and *Gooseberry*. *IntechOpen*, 10, 162–177. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.77365>
- Steenkamp, V., Fernandes, A. C. e Van Rensburg, C. E. J. (2007). Screening of Venda medicinal plants for antifungal activity against *Candida albicans*. *South African Journal of Botany*, 73(2), 256–258. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2006.11.003>
- Sucupira, N. R., Da Silva, A. B., Pereira, G. e Da Costa, J. N. (2012). Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. *UNOPAR Científica: Ciências Biológicas de Saúde*, 14(4), 263–269.
- Sulaiman, S. F., Yusoff, N. A., Eldeen, I. M., Seow, E. M., Sajak, A. A. B., Ooi, K. L. e Supriatno. (2011). Correlation between total phenolic and mineral contents with antioxidant activity of eight *Malaysian bananas* (*Musa sp.*). *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.04.005>
- Temple, N. J. (2000). The biochemistry of oxidative stress. *Nutrition Research*, 20(3), 449–459.

- Tiwari, R. K., M. U. e Chanda, S. (2016). Quantitative analysis of secondary metabolites in aqueous extract of *Clerodendrum serratum*. *International Research Journal of Pharmacy*, 7(12), 61–65. <https://doi.org/10.7897/2230-8407.0712148>
- Van Beek, T. A., Deelder, A. M., Verpoorte, R. e Svendsen, A. B. (1984). Antimicrobial, antiamebic and antiviral screening of some *Tabernaemontana* species. *Planta Medica*, 50(2), 180–185. <https://doi.org/10.1055/s-2007-969666>
- Van Der Heijden, R., Brouwer, R. L., Verpoorte, R., Wijnsma, R., Van Beek, T. A., Harkes, P. A. A. e Svendsen, A. B. (1986). Indole alkaloids from a callus culture of *T. elegans*. *Phytochemistry*, 25(4), 843–846.
- Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J. e Kowalska, T. (2008). *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*. Taylor & Francis Group. New York.
- Zehiroglu, C. e Sarikaya, S. B. O. (2019). The importance of antioxidants and place in today's scientific and technological studies. *Journal of Food Science and Technology*, 56(11), 4757–4774. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03952-x>
- Zimila, H. E., Matsinhe, A. L., Malayika, E., Sulemane, Á. I., Saete, N. C., Rugunate, S. C., Cumbane, P. J., Magaia, I. e Munyemana, F. (2020). Phytochemical analysis and *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of hydroalcoholic extracts of the leaves of *Salacia kraussii*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 30, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101862>

## ANEXOS

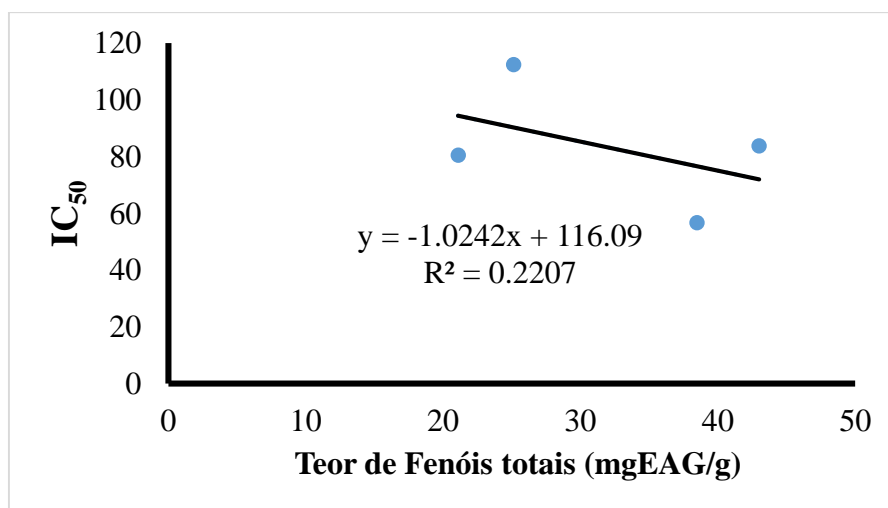
### Anexo A: correlação entre fenóis totais, flavonóides totais, alcalóides e actividade antioxidante

#### I. Método de DPPH

##### Fenóis totais

**Tabela A1:** Correlação entre actividade a antioxidante e o teor de fenóis totais nos extractos brutos pelo método de DPPH

| Extracto | Fenóis totais (mgEAG/g) | IC <sub>50</sub> |
|----------|-------------------------|------------------|
| EBCV     | 38,468                  | 56,743           |
| EBCM     | 25,125                  | 112,481          |
| EBPM     | 21,091                  | 80,561           |
| EBSM     | 43,002                  | 83,791           |

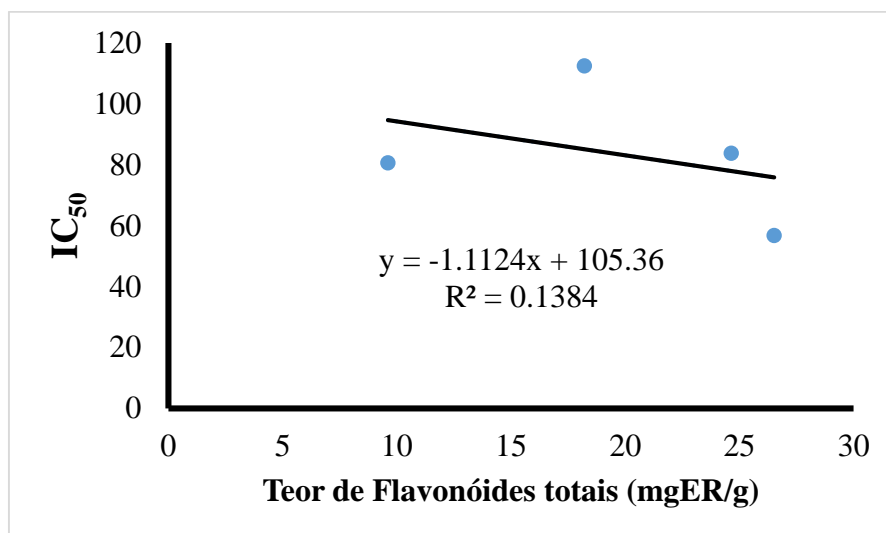


**Figura A1:** gráfico de correlação entre a actividade antioxidante e o teor de fenóis totais nos extractos brutos pelo método de DPPH

##### Flavonóides totais

**Tabela A2:** Correlação entre a actividade antioxidante e o teor de flavonóides totais nos extractos brutos pelo método de DPPH

| Extracto | Flavonóides totais (mgER/g) | IC <sub>50</sub> |
|----------|-----------------------------|------------------|
| EBCV     | 26,521                      | 56,743           |
| EBCM     | 18,208                      | 112,481          |
| EBPM     | 9,609                       | 80,561           |
| EBSM     | 24,640                      | 83,791           |

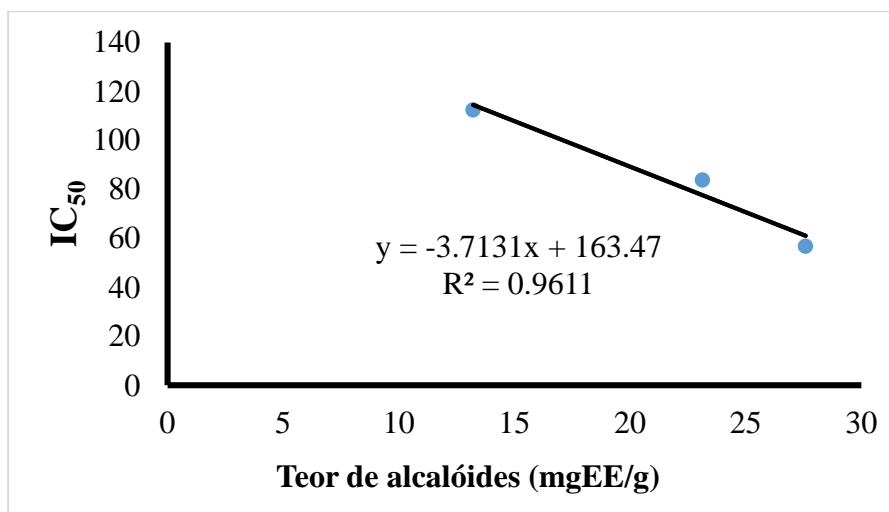


**Figura A2:** gráfico de correlação entre a actividade antioxidante e o teor de flavonóides totais nos extractos brutos pelo método de DPPH

### Alcalóides

**Tabela A3:** Correlação entre a actividade antioxidante e o teor de alcalóides nos extractos brutos pelo método de DPPH

| Extracto | Alcalóides (mgEE/g) | IC <sub>50</sub> |
|----------|---------------------|------------------|
| EBCV     | 27,592              | 56,743           |
| EBCM     | 13,214              | 112,481          |
| EBSM     | 23,129              | 83,791           |



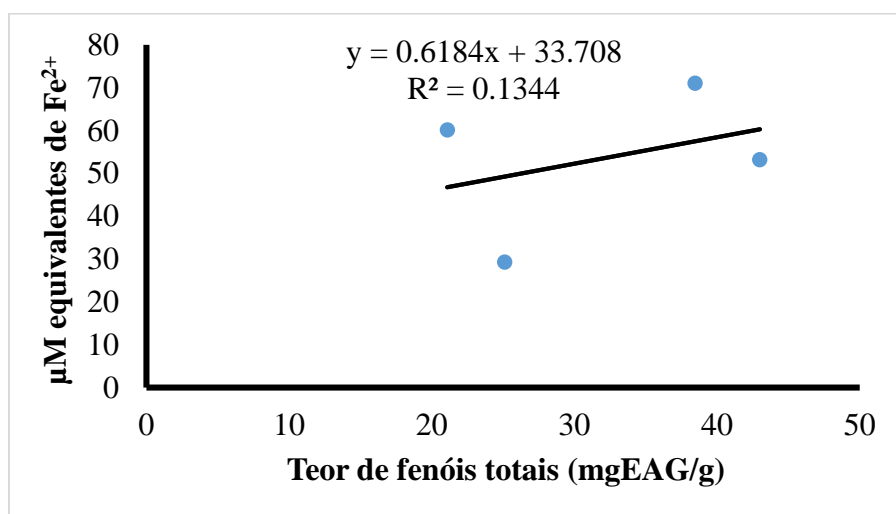
**Figura A3:** gráfico de correlação entre a actividade antioxidante e o teor de alcalóides nos extractos brutos pelo método de DPPH

## Método FRAP

### Fenóis totais

**Tabela A4:** Correlação entre a actividade antioxidante e o teor de fenóis totais nos extractos brutos pelo método FRAP

| Extracto (140 µg/mL) | Fenóis totais (mgEAG/g) | µM equivalentes de Fe <sup>2+</sup> |
|----------------------|-------------------------|-------------------------------------|
| EBCV                 | 38,468                  | 71,083                              |
| EBCM                 | 25,125                  | 29,355                              |
| EBPM                 | 21,091                  | 60,167                              |
| EBSM                 | 43,002                  | 53,187                              |

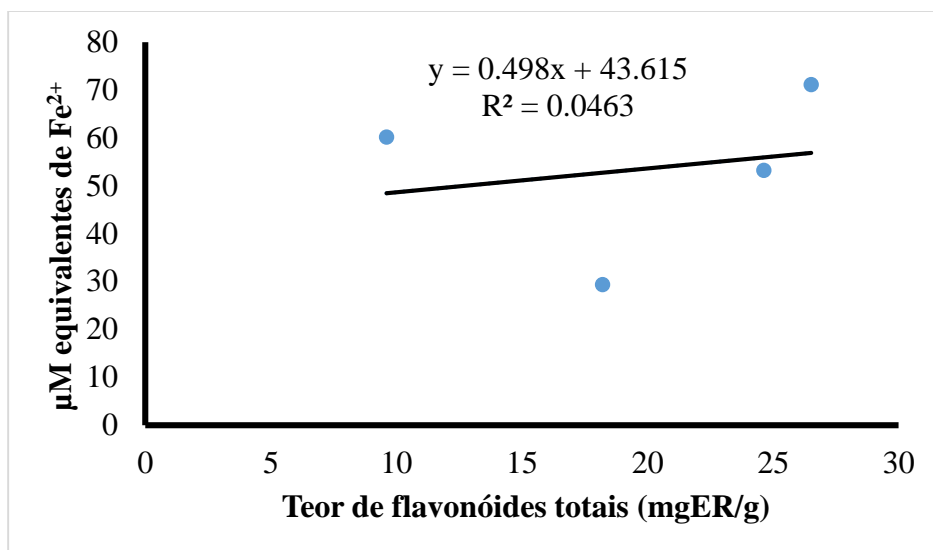


**Figura A4:** gráfico de correlação entre a actividade antioxidante e o teor de fenóis totais nos extractos brutos pelo método FRAP

### Flavonóides totais

**Tabela A5:** Correlação entre a actividade antioxidante e o teor de flavonóides totais nos extractos brutos pelo método FRAP

| Extracto (140 µg/mL) | Flavonóides totais (mgER/g) | µM equivalentes de Fe <sup>2+</sup> |
|----------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| EBCV                 | 26,521                      | 71,083                              |
| EBCM                 | 18,208                      | 29,355                              |
| EBPM                 | 9,609                       | 60,167                              |
| EBSM                 | 24,640                      | 53,187                              |

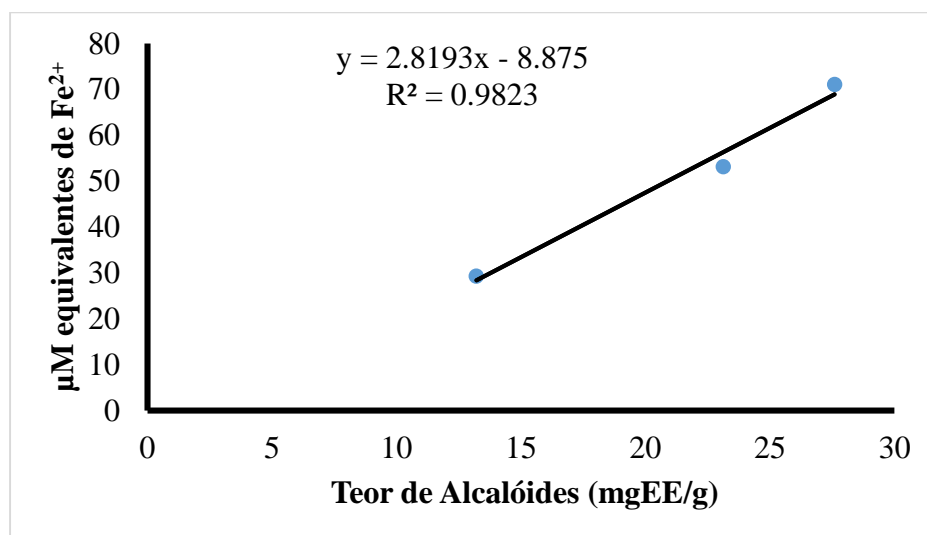


**Figura A5:** gráfico de correlação entre a actividade antioxidante e o teor de flavonóides totais nos extractos brutos pelo método FRAP

### Alcalóides

**Tabela A6:** Correlação entre a actividade antioxidante e o teor de alcalóides nos extractos brutos pelo método FRAP

| Extracto (140 μg/mL) | Alcalóides (mgEE/g) | μM equivalentes de Fe <sup>2+</sup> |
|----------------------|---------------------|-------------------------------------|
| EBCV                 | 27,592              | 71,083                              |
| EBCM                 | 13,214              | 29,355                              |
| EBSM                 | 23,129              | 53,187                              |



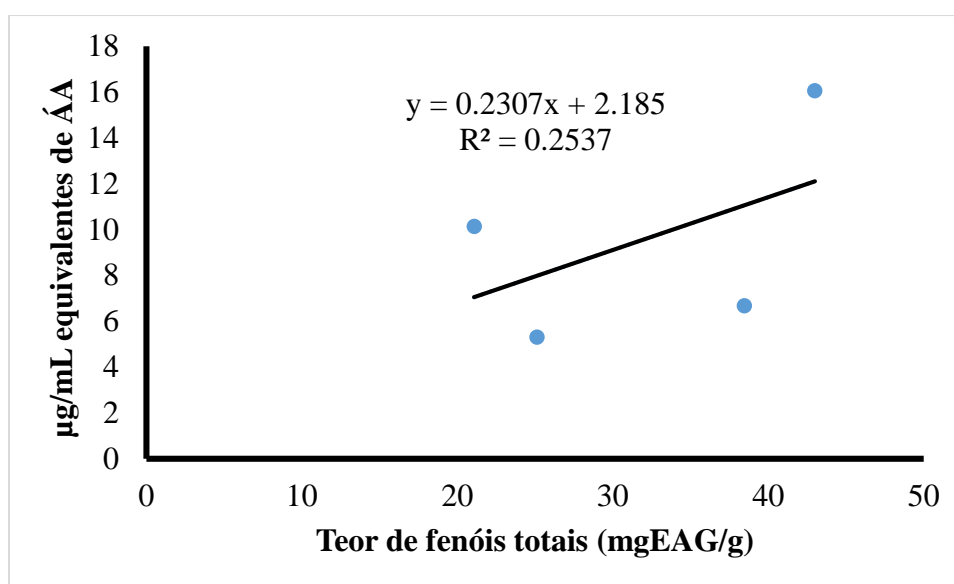
**Figura A6:** gráfico de correlação entre a actividade antioxidante e o teor de alcalóides nos extractos brutos pelo método FRAP

## II. Método de Ácido Fosfomolibdico

### Fenóis totais

**Tabela A7:** Correlação entre a actividade antioxidante e o teor de fenóis totais nos extractos brutos pelo método de ácido fosfomolibdico

| Extracto (140 µg/mL) | Fenóis totais (mgEAG/g) | µg/mL equivalentes de ÁA |
|----------------------|-------------------------|--------------------------|
| EBCV                 | 38,468                  | 6,684                    |
| EBCM                 | 25,125                  | 5,308                    |
| EBPM                 | 21,091                  | 10,138                   |
| EBSM                 | 43,002                  | 16,069                   |

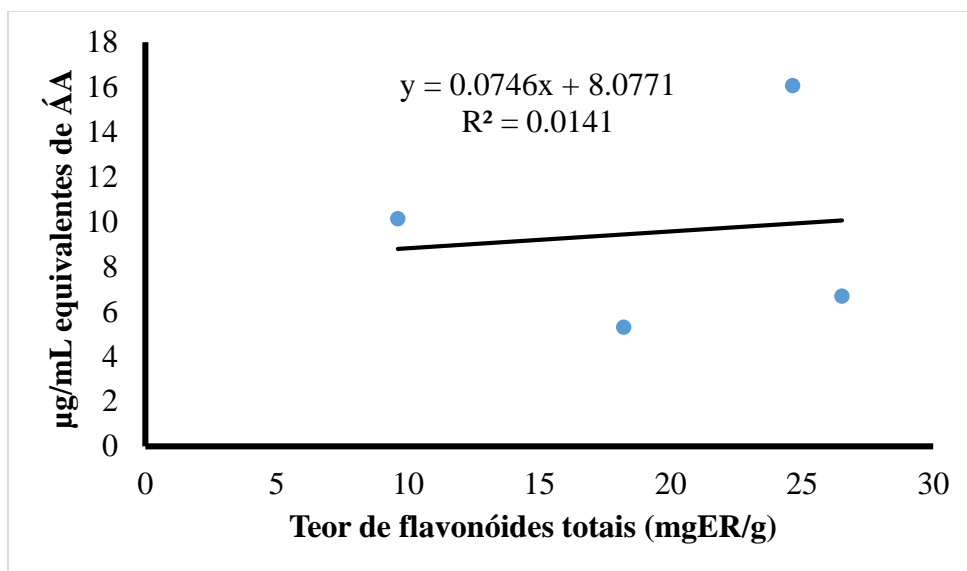


**Figura A7:** gráfico de correlação entre a actividade antioxidante e o teor de fenóis totais nos extractos brutos pelo método de ácido fosfomolibdico

### Flavonóides totais

**Tabela A8:** Correlação entre a actividade antioxidante e o teor de flavonóides totais nos extractos brutos pelo método de ácido fosfomolibdico

| Extracto (140 µg/mL) | Flavonóides totais (mgER/g) | µg/mL equivalentes de ácido ascórbico |
|----------------------|-----------------------------|---------------------------------------|
| EBCV                 | 26,521                      | 6,684                                 |
| EBCM                 | 18,208                      | 5,308                                 |
| EBPM                 | 9,609                       | 10,138                                |
| EBSM                 | 24,64                       | 16,069                                |

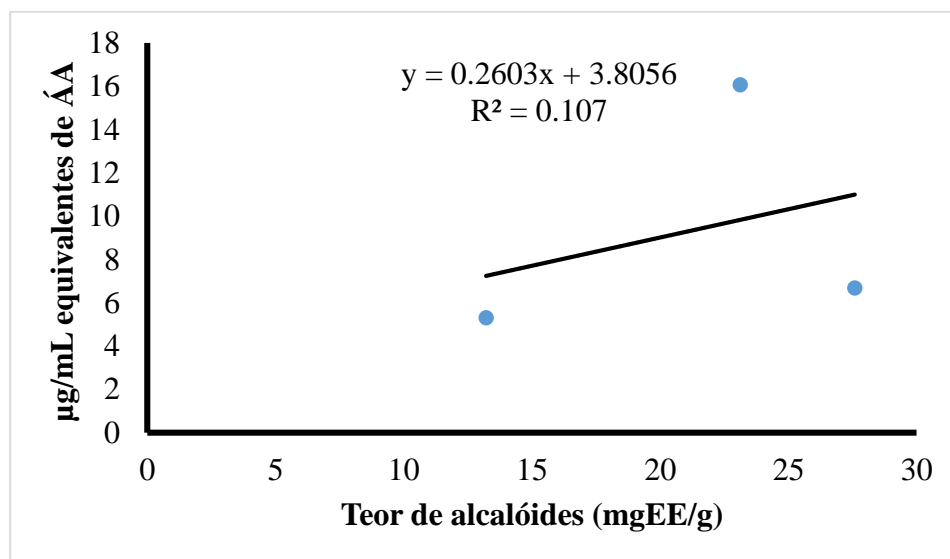


**Figura A8:** gráfico de correlação entre a actividade antioxidante e o teor de flavonóides totais nos extractos brutos pelo método de ácido fosfomolibdico

### Alcalóides

**Tabela A9:** Correlação entre a actividade antioxidante e o teor de alcalóides nos extractos brutos pelo método de ácido fosfomolibdico

| Extracto (140 µg/mL) | Alcalóides (mgEE/g) | µg/mL equivalentes de AA |
|----------------------|---------------------|--------------------------|
| EBCV                 | 27,592              | 6,684                    |
| EBCM                 | 13,214              | 5,308                    |
| EBSM                 | 23,129              | 16,069                   |



**Figura A9:** gráfico de gráfico de correlação entre a actividade antioxidante e o teor de alcalóides nos extractos brutos pelo método de ácido fosfomolibdico



## Anexo B: análise fitoquímica quantitativa

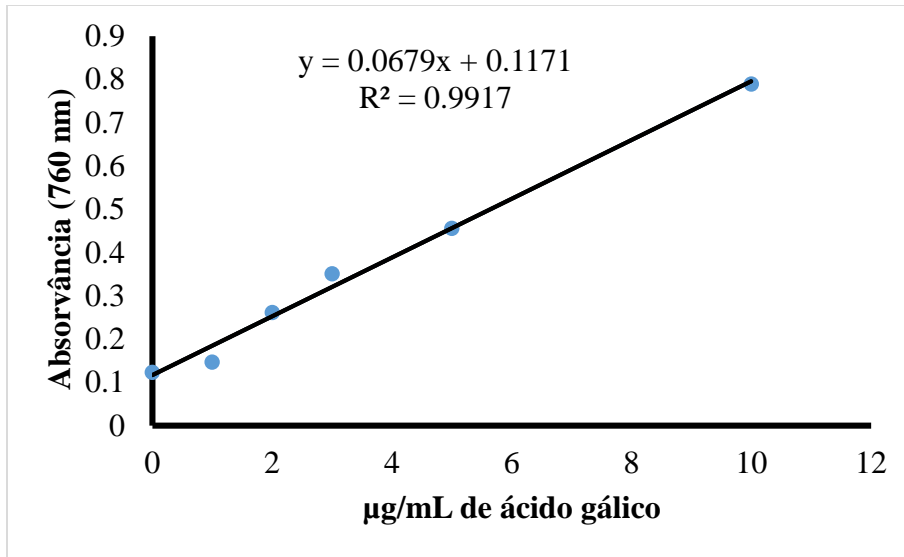
### Fenóis totais

**Tabela B1:** Resultados da absorvância do padrão ácido gálico para a determinação de fenóis totais

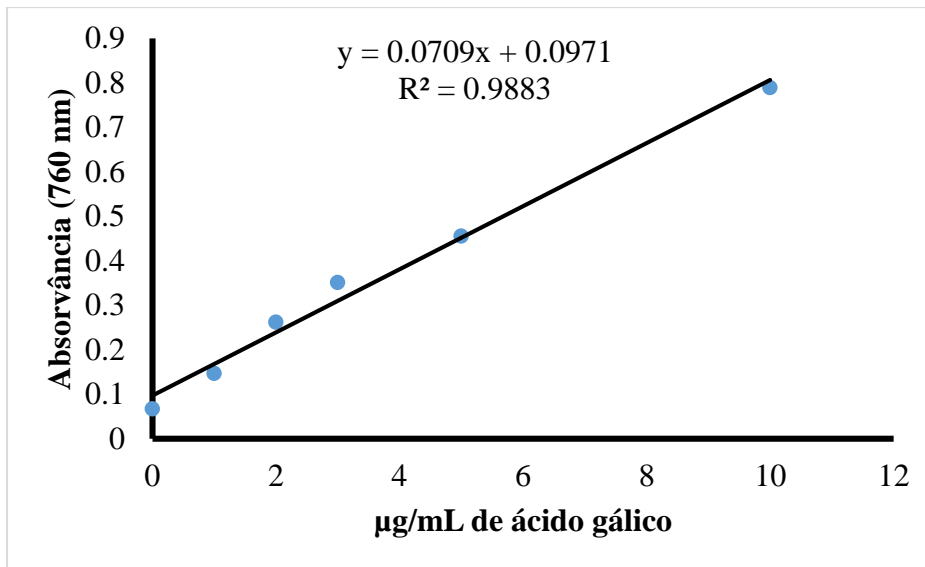
| Réplicas | µg/mL | Absorvância | Média  | DP                   | CV (%) |
|----------|-------|-------------|--------|----------------------|--------|
| 1        |       | 0,1468      |        |                      |        |
| 2        | 1     | 0,1467      | 0,1468 | $5,8 \times 10^{-5}$ | 0,04   |
| 3        |       | 0,1468      |        |                      |        |
| 1        |       | 0,2618      |        |                      |        |
| 2        | 2     | 0,2620      | 0,2618 | $2 \times 10^{-4}$   | 0,08   |
| 3        |       | 0,2616      |        |                      |        |
| 1        |       | 0,3509      |        |                      |        |
| 2        | 3     | 0,3510      | 0,3509 | $1 \times 10^{-4}$   | 0,03   |
| 3        |       | 0,3508      |        |                      |        |
| 1        |       | 0,4556      |        |                      |        |
| 2        | 5     | 0,4554      | 0,4556 | $1,5 \times 10^{-4}$ | 0,03   |
| 3        |       | 0,4557      |        |                      |        |
| 1        |       | 0,7890      |        |                      |        |
| 2        | 10    | 0,7900      | 0,7890 | $1 \times 10^{-3}$   | 0,13   |
| 3        |       | 0,7880      |        |                      |        |

**Tabela B2:** Resultados da absorvância dos brancos dos extractos brutos para a determinação de fenóis totais

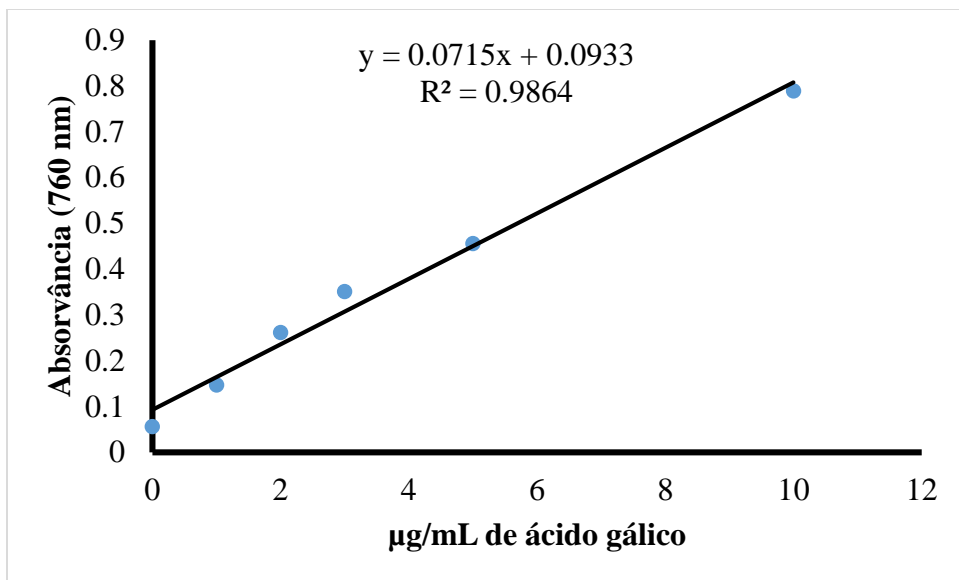
| Branco | Absorvância | Média  | DP                    | CV (%) |
|--------|-------------|--------|-----------------------|--------|
| EBCV   | 0,1234      | 0,1233 | $5,09 \times 10^{-5}$ | 0,04   |
| EBCM   | 0,0669      | 0,0668 | $1 \times 10^{-5}$    | 0,15   |
| EBPM   | 0,0562      | 0,0562 | $5,09 \times 10^{-5}$ | 0,09   |
| EBSM   | 0,0750      | 0,0750 | $5,09 \times 10^{-4}$ | 0,68   |



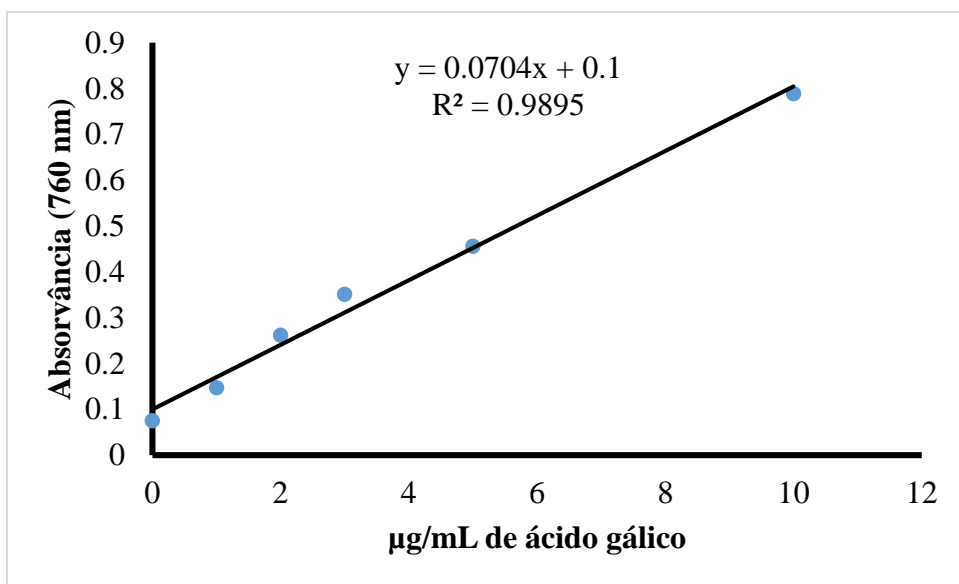
**Figura B1:** gráfico da curva de calibração do padrão ácido gálico para o EBCV



**Figura B2:** gráfico da curva de calibração do padrão ácido gálico para o EBCM



**Figura B3** gráfico da curva de calibração do padrão ácido gálico para o EBPM



**Figura B4:** gráfico da curva de calibração do padrão ácido gálico para o EBSM

**Tabela B3:** Resultados da determinação do teor de fenóis totais nos extractos brutos

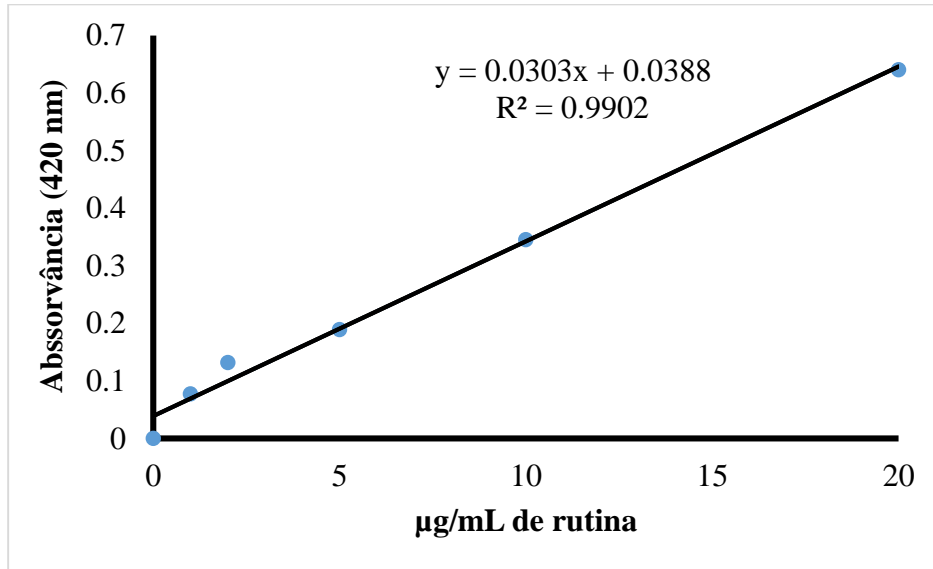
| Amostras    | Absorvância | Média  | DP                    | mg de AG | mgEAG/g | Média  | DP    | CV (%) |
|-------------|-------------|--------|-----------------------|----------|---------|--------|-------|--------|
| <b>EBCV</b> |             |        |                       |          |         |        |       |        |
| 1           | 0,2478      |        |                       | 0,0192   | 38,498  |        |       |        |
| 2           | 0,2483      | 0,2477 | $6,56 \times 10^{-4}$ | 0,0193   | 38,645  | 38,468 | 0,191 | 0,26   |
| 3           | 0,2470      |        |                       | 0,0191   | 38,262  |        |       |        |
| <b>EBCM</b> |             |        |                       |          |         |        |       |        |
| 1           | 0,1868      |        |                       | 0,0127   | 25,303  |        |       |        |
| 2           | 0,1855      | 0,1862 | $6,51 \times 10^{-4}$ | 0,0125   | 24,936  | 25,125 | 0,183 | 0,35   |
| 3           | 0,1862      |        |                       | 0,0126   | 25,134  |        |       |        |
| <b>EBPM</b> |             |        |                       |          |         |        |       |        |
| 1           | 0,1679      |        |                       | 0,0104   | 20,867  |        |       |        |
| 2           | 0,1690      | 0,1687 | $7 \times 10^{-4}$    | 0,0106   | 21,175  | 21,091 | 0,196 | 0,41   |
| 3           | 0,1692      |        |                       | 0,0106   | 21,231  |        |       |        |
| <b>EBSM</b> |             |        |                       |          |         |        |       |        |
| 1           | 0,2514      |        |                       | 0,0215   | 43,011  |        |       |        |
| 2           | 0,2525      | 0,2514 | $1,15 \times 10^{-3}$ | 0,0217   | 43,324  | 43,002 | 0,327 | 0,46   |
| 3           | 0,2502      |        |                       | 0,0213   | 42,670  |        |       |        |

**Flavonóides totais****Tabela B4:** Resultados da absorvância do padrão rutina para a determinação de flavonóides totais

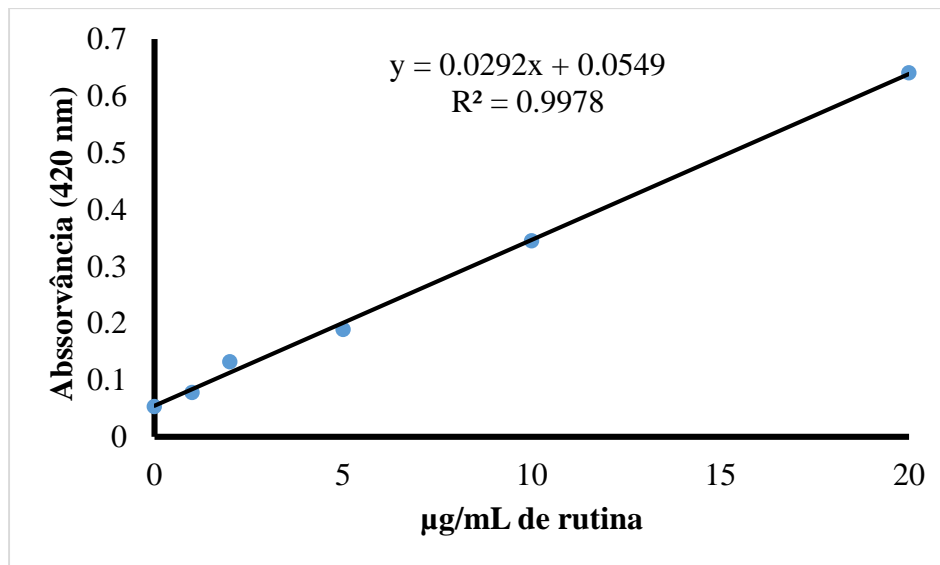
| Réplicas | $\mu\text{g/mL}$ | Absorvância | Média  | DP    | CV (%) |
|----------|------------------|-------------|--------|-------|--------|
| 1        |                  | 0,0779      |        |       |        |
| 2        | 1                | 0,0658      | 0,0779 | 0,007 | 9,12   |
| 3        |                  | 0,0783      |        |       |        |
| 1        |                  | 0,1290      |        |       |        |
| 2        | 2                | 0,1321      | 0,1321 | 0,006 | 4,76   |
| 3        |                  | 0,1411      |        |       |        |
| 1        |                  | 0,1892      |        |       |        |
| 2        | 5                | 0,1965      | 0,1892 | 0,008 | 4,18   |
| 3        |                  | 0,1807      |        |       |        |
| 1        |                  | 0,3489      |        |       |        |
| 2        | 10               | 0,3170      | 0,3170 | 0,017 | 5,06   |
| 3        |                  | 0,3453      |        |       |        |
| 1        |                  | 0,6389      |        |       |        |
| 2        | 20               | 0,6412      | 0,6409 | 0,001 | 0,20   |
| 3        |                  | 0,6409      |        |       |        |

**Tabela B5:** Resultados da absorvância dos brancos dos extractos brutos para a determinação de flavonóides totais

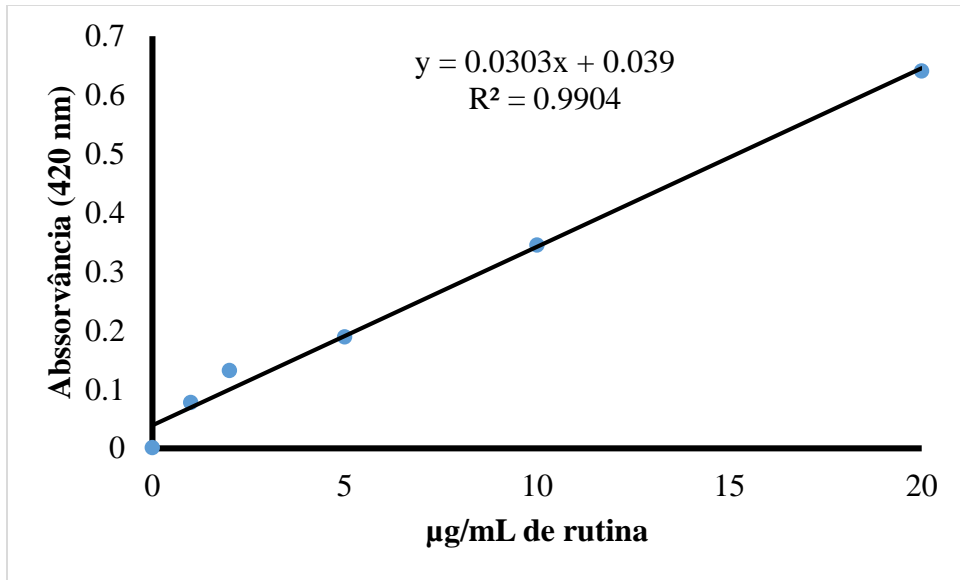
| Branco | Absorvância | Média  | DP                   | CV (%) |
|--------|-------------|--------|----------------------|--------|
| EBCV   | 0,0006      | 0,0006 | 0,0006               | 0,00   |
| EBCM   | 0,0534      | 0,0526 | 0,0009               | 1,69   |
| EBPM   | 0,0013      | 0,0014 | $5,8 \times 10^{-5}$ | 4,33   |
| EBSM   | 0,0030      | 0,0030 | $5,8 \times 10^{-5}$ | 1,90   |



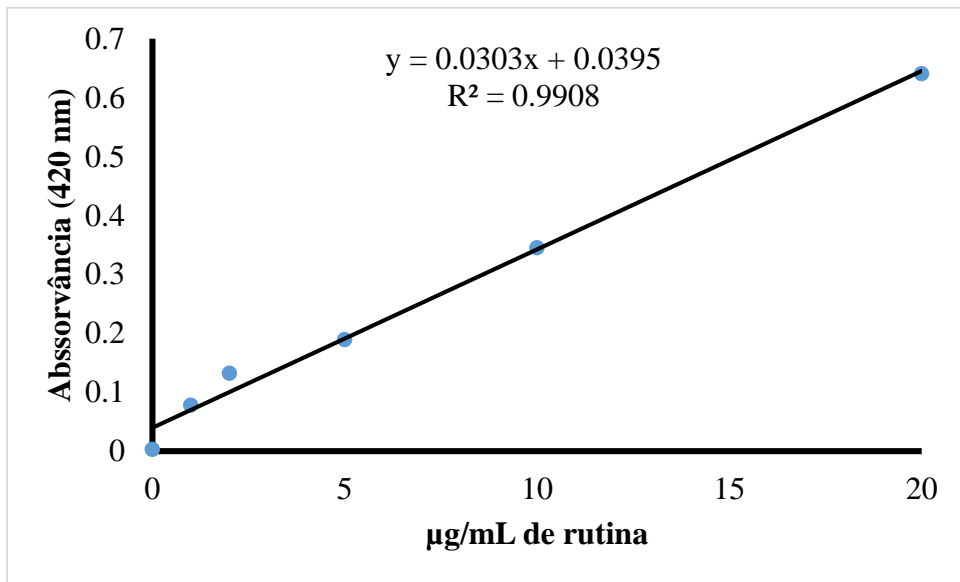
**Figura B5:** gráfico da curva de calibração do padrão rutina para o EBCV



**Figura B6:** gráfico da curva de calibração do padrão rutina para o EBCM



**Figura B7:** gráfico da curva de calibração do padrão rutina para o EBPM



**Figura B8:** gráfico da curva de calibração do padrão rutina para o EBSM

**Tabela B6:** Resultados da determinação do teor de flavonóides totais nos extractos brutos

| Amostra | Absorvância | Média  | DP    | mgER   | mgER/g | Média  | DP    | CV (%) |
|---------|-------------|--------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|
| EBCV    |             |        |       |        |        |        |       |        |
| 1       | 0,3351      |        |       | 0,0978 | 24,447 |        |       |        |
| 2       | 0,3614      | 0,3602 | 0,025 | 0,1065 | 26,617 | 26,521 | 2,027 | 7,64   |
| 3       | 0,3842      |        |       | 0,1140 | 28,498 |        |       |        |
| EBCM    |             |        |       |        |        |        |       |        |
| 1       | 0,2548      |        |       | 0,0685 | 17,115 |        |       |        |
| 2       | 0,2828      | 0,2676 | 0,014 | 0,0780 | 19,512 | 18,208 | 1,213 | 6,66   |
| 3       | 0,2651      |        |       | 0,0720 | 17,997 |        |       |        |
| EBPM    |             |        |       |        |        |        |       |        |
| 1       | 0,1563      |        |       | 0,0385 | 9,637  |        |       |        |
| 2       | 0,1523      | 0,156  | 0,004 | 0,0372 | 9,307  | 9,609  | 0,290 | 3,01   |
| 3       | 0,1593      |        |       | 0,0395 | 9,884  |        |       |        |
| EBSM    |             |        |       |        |        |        |       |        |
| 1       | 0,3298      |        |       | 0,0960 | 23,993 |        |       |        |
| 2       | 0,3256      | 0,3277 | 0,017 | 0,0946 | 23,647 | 24,640 | 1,430 | 5,80   |
| 3       | 0,3575      |        |       | 0,1051 | 26,279 |        |       |        |

## Alcalóides

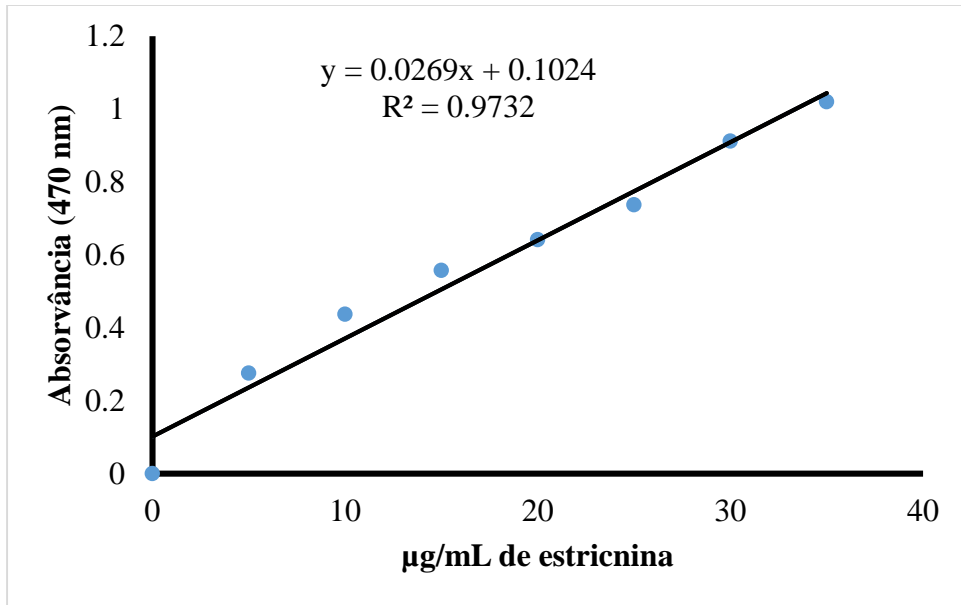
**Tabela B7:** Resultados da absorvância do padrão estricnina para a determinação de alcalóides

| Réplicas | µg/mL | Absorvância | Média  | DP                 | CV (%) |
|----------|-------|-------------|--------|--------------------|--------|
| 1        |       | 0,2725      |        |                    |        |
| 2        | 5     | 0,2765      | 0,2758 | 0,0030             | 1,09   |
| 3        |       | 0,2784      |        |                    |        |
| 1        |       | 0,4381      |        |                    |        |
| 2        | 10    | 0,4380      | 0,4380 | 1x10 <sup>-4</sup> | 0,02   |
| 3        |       | 0,4379      |        |                    |        |
| 1        |       | 0,5564      |        |                    |        |
| 2        | 15    | 0,5578      | 0,5580 | 0,0017             | 0,31   |
| 3        |       | 0,5598      |        |                    |        |
| 1        |       | 0,6412      |        |                    |        |
| 2        | 20    | 0,6424      | 0,6421 | 0,0008             | 0,12   |
| 3        |       | 0,6427      |        |                    |        |
| 1        |       | 0,7383      |        |                    |        |
| 2        | 25    | 0,7388      | 0,7380 | 0,0010             | 0,13   |
| 3        |       | 0,7369      |        |                    |        |
| 1        |       | 0,9132      |        |                    |        |
| 2        | 30    | 0,9115      | 0,9120 | 0,0010             | 0,11   |
| 3        |       | 0,9113      |        |                    |        |
| 1        |       | 1,0211      |        |                    |        |
| 2        | 35    | 1,0219      | 1,0120 | 0,0027             | 0,26   |
| 3        |       | 1,0169      |        |                    |        |

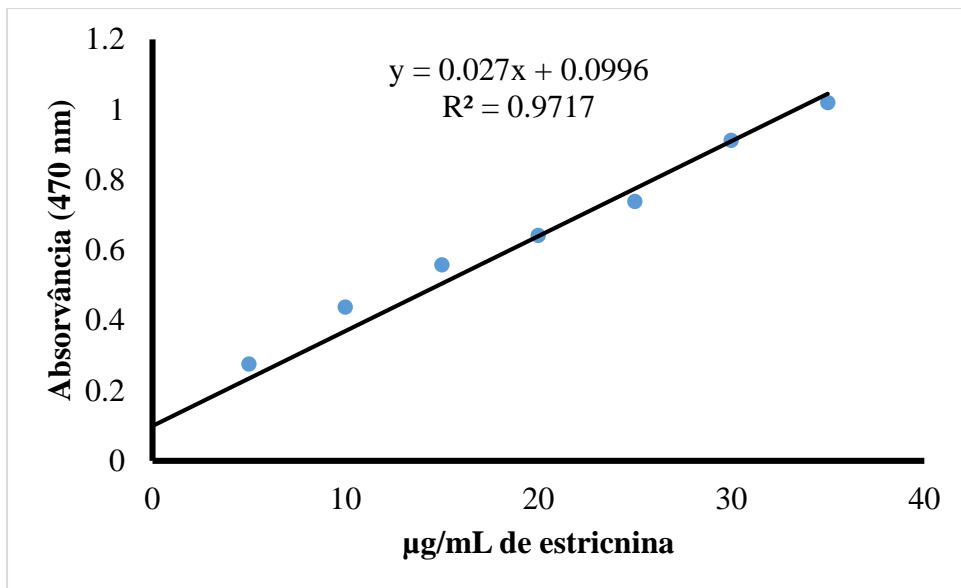
**Tabela B8:** Resultados da absorvância dos brancos dos extractos brutos para a determinação de alcalóides

| Branco | Absorvância | Média   | DP      | CV (%)               |       |
|--------|-------------|---------|---------|----------------------|-------|
| EBCV   | 0,0009      | 0,0010  | 0,0009  | 5,8x10 <sup>-5</sup> | 5,97  |
| EBCM   | -0,0049     | -0,0068 | -0,0057 | 9,5x10 <sup>-4</sup> | 16,45 |
| EBSM   | 0,0048      | 0,0055  | 0,0047  | 4,3x10 <sup>-4</sup> | 8,72  |

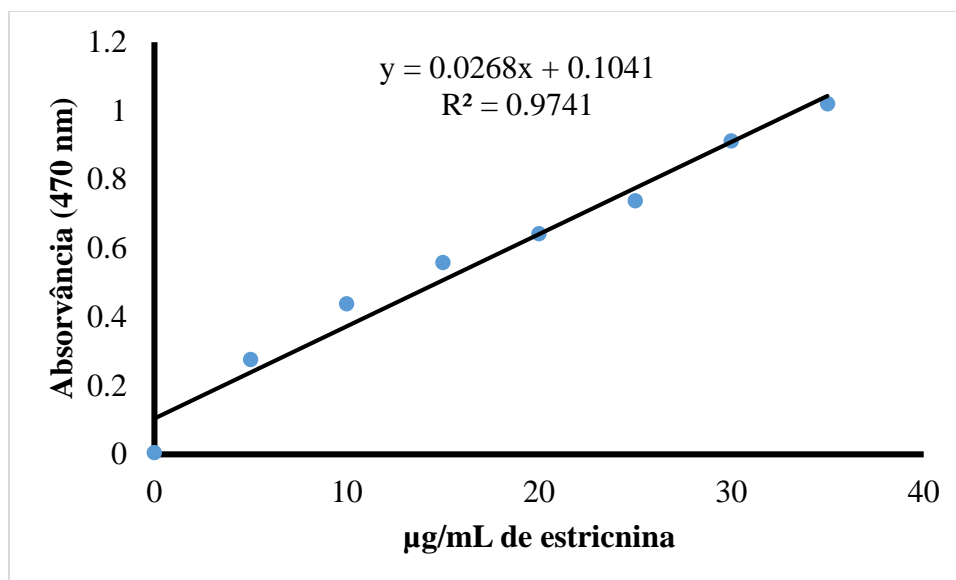




**Figura B9:** gráfico da curva de calibração do padrão estircina para o EBCV



**Figura B10:** gráfico da curva de calibração do padrão estircina para o EBCM



**Figura B11:** gráfico da curva de calibração do padrão estricnina para o EBSM

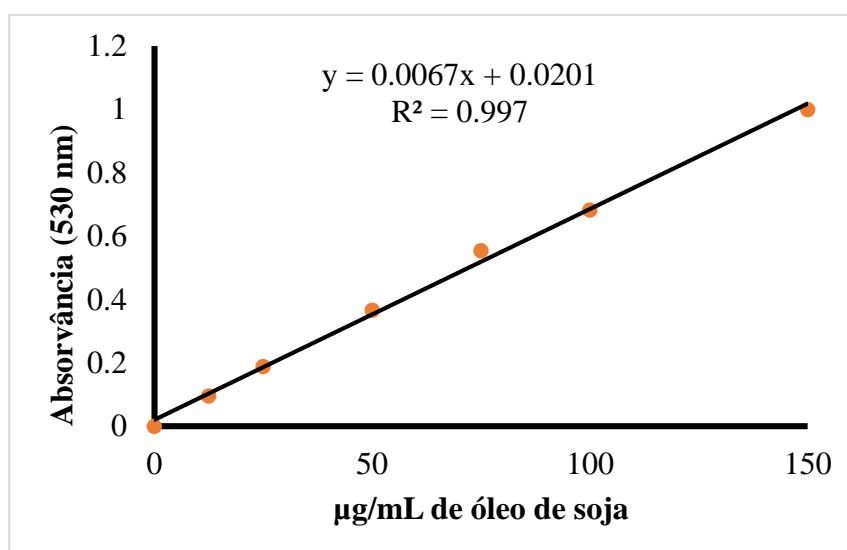
**Tabela B9:** Resultados da determinação do teor de alcalóides nos extractos brutos

| Amostra     | Absorvância | Média  | DP     | mgEE   | mgEE/g | Média  | DP    | CV (%) |
|-------------|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|
| <b>EBCV</b> |             |        |        |        |        |        |       |        |
| 1           | 0,8130      |        |        | 0,2642 | 26,416 |        |       |        |
| 2           | 0,8276      | 0,8446 | 0,0428 | 0,2696 | 26,959 | 27,592 | 1,590 | 5,76   |
| 3           | 0,8933      |        |        | 0,2940 | 29,401 |        |       |        |
| <b>EBCM</b> |             |        |        |        |        |        |       |        |
| 1           | 0,4157      |        |        | 0,1171 | 11,707 |        |       |        |
| 2           | 0,4846      | 0,4564 | 0,0361 | 0,1426 | 14,259 | 13,214 | 1,337 | 0,10   |
| 3           | 0,4688      |        |        | 0,1367 | 13,674 |        |       |        |
| <b>EBSM</b> |             |        |        |        |        |        |       |        |
| 1           | 0,7083      |        |        | 0,2254 | 22,545 |        |       |        |
| 2           | 0,7395      | 0,724  | 0,0156 | 0,2371 | 23,709 | 23,129 | 0,582 | 0,02   |
| 3           | 0,7241      |        |        | 0,2313 | 23,134 |        |       |        |

## Lípidos

**Tabela B10:** Resultados da absorvância do padrão óleo de soja para a determinação de lípidos

| Réplicas | µg/mL | Absorvância | Média  | DP     | CV (%) |
|----------|-------|-------------|--------|--------|--------|
| 1        | 0     | 0,0003      | 0,0003 | 0      | 0      |
| 2        |       | 0,0003      |        |        |        |
| 3        |       | 0,0003      |        |        |        |
| 1        | 12,5  | 0,0946      | 0,0957 | 0,0011 | 1,15   |
| 2        |       | 0,0957      |        |        |        |
| 3        |       | 0,0968      |        |        |        |
| 1        | 25    | 0,1875      | 0,1885 | 0,0009 | 0,49   |
| 2        |       | 0,1887      |        |        |        |
| 3        |       | 0,1893      |        |        |        |
| 1        | 50    | 0,3668      | 0,3660 | 0,0009 | 0,25   |
| 2        |       | 0,3650      |        |        |        |
| 3        |       | 0,3661      |        |        |        |
| 1        | 75    | 0,5538      | 0,5545 | 0,0007 | 0,12   |
| 2        |       | 0,5546      |        |        |        |
| 3        |       | 0,5551      |        |        |        |
| 1        | 100   | 0,6832      | 0,6820 | 0,0012 | 0,17   |
| 2        |       | 0,6819      |        |        |        |
| 3        |       | 0,6809      |        |        |        |
| 1        | 150   | 0,9983      | 0,9993 | 0,0010 | 0,10   |
| 2        |       | 0,9994      |        |        |        |
| 3        |       | 1,0002      |        |        |        |



**Figura B12:** gráfico da curva de calibração do padrão óleo de soja

**Tabela B11:** Resultados da determinação do teor de lípidos nas amostras secas

| Amostra          | Absorvância | Média  | DP     | mgEOS  | mgEOS/g | Média   | DP    | CV (%) |
|------------------|-------------|--------|--------|--------|---------|---------|-------|--------|
| Casca verde      |             |        |        |        |         |         |       |        |
| 1                | 0,6040      |        |        | 27,191 | 271,906 |         |       |        |
| 2                | 0,6031      | 0,6023 | 0,0022 | 27,149 | 271,487 | 271,114 | 1,030 | 0,38   |
| 3                | 0,5998      |        |        | 26,995 | 269,950 |         |       |        |
| Casca madura     |             |        |        |        |         |         |       |        |
| 1                | 0,6233      |        |        | 28,089 | 280,893 |         |       |        |
| 2                | 0,6254      | 0,6245 | 0,0011 | 28,187 | 281,871 | 281,436 | 0,498 | 0,18   |
| 3                | 0,6247      |        |        | 28,155 | 281,545 |         |       |        |
| Polpa madura     |             |        |        |        |         |         |       |        |
| 1                | 0,5711      |        |        | 25,659 | 256,585 |         |       |        |
| 2                | 0,5524      | 0,5591 | 0,0104 | 24,788 | 247,877 | 251,013 | 4,839 | 1,93   |
| 3                | 0,5539      |        |        | 24,858 | 248,576 |         |       |        |
| Sementes maduras |             |        |        |        |         |         |       |        |
| 1                | 0,9399      |        |        | 42,832 | 428,325 |         |       |        |
| 2                | 0,9401      | 0,9423 | 0,004  | 42,842 | 428,418 | 429,442 | 1,856 | 0,43   |
| 3                | 0,9469      |        |        | 43,158 | 431,584 |         |       |        |

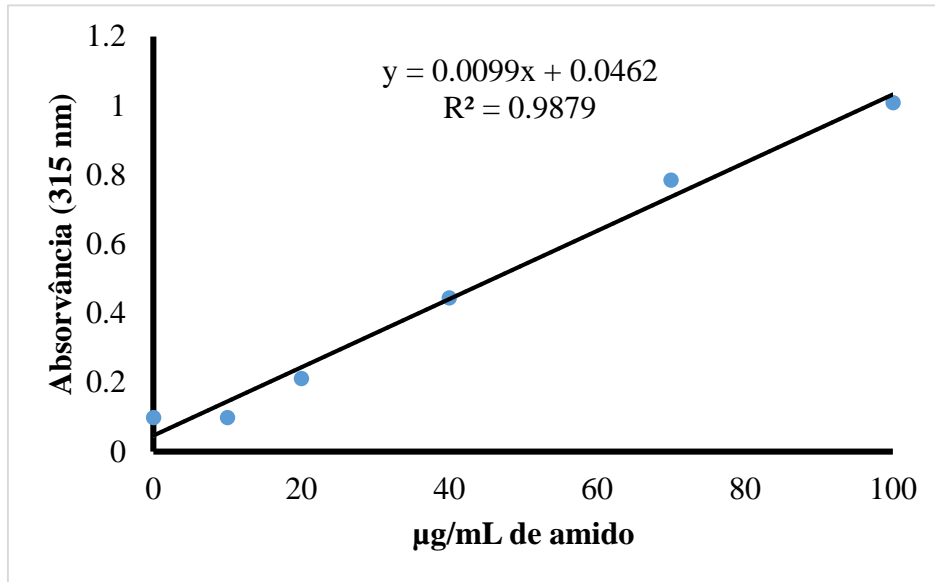
## Carboidratos

**Tabela B12:** Resultados da absorvância do padrão amido para a determinação de carboidratos

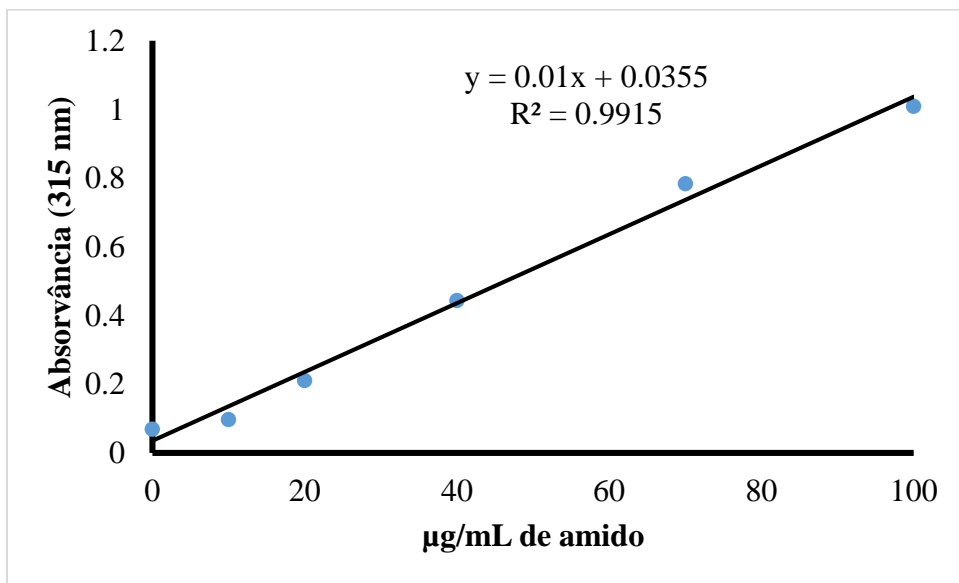
| Réplicas | µg/mL | Absorvância | Média  | DP     | CV (%) |
|----------|-------|-------------|--------|--------|--------|
| 1        |       | 0,0967      |        |        |        |
| 2        | 10    | 0,0977      | 0,0979 | 0,0013 | 1,34   |
| 3        |       | 0,0993      |        |        |        |
| 1        |       | 0,2111      |        |        |        |
| 2        | 20    | 0,2101      | 0,2111 | 0,0010 | 0,47   |
| 3        |       | 0,2121      |        |        |        |
| 1        |       | 0,4452      |        |        |        |
| 2        | 40    | 0,4438      | 0,4444 | 0,0007 | 0,17   |
| 3        |       | 0,4441      |        |        |        |
| 1        |       | 0,7853      |        |        |        |
| 2        | 70    | 0,7842      | 0,7844 | 0,0008 | 0,10   |
| 3        |       | 0,7837      |        |        |        |
| 1        |       | 1,0102      |        |        |        |
| 2        | 100   | 1,0091      | 1,0091 | 0,0010 | 0,10   |
| 3        |       | 1,0081      |        |        |        |

**Tabela B13:** Resultados da absorvância dos brancos dos extractos brutos para a determinação do teor de carboidratos

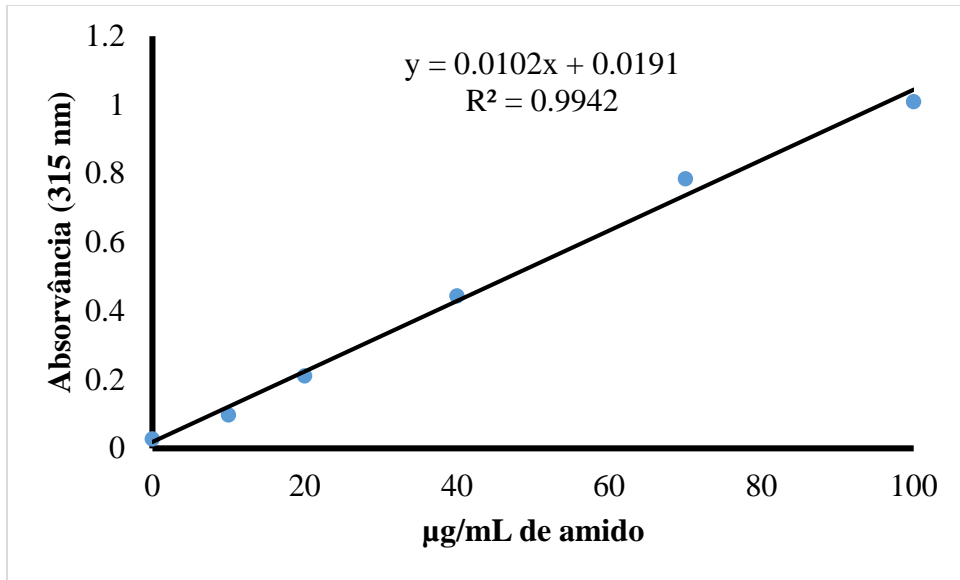
| Branco | Absorvância | Média  | DP     | CV (%) |        |      |
|--------|-------------|--------|--------|--------|--------|------|
| EBCV   | 0,0968      | 0,0981 | 0,0995 | 0,0981 | 0,0014 | 1,38 |
| EBCM   | 0,0703      | 0,0702 | 0,0699 | 0,0701 | 0,0002 | 0,30 |
| EBPM   | 0,0275      | 0,0274 | 0,0272 | 0,0274 | 0,0002 | 0,56 |
| EBSM   | 0,0304      | 0,0306 | 0,0311 | 0,0307 | 0,0004 | 1,17 |



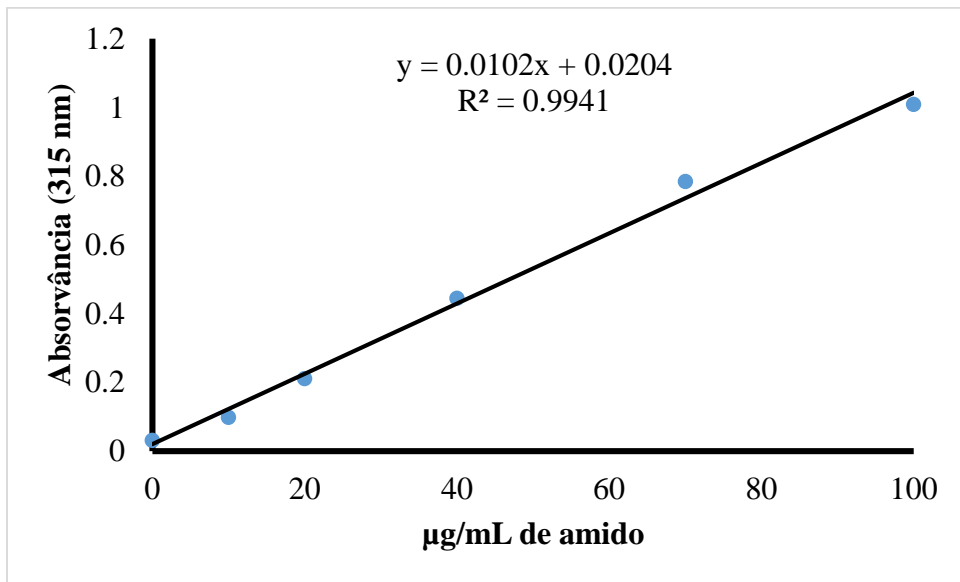
**Figura B13:** gráfico da curva de calibração do padrão amido para o EBCV



**Figura B14:** gráfico da curva de calibração do padrão amido para o EBCM



**Figura B15:** gráfico da curva de calibração do padrão amido para o EBPM



**Figura B16:** gráfico da curva de calibração do padrão amido para o EBSM

**Tabela B14:** Resultados da determinação do teor de carboidratos nos extractos brutos

| Amostra     | Absorvância | Média  | DP     | mgEA   | mgEA/g  | Média   | DP    | CV (%) |
|-------------|-------------|--------|--------|--------|---------|---------|-------|--------|
| <b>EBCV</b> |             |        |        |        |         |         |       |        |
| 1           | 0,5443      |        |        | 0,2516 | 457,392 |         |       |        |
| 2           | 0,5402      | 0,5433 | 0,0027 | 0,2495 | 453,627 | 456,474 | 2,516 | 0,55   |
| 3           | 0,5454      |        |        | 0,2521 | 458,402 |         |       |        |
| <b>EBCM</b> |             |        |        |        |         |         |       |        |
| 1           | 0,2365      |        |        | 0,1005 | 182,727 |         |       |        |
| 2           | 0,2401      | 0,2395 | 0,0027 | 0,1023 | 186,000 | 185,455 | 2,500 | 1,35   |
| 3           | 0,2419      |        |        | 0,1032 | 187,636 |         |       |        |
| <b>EBPM</b> |             |        |        |        |         |         |       |        |
| 1           | 0,9481      |        |        | 0,4554 | 827,986 |         |       |        |
| 2           | 0,9547      | 0,9523 | 0,0037 | 0,4586 | 833,868 | 831,759 | 3,275 | 0,39   |
| 3           | 0,9542      |        |        | 0,4584 | 833,422 |         |       |        |
| <b>EBSM</b> |             |        |        |        |         |         |       |        |
| 1           | 0,5173      |        |        | 0,2436 | 442,870 |         |       |        |
| 2           | 0,5165      | 0,5143 | 0,0045 | 0,2432 | 442,157 | 440,196 | 4,029 | 0,91   |
| 3           | 0,5091      |        |        | 0,2396 | 435,561 |         |       |        |

## Anexo C: actividade antioxidante

### I. Método de descoloração do radical DPPH

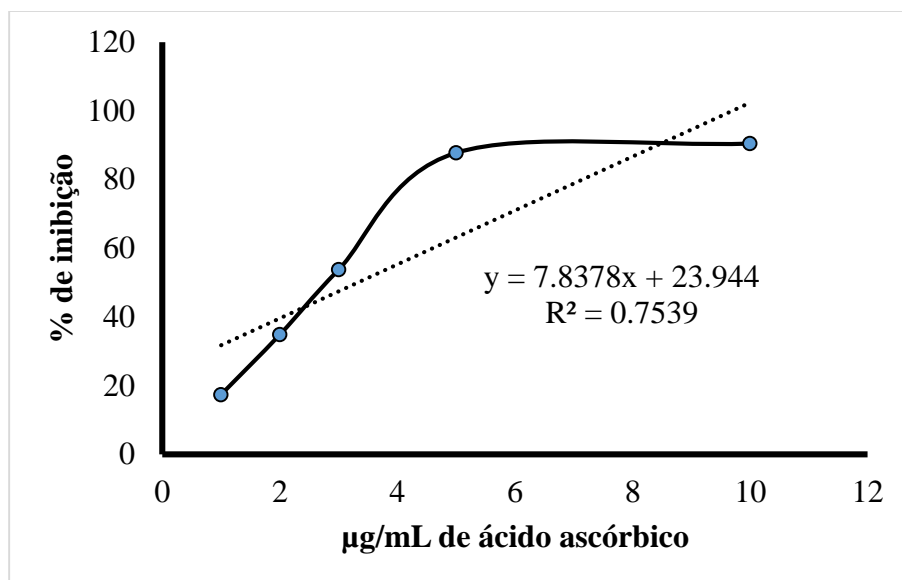
$$\% \text{ de Inibição} = \frac{\text{Abs. da solução controle} - \text{Abs. da amostra}}{\text{Abs. da solução controle}} \times 100$$

### Padrão (ácido ascórbico)

Absorvância da solução controle (517 nm) = 0,6736

**Tabela C1:** Resultados da actividade antioxidante do ácido ascórbico pelo método de DPPH

| µg/mL                  | Inibição (Réplicas) |      |             |      |             |      | Média (%) | DP    | CV (%) |
|------------------------|---------------------|------|-------------|------|-------------|------|-----------|-------|--------|
|                        | 1                   |      | 2           |      | 3           |      |           |       |        |
|                        | Absorvância         | %    | Absorvância | %    | Absorvância | %    |           |       |        |
| 1                      | 0,5599              | 16,9 | 0,5495      | 18,4 | 0,5601      | 16,8 | 17,4      | 0,900 | 5,18   |
| 2                      | 0,4362              | 35,2 | 0,4442      | 34,1 | 0,4359      | 35,3 | 34,9      | 0,699 | 2,00   |
| 3                      | 0,3107              | 53,9 | 0,3098      | 54,0 | 0,3135      | 53,5 | 53,8      | 0,286 | 0,53   |
| 5                      | 0,0821              | 87,8 | 0,0839      | 87,5 | 0,0804      | 88,1 | 87,8      | 0,260 | 0,30   |
| 10                     | 0,0631              | 90,6 | 0,0634      | 90,6 | 0,0659      | 90,2 | 90,5      | 0,228 | 0,25   |
| <b>IC<sub>50</sub></b> | 3,3                 |      | 3,3         |      | 3,3         |      | 3,3       | 0,011 | 0,33   |



**Figura C1:** gráfico da curva de inibição do padrão ácido ascórbico pelo método de DPPH

## Amostras

- i. Absorvância da solução controle para extractos brutos = 0,3706
- ii. Absorvância da solução controle para fracção alcaloídica = 0,9580

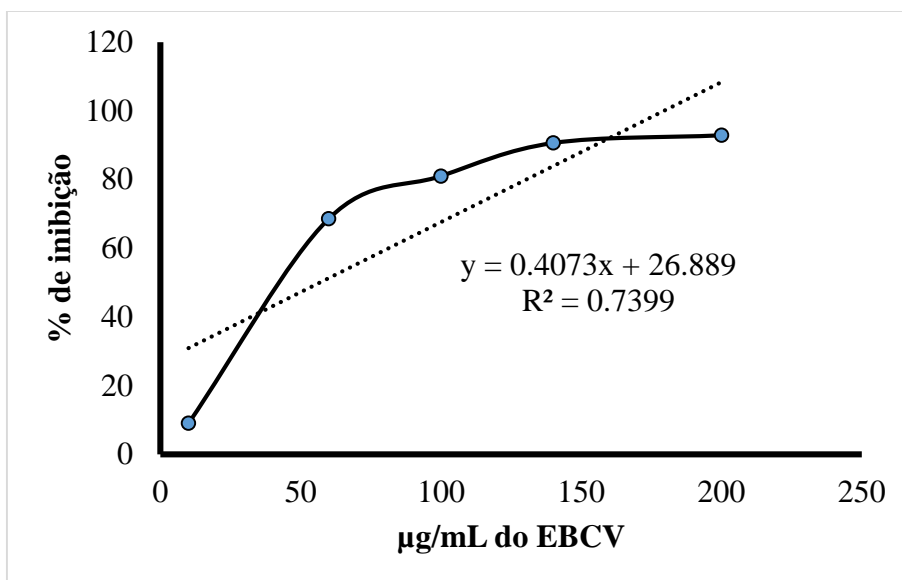
## Casca verde

### ✚ Extracto bruto

**Tabela C2:** Resultados da actividade antioxidante de EBCV pelo método de DPPH

| µg/mL                  | Inibição (Réplicas) |      |             |      |             |      | Média (%) | DP    | CV (%) |
|------------------------|---------------------|------|-------------|------|-------------|------|-----------|-------|--------|
|                        | 1                   |      | 2           |      | 3           |      |           |       |        |
|                        | Absorvância         | %    | Absorvância | %    | Absorvância | %    |           |       |        |
| 10                     | 0,3375              | 8,9  | 0,3366      | 9,2  | 0,3367      | 9,1  | 9,1       | 0,133 | 1,467  |
| 60                     | 0,1211              | 67,3 | 0,1140      | 69,2 | 0,1141      | 69,2 | 68,6      | 1,098 | 1,602  |
| 100                    | 0,0699              | 81,1 | 0,0719      | 80,6 | 0,0694      | 81,3 | 81,0      | 0,357 | 0,441  |
| 140                    | 0,0343              | 90,7 | 0,0354      | 90,4 | 0,0345      | 90,7 | 90,6      | 0,158 | 0,174  |
| 200                    | 0,0277              | 92,5 | 0,0228      | 93,8 | 0,0288      | 92,2 | 92,9      | 0,862 | 0,928  |
| <b>IC<sub>50</sub></b> | 57,7                |      | 56,5        |      | 56,1        |      | 56,7      | 0,833 | 1,5    |



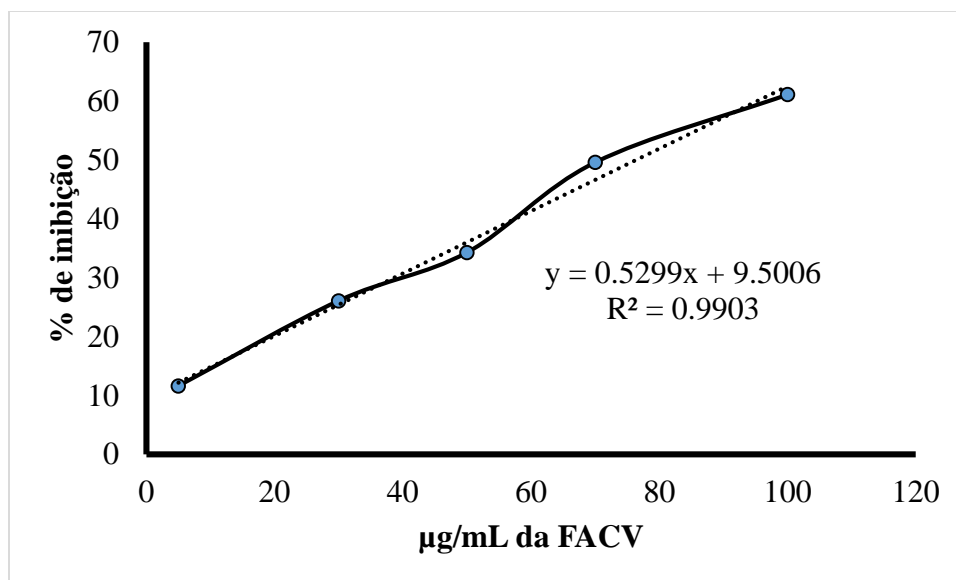


**Figura C2:** gráfico da curva de inibição de EBCV pelo método de DPPH

### ✚ Fracção alcaloídica

**Tabela C3:** Resultados da actividade antioxidante de FACV pelo método de DPPH

| µg/mL                  | Inibição (Réplicas) |      |             |      |             |      | Média (%) | DP    | CV (%) |
|------------------------|---------------------|------|-------------|------|-------------|------|-----------|-------|--------|
|                        | 1                   |      | 2           |      | 3           |      |           |       |        |
|                        | Absorvância         | %    | Absorvância | %    | Absorvância | %    |           |       |        |
| 5                      | 0,8479              | 11,5 | 0,8475      | 11,5 | 0,8449      | 11,8 | 11,6      | 0,170 | 1,46   |
| 30                     | 0,7084              | 26,1 | 0,7071      | 26,2 | 0,7091      | 26,0 | 26,1      | 0,106 | 0,41   |
| 50                     | 0,6304              | 34,2 | 0,6296      | 34,3 | 0,6292      | 34,3 | 34,3      | 0,064 | 0,19   |
| 70                     | 0,4824              | 49,6 | 0,4832      | 49,6 | 0,4837      | 49,5 | 49,6      | 0,068 | 0,14   |
| 100                    | 0,3741              | 60,9 | 0,3718      | 61,2 | 0,3726      | 61,1 | 61,1      | 0,122 | 0,20   |
| <b>IC<sub>50</sub></b> | 76,5                |      | 76,3        |      | 76,5        |      | 76,4      | 0,104 | 0,14   |



**Figura C3:** gráfico da curva de inibição de FACV pelo método de DPPH

### Casca madura

#### ✚ Extracto bruto

**Tabela C4:** Resultados da actividade antioxidante de FACV pelo método de DPPH

| µg/mL                  | Inibição (Réplicas) |      |             |      |             |      | Média (%) | DP    | CV (%) |
|------------------------|---------------------|------|-------------|------|-------------|------|-----------|-------|--------|
|                        | 1                   |      | 2           |      | 3           |      |           |       |        |
|                        | Absorvância         | %    | Absorvância | %    | Absorvância | %    |           |       |        |
| 10                     | 0,3037              | 18,0 | 0,3024      | 18,4 | 0,2967      | 19,9 | 18,8      | 1,005 | 5,35   |
| 60                     | 0,2147              | 42,1 | 0,2115      | 42,9 | 0,2216      | 40,2 | 41,7      | 1,393 | 3,34   |
| 100                    | 0,1865              | 49,7 | 0,1762      | 52,4 | 0,1798      | 51,5 | 51,2      | 1,411 | 2,75   |
| 140                    | 0,1483              | 60,0 | 0,1490      | 59,8 | 0,1492      | 59,7 | 59,8      | 0,128 | 0,21   |
| 200                    | 0,1284              | 65,3 | 0,1259      | 66,0 | 0,1261      | 66,0 | 65,8      | 0,375 | 0,57   |
| <b>IC<sub>50</sub></b> | 114,3               |      | 110,6       |      | 112,6       |      | 112,5     | 1,841 | 1,64   |

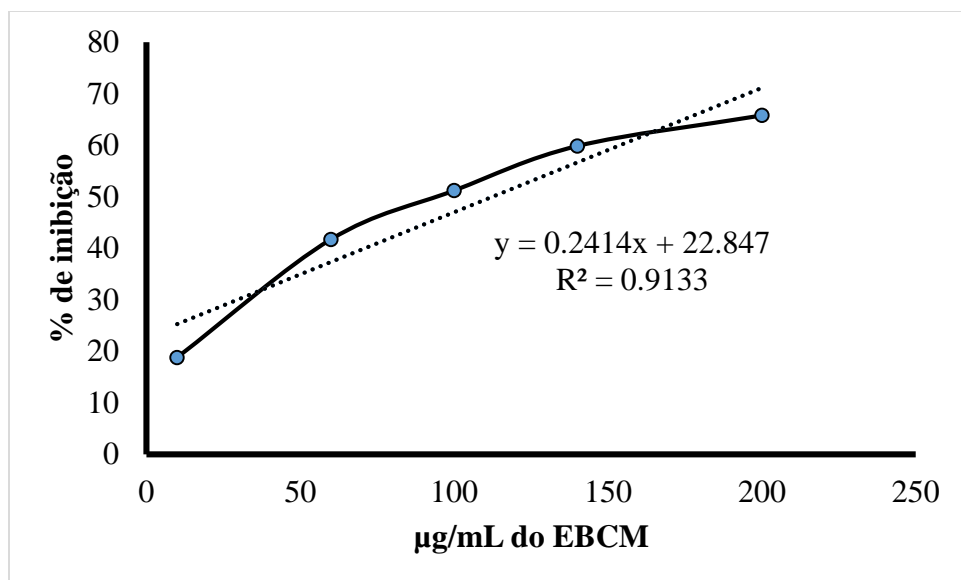
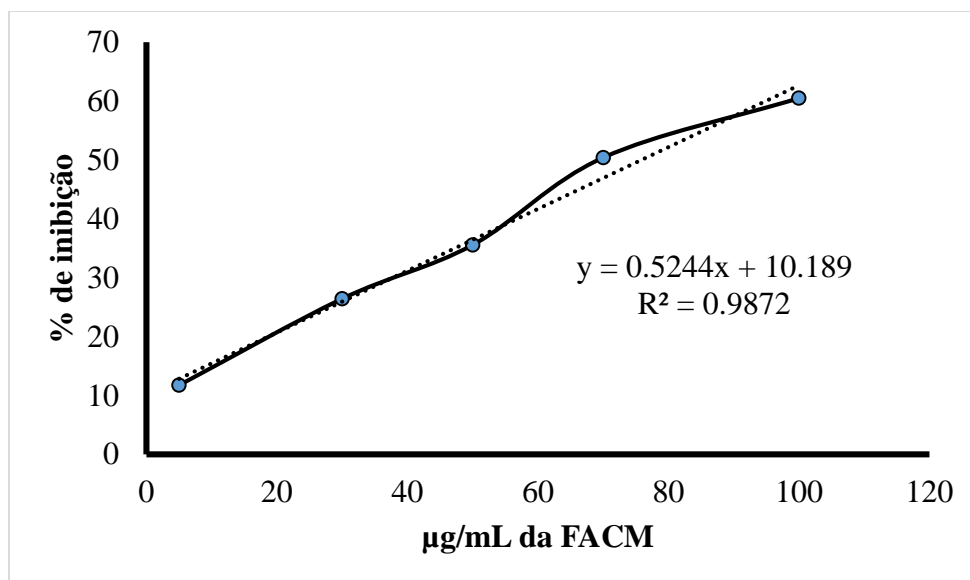


Figura C4: gráfico da curva de inibição de EBCM pelo método DPPH

#### ✚ Fracção alcaloídica

Tabela C5: Resultados da actividade antioxidante de FACV pelo método de DPPH

| µg/mL                  | Inibição (Réplicas) |      |             |      |             |      | Média (%) | DP    | CV (%) |
|------------------------|---------------------|------|-------------|------|-------------|------|-----------|-------|--------|
|                        | 1                   |      | 2           |      | 3           |      |           |       |        |
|                        | Absorvância         | %    | Absorvância | %    | Absorvância | %    |           |       |        |
| 5                      | 0,8517              | 11,1 | 0,8411      | 12,2 | 0,8434      | 12,0 | 11,8      | 0,582 | 4,95   |
| 30                     | 0,6999              | 26,9 | 0,7096      | 25,9 | 0,7045      | 26,5 | 26,4      | 0,506 | 1,91   |
| 50                     | 0,6152              | 35,8 | 0,6149      | 35,8 | 0,6215      | 35,1 | 35,6      | 0,389 | 1,09   |
| 70                     | 0,4765              | 50,3 | 0,4772      | 50,2 | 0,4718      | 50,7 | 50,4      | 0,307 | 0,61   |
| 100                    | 0,3771              | 60,6 | 0,3801      | 60,3 | 0,3783      | 60,5 | 60,5      | 0,158 | 0,26   |
| <b>IC<sub>50</sub></b> | 75,7                |      | 76,2        |      | 75,9        |      | 75,9      | 0,265 | 0,35   |



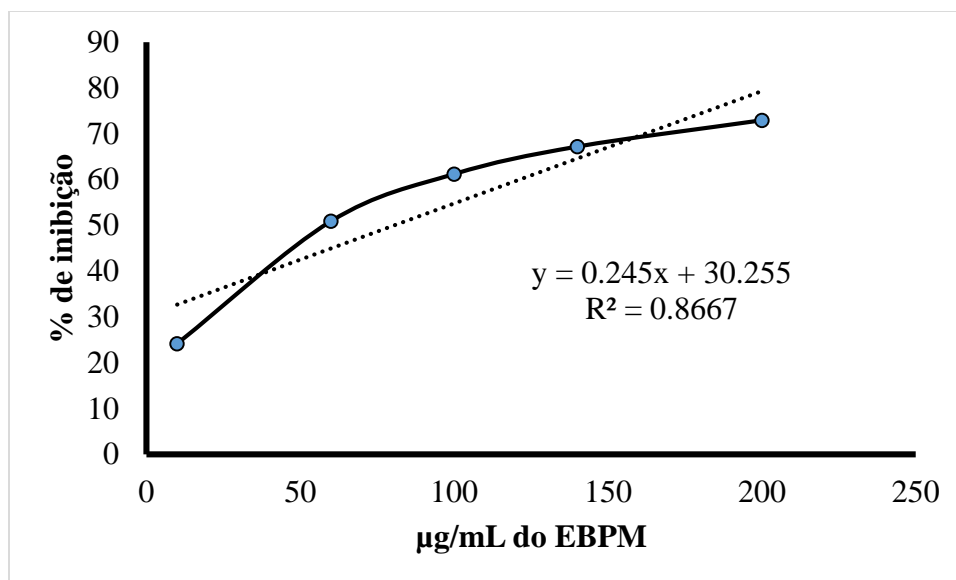
**Figura C5:** gráfico da curva de inibição de FACM pelo método DPPH

### Polpa madura

#### ✚ Extracto bruto

**Tabela C6:** Resultados da actividade antioxidante de FACV pelo método de DPPH

| µg/mL                  | Inibição (Réplicas) |      |             |      |             |      | Média (%) | DP    | CV (%) |
|------------------------|---------------------|------|-------------|------|-------------|------|-----------|-------|--------|
|                        | 1                   |      | 2           |      | 3           |      |           |       |        |
|                        | Absorvância         | %    | Absorvância | %    | Absorvância | %    |           |       |        |
| 10                     | 0,2750              | 25,8 | 0,2883      | 22,2 | 0,2799      | 24,5 | 24,1      | 1,815 | 7,51   |
| 60                     | 0,1865              | 49,7 | 0,1793      | 51,6 | 0,1803      | 51,3 | 50,9      | 1,053 | 2,07   |
| 100                    | 0,1503              | 59,4 | 0,1417      | 61,8 | 0,1397      | 62,3 | 61,2      | 1,520 | 2,48   |
| 140                    | 0,1222              | 67,0 | 0,1216      | 67,2 | 0,1214      | 67,2 | 67,1      | 0,112 | 0,17   |
| 200                    | 0,0990              | 73,3 | 0,0986      | 73,4 | 0,1037      | 72,0 | 72,9      | 0,765 | 1,05   |
| <b>IC<sub>50</sub></b> | 81,2                |      | 81,4        |      | 79,1        |      | 80,6      | 1,280 | 1,6    |



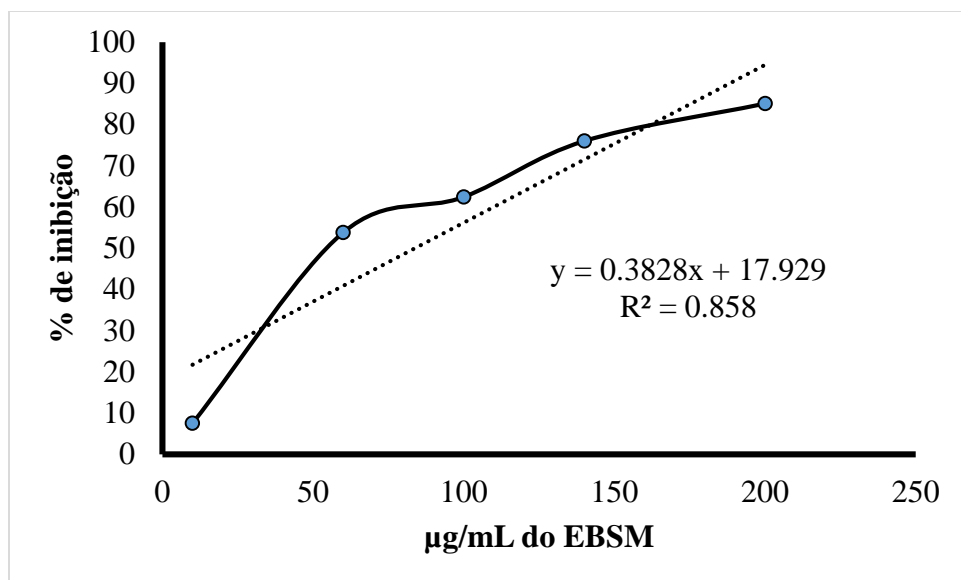
**Figura C6:** gráfico da curva de inibição de EBPM pelo método de DPPH

### Sementes maduras

#### ✚ Extracto bruto

**Tabela C7:** Resultados da actividade antioxidante de EBSM pelo método de DPPH

| µg/mL                  | Inibição (Réplicas) |      |             |      |             |      | Média (%) | DP    | CV (%) |
|------------------------|---------------------|------|-------------|------|-------------|------|-----------|-------|--------|
|                        | 1                   |      | 2           |      | 3           |      |           |       |        |
|                        | Absorvância         | %    | Absorvância | %    | Absorvância | %    |           |       |        |
| 10                     | 0,3432              | 7,4  | 0,3428      | 7,5  | 0,3418      | 7,8  | 7,5       | 0,195 | 2,58   |
| 60                     | 0,1698              | 54,2 | 0,1701      | 5,1  | 0,1736      | 53,1 | 53,8      | 0,570 | 1,06   |
| 100                    | 0,1373              | 62,9 | 0,1404      | 62,1 | 0,1399      | 62,2 | 62,4      | 0,449 | 0,72   |
| 140                    | 0,0900              | 75,7 | 0,0898      | 75,8 | 0,0871      | 76,5 | 76,0      | 0,437 | 0,57   |
| 200                    | 0,0587              | 84,2 | 0,0575      | 84,5 | 0,0498      | 86,6 | 85,1      | 1,303 | 1,53   |
| <b>IC<sub>50</sub></b> | 83,8                |      | 84,1        |      | 83,5        |      | 83,8      | 0,309 | 0,37   |

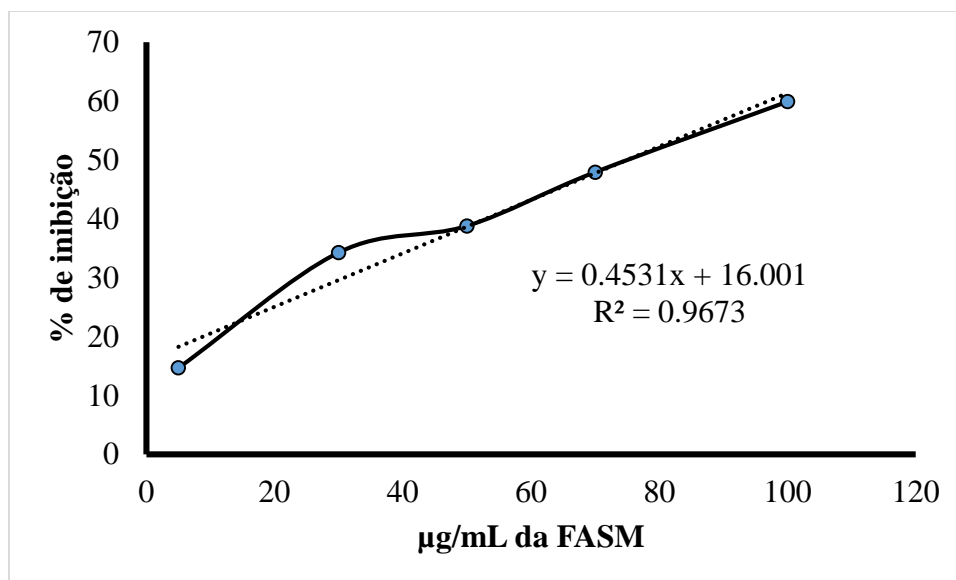


**Figura C7:** gráfico da curva de inibição de EBSM pelo método de DPPH

#### ✚ Fracção alcaloídica

**Tabela C8:** Resultados da actividade antioxidante de FASM pelo método de DPPH

| µg/mL                  | Inibição (Réplicas) |      |             |      |             |       | Média (%) | DP    | CV (%) |
|------------------------|---------------------|------|-------------|------|-------------|-------|-----------|-------|--------|
|                        | 1                   |      | 2           |      | 3           |       |           |       |        |
|                        | Absorvância         | %    | Absorvância | %    | Absorvância | %     |           |       |        |
| 5                      | 0,8177              | 14,6 | 0,8164      | 14,8 | 0,8180      | 14,6  | 14,7      | 0,089 | 0,60   |
| 30                     | 0,6290              | 34,3 | 0,6294      | 34,3 | 0,6305      | 34,19 | 34,3      | 0,081 | 0,24   |
| 50                     | 0,5876              | 38,7 | 0,5861      | 38,8 | 0,5856      | 38,9  | 38,8      | 0,109 | 0,28   |
| 70                     | 0,4982              | 48,0 | 0,4999      | 47,8 | 0,4988      | 47,9  | 47,9      | 0,090 | 0,19   |
| 100                    | 0,3848              | 59,8 | 0,3845      | 59,9 | 0,3838      | 59,9  | 59,9      | 0,054 | 0,09   |
| <b>IC<sub>50</sub></b> | 75,1                |      | 75,1        |      | 75,0        |       | 75,0      | 0,076 | 0,10   |



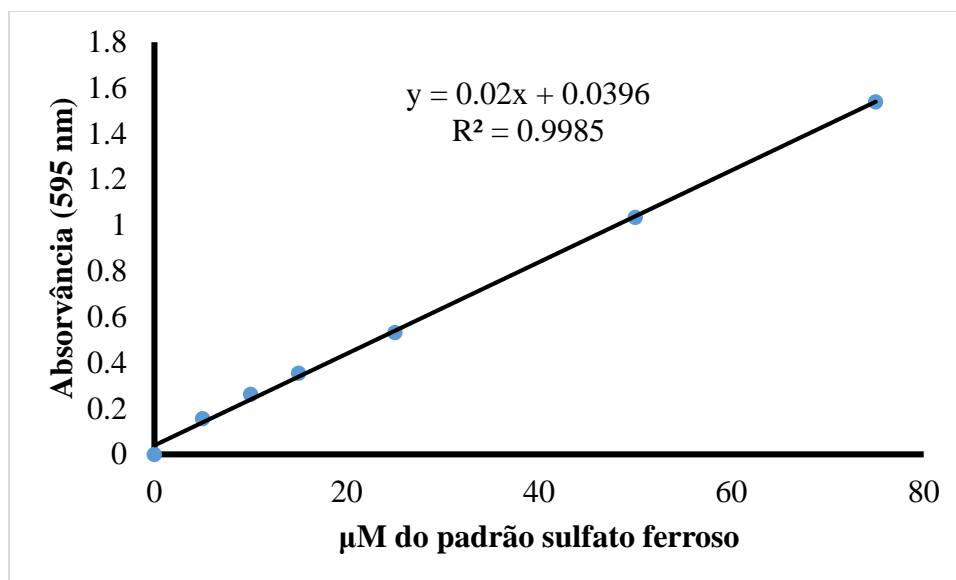
**Figura C8:** gráfico da curva de inibição de FASM pelo método de DPPH

## II. Método de poder de redução do ião férrico (FRAP)

### Padrão (sulfato Ferroso)

**Tabela C9:** Resultados das absorvâncias do padrão sulfato ferroso pelo método de FRAP

| µM de Fe <sup>2+</sup> | Absorvância do padrão (595 nm) | Média  | DP    | CV (%) |
|------------------------|--------------------------------|--------|-------|--------|
| 5                      | 0,1555                         | 0,1561 | 0,001 | 0,76   |
|                        | 0,1575                         |        |       |        |
|                        | 0,1554                         |        |       |        |
| 10                     | 0,2693                         | 0,2620 | 0,007 | 2,57   |
|                        | 0,2560                         |        |       |        |
|                        | 0,2608                         |        |       |        |
| 15                     | 0,3448                         | 0,3544 | 0,008 | 2,35   |
|                        | 0,3598                         |        |       |        |
|                        | 0,3586                         |        |       |        |
| 25                     | 0,5730                         | 0,5318 | 0,039 | 7,40   |
|                        | 0,4946                         |        |       |        |
|                        | 0,5279                         |        |       |        |
| 50                     | 1,0190                         | 1,0352 | 0,017 | 1,66   |
|                        | 1,0532                         |        |       |        |
|                        | 1,0334                         |        |       |        |
| 75                     | 1,5351                         | 1,5391 | 0,020 | 1,28   |
|                        | 1,5218                         |        |       |        |
|                        | 1,5605                         |        |       |        |



**Figura C9:** gráfico da curva de calibração do Sulfato Ferroso pelo método de FRAP

## Amostras

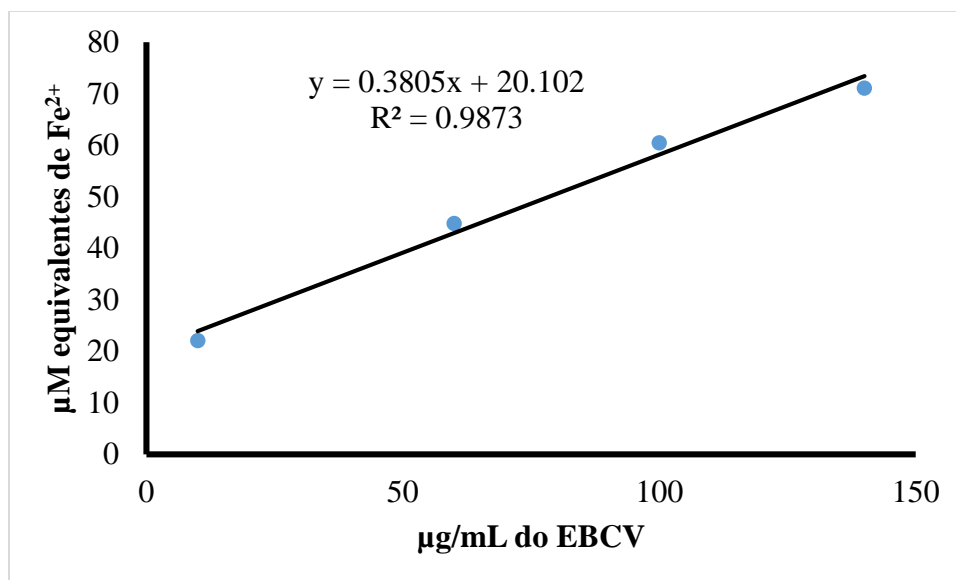
### Casca verde

#### ✚ Extracto bruto

**Tabela C10:** Resultados da actividade antioxidante de EBCV pelo método de FRAP

| <b>μg/mL do EBCV</b> | <b>Absorvância (595 nm)</b> | <b>Média</b> | <b>DP</b> | <b>μM eq. de Fe<sup>2+</sup></b> | <b>Média</b> | <b>DP</b> | <b>CV (%)</b> |
|----------------------|-----------------------------|--------------|-----------|----------------------------------|--------------|-----------|---------------|
| 10                   | 0,4746                      | 0,4809       | 0,0073    | 21,750                           | 22,065       | 0,365     | 1,65          |
|                      | 0,4889                      |              |           | 22,465                           |              |           |               |
|                      | 0,4792                      |              |           | 21,980                           |              |           |               |
| 60                   | 0,9285                      | 0,9354       | 0,0106    | 44,445                           | 44,790       | 0,530     | 1,18          |
|                      | 0,9476                      |              |           | 45,400                           |              |           |               |
|                      | 0,9301                      |              |           | 44,525                           |              |           |               |
| 100                  | 1,2606                      | 1,2480       | 0,0113    | 61,050                           | 60,418       | 0,567     | 0,94          |
|                      | 1,2387                      |              |           | 59,955                           |              |           |               |
|                      | 1,2446                      |              |           | 60,250                           |              |           |               |
| 140                  | 1,5270                      | 1,4613       | 0,0569    | 74,370                           | 71,083       | 2,847     | 4,00          |
|                      | 1,4274                      |              |           | 69,390                           |              |           |               |
|                      | 1,4294                      |              |           | 69,490                           |              |           |               |



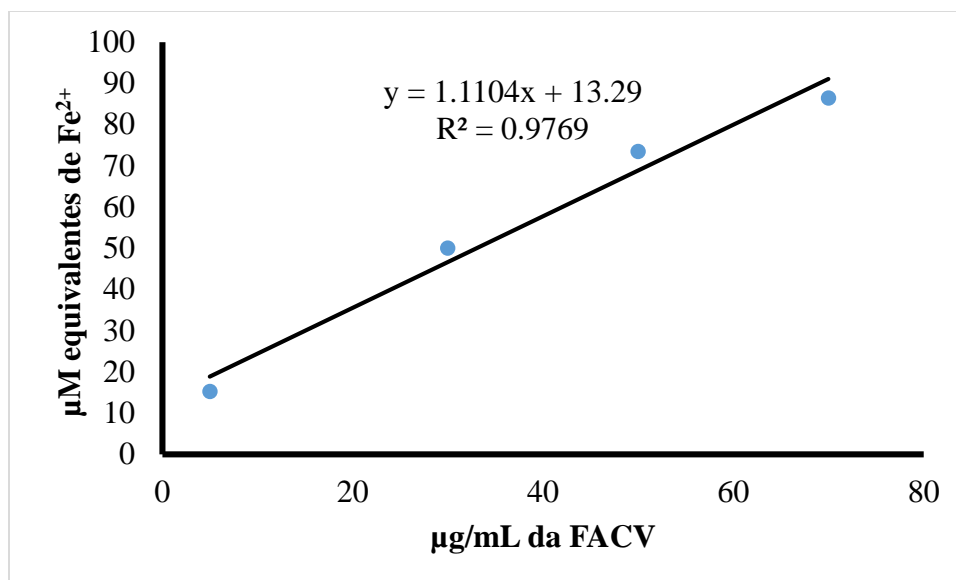


**Figura C10:** gráfico da curva dose-resposta de EBCV pelo método de FRAP

#### ✚ Fracção alcaloídica

**Tabela C11:** Resultados da actividade antioxidante de FACV pelo método de FRAP

| µg/mL do FACV | Absorvância (595 nm) | Média  | DP     | µM eq. de Fe <sup>2+</sup> | Média  | DP     | CV (%) |
|---------------|----------------------|--------|--------|----------------------------|--------|--------|--------|
| 5             | 0,3452               | 0,3450 | 0,0009 | 15,280                     | 15,272 | 0,0431 | 0,28   |
|               | 0,3458               |        |        | 15,310                     |        |        |        |
|               | 0,3441               |        |        | 15,225                     |        |        |        |
| 30            | 1,0407               | 1,0408 | 0,0002 | 50,055                     | 50,058 | 0,0104 | 0,02   |
|               | 1,0410               |        |        | 50,070                     |        |        |        |
|               | 1,0406               |        |        | 50,050                     |        |        |        |
| 50            | 1,5097               | 1,5095 | 0,0003 | 73,505                     | 73,495 | 0,0132 | 0,02   |
|               | 1,5092               |        |        | 73,480                     |        |        |        |
|               | 1,5096               |        |        | 73,500                     |        |        |        |
| 70            | 1,7697               | 1,7684 | 0,0012 | 86,505                     | 86,442 | 0,0584 | 0,07   |
|               | 1,7682               |        |        | 86,430                     |        |        |        |
|               | 1,7674               |        |        | 86,390                     |        |        |        |



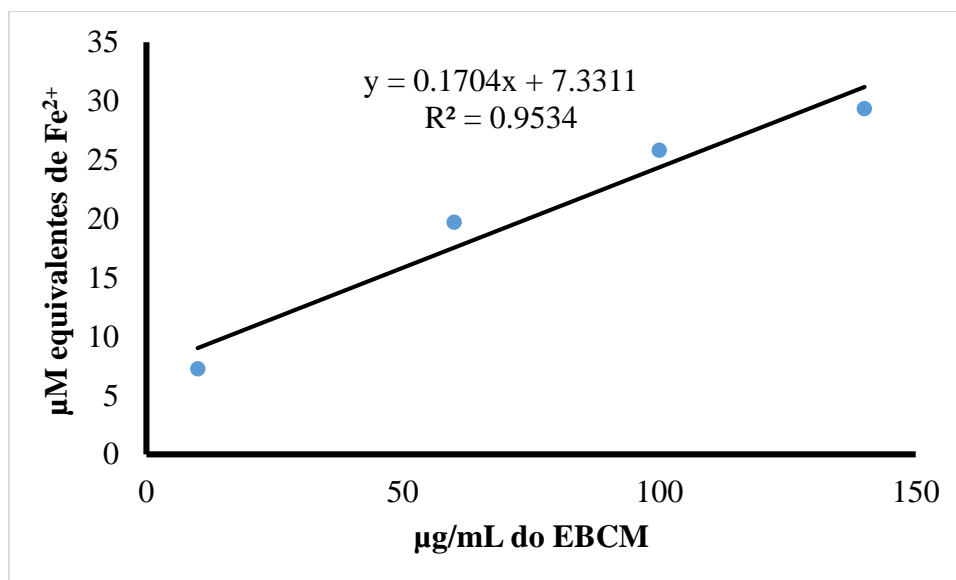
**Figura C11:** gráfico da curva dose-resposta de FACV pelo método de FRAP

### Casca madura

#### ✚ Extracto bruto

**Tabela C12:** Resultados da actividade antioxidante de EBCM pelo método de FRAP

| µg/mL de EBCM | Absorvância (595 nm) | Média  | DP    | µM eq. de Fe <sup>2+</sup> | Média  | DP    | CV (%) |
|---------------|----------------------|--------|-------|----------------------------|--------|-------|--------|
| 10            | 0,1767               | 0,1850 | 0,007 | 6,855                      | 7,270  | 0,359 | 4,94   |
|               | 0,1892               |        |       | 7,480                      |        |       |        |
|               | 0,1891               |        |       | 7,475                      |        |       |        |
| 60            | 0,4351               | 0,4335 | 0,003 | 19,775                     | 19,697 | 0,131 | 0,67   |
|               | 0,4305               |        |       | 19,545                     |        |       |        |
|               | 0,4350               |        |       | 19,770                     |        |       |        |
| 100           | 0,5493               | 0,5559 | 0,010 | 25,485                     | 25,815 | 0,508 | 1,97   |
|               | 0,5676               |        |       | 26,400                     |        |       |        |
|               | 0,5508               |        |       | 25,560                     |        |       |        |
| 140           | 0,6053               | 0,6267 | 0,019 | 28,285                     | 29,355 | 0,928 | 3,16   |
|               | 0,6382               |        |       | 29,930                     |        |       |        |
|               | 0,6366               |        |       | 29,850                     |        |       |        |

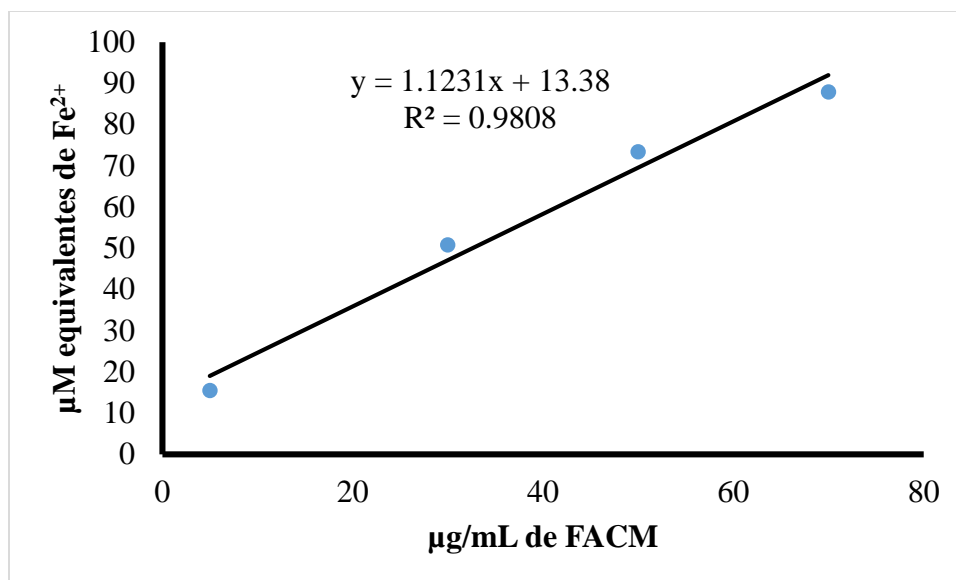


**Figura C12:** gráfico da curva dose-resposta de EBCM pelo método de FRAP

#### ✚ Fracção alcaloídica

**Tabela C13:** Resultados da actividade antioxidante de FACM pelo método de FRAP

| µg/mL de FACM | Absorvância (595 nm) | Média  | DP    | µM eq. de Fe <sup>2+</sup> | Média  | DP    | CV (%) |
|---------------|----------------------|--------|-------|----------------------------|--------|-------|--------|
| 5             | 0,3573               | 0,3501 | 0,006 | 15,885                     | 15,525 | 0,319 | 2,05   |
|               | 0,3452               |        |       | 15,280                     |        |       |        |
|               | 0,3478               |        |       | 15,410                     |        |       |        |
| 30            | 1,0543               | 1,0555 | 0,004 | 50,735                     | 50,793 | 0,209 | 0,41   |
|               | 1,0520               |        |       | 50,620                     |        |       |        |
|               | 1,0601               |        |       | 51,025                     |        |       |        |
| 50            | 1,4948               | 1,5069 | 0,011 | 72,760                     | 73,365 | 0,555 | 0,76   |
|               | 1,5093               |        |       | 73,485                     |        |       |        |
|               | 1,5166               |        |       | 73,850                     |        |       |        |
| 70            | 1,7754               | 1,7978 | 0,019 | 86,790                     | 87,908 | 0,969 | 1,10   |
|               | 1,8081               |        |       | 88,425                     |        |       |        |
|               | 1,8098               |        |       | 88,510                     |        |       |        |



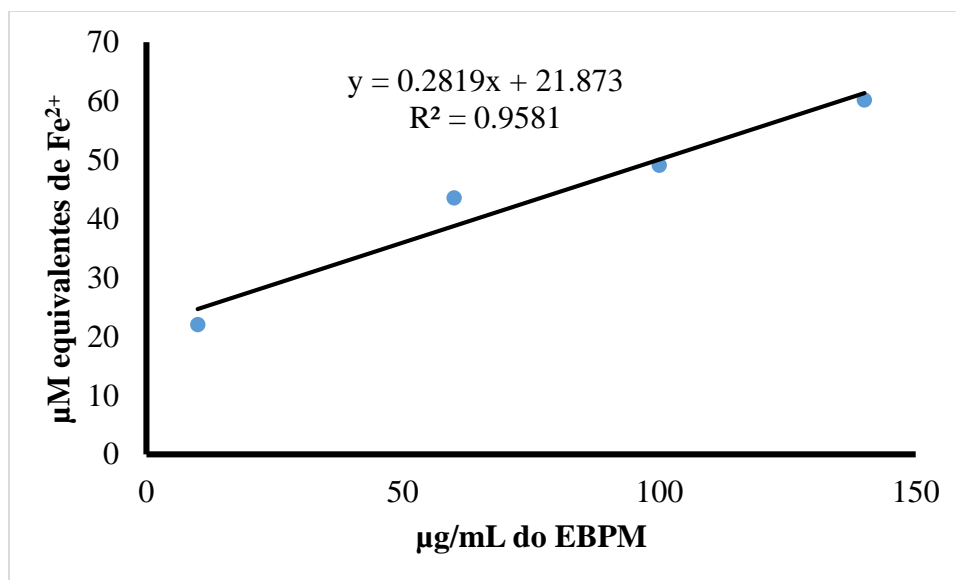
**Figura C13:** gráfico da curva dose-resposta de FACM pelo método de FRAP

### Polpa madura

#### ✚ Extracto bruto

**Tabela C14:** Resultados da actividade antioxidante de EBPM pelo método de FRAP

| µg/mL de EBPM | Absorvância (595 nm) | Média  | DP     | µM eq. de Fe <sup>2+</sup> | Média  | DP    | CV (%) |
|---------------|----------------------|--------|--------|----------------------------|--------|-------|--------|
| 10            | 0,5544               | 0,4805 | 0,0711 | 25,740                     | 22,043 | 3,557 | 16,14  |
|               | 0,4745               |        |        | 21,745                     |        |       |        |
|               | 0,4125               |        |        | 18,645                     |        |       |        |
| 60            | 0,9493               | 0,9111 | 0,0425 | 45,485                     | 43,573 | 2,125 | 4,88   |
|               | 0,8653               |        |        | 41,285                     |        |       |        |
|               | 0,9186               |        |        | 43,950                     |        |       |        |
| 100           | 1,0152               | 1,0216 | 0,0056 | 48,780                     | 49,100 | 0,278 | 0,57   |
|               | 1,0243               |        |        | 49,235                     |        |       |        |
|               | 1,0253               |        |        | 49,285                     |        |       |        |
| 140           | 1,2176               | 1,2429 | 0,0282 | 58,900                     | 60,167 | 1,409 | 2,34   |
|               | 1,2379               |        |        | 59,915                     |        |       |        |
|               | 1,2733               |        |        | 61,685                     |        |       |        |



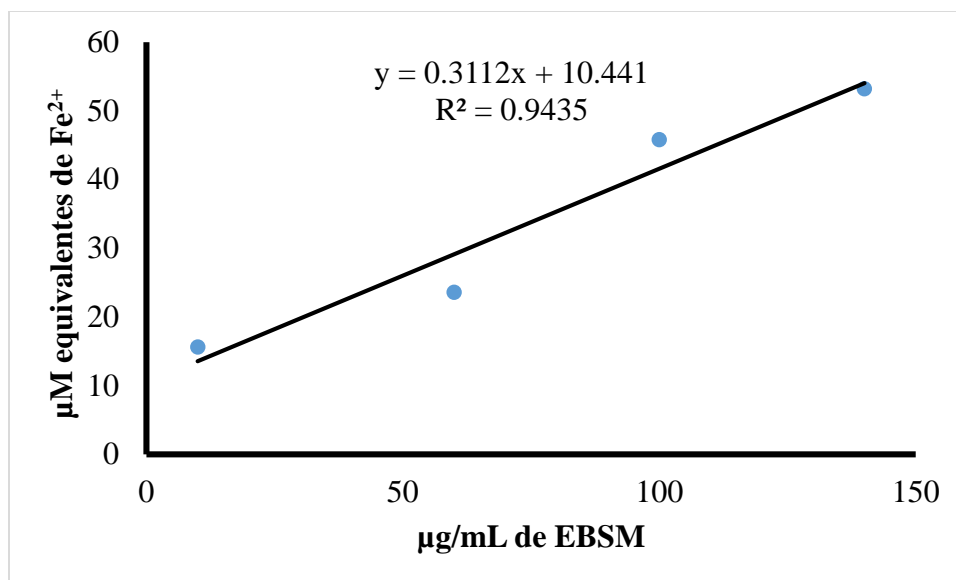
**Figura C14:** gráfico da curva dose-resposta de EBPM pelo método de FRAP

### Sementes maduras

#### ✚ Extracto bruto

**Tabela C15:** Resultados da actividade antioxidante de EBSM pelo método de FRAP

| $\mu\text{g/mL}$ de EBSM | Absorvância (595 nm) | Média  | DP    | $\mu\text{M}$ eq. de $\text{Fe}^{2+}$ | Média  | DP    | CV (%) |
|--------------------------|----------------------|--------|-------|---------------------------------------|--------|-------|--------|
| 10                       | 0,3487               | 0,3525 | 0,005 | 15,455                                | 15,647 | 0,229 | 1,46   |
|                          | 0,3513               |        |       | 15,585                                |        |       |        |
|                          | 0,3576               |        |       | 15,900                                |        |       |        |
| 60                       | 0,5134               | 0,5112 | 0,002 | 23,690                                | 23,580 | 0,101 | 0,43   |
|                          | 0,5108               |        |       | 23,560                                |        |       |        |
|                          | 0,5094               |        |       | 23,490                                |        |       |        |
| 100                      | 0,9612               | 0,9559 | 0,006 | 46,080                                | 45,815 | 0,287 | 0,63   |
|                          | 0,9567               |        |       | 45,855                                |        |       |        |
|                          | 0,9498               |        |       | 45,510                                |        |       |        |
| 140                      | 1,1006               | 1,1033 | 0,006 | 53,050                                | 53,187 | 0,281 | 0,53   |
|                          | 1,0996               |        |       | 53,000                                |        |       |        |
|                          | 1,1098               |        |       | 53,510                                |        |       |        |

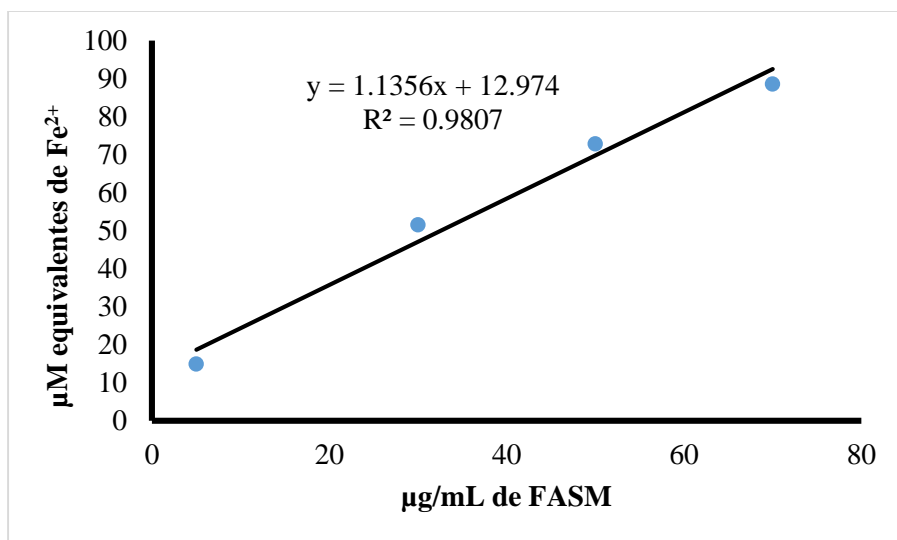


**Figura C15:** gráfico da curva dose-resposta de EBSM pelo método de FRAP

#### ✚ Fracção alcaloídica

**Tabela C16:** Resultados da actividade antioxidante de FASM pelo método de FRAP

| µg/mL de FASM | Absorvância (595 nm) | Média  | DP     | µM eq. de Fe <sup>2+</sup> | Média  | DP    | CV (%) |
|---------------|----------------------|--------|--------|----------------------------|--------|-------|--------|
| 5             | 0,3390               | 0,3382 | 0,0011 | 14,970                     | 14,932 | 0,054 | 0,36   |
|               | 0,3387               |        |        | 14,955                     |        |       |        |
|               | 0,3370               |        |        | 14,870                     |        |       |        |
| 30            | 1,0700               | 1,0703 | 0,0003 | 51,520                     | 51,535 | 0,013 | 0,03   |
|               | 1,0705               |        |        | 51,545                     |        |       |        |
|               | 1,0704               |        |        | 51,540                     |        |       |        |
| 50            | 1,4968               | 1,4968 | 0,0006 | 72,860                     | 72,862 | 0,028 | 0,04   |
|               | 1,4963               |        |        | 72,835                     |        |       |        |
|               | 1,4974               |        |        | 72,890                     |        |       |        |
| 70            | 1,8123               | 1,8114 | 0,0009 | 88,635                     | 88,588 | 0,043 | 0,05   |
|               | 1,8106               |        |        | 88,550                     |        |       |        |
|               | 1,8112               |        |        | 88,580                     |        |       |        |



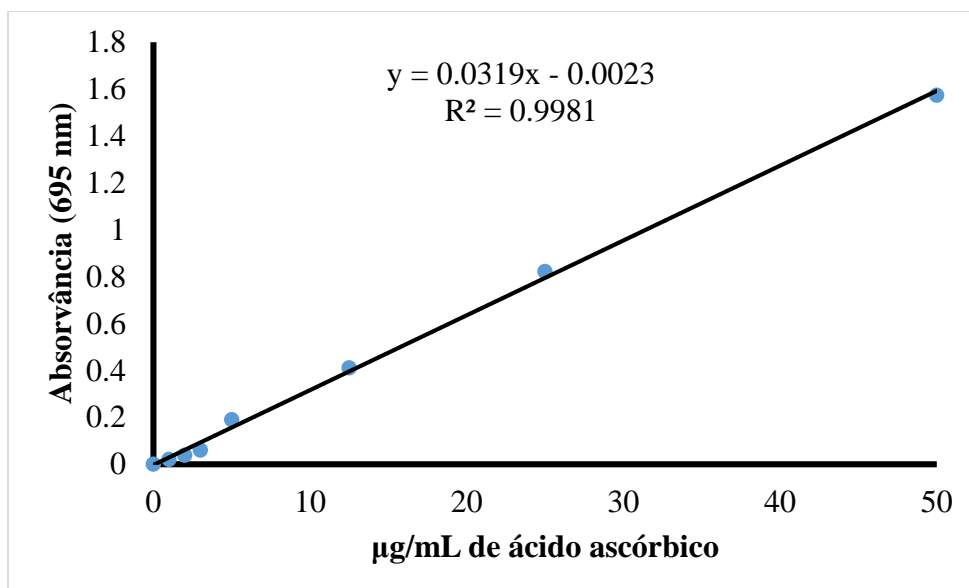
**Figura C16:** gráfico da curva dose-resposta de FASM pelo método de FRAP

### III. Método de ácido fosfomolibdico

#### Padrão (ácido ascórbico)

**Tabela C17:** Resultados das absorvâncias do padrão ácido ascórbico pelo método de Ácido Fosfomolibdico

| µg/mL de Ácido Ascórbico | Absorvância do padrão (695 nm) | Média  | DP                 | CV (%) |
|--------------------------|--------------------------------|--------|--------------------|--------|
| 0                        | 0,0013<br>0,0012<br>0,0013     | 0,0033 | $6 \times 10^{-5}$ | 1,75   |
| 1                        | 0,0228<br>0,0217<br>0,0227     | 0,0224 | 0,0006             | 2,72   |
| 2                        | 0,0398<br>0,0403<br>0,0367     | 0,0389 | 0,0020             | 5,01   |
| 3                        | 0,0607<br>0,0632<br>0,0595     | 0,0611 | 0,0019             | 3,09   |
| 5                        | 0,1918<br>0,1936<br>0,1860     | 0,1904 | 0,0040             | 2,07   |
| 12,5                     | 0,4137<br>0,4151<br>0,4061     | 0,4116 | 0,0048             | 1,18   |
| 25                       | 0,8249<br>0,8322<br>0,8109     | 0,8226 | 0,0108             | 1,32   |
| 50                       | 1,5726<br>1,5714<br>1,5784     | 1,5741 | 0,0037             | 0,24   |



**Figura C17:** gráfico da curva de calibração do ácido ascórbico pelo método de ácido fosfomolibdico

## Amostras

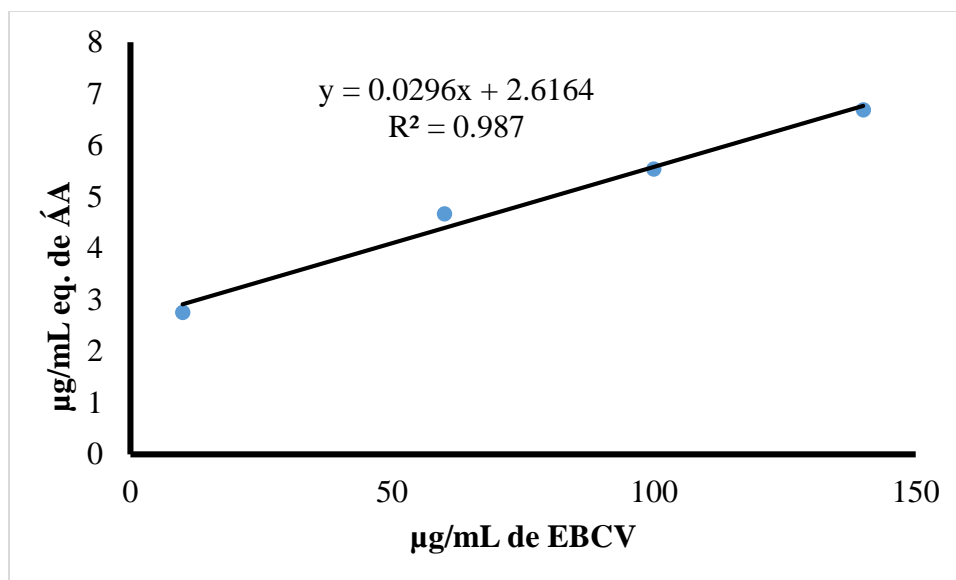
### Casca verde

#### ✚ Extracto bruto

**Tabela C18:** Resultados da actividade antioxidante de EBCV pelo método de ácido fosfomolibdico

| µg/mL de EBCV | Absorvância (695 nm) | Média  | DP     | µg/mL eq. de ÁA | Média | DP    | CV (%) |
|---------------|----------------------|--------|--------|-----------------|-------|-------|--------|
| 10            | 0,0845               | 0,0853 | 0,0020 | 2,730           | 2,757 | 0,062 | 2,26   |
|               | 0,0839               |        |        | 2,712           |       |       |        |
|               | 0,0876               |        |        | 2,828           |       |       |        |
| 60            | 0,1497               | 0,1463 | 0,0037 | 4,774           | 4,667 | 0,117 | 2,50   |
|               | 0,1423               |        |        | 4,542           |       |       |        |
|               | 0,1468               |        |        | 4,683           |       |       |        |
| 100           | 0,1779               | 0,1740 | 0,0046 | 5,658           | 5,536 | 0,145 | 2,61   |
|               | 0,1689               |        |        | 5,376           |       |       |        |
|               | 0,1752               |        |        | 5,574           |       |       |        |
| 140           | 0,2101               | 0,2106 | 0,0005 | 6,668           | 6,684 | 0,016 | 0,24   |
|               | 0,2111               |        |        | 6,699           |       |       |        |
|               | 0,2107               |        |        | 6,687           |       |       |        |



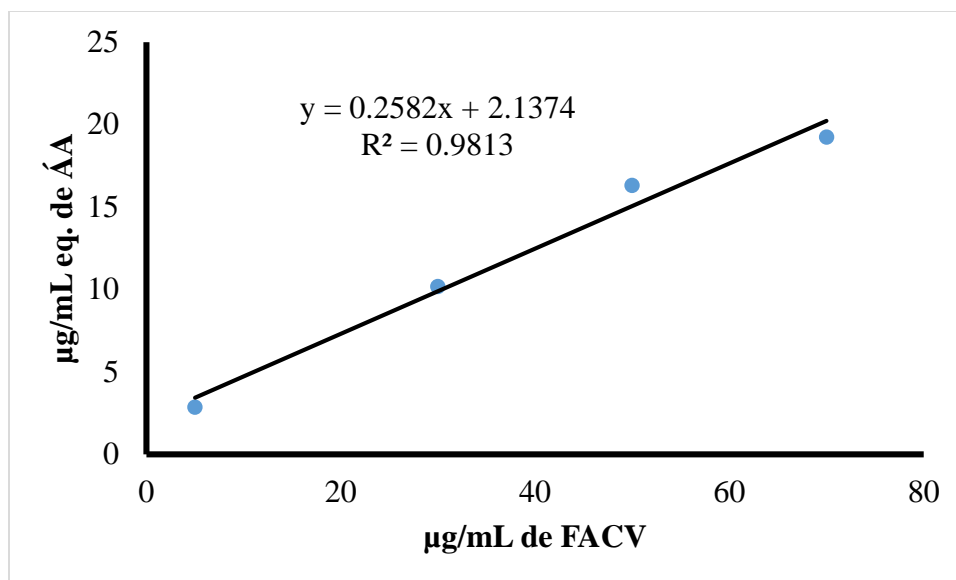


**Figura C18:** gráfico da curva dose-resposta de EBCV pelo método de ácido fosfomolibdico

#### ✚ Fracção alcaloídica

**Tabela C19:** Resultados da actividade antioxidante de FACV pelo método de ácido fosfomolibdico

| µg/mL de FACV | Absorvância (695 nm) | Média  | DP     | µg/mL eq. de ÁA | Média  | DP    | CV (%) |
|---------------|----------------------|--------|--------|-----------------|--------|-------|--------|
| 5             | 0,0885               | 0,0888 | 0,0004 | 2,856           | 2,864  | 0,012 | 0,41   |
|               | 0,0886               |        |        | 2,859           |        |       |        |
|               | 0,0892               |        |        | 2,878           |        |       |        |
| 30            | 0,3210               | 0,3219 | 0,0011 | 10,144          | 10,172 | 0,034 | 0,33   |
|               | 0,3216               |        |        | 10,163          |        |       |        |
|               | 0,3231               |        |        | 10,210          |        |       |        |
| 50            | 0,5157               | 0,5175 | 0,0018 | 16,248          | 16,303 | 0,055 | 0,34   |
|               | 0,5175               |        |        | 16,304          |        |       |        |
|               | 0,5192               |        |        | 16,357          |        |       |        |
| 70            | 0,6097               | 0,6109 | 0,0010 | 19,194          | 19,231 | 0,033 | 0,17   |
|               | 0,6112               |        |        | 19,241          |        |       |        |
|               | 0,6117               |        |        | 19,257          |        |       |        |



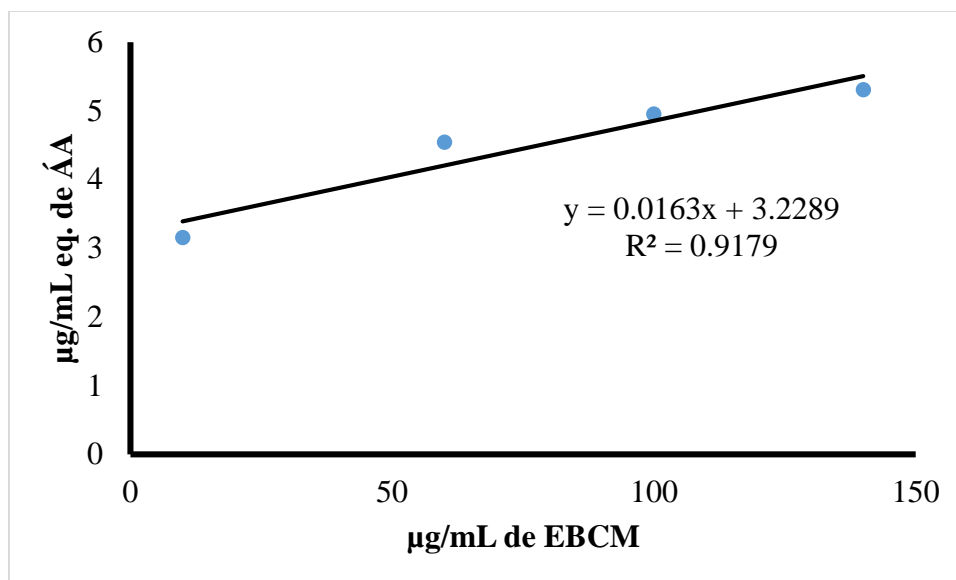
**Figura C19:** gráfico da curva dose-resposta de FACV pelo método de ácido fosfomolibdico

### Casca madura

#### ✚ Extracto bruto

**Tabela C20:** Resultados da actividade antioxidante de EBCM pelo método de ácido fosfomolibdico

| µg/mL de EBCM | Absorvância (695 nm) | Média  | DP    | µg/mL eq. de ÁA | Média | DP    | CV (%) |
|---------------|----------------------|--------|-------|-----------------|-------|-------|--------|
| 10            | 0,0962               | 0,0980 | 0,004 | 3,097           | 3,152 | 0,112 | 3,54   |
|               | 0,1021               |        |       | 3,282           |       |       |        |
|               | 0,0957               |        |       | 3,082           |       |       |        |
| 60            | 0,1392               | 0,1423 | 0,003 | 4,445           | 4,542 | 0,094 | 2,07   |
|               | 0,1425               |        |       | 4,549           |       |       |        |
|               | 0,1452               |        |       | 4,633           |       |       |        |
| 100           | 0,1591               | 0,1554 | 0,008 | 5,069           | 4,954 | 0,250 | 5,04   |
|               | 0,1609               |        |       | 5,125           |       |       |        |
|               | 0,1463               |        |       | 4,668           |       |       |        |
| 140           | 0,1718               | 0,1667 | 0,004 | 5,467           | 5,308 | 0,139 | 2,62   |
|               | 0,1635               |        |       | 5,207           |       |       |        |
|               | 0,1649               |        |       | 5,251           |       |       |        |

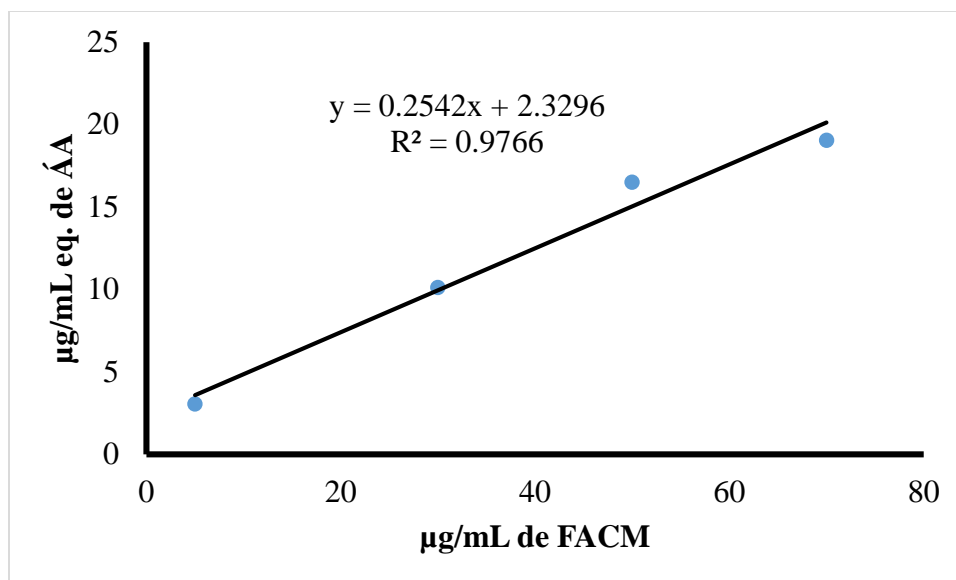


**Figura C20:** gráfico da curva dose-resposta de EBCM pelo método de ácido fosfomolíbido

#### ✚ Fracção alcaloídica

**Tabela C21:** Resultados da actividade antioxidante de FACM pelo método de ácido fosfomolíbido

| µg/mL de FACM | Absorvância (695 nm) | Média  | DP     | µg/mL eq. de ÁA | Média  | DP    | CV (%) |
|---------------|----------------------|--------|--------|-----------------|--------|-------|--------|
| 5             | 0,1002               | 0,0947 | 0,0048 | 3,223           | 3,0512 | 0,151 | 4,95   |
|               | 0,0929               |        |        | 2,994           |        |       |        |
|               | 0,0911               |        |        | 2,937           |        |       |        |
| 30            | 0,3151               | 0,3203 | 0,0047 | 9,959           | 10,121 | 0,148 | 1,47   |
|               | 0,3213               |        |        | 10,154          |        |       |        |
|               | 0,3244               |        |        | 10,251          |        |       |        |
| 50            | 0,5223               | 0,5236 | 0,0012 | 16,455          | 16,494 | 0,037 | 0,22   |
|               | 0,5238               |        |        | 16,502          |        |       |        |
|               | 0,5246               |        |        | 16,527          |        |       |        |
| 70            | 0,6112               | 0,6052 | 0,0058 | 19,241          | 19,053 | 0,182 | 0,96   |
|               | 0,5996               |        |        | 18,878          |        |       |        |
|               | 0,6048               |        |        | 19,041          |        |       |        |



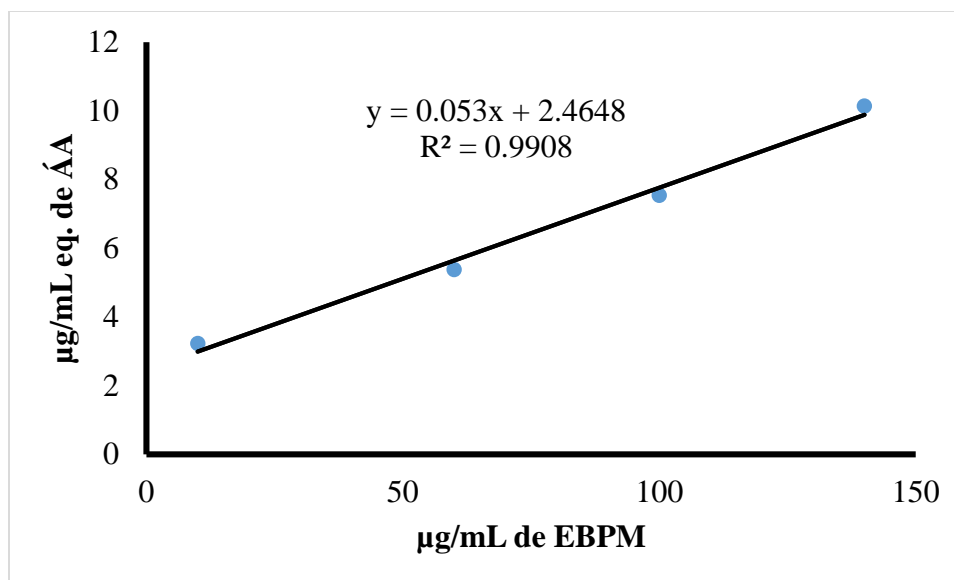
**Figura C21:** gráfico da curva dose-resposta de FACM pelo método de ácido fosfomolibdico

### Polpa madura

#### ✚ Extracto bruto

**Tabela C22:** Resultados da actividade antioxidante de EBPM pelo método de ácido fosfomolibdico

| µg/mL de FACM | Absorvância (695 nm) | Média  | DP    | µg/mL eq. de ÁA | Média  | DP    | CV (%) |
|---------------|----------------------|--------|-------|-----------------|--------|-------|--------|
| 10            | 0,0998               | 0,1004 | 0,004 | 3,210           | 3,228  | 0,125 | 3,87   |
|               | 0,1046               |        |       | 3,361           |        |       |        |
|               | 0,0967               |        |       | 3,113           |        |       |        |
| 60            | 0,1699               | 0,1689 | 0,001 | 5,408           | 5,375  | 0,031 | 0,58   |
|               | 0,1688               |        |       | 5,373           |        |       |        |
|               | 0,1679               |        |       | 5,345           |        |       |        |
| 100           | 0,2354               | 0,2379 | 0,002 | 7,461           | 7,540  | 0,071 | 0,95   |
|               | 0,2398               |        |       | 7,599           |        |       |        |
|               | 0,2386               |        |       | 7,561           |        |       |        |
| 140           | 0,3197               | 0,3208 | 0,004 | 10,103          | 10,138 | 0,112 | 1,11   |
|               | 0,3179               |        |       | 10,047          |        |       |        |
|               | 0,3248               |        |       | 10,263          |        |       |        |



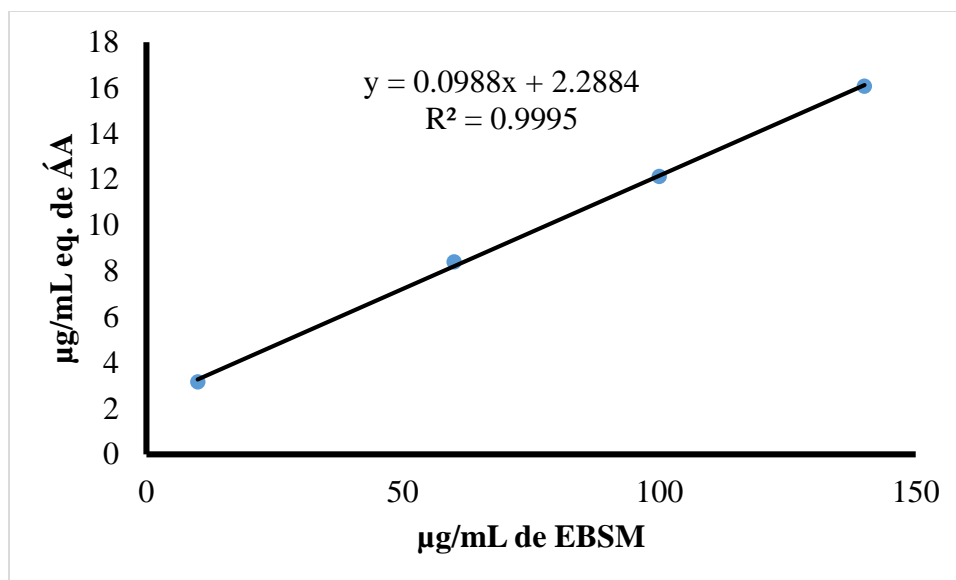
**Figura C22:** gráfico da curva dose-resposta de EBPM pelo método de ácido fosfomolibdico

### Sementes maduras

#### ✚ Extracto bruto

**Tabela C23:** Resultados da actividade antioxidante de EBSM pelo método de ácido fosfomolibdico

| µg/mL de EBSM | Absorvância (695 nm) | Média  | DP    | µg/mL eq. de ÁA | Média  | DP    | CV (%) |
|---------------|----------------------|--------|-------|-----------------|--------|-------|--------|
| 10            | 0,0998               | 0,0986 | 0,001 | 3,210           | 3,171  | 0,045 | 1,41   |
|               | 0,0970               |        |       | 3,122           |        |       |        |
|               | 0,0989               |        |       | 3,182           |        |       |        |
| 60            | 0,2748               | 0,2654 | 0,008 | 8,696           | 8,402  | 0,257 | 3,06   |
|               | 0,2619               |        |       | 8,292           |        |       |        |
|               | 0,2596               |        |       | 8,219           |        |       |        |
| 100           | 0,3958               | 0,3845 | 0,010 | 12,489          | 12,134 | 0,308 | 2,54   |
|               | 0,3794               |        |       | 11,975          |        |       |        |
|               | 0,3782               |        |       | 11,937          |        |       |        |
| 140           | 0,5039               | 0,5100 | 0,005 | 15,878          | 16,069 | 0,166 | 1,04   |
|               | 0,5125               |        |       | 16,147          |        |       |        |
|               | 0,5136               |        |       | 16,182          |        |       |        |

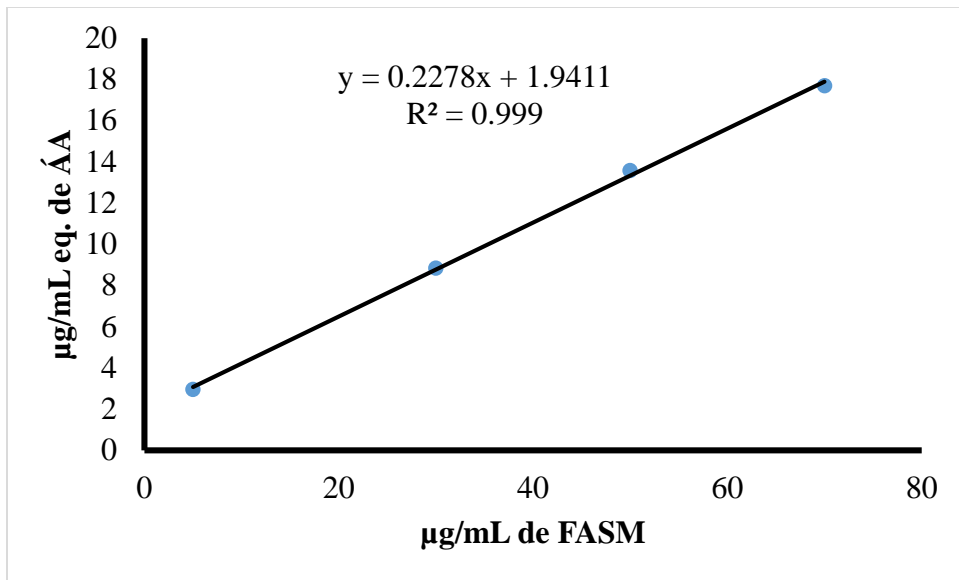


**Figura C23:** gráfico da curva dose-resposta de EBSM pelo método de ácido fosfomolibdico

#### ✚ Fracção alcaloídica

**Tabela C24:** Resultados da actividade antioxidante de FASM pelo método de ácido fosfomolibdico

| µg/mL de FASM | Absorvância (695 nm) | Média  | DP     | µg/mL eq. de ÁA | Média  | DP    | CV (%) |
|---------------|----------------------|--------|--------|-----------------|--------|-------|--------|
| 5             | 0,0912               | 0,0918 | 0,0006 | 2,940           | 2,960  | 0,019 | 0,64   |
|               | 0,0919               |        |        | 2,962           |        |       |        |
|               | 0,0924               |        |        | 2,978           |        |       |        |
| 30            | 0,2785               | 0,2797 | 0,0014 | 8,812           | 8,849  | 0,043 | 0,49   |
|               | 0,2812               |        |        | 8,897           |        |       |        |
|               | 0,2793               |        |        | 8,837           |        |       |        |
| 50            | 0,4297               | 0,4305 | 0,0008 | 13,552          | 13,577 | 0,025 | 0,18   |
|               | 0,4305               |        |        | 13,577          |        |       |        |
|               | 0,4313               |        |        | 13,602          |        |       |        |
| 70            | 0,5673               | 0,5618 | 0,0048 | 17,865          | 17,692 | 0,151 | 0,86   |
|               | 0,5584               |        |        | 17,586          |        |       |        |
|               | 0,5596               |        |        | 17,624          |        |       |        |



**Figura C24:** gráfico da curva dose-resposta de FASM pelo método de ácido fosfomolibdico