



UNIVERSIDADE
EDUARDO
MONDLANE

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM QUÍMICA E PROCESSAMENTO
DE RECURSOS LOCAIS

**Tema: Avaliação Fitoquímica e Antioxidante dos extractos
de *Cassytha Filiformis*; *Commiphora Schlechteri*; *Ochna
Natalitias* e *Pavetta Kotdzei***

AUTORA: Chemane, Maria Isabel

Maputo, Maio de 2019



UNIVERSIDADE
E D U A R D O
M O N D L A N E

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM QUÍMICA E PROCESSAMENTO
DE RECURSOS LOCAIS

**Tema: Avaliação Fitoquímica e Antioxidante dos extractos
de *Cassytha Filiformis*; *Commiphora Schlechteri*; *Ochna
Natalitias* e *Pavetta Kotdzei***

AUTORA: Chemane, Maria Isabel

Supervisora: Doutora Ana Raquel Fernandes Siteo

Maputo, Maio de 2019

DEDICATÓRIA

O presente trabalho é dedicado aos meus pais, Alberto Mazambiane Chemane e Fuiata Chibindze Cristina, e também dedicado ao meu Esposo Samuel João Langa.

DECLARAÇÃO DE HONRA

Declaro que esta dissertação nunca foi apresentada para a obtenção de qualquer grau ou num outro âmbito e que ele constitui o resultado do meu trabalho individual. Esta dissertação é apresentada em cumprimento parcial dos requisitos para a obtenção do grau de Mestrado em Química e Processamento de Recursos Locais da Faculdade de Ciências da Universidade Eduardo Mondlane

Maria Isabel Chemane

Maputo, _____ de _____ de 2019

AGRADECIMENTOS

Desejo expressar os meus mais sinceros agradecimentos:

- Em primeiro lugar á DEUS pelo dom da vida.
- Um especial agradecimento a minha família pelo apoio moral e incondicional na realização do presente trabalho.
- À Doutora Ana Raquel Fernandes Siteo, supervisora, pela revisão e crítica da presente dissertação e sobretudo pela exigente e dedicada orientação científica, permanente disponibilidade e sobretudo pela amizade que sempre soube demonstrar;
- Ao Doutor Julião Monjane, Pelo apoio prestado ao longo do trabalho;
- Ao dr. Jaime Cumbe, pelo seu extraordinário empenho além da permanente disponibilidade e incentivo bem como pela amizade.
- Dr. Paulo Cumbane por ter criado condições para a realização de alguns ensaios no Laboratório do ISCTEM e esclarecimento de dúvidas que foram surgindo ao longo do trabalho.
- Ao dr Carlos Sono, pelas sugestões bastante valiosas e orientação durante a elaboração do trabalho.
- Aos meus colegas do LNCQM e LNHAA, pela simpatia e amizade que sempre dispensaram;

Cumpro me ainda agradecer a todas as instituições que contribuíram para que a realização da parte experimental se tornasse possível nomeadamente:

- Ao Ministério da Saúde, instituição onde me encontro filiada no Laboratório Nacional de Controlo de Qualidade de Medicamentos, pela oportunidade que me foi concedida para o enriquecimento dos meus conhecimentos, no âmbito do programa formação dos seus quadros;
- Ao Instituto de Medicina Tradicional, em particular a dra Felisbela Gaspar por ter cedido pessoal e sala para o processamento de amostras sob as condições requeridas.
- Ao Laboratório da Faculdade de Engenharias da Universidade Eduardo Mondlane, por ter cedido espaço para a realização do processo de moagem das amostras.
- Ao Laboratório Nacional de Higiene de Águas e Alimentos, em particular a directora pela concessão do espaço para a realização de parte das experiências.
- Ao Instituto Superior de Ciências e Tecnologias de Moçambique, pela concessão de espaço para a realização de parte das experiências.

RESUMO

As espécies *Cassytha Filiformis*; *Commiphora Schlechteri*; *Ochna Natalitias* e *Pavetta Kotdzei* em estudo são utilizadas na medicina tradicional moçambicana para redução de problemas de doenças degenerativas tais como cardiovasculares, cancerígenas, diabéticas, reumáticas, infertilidade entre outras, contudo investigações científicas com o objectivo de determinar o seu potencial terapêutico são escassas.

No presente trabalho foi feita a triagem fitoquímica nos extractos brutos e nas fracções de etil acetato e hidrometanólicos monitoradas pela cromatografia em camada fina. Foi determinado o teor dos fenóis totais pelo método de Folin-Ciancalteu bem como o poder redutor aplicando o método de redução do ião férrico em todos os extractos brutos das folhas das quatro plantas estudadas.

Os diferentes extractos e fracções, revelaram a presença de fitoesteróides, triterpenos, gliósidos, fenóis, taninos, diterpenos e flavonóides bem como teores de fenóis totais, os quais não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) nomeadamente: $473.854 \text{ mgEAG} \pm 0.794$ para *Cassytha Filiformis*; $561.723 \text{ mgEAG} \pm 0.458$ *Commiphora Schlechteri*; $685.909 \text{ mgEAG} \pm 0.200$ *Ochna Natalitias* e $687.282 \text{ mgEAG} \pm 0.630$ de *Pavetta Kotdzei* por grama de extracto seco.

O maior poder redutor observou-se nos extractos brutos hidrometanólicos das folhas. Este facto é justificado pela tendência linear que as variáveis poder redutor e concentração apresentaram. Contudo, nestes mesmos extractos as plantas *C. Schelcheri*, *O. Natalitias* e *P. Kotdzei* demonstraram potente actividade antioxidante pois os valores de CE_{50} variaram de 1.008 ± 0.004 a $2.090 \pm 0.121 \mu\text{g mL}^{-1}$ o que era de se esperar. Assim, a ordem de actividade antioxidante observada nas plantas foi *Pavetta Kotdzei* > *Ochna Natalitias* > *Commiphora Schlechteri* > *Cassytha Filiformis*.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que as quatro plantas possuem potente actividade antioxidante bem como a existência de fitoconstituíntes o que justifica a utilização das mesmas na medicina tradicional para o tratamento de doenças acima referidas.

Palavras-chave: Fenóis totais; FRAP; *Cassytha Filiformis*; *Commiphora Schlechteri*; *Ochna Natalitias*; *Pavetta Kotdzei*; extractos; antioxidante.

ABSTRACT

The species *Cassytha Filiformis*; *Commiphora Schlechteri*; *Ochna Natalitias* e *Pavetta Kotdzei* studied are used in Mozambican folk medicine for treatment of various diseases, such as cancer, diabetes, cardiovascular diseases, infertility, alzemer, arteoscleose and others but, scientific investigations aiming to determine the potential therapeutic are still scarce.

In the present study there has been performed the phitochemical screening in all extracts of leaf of the plants monitored by thin layer chromatography in the ethyl acetate and hidromethanolic fraction. Also were determined the total contents of phenolic compounds by Folin-Ciancalteu method as well the reducing power applying the method of Ferric Reduction Power (FRAP) this was done in all leaf extracts of the plants in investigation.

The phitochemical screening in diferents extracts and fraction of all plants reveled the presence of steroids, triterpens, glicosids, phenols, flavonoids, tanins and diterpens.

The leaf extracts of all the plants studied, demonstrated contents of phenolic compounds in witch there were no significant differences for $p < 0,05$ where the hidromethanolic extracts reveled higher content of thenolic compounds namly: **473.854 mgEAG \pm 0.794 for *Cassytha Filiformis*, 561.723 mgEAG \pm 0.458 for *Commiphora Schlechter.*; 685.909 mgEAG \pm 0.200 for *Ochna Natalitias* and 687.282 mgEAG \pm 0.630 for *Pavetta Kotdzei* respectively per gram of the dried material.**

The hihger reducing power was observed in the hidromethanolic leaves extracts. This fact is proved by the linear tendency observed betwine the variable reducing power and concentration. However, this thesis can also be demonstrated by the lower CE₅₀ values wich vary from 1.008 ± 0.004 to $2.090 \pm 0.121 \mu\text{g mL}^{-1}$ as was expected. Thus, the order of the antioxidant activity of the plants were as following ***Pavetta Kotdzei* > *Ochna Natalities* > *Commiphora Schlechteri* > *Cassytha Filiformis*.**

This work provides a scientific support for the high antioxidant activity of this plant because of their phytochemical components and thus it may find potential applications in the folk medicin for treatment of some diseases including cancer, diabetes, cardiovascular diseases, infertility, alzemer arteoscleose and others.

Key words: Total phenolics, FRAP, *Cassytha Filiformis*; *Commiphora Schlechteri*; *Ochna Natalitias*; *Pavetta Kotdzei*; extracts; antioxidant.

INDICE

AGRADECIMENTOS.....	iii
DECLARAÇÃO DE HONRA	ii
RESUMO	v
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS, SIGLAS E ACRÓNIMOS.....	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ANEXOS.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. OBJECTIVOS	5
1.1.1. Geral.....	5
1.1.2. Específicos.....	5
1.2. METODOLOGIA.....	6
1.2.1. Revisão Bibliográfica.....	6
1.2.2. Parte experimental	6
1.2.3. Tratamento análise e Discussão dos resultados	7
1.2.4. Elaboração do relatório final	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
2.1. DESCRIÇÃO, ASPECTOS ETNOFARMACOLOGICOS E FITOQUÍMICOS DAS PLANTAS EM ESTUDO.....	8
2.1.1. <i>Cassytha Filiformis</i>	10
2.1.2. <i>Commiphora Schlechteri</i>	11
2.1.3. <i>Ochna Natalitias</i>	13
2.1.4. <i>Pavetta Kotzei</i>	19
2.2. COMPOSTOS FENÓLICOS	21
2.2.1. Flavonoides.....	23
2.2.2. Taninos.....	26
2.2.3. Actividade antioxidante	28
2.2.4. Quantificação dos fenóis	34
2.2.5. Avaliação da actividade antioxidante	35

3.	PARTE EXPERIMENTAL.....	36
3.1.	GENERALIDADES	36
3.2.	COLHEITA E PRÉ-TRATAMENTO DAS PLANTAS	36
3.3.	PROCEDIMENTO DE EXTRACÇÃO.....	37
3.4.	FITOQUÍMICA QUALITATIVA.....	37
3.4.1.	Triagem fitoquímica aplicando os reagentes específicos.....	37
3.4.2.	Cromatografia em camada fina (TLC).....	37
3.4.3.	Cromatografia em coluna.....	39
3.5.	DETERMINAÇÃO DOS FENÓIS TOTAIS.....	41
3.6.	DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE	42
3.6.1.	Redução do ião férrico (método de cianeto férrico)	42
4.	RESULTADOS	43
4.1.	FITOQUÍMICA QUALITATIVA.....	44
4.1.1.	Triagem fitoquímica.....	44
4.1.2.	Cromatografia de camada fina (TLC).....	47
4.2.	FITOQUÍMICA QUANTITATIVA DOS COMPOSTOS FENÓLICOS	50
4.2.1.	Quantificação dos fenóis	50
4.3.	ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	51
5.	DISCUSSÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS.....	58
5.1.	FITOQUÍMICA QUALITATIVA.....	58
5.1.1.	Cromatografia de camada fina (TLC).....	59
5.2.	FITOQUÍMICA QUANTITATIVA.....	60
5.3.	ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	62
6.	CONCLUSÕES	68
7.	RECOMENDAÇÕES	70
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
	ANEXOS.....	a

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS, SIGLAS E ACRÓNIMOS

Acetil-CoA	Acetil Coenzima A
HAC	Ácido acético glacial
AcOEt	Acetato de etilo
ACLAE	Cromatografia líquida de Alta Eficiência
AMETRAMO	Associação de Médicos Tradicionais
<i>C. Filiformis</i>	<i>Cassytha Filiformis</i>
<i>C. Schlechteri,</i>	<i>Commiphora Schlechteri</i>
BHA	Hidroxianisolbutilato
BHT	Toluenohidroxibutilato
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FRAP	Método de redução de ferro
O ₂ •-	Anião radical superóxido e
ROO•	hidroperoxila
EC ₅₀	Concentração efectiva
TLC(CCF)	Cromatografia em camada fina
DCM	Diclorometano
CC	Cromatografia em coluna
HDL	Lipoproteína de alta densidade
ISCTEM	Instituto Superior de Ciências e Tecnologias de Moçambique
IMT	Instituto de Medicina Tradicional
LNCQM	Laboratório Nacional de Controlo da Qualidade de Medicamentos
LNHAA	Laboratório Nacional de Higiene de Águas e Alimentos

LDL	Lipoproteína de baixa densidade
Malonil-CoA	malonil Coenzima A
n-Hex	n-Hexano
MeOH:H ₂ O	Mistura de metanol e água
Tol	Tolueno
OMS	Organização Mundial da Saúde
UV/Vis	Ultravioleta visível
<i>O. Natalitias</i>	<i>Ochna Natalitias</i>
<i>P. Kotzei</i>	<i>Pavetta Kotzei</i>
PMT	Praticante de Medicina Tradicional

LISTA DE TABELAS

- Tabela I.** Taxonomia das plantas em estudo
- Tabela II:** Material e reagentes para identificação fitoquímica
- Tabela III:** Material e reagentes para determinação da actividade anti-oxidante e fenóis totais
- Tabela IV:** Sistemas de Solventes usados para a eluição das fracções.
- Tabela V:** fitoquímica de extractos de *Cassytha Filiformis* (folhas)
- TabelaVI:** Fitoquímicas de extractos de *Commiphora Schlechteri* (folhas)
- Tabela VII:** Fitoquímicas de extractos de *Ochna Natalitius* (folhas)
- Tabela VIII:** Fitoquímicas de extractos de *Pavetta Kotzei* (folhas)
- Tabela IX:** Fitoquímica dos extractos de folhas de *C. Filiformis*, *C. Schlechter*, *O. Natalitias* e *P. Kotdzei*
- TabelaX:** Actividade Antioxidante de extractos brutos de folhas n- Hex
- Tabela1XI:** Actividade Antioxidante de extractos brutos de folhas DCM
- TabelaXII:** Actividade Antioxidante de extractos brutos de folhas AcOEt
- TabelaXIII:** Actividade Antioxidante de extractos brutos de folhas MeOH/H₂O
- Tabela XIV:** Concentração eficiente dos quatro extractos brutos

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Produtos naturais isolados a partir de plantas
- Figura 2. Estrutura de novos medicamentos produzidos a partir de produtos naturais
- Figura 3. Compostos isolados da *C. Filiformis*
- Figura 4. Algumas estruturas de compostos isolados do género *Commiphora*
- Figura 5. Algumas estruturas de compostos isolados do género *Ochna*
- Figura 6. Compostos isolados da *Pavetta Kotdzei*
- Figura 7. Reacção de formação do ácido cloragénico
- Figura 8. Estrutura básica dos flavanóides
- Figura 9. Biosíntese de flavonóides
- Figura 10. Exemplo de tanino condensado
- Figura 11. Antioxidantes naturais e sintéticos mais comuns
- Figura 12. Estrutura de ácido ascórbico, antioxidante natural
- Figura 13. Antioxidantes lipossolúveis
- Figura 14. Reacção de eliminação de espécies reactivas de oxigénio
- Figura 15. Reacção do ácido gálico com molibdénio, componente do reagente de Folin Calteau
- Figura 16. Reacção da redução envolvida na determinação do poder redutor dos antioxidantes
- Figura 17. Fluxograma do processos
- Figura 18. Fluxograma do fraccionamento dos extractos
- Figura 19. Cromatogramas das fracções metanólicas da espécie *Cassytha*

- Figura 20. Cromatogramas das fracções metanólicas da espécie *Commiphora*
- Figura 21. Cromatogramas das fracções metanólicas da espécie *Ochna*
- Figura 22. Cromatogramas das fracções metanólicas da espécie *Paveta*
- Figura 23. Curva de calibração do ácido gálico
- Figura 24. Curva de poder Redutor X Concentração

LISTA DE ANEXOS

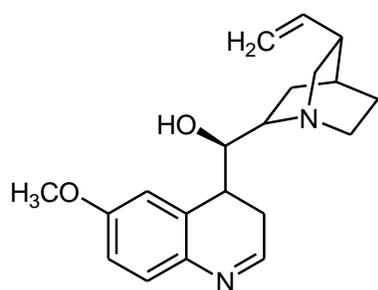
1. Preparação do material vegetal
2. Tratamento do material vegetal até á obtenção do extracto seco
3. Cromatografias de Coluna e de Camada Fina
4. Quantificação dos fenóis
5. Actividade antioxidante

1. INTRODUÇÃO

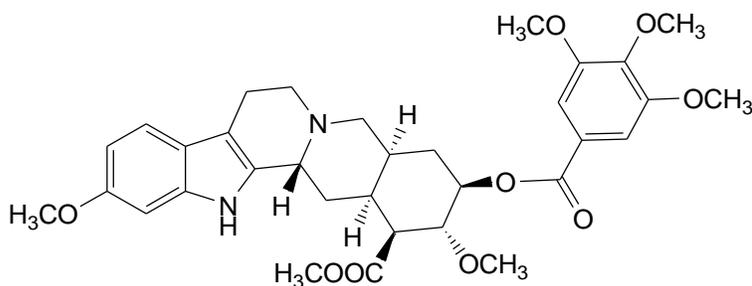
Os produtos naturais foram a base do sistema antigo da medicina tradicional, tal como é o caso dos sistemas Chinês, Ayurvedica e Egípcia (3000 A. C.) (Doughari, 2012; Shaker et al., 2006).

Na maioria das plantas, os compostos activos são metabolitos secundários.

Os Metabolitos secundários são definidos como pequenas moléculas (com peso molecular < 2000 uma) produzidos por organismos que são estritamente necessários para a sobrevivência de organismos. Estes metabolitos secundários compostos são responsáveis pela protecção das plantas contra infecções microbianas ou pelas infestações das pragas. (Doughari, 2012., Sarker et al.,2006). Estes metabolitos secundários são relacionados aos produtos naturais. Os produtos naturais isolados a partir de plantas e microorganismos tem desempenhado um papel vital como fonte primária de compostos para a indústria farmacêutica. O isolamento de compostos activos a partir de plantas começou cedo no século XIX quando compostos tais como a quinina(1) um antimalárico que foi isolado a partir da casca da árvore da *Cinchona* pelos cientistas franceses Cavetto e Pelletier (Henry, 1949); reserpina(2) um antihipertensivo e tranquilizador a partir da *Rauwolfia Serpentina* (Marles e Farnsworth, 1995) e no século passado foi isolado a morfina (3) um analgésico a partir da *Papaver Somnifer* e a Vincristina(4) anticancerígeno a partir da *Vinca rosea* (Sarker et al.,2006). Fig. 1.



1. Quinina



2- Reserpina

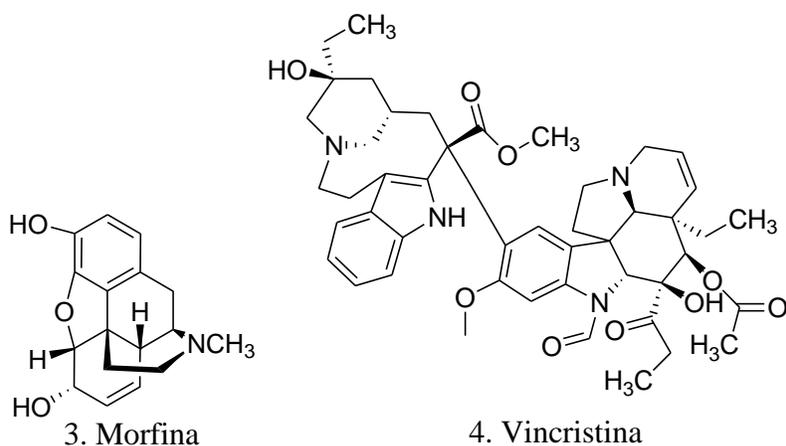
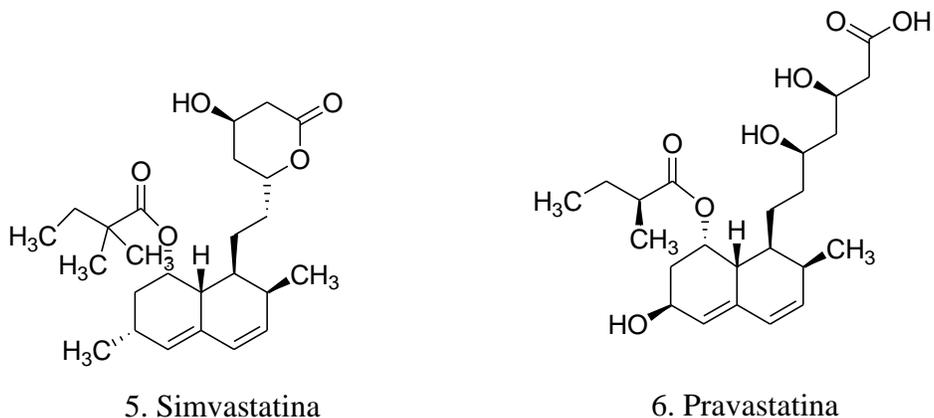
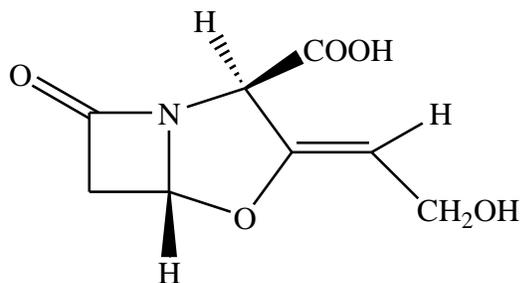


Fig. 1. Produtos naturais isolados a partir de plantas

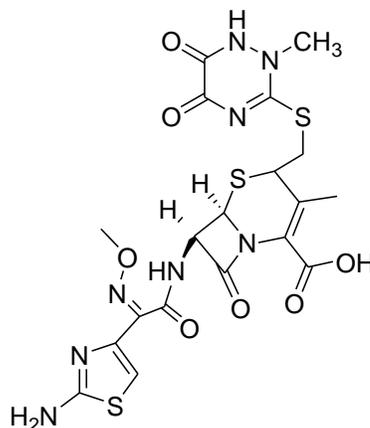
No mundo, estima-se que cerca de oitenta e três (83) bilhões de dólares americanos são gastos anualmente no desenvolvimento de produtos que derivam de plantas e este número continua ainda a crescer. Mais ainda, estima-se que aproximadamente 25% de medicamentos modernos com maior destaque para medicamentos anticancerígenos (60%) são obtidos a partir de produtos naturais (Palhares, Drummond, & Alves, 2015).

Desde o ano 2000 cerca de 60% dos medicamentos (Fig. 2) de origem natural, que foram usados em estudos clínicos para vários tipos de câncros eram de origem natural. Oito dos trinta foram considerados os mais vendidos em 2001, nomeadamente a Simvastatina (5) (um derivado sintético do produto de fermentação de *Aspergillus terreus*); Pravastatina (6) (derivado do metabolito do fungo da *Penicillium citrinum*); o ácido clavulânico (7) (produzido pela *Streptomyces clavuligerus*); bem como a Ceftriaxona (8) (isolada a partir do fungo *Tolypocladium inflatum* (Newmam et al., 2003).





7. Acido clavulanico



8. Ceftriaxona

Fig. 2 Estrutura de novos medicamentos produzidos a partir de produtos naturais

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) (OMS, 2015), entre 60% – 80% da população dos países em vias de desenvolvimento ainda usa plantas medicinais para os cuidados de saúde primários. O desenvolvimento de novos produtos a partir de fontes naturais é também encorajado porque estima-se que das 300.000 espécies de plantas que existem no mundo, apenas 15% foi avaliada para determinar o seu potencial farmacológico (Palhares et al., 2015)(Rao, 2012a).

No país, cerca de 10% de 5500 espécies de plantas recolhidas e registadas são usados na medicina tradicional. Durante o período colonial (1891 – 1975) e mesmo durante o período pós independência (1975 – 1990), não se encorajava o uso de plantas medicinais, pois eram relacionadas com a superstição e crenças, mas desde as últimas décadas do século XX, a medicina tradicional tem ganho mais respeito por parte dos governantes e pelos provedores de cuidados primários, o que resultou na criação, em 1990, da Associação de Médicos Tradicionais (AMETRAMO) (Bruschi, Morganti, Mancini, & Signorini, 2011). Embora muita bibliografia editada faça apenas referência a aspectos etnobotânicos de plantas moçambicanas usadas na medicina tradicional, poucas são as pesquisas relacionadas com a avaliação da actividade farmacológica e fitoquímica.

É de conhecimento científico o potencial antioxidante dos compostos fenólicos, que actuam como redutores de oxigênio singlete nas reações de oxidação lipídica e na quelação de metais, daí apresentarem uma ampla gama de propriedades farmacológicas tais como antihemorrágicas, antidiabéticas, antialérgicas, antiarteriogénicas, anti-inflamatórias, antimicrobianas,

antitrombóticas e também com efeitos cardioprotetores e vasodilatadores (Puupponen-Pimiä et al., 2005).

O presente trabalho visa caracterizar fitoquimicamente e avaliar a actividade antioxidante dos extractos das plantas *Cassytha Filiformis*, *Commiphora Schlechteri*, *Ochna Natalitias* e *Pavetta Kotdzei*, que podem contribuir para redução de problemas de doenças degenerativas tais como cardiovasculares, cancerígenas, diabéticas, reumáticas e problemas de infertilidade entre outros (Rao.,2012). Para além de possuírem elevada actividade antioxidante, as plantas medicinais em estudo, mais do que serem uma alternativa para as populações de baixo poder aquisitivo, representam uma fonte natural rica em compostos químicos de interesse científico confirmando que indubitavelmente, os produtos naturais não perderam o seu lugar e que a prática do uso de plantas medicinais é tida como a principal opção terapêutica.

Devido aos aspectos acima mencionados torna-se relevante pesquisar-se sobre este tema pois, se por um lado os resultados da caracterização fitoquímica e da avaliação antioxidante vão contribuir para a terapêutica á base destas, por outro vão servir para consciencializar as populações sobre o uso racional de recursos locais bem como potenciar as mesmas sobre o conhecimento das propriedades químicas e farmacológicas das mesmas.

1.1. OBJECTIVOS

1.1.1. Geral

- Caracterizar fitoquimicamente e avaliar a actividade antioxidante dos extractos das plantas *Cassytha Filiformis*, *Commiphora Schlechteri*, *Ochna Natalitias* e *Pavetta Kotdzei*.

1.1.2. Específicos

- Obter os extractos a partir das folhas de *Cassytha Filiformis*, *Commiphora Schlechteri*, *Ochna Natalitias* e *Pavetta Kotdzei* pelo método de maceração sequencial por ordem crescente de polaridade dos solventes hexano, diclorometano acetato de etilo e hidrometanólico;
- Realizar a triagem fitoquímica nos extractos brutos e nas fracções das plantas usando reagentes específicos e monitorar com a cromatografia em camada fina (TLC – *Thin Layer Chromatography*);
- Quantificar os fenóis totais nos extractos de plantas usando o método de Folin - Ciocalteu;
- Determinar a actividade antioxidante dos extractos usando o método de cianeto férrico.

1.2. METODOLOGIA

A parte experimental, referente a obtenção dos extractos, foi realizada na secção de toxicologia do Laboratório de Higiene de Águas e Alimentos (LNHAA). O material vegetal previamente pesado numa balança analítica da marca (Mettler Toledo ML 204) foi usado para a obtenção de extractos aplicando o método de extracção por maceração sequencial à temperatura ambiente e em ordem crescente de polaridade durante 72h.

Os extractos obtidos foram tratados e filtrados sob sucção. Estes foram submetidos ao processo de evaporação do solvente, no rotavapor à baixa pressão. Os extractos concentrados foram deixados no nincho até a evaporação total do solvente.

A realização do presente trabalho compreendeu as seguintes etapas:

1.2.1. Revisão Bibliográfica

A revisão bibliográfica consistiu na pesquisa de toda informação relacionada com as plantas em estudo e outras espécies. Deste modo, foram recolhidas todas as informações sobre os métodos de extracção e de análise usados em fontes tais como: artigos científicos, livros sobre produtos naturais e publicações na internet.

1.2.2. Parte experimental

A parte experimental foi realizada seguindo-se os passos abaixo descritos:

- Colheita e pré-tratamento das plantas;
- Obtenção dos extractos pelo método de maceração sequencial;
- Realização da fitoquímica usando reagentes específicos e identificação por TLC(Thin Layer Chromatography);
- Quantificação dos fenóis totais e
- Realização da actividade antioxidante.

1.2.3. Tratamento, análise e discussão dos resultados

A discussão dos resultados foi feita comparando os resultados obtidos com os dados descritos na literatura relacionada ao tema do trabalho.

1.2.4. Elaboração do relatório final

O relatório final foi compilado com base nos resultados laboratoriais sua discussão bem como da revisão bibliográfica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. DESCRIÇÃO, ASPECTOS ETNOFARMACOLÓGICOS E FITOQUÍMICOS DAS PLANTAS EM ESTUDO

O elevado potencial de plantas como fonte para o desenvolvimento de novos medicamentos ainda é largamente não explorado. Dentre as várias espécies de plantas, estima-se que 250.000 a 500.000 destas, apenas uma pequena percentagem foi investigada fitoquimicamente e as mesmas já foram submetidas a estudos biológicos e farmacológicos também em número reduzido (Rao, 2012b). Hoje em dia, a prática da medicina tradicional é parte integrante da medicina complementar ou alternativa. Apesar de sua eficiência e mecanismo de acção, ainda na maioria dos casos não terem sido testados cientificamente, estas simples plantas medicinais frequentemente actuam como intermediários de respostas benéficas devido aos seus constituintes químicos activos (Olutayo et al., 2013). O presente trabalho visa investigar os extractos das plantas *Cassytha Filiformis*, *Commiphora Schlechteri*, *Ochna Natalitias* e *Pavetta Kotdzei*, que são normalmente usadas como medicinais na zona sul de Moçambique. A tabela a baixo resume a taxonomia das plantas em estudo.

Tabela I. Taxonomia das plantas em estudo

Taxonomia	Descrição das espécies em estudo			
	Planta 1	Planta 2	Planta 3	Planta 4
	<i>Cassytha Filiformis</i>	<i>Commiphora Schlechteri</i>	<i>Ochna Natalitias</i>	<i>Pavetta Kotdzei</i>
Reino	Plantae	Plantae	Plantae	Plantae
Divisão	Magnoliophyta	Angiospermae	Magnoliophyta	Angiospermae
Classe	Magnoliopsida	Dicotyledones	Magnoliopsida	-----
Ordem	Laurales	Geraniales	Malpighiales	Gentianales
Família	Lauraceae	Burseraceae	Ochnaceae	Rubiaceae
Gênero	Cassytha	<i>Commiphora</i>	Ochna	Pavetta
Espécie	<i>Cassytha Filiformis</i>	<i>stocksiana</i>	<i>Ochna Natalitia</i>	<i>Pavetta Kotdzei</i>
Nomes Vernáculos (Ronga)	Tambambe, lientsentse	nhita, chimbtcanhi	Machanganiço, ximurrirua	umba
Imagens				

2.1.1. *Cassytha Filiformis*

A *Cassytha Filiformis* (*C. Filiformis*) é uma erva parasita daninha de entrelaçamento na profusão, difundida na pastagem e no arvoredo, caule verde ou amarelado, com otários curtos, folhas reduzidas às escalas minúsculas. Inflorescência minúscula ± 5 mm de diâmetro, fruta vermelha rosada (Luís & Moraes, 2005). É um género da família (Lauraceae) com cerca de 20 espécies, distribuída em África, América, Ásia e a maioria ocorre na Austrália, em pequena escala na África do sul (Nelson, 2008) e a planta ocorre também em Moçambique e Madagáscar.

A *C. Filiformis* é de um modo geral em África é usada para o tratamento de cancro, tripanossomíase africana e outras doenças; na medicina tradicional das Comores é usada para o tratamento de muitas doenças tais como diarreia, malária, doenças ginecológicas e diabetes; na Polinésia a *C. Filiformis* é usada para o tratamento do cancro, parasitas intestinais como vasorelaxante, agente antitripanosomal, antagonista adreno-receptor e como diurético (Edewor, Owa, Ologan, & Akinfemi, 2016); os Togolenses, usam-na para a cura de condições específicas ginecológicas que incluem sangramento vaginal, infertilidade, problemas menstruais, desordens dos seios incluindo falsa gravidez; em Taiwan, a *C. Filiformis* é usada para o tratamento dos rins, gonoreia e como diurético. Na África do sul por exemplo, é usada para o tratamento de problemas de nascimentos. As parteiras recomendam tomar o sumo preparado a partir das folhas trituradas durante quatro semanas antes do parto com a finalidade de facilitar o trabalho do parto, lubrificar o canal de tal forma a flexibilizar o nascimento; No Brasil, Japão e Benin é localmente usada para o tratamento de infecções urinárias, Gonoreia, Malária, disenteria e febres (Steenkamp, 2003) (Medica, Abdillahi, Society, & Africa, 2013) (Hoet, Block, Wautier, & Stévigny, 2004). Em Moçambique nas províncias de Gaza e Maputo as comunidades usam as folhas fervidas de *C. Filiformis* misturadas com as de *Commiphora Schlechteri* para o tratamento da infertilidade.

O género *Cassytha* (Lauraceae) é uma fonte rica em fitoconstituíntes tais como os alcalóides de aporfina, totalizando cerca de treze cujo teor ronda à volta de 0,11 – 0,43%. Todavia, estudos realizados recentemente em Taiwan, Japão, China e Benin, revelaram que extractos metanólicos de *C. Filiformis* apresentaram oito grupos de alcalóides de aporfina nomeadamente: cataformina, actinodapinina, n-metilactinodapinina, predicentrina, ocoteina, neolitisina, dicentrina e cassitina (cassifilina) respectivamente. Foi ainda identificado um grupo de compostos de flavonóides com semelhante composição tais como: quercetina 3-O-robinobiosida, quercetina 3-O-rutinosida,

quercetina 3-O-galactosida, kamferol 3-O-robinobiosida, isoraminetina 3-O-rutinosida e isoraminetina 3-O-robinobiosida. Enquanto que no Brasil, Austrália e Nova Guiné demonstraram variação significativa em termos de composição de alcalóides, flavonóides, triterpenoides e esteroides. Estes fitoconstituíntes tornam a planta biologicamente activa (Mythili, Gajalakshmi, Sathiavelu, & Sridharan, 2011)(Ho et al., 2012)(Investigation, Five, In, & Folkloric, 2013). Estudos recentes demonstraram que a *C. Filiformes* possui ambas propriedades farmacológica e biológica e foram isolados alcalóides e flavonóides desta planta no Japão, Brasil e Taiwan, com actividade antimicrobiana, antibacteriana e substancial actividade anticancerígena e antimutagénica (Medica et al., 2013) (Nelson, 2008).

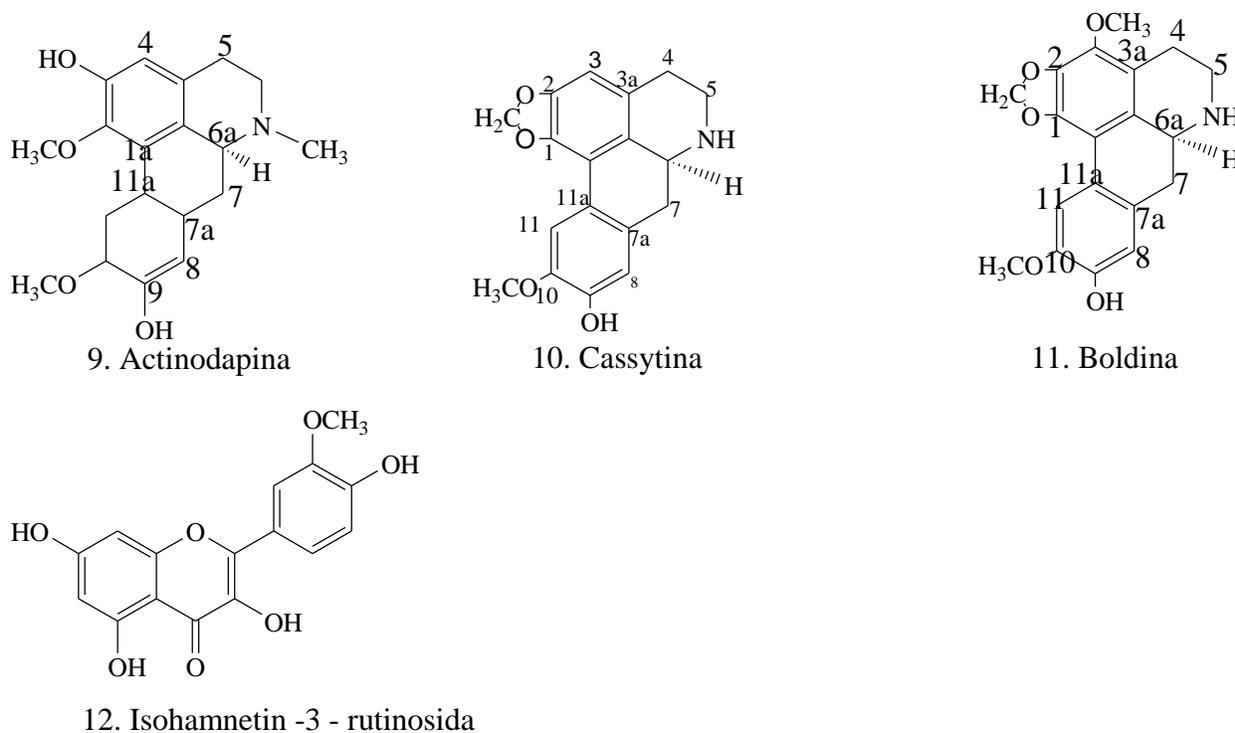


Fig. 3 Compostos isolados da *C. Filiformis*

2.1.2. *Commiphora Schlechterii*

São poucos os relatos na literatura sobre *Commiphora Schlechterii* (*C. Schlechterii*) ou quase que não existem. Os estudos envolvendo espécies do género *Commiphora* são escassos, entretanto os estudos fitoquímicos existentes descrevem outras espécies deste género e mostram-se bastante promissores quanto ao isolamento de compostos biologicamente activos.

A *Commiphora Schlechteri* (*C. Schlechterii*) é uma árvore pequena até 6 m, de altura; casca lisa, cinzento-verde, folhas 3 foliolato; com pecíolos até 5m, os folhetos com até 7 x 3.2cm, flores que aparecem com as folhas nos cumes paniculate axilares até 11 cm, ambas as faces profundamente convexas (Ribeiro, Romeiras, Tavares, & Faria, 2010). O género *Commiphora* da família (Burseraceae) compreende mais de 200 espécies todas nativas de África, Arábia, Madagáscar, Bangladesh Paquistão e Índia (Hanus, Řezanka, & Dembitsky, 2005). A planta ocorre também em Moçambique.

Segundo (Hanus et al., 2005), o género da família Burseraceae, foi reportado na China nos anos 600 (A.C) durante a dinastia Tang, usada tradicionalmente durante longos anos pelas comunidades para a cura de várias enfermidades. Hoje, os chineses usam-na para o tratamento de feridas, febres e dores menstruais devidas à coagulação sanguínea.

Espécies do *Commiphora* são ricas em óleos que podem ser usados como agentes aromatizantes; a Somália e Egipto são tidos como grandes produtores das duas resinas. O norte da Somália é a maior fonte de incenso e a República Popular da China é o maior mercado destas duas resinas no mundo, com maior enfoque para o uso na medicina tradicional (Iluz, Hoffman, Gilboa-garber, Amar, & Israel, 2010). Variedades de produtos à base de plantas deste género podem ser encontradas com maior abundância no norte da Arábia, Sudão, Etiópia, Eritreia, Somália e Kenya (Sarup, Bala, & Kamboj, 2015). Em Dhofar por exemplo a parte interna das cascas de *Commiphora* é colocada nas feridas como agente antiséptico, enquanto a tintura extraída das cascas secas é usada para o tratamento de doenças da pele tal como inflamações e equizemas (Iluz et al., 2010). É também aplicado como antirábica, alivia as dores durante o trabalho de parto e é aplicado nos banhos dos recém-nascidos. Outros autores referem que extractos desta planta são usadas como antihipertensivos. Estudos preliminares desta planta revelaram possuir actividade antibacteriana a qual valida o uso local dela para o tratamento de feridas (Kumar & Mahato, 2013). Em Moçambique, esta planta é usada pelos Praticantes da Medicina Tradicional (PMTs) nas províncias de Gaza e Maputo para a lavagem do útero, concepção e para assegurar a gravidez.

Na fitoquímica da família (Burseraceae) foram isolados diterpenos, triterpenos, esteróides, cadeia longa de tetróis alifáticos, ésteres alifáticos, carboidratos, variedade de iões inorgânicos, pequenas quantidades de sesamina e outros constituintes não identificados (Sarup et al., 2015).

Espécies deste género, primeiro foram extraídos os monoterpenos limoneno (13), aldeído cinâmico (14) e m-cresol (14) mais tarde, ainda na mesma espécie foi isolado o sesquiterpeno commiferina (16). Em Quênia por exemplo, em algumas espécies deste género foram isolados o α -terpineol (17) e β -bisaboleno(18)(Hanusš et al., 2005)(Iluz et al., 2010).

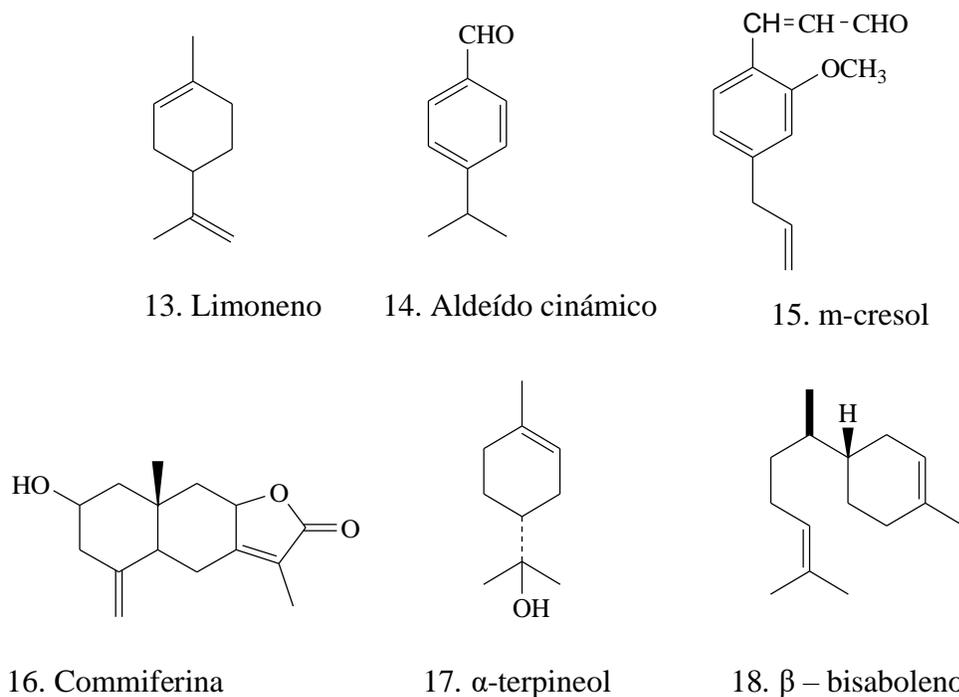


Fig. 4 Algumas estruturas de compostos isolados do género *Commiphora*

2.1.3. *Ochna Natalitia*

São poucos os relatos na literatura sobre *Ochna Natalitia* (*O. Natalitia*) Os estudos envolvendo espécies do género *Ochna* são escassos, entretanto os estudos fitoquímicos existentes mostram-se bastante promissores quanto ao isolamento de flavonóides.

A *Ochna Natalitia* (*O. Natalitia*) é um arbusto ou árvore pequena que pode crescer até 5m de altura, por vezes ramificado; espécies de família *Ochnaceae*, florescem desde zonas semi-abertas a abertas e em todas as florestas verdes, eles são caracterizados por folhas com pétalas verdes as quais as vezes se tornam rijas, especialmente o género *Lanceolata*. A família *Ochnaceae* compreende 86 gêneros e cerca de 400 espécies com ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo e inúmeras espécies do género *Ochna* são nativas das zonas tropicais

de África tropical, América Ásia, Austrália, Madagáscar e Ilhas Mascarenhas. Um número reduzido (11 espécies) ocorrem na Índia. Na África subsahariana, as espécies de *Ochna* são encontradas na África do Sul (nas províncias de Limpopo, Mpumalanga, KwaZulu-Natal e oeste da cidade do Cabo), Swazilândia, Zimbabwewe e Moçambique nas províncias de Gaza e Maputo (Makhafola, Eloff, Programme, & Sciences, 2012).

Os dois géneros de *Ochna Brackenridgea* são maioritariamente encontrados na África do Sul, Moçambique e Zimbabwewe, com um total de 32 espécies nativas. Para o género *Brackenridgea*, sabe-se que cerca de 12 espécies são nativas da África do sul incluindo Zimbabwewe e Moçambique e 20 espécies do género *Ochna* ocorrem nestas áreas (Ndoile, 2012).

Em vários sistemas de medicina tradicional, membros da família *ochnaceae* são popularmente usados como medicamentos para a cura de diferentes doenças. As espécies do género *Lophira* também conhecida como “*namijin Kandanya*” língua local da Nigéria, são aplicadas em mulheres grávidas durante o trabalho de parto (Dafreville & Humeau, 2013). Inúmeras espécies do género *Ochna* são utilizadas na medicina popular, por exemplo, a *Ochna afzelii* é usada no tratamento de icterícia, cólicas menstruais, dores nas costas, disenteria e dor de dente; o caule de *Ochna integerrima* é usado como tónico digestivo; as folhas de *Ochna squarrosa* são usadas no tratamento de constipações, úlceras e câncer; as raízes são usadas no tratamento de cólicas menstruais e asma, enquanto que na Indonésia, a infusão das folhas e raízes possui acção antidisentérica; na Tailândia, no sistema de medicina tradicional a *Ochna integerrima* é uma planta comum e extremamente distribuída sendo a casca do caule usada como tónico digestivo (Federal & Catarina, 2008); no Vietname durante o festival “Tet”, que acontece o fim do ano, as flores dessa planta são usadas para efeito e decorativos. Na cultura Vietnamita o festival “Tet” dá sorte e prosperidade às famílias. No sistema de medicina tradicional Indiana, espécies de *Ochna* também são designadas de “Sunan” ou “Yerra juvvi” e são consideradas como os mais importantes medicamentos para o tratamento de diferentes doenças tais como: constipação, úlceras, feridas, câncros, epilepsia, dores menstruais, asma, lumbago e como antídoto contra picada de cobras enquanto que as cascas das raízes da planta são usadas como tónico digestivo. As folhas fervidas são consideradas o elemento chave para o tratamento de lumbago e úlceras; a decocção das raízes destas plantas na medicina tradicional Indiana são usadas no tratamento de complicações menstruais e asma (Ndoile, 2012); a tribo zulo, na África do Sul, por exemplo, emprega espécies de *Ochna* tradicionalmente para o

tratamento de dismenoreia, problemas de fertilidade, diarreia, hemorróide e dores de estômago; a infusão de folhas e raízes de *Ochna Integerrima* é usada localmente como antidisentérico e antipirético (Jan, 2009) bem como a decocção das raízes de *Serrulata* o qual é conhecido como “fynblaarrooihout” (Africance), Umbomvane (ZULU), Ilitye (Xhosa), para o tratamento de problemas de ossos e protitesgangrenous (Hutchingsetal.,1996; Hutchings and Van Staden, 1994).

No sistema de medicina tradicional Swazi, as cascas do caule de *Ochna Arborea* Burch também conhecida como Sifubasenkhalá em XiSwati, é usada para curar ossos fracturados e aliviar a dor especialmente dores de cabeça. são também usadas para a das mesmas doenças *O. Gamostigmata*, *O. Hostii*, *O. Natalitia* e *O. Serrulata*. A *Ochna Arborea* é usada para produzir bengalas usadas como suporte pelos mais velhos e pensa-se que a planta protege contra maus espíritos (Ndoile, 2012).

No Zimbabwe, as folhas maduras de *O. Pulchra* também chamadas de “umnyelenyele” ou “muparamhosva” nomes vernáculos assume-se que são boas para alimentar o gado mas as folhas quando novas acredita-se que podem ser venenosas para o gado. No sistema de medicina tradicional Zimbabweana, a planta é extensamente usada para tratar parasitas no sangue e várias doenças da pele. A população indígena da África Central usa as cascas de caule de *O. Calodendron* para o tratamento de mesmas doenças (Ndoile, 2012). *O. Lanceolata*, é usado como abortificante e também para o tratamento de complicações gástricas, alivia as dores desordens menstruais, tratamento de infecções do fígado e disenteria. A casca do caule da árvore que é extensamente distribuída na África Central e na Índia peninsular é também usada no tratamento do mesmo tipo de doenças. A Sociedade Kilimanjaro na Tanzania, usa a madeira de *O. holstii*, localmente conhecida como “Kitakwa” para produzir objectos de adorno e como lenha. A *O. afzelii* é uma árvore comum da África Ocidental onde tem vários nomes em diferentes países da África Ocidental. Em Ghana por exemplo, a planta é localmente conhecida como “adangme” ou Okoliawatso, no Senegal e Togo várias partes da planta (folhas, raízes, caule e madeira) são usadas pelos nativos para o tratamento de diferentes problemas de saúde incluindo infertilidade feminina, complicações menstruais, lumbago, icterícia e disenteria (Ndoile, 2012).

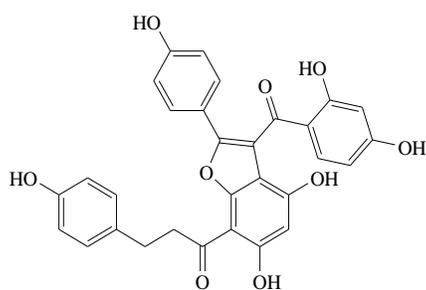
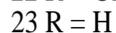
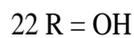
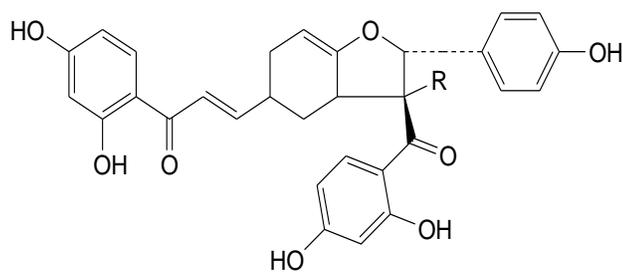
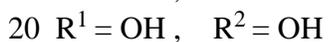
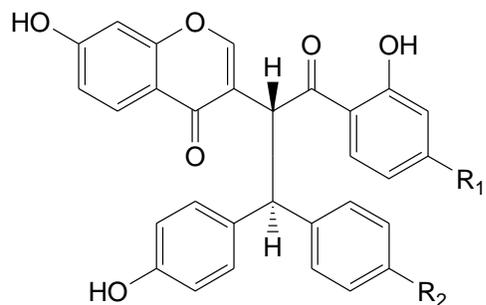
A família *Ochnaceae* é caracterizada pela presença de flavonóides e biflavonóides bem como terpenóides como principais metabolitos secundários. Estudos de outras espécies de *Ochna*, revelaram que dentro deste género a fitoquímica é constituída maioritariamente por glicósidos,

saponinas, esteróides flavonas e ácidos gordos (Makhafola et al., 2012). Outros estudos fitoquímicos do género *Ochna*, também revelaram que este é rico em biflavonóides fenólicos (Khalivulla et al., 2008; Likhitwitayawuidet al., 2001; Pegnyemb et al., 2001, 2003b), flavonóides, uma classe abundante de constituintes nas plantas conhecida por exhibir inúmeras actividades farmacológicas tais como anticancerígena, antibacteriana, antiviral, antiinflamatória, actividades imunomodulatórias, antimalárica e anti-HIV. Em outros estudos fitoquímicos de algumas espécies de *Ochna* foram identificados nas folhas de *Ochna Integerrima* flavonóides monoméricos e diméricos; bem como ao isolamento de uma antrona e dois vismiones a partir da casca da raiz de *Ochna Pulchra* também foram isolados a partir da casca do caule isobiflavonóides, glicósidos e saponinas (Jan, 2009). O rearranjo de biflavonóides calodenone (19), lopirone A (20) e afzelone D (21), levou ao isolamento pela primeira vez em extractos metanólicos da casca do caule de *O. Calodendron*, *L. Lanceolata* e *O. Afzeli* respectivamente. Os compostos representam uma variedade não usual de esqueletos de biflavonóides Lophirone A (20) que tem sido reportado como sendo inibidor do vírus Epstein – Barr e demonstrou propriedades inibitórias contra tumores. Até a data, houveram muitos dados divulgados sobre o isolamento de trinta e seis compostos a partir de espécies de *Ochna*. Ainda não há registos sobre actividade biológica de (20) e (21). Colchonas diméricas foram também isoladas do género *Ochna* bem como ao isolamento e caracterização de Lophirone K (22), e Lophirone C (23) a partir de *Lophira Lanceolata*. A *Calodeinin* A (24) e *Calodenin* B (25) foram isoladas de *O. Calodendro*; outras colchonas diméricas foram isoladas de *O. Afzeli* são *Isophirone* C (26) e *Dihidrolophirone* C (27). A casca do caule de *O. Afzeli*, planta normalmente encontrada na África tropical, extraíram-se três biflavonóides, nomeadamente a flavonona (chalcona híbrida), afzelona A (28) e a biflavona B (29) (Pegnyemb et al., 2001, 2003b). As actividades biológicas destes compostos ainda não foram estudadas (Ndoile, 2012).

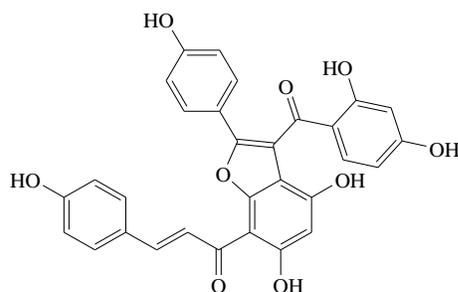
Extractos de *Ochna Integerrima* demonstraram boa actividade antiviral e antiparasitária. O estudo envolveu o isolamento de biflavonóides com actividade antimalárica; também da mesma espécie foi isolado o glicósido flavonóide com actividade anti HIV- 1 (Jan, 2009), também foram isolados pela primeira vez de *O. Pretoriensis* *Ochnaflavona* (28) *Ochnaflavone 7-O- methyl ether*(28) e β *cisterol* (29); extractos de acetona com actividade antibacteriana (Khalivulla et al., 2008; Likhitwitayawuidet al., 2001; Pegnyemb et al., 2001, 2003b).

Várias actividades biológicas foram estudadas em diferentes espécies de *Ochna*. A actividade analgésica e antiinflamatória foi observada no extrato metanólico das raízes de *Ochna Squarrosa*, também foi observada a atividade anti-HIV na fração acetato de etila do extrato etanólico das folhas de *Ochna Integerrima*;

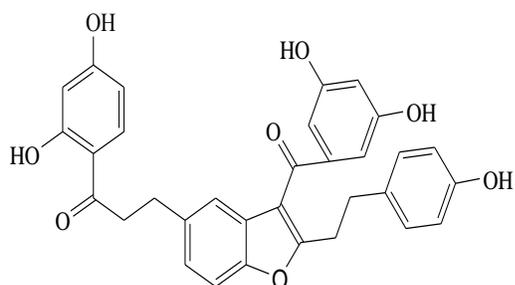
Os extractos etanólicos do caule de *O. Macrocalyx* e *O. Integerrima* demonstraram excelentes actividades antimalária; citotóxica e antibacteriana. (Federal & Catarina, 2008).



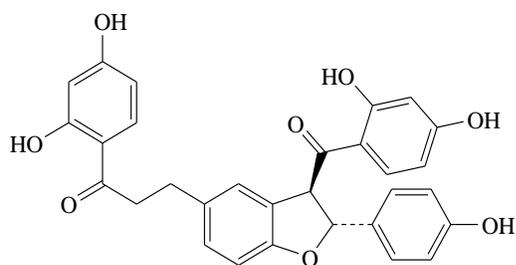
24



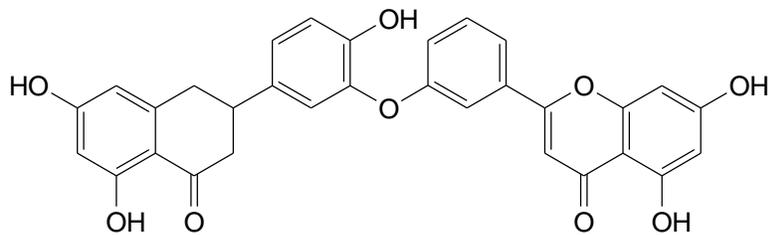
25



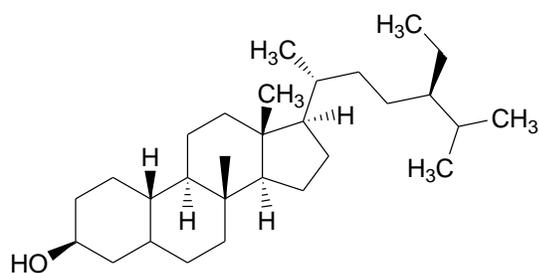
26.



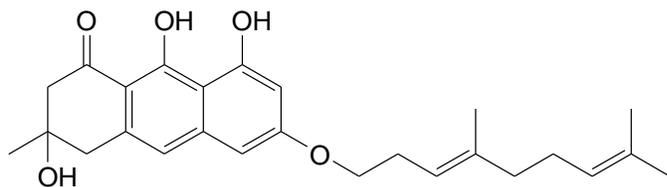
27.



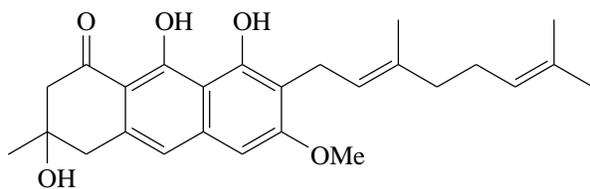
28. Dihidroochnaflanona 7 - O-metileter



29. β -Sitosterol



30. D vismitone



31. L vismitone

Fig. 5 Algumas estruturas de compostos isolados do género *Ochna*

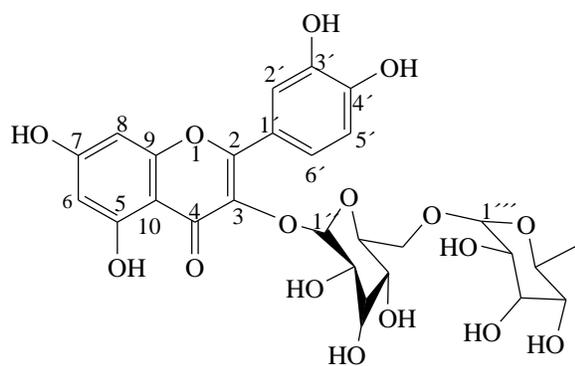
2.1.4. *Pavetta Kotdzei*

São poucos os relatos na literatura sobre *Pavetta kotdzei* (*P. kotdzei*) Os estudos envolvendo espécies do gênero *Pavetta* são escassos, entretanto estudos fitoquímicos existentes mostram-se bastante promissores quanto ao isolamento de flavonóides. Até agora ainda não foi reportada nenhuma actividade antioxidante.

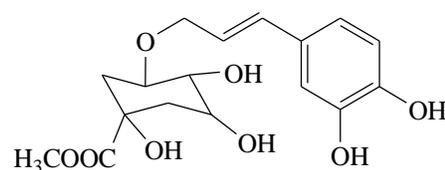
Pavetta kotdzei é um arbusto, com cerca de 2 m de altura, frequente nos sub-bosque das florestas verdes, as raízes às vezes crescem ao longo da terra, folhas opostas, elípticas ao oblanceolate (50-90 x 11-20 mm), profundo lustroso - esverdeado acima, margens que curvam-se para baixo; base e vértice que afilam-se aos pontos; flores unidas num ponto, frutos unidos em conjunto, redondos verdes e quando maduro pretos, com um diâmetro de 9 mm (Ibekwe et al., 2012), *P. kotdzei* pertence á família Rubiaceae é extensamente distribuida desde as ilhas Andaman, Índia e norte -este de Imalaya a sul da China em direcção ao sul da Malásia até ao norte da Austrália; o género pavetta possui cerca de 200 espécies dentre elas a *P. Indica* que é conhecida por ser usada na etnomedicina para o tratamento de infecções microbianas (Bello, Ndukwe, Audu, & Habila, 2011). As folhas da *P. Indica* são usadas para o tratamento de doenças do fígado, hemorróides, doenças urinárias e febres. É uma planta medicinalmente importante cujos extractos das folhas revelaram actividades antiinflamatórias bem como analgésicas. Os extractos das raízes também possuem actividades diurética e purgativa. Outras espécies de *Pavetta* também demonstraram diferentes actividades biológicas. As *P. Gardeniifolia*, *P. Pyroides* e *P. Crassipes* foi reportado possuirem actividades antimalárica (Gupta, Kaur, Simlai, & Roy, 2013). Na Nigéria, as folhas *P. Crassipes* são usadas para o tratamento de infecções respiratórias e desordens anormais; as folhas desta planta, são também usadas na Tanzania para o tratamento da gonorreia. No Malawi, as folhas secas de *P. Crassipes* são usadas para aumentar o líbido nos homens, as raízes são usadas para tratar picadas de cobra enquanto que a casca do caule como purgativo. Na África Central a infusão das folhas é tomada como remédio para constipação (Alakali, Ismaila, Alaka, Faasema, & Yaji, 2016). Estudos farmacológicos de outras espécies *P. Crassipes* revelaram actividades antiplasmódica, hipotensiva, actividade antimicrobiana contra *Klebsiella pneumoniae* bem como efeitos inibitórios no sistema gastrointestinal, músculos uterinos e *in vitro* actividades antimicrobiana, antiprotozoária e antitumorais (Bello et al., 2011). De acordo com (Khalivulla et al., 2008; Likhitwitayawuidet al., 2001; Pegnyemb et al., 2001, 2003b) isolou-se o flavanóide

(quercetin-3-O-rutinoside) a partir das folhas de *P. Crassipes* que eram responsáveis pela actividade antimicrobiana; extractos metanólicos demonstraram presença de flavonóides, alcalóides, taninos, glicósidos cardiotónicos e antraquinonas e as folhas deram positivo para flavonóides, taninos e antraquinonas, proantocianidinas diméricas e triméricas, acetatos de cinnamtaminnin B1, pavetannin B1, pavetannin B3, pavetannin B5 bem como a Quercetin – 3 - O – rutinoside que foram isolados desta planta. Na literatura publicada, não há análises fitoquímicas detalhadas, desta planta (Thesis, 2012).

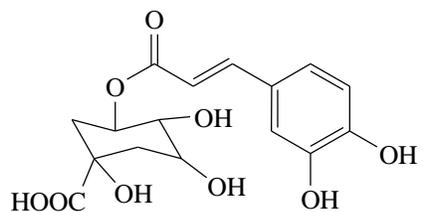
Das invetstigações foram levadas a cabo e foi também reportado que os extractos etanólicos e de acetona de *P. Owariensis* possuem propriedades schistosomicidal contudo, algumas tribos nativas consomem as folhas misturadas com outros alimentos ou fervidas com água um pouco fermentada na qual foram colocados cereais e ou são consumidas com papas (Likhitwitayawuidet al., 2001).



32. Quercetin - 3 - O - rutinosida



34. metil clorogenato



33. ácido cloragénico

Fig. 6 Compostos isolados da *Pavetta* Kotdzei

A investigação fitoquímica baseada na informação etnofarmacológica é considerada como a abordagem efectiva na descoberta de novos agentes a partir de plantas superiores. Os compostos fenólicos são considerados metabolitos secundários e são sintetizados por plantas durante o

desenvolvimento normal e são maioritariamente sintetizados a partir da fenilalanina via acção da fenilalanina liase (Paul, 2002).

2.2. COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são normalmente encontrados em ambas plantas tanto comestíveis como não e possuem múltiplos efeitos biológicos incluindo a actividade antioxidante. Extratos brutos de plantas, frutas, vegetais, cereais e outros materiais das plantas ricos em compostos fenólicos estão a ser intensamente usados na indústria alimentar porque retardam a degradação oxidativa dos lípidos e aumentam a qualidade e o valor nutricional dos alimentos. Estes, actuam como poderosos antioxidantes naturais e são responsáveis pela coloração das plantas e frutas (Rao, 2012b) (Puupponen-Pimiä et al., 2005).

Os compostos fenólicos são considerados metabolitos secundários e são sintetizados por plantas durante o desenvolvimento normal, e em resposta as infecções, ferimentos, radiações UV e insectos. Estes compostos fitoquímicos derivam da fenilalanina e tirosina e ocorrem em plantas e são muito diversificadas e caracterizados pela presença de pelo menos um anel benzénico, que está ligado directamente a pelo menos um grupo hidróxilo livre ou envolvido numa outra função: éter, éster, heterósido (Ciências & Mendes, 2011).

As plantas com compostos fenólicos podem ser classificadas nas seguintes categorias: compostos fenólicos simples, fenólicos ácidos (derivados de ácidos cinâmico e benzóico), cumarinas, flavonóides, flavanóides polifenólicos que incluem flavononas, flavonas, catequinas e bem como flavanóides não polifenólicos, taninos, ligninas e lignanos, xantonas, o ácido caféico considerado o composto fenólico mais distribuído na flora das plantas, seguida pelo ácido cloragénico conhecido por causar dermatites alérgicas em humanos; os principais destes são os flavonóides os quais possuem actividade antioxidante potente (Rao, 2012b).

Dos cerca de 10.000 compostos fenólicos encontrados nas plantas, alguns são solúveis em água, outros em solventes orgânicos e outro grande grupo em polímeros. A síntese de compostos fenólicos que derivam das plantas pode proceder em alguns caminhos diferentes e, portanto, eles

compreendem diversos grupos de metabolitos. A sua diversidade química é cruzada com um rol variado de plantas (Ciências & Mendes, 2011).

Os compostos fenólicos simples incluem os fenilpropanóides, ácido trans-cinâmico, ácido p-cumárico e seus derivados, lactonas polipropanóides designadas de cumarinas e ácido benzóico e seus derivados. As moléculas mais complexas são elaboradas pela adicção a estes esqueletos de carbono básico. Como por exemplo, a adicção de ácido quínico ao caféico produz o ácido cloragénico o qual acumula-se nas folhas de alface e contribui para as células se tornarem acastanhadas (Alta et al., 2017).

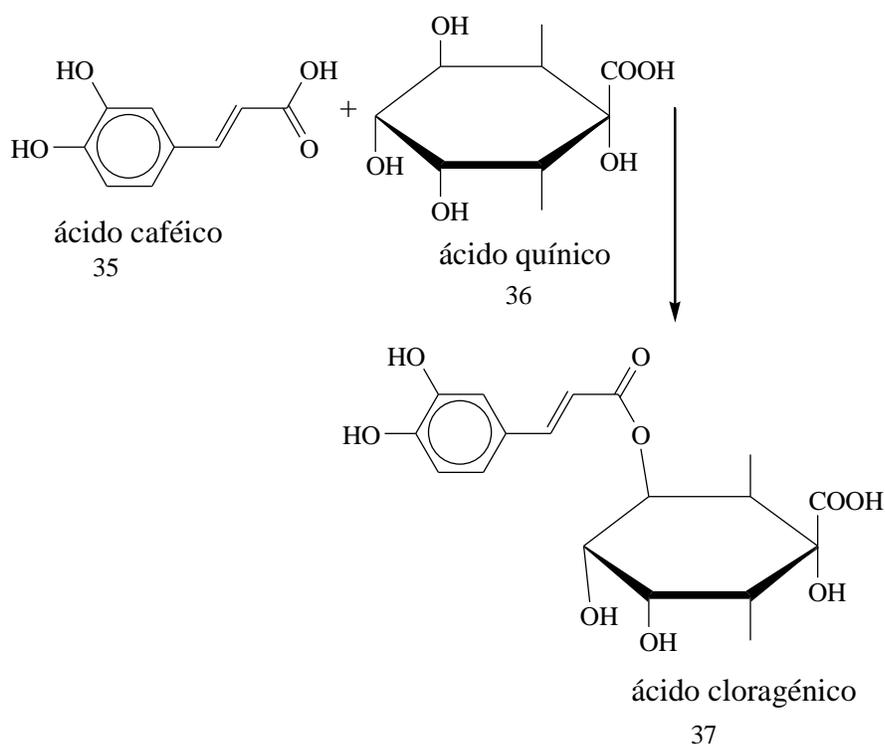


Fig. 7 Reacção de formação do ácido cloragénico

Os fenóis simples são bastante raros nas plantas, com excepção dos derivados da hidroquinona que existem em diversas famílias, geralmente sob a forma de glucósido de um difenol ou do seu monometiléter. os ácidos fenólicos derivados do ácido benzóico e do ácido cinâmico, em especial os compostos hidroxilados, alguns deles ligados a oses são relativamente abundantes no reino vegetal (Ciências & Mendes, 2011).

Os compostos fenólicos são biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides e são frequentemente conjugados a açúcares, outros fenólicos e poliamidas. Dentre os fenólicos, merecem destaque os flavonóides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis como os mais comuns antioxidantes de fonte natural e é devido à elevada capacidade antioxidante do grupo, que os compostos fenólicos têm sido citados como protectores no combate ao estresse oxidativo associado a diversas doenças crônicas como: aterosclerose, hipertensão, doenças renais, cardiovasculares e obesidade desencadeadas por um aumento excessivo de espécies reativas (Alta et al., 2017) .

Em consequência das evidências sobre as propriedades dos compostos bioactivos, acelerou-se a busca de princípios antioxidantes, levando ao aumento, nas últimas duas décadas, por pesquisas de identificação dos recursos naturais e isolamento de moléculas antioxidantes activas (Olutayo et al., 2013).

2.2.1. Flavonóides

Os flavonóides são compostos largamente distribuídos no reino vegetal e têm inúmeras funções na natureza, formando um grupo vasto de metabolitos secundários com actividades biológicas muito diversas (Campos, 2005). Até ao ano de 2008, foram identificadas mais de 8000 variedades de flavonóides. A estas substâncias se deve a maior parte das cores vermelha, azul e violeta das plantas, para além da coloração branca e amarela (Ciências & Mendes, 2011).

Os flavonóides são compostos de baixo peso molecular que estão presentes em toda a parte aérea das plantas e podem ocorrer na forma de genina (aglicona) glicosídica ou como derivados metilados. Os flavonóides na forma de genina consistem num anel benzénico, normalmente denominado anel A, condensado com um anel de 6 membros, anel C, que, por sua vez, tem ligado um grupo fenilo ou fenilo substituído B. O anel de seis membros C condensado com o anel benzénico ou é uma γ -pirona – flavonóis e flavonas – ou o seu derivado (Eliana et al., 2013) (Ciências & Mendes, 2011). A posição dos substituintes benzénicos divide a classe destas moléculas em:

- Flavóides, em que a substituição é na posição 2;
- Isoflavonóides, em que a substituição é na posição 3;
- Neoflavonóides, em que a substituição é na posição 4.

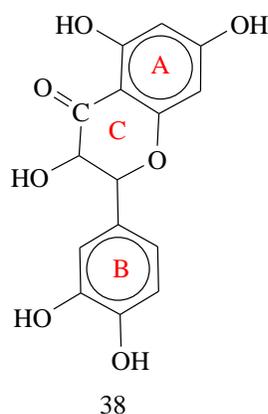


Fig.8 Estrutura básica dos flavanóides

Cerca de 80% dos flavonóides descritos em extractos vegetais incluem as flavonas (apigenina e luteolina), os flavonóis (o campferol e a quercetina) e as flavanonas (naringenina), encontrando-se frequentemente sob uma forma *O*-glicosilada. De entre estes compostos, os flavonóis são aqueles que possuem uma distribuição mais ampla, sendo a quercetina (3,3',4',5,7-penta-hidroxi-flavona) o composto fenólico que ocorre com maior frequência na natureza. As antocianinas, outra forma estrutural de flavonóides, podem ocorrer em outros órgãos das plantas, tais como as raízes e folhas (Eliana et al., 2013) os flavonóides apresentam duas bandas típicas de absorção no UV, a banda II, entre os 240 e os 285 nm (devida à absorção do anel A) e a banda I, entre 300 e 550 nm (devida ao anel B). A localização das bandas no espectro depende da estrutura base do flavonóide e do número e posição dos substituintes (Campos, 2005).

Os flavonóides são uma classe importante de compostos fenólicos e possuem potente actividade antioxidante. A propriedade antioxidante dos flavonóides é o primeiro mecanismo de acção estudado no que diz respeito ao seu efeito protector contra doenças cardiovasculares. Os flavonóides têm demonstrado ser melhores sequestradores de radicais livres de muitas moléculas oxidativas, incluindo o oxigênio e vários radicais livres implicados em várias doenças. O papel fisiológico destes compostos está ligado à prevenção de danos de componentes celulares que acredita-se serem consequência de reacções químicas que envolvem radicais livres (Alta et al., 2017).

Há relatos de que alguns flavonóides possuem uma variedade de actividades biológicas, incluindo anti-alérgica, anti-inflamatória, antiviral, antiproliferativa e anticancerígena. Os flavonóides ocorrem naturalmente nas plantas e pensa-se que possuem efeitos positivos na saúde

humana. Estudos de derivados flavonóidicos têm demonstrado um amplo espectro de actividades antibacteriana, anti-viral, anti-inflamatória, anticâncerígena e anti-alérgica (Di Carlo et al., 1999; Montoro et al., 2005). Os flavonóides com actividade anti-biológica, são componentes importantes para a dieta humana apesar de serem geralmente considerados não nutrientes. As fontes de flavonóides são alimentos, bebidas, diferentes medicamentos a base de ervas e alguns fitomedicamentos relacionados (Rao, 2012b).

Segundo (Montoro et al., 2005) as isoflavonas desempenham uma importante acção hormonal (fitoestrógenos) em animais ou *in vitro*, o que leva a acreditar em potentes benefícios para a saúde humana associados à ingestão da dieta rica destes compostos. Eles contribuem para as propriedades antioxidantes dos vegetais verdes, frutas, azeite e óleos de soja, vinho tinto, chocolate e chás.

2.2.1.1. Biossíntese

A biossíntese ocorre através da combinação do anel B e os três carbonos que compõem o anel C originam-se do ácido aminado fenilalanina, que é sintetizado a partir do ácido chiquímico. Este age como precursor na síntese de um intermediário ao qual são adicionados os seis carbonos do anel A originados a partir de unidades de malonil-CoA, produzidas pela via do acetato. O acetil-CoA é formado através da descarboxilação oxidativa do ácido pirúvico, oriundo da via da glicólise. O malonil-CoA é gerado através de uma reacção de carboxilação do acetil-CoA através do CO₂, utilizando-se a coenzima biotina e adenosinatrifosfato (ATP). As hidroxilações e reduções que ocorrem posteriormente originam as diferentes formas de flavonóides (Pessoa, 2013).

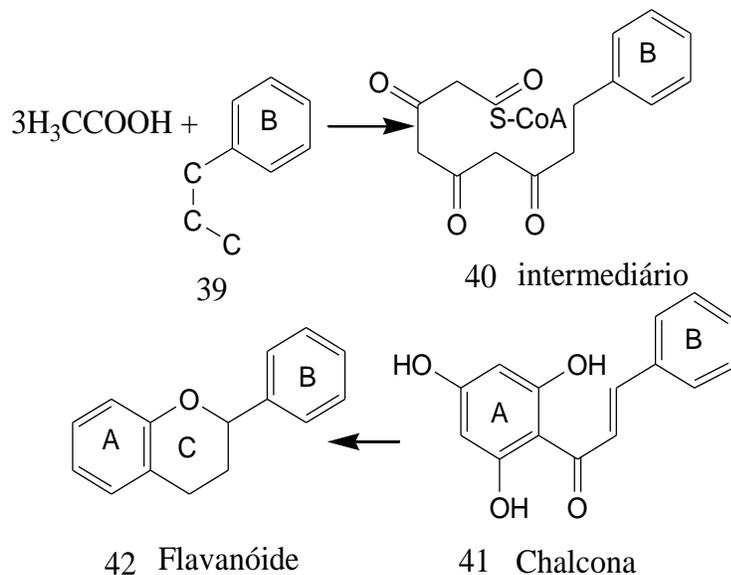


Fig. 9 Biosíntese de flavonóides

Já as flavanonas são intermediárias biossintéticas da maioria das classes de flavonóides, sendo que as flavanonas e as di-hidrochalconas podem ter influência no sabor amargo ou doce. Pequenas modificações na molécula, sejam nas posições e/ou na natureza dos açúcares ou outros substituintes no anel A e/ou B, podem produzir grandes alterações nas propriedades físicas. Isoflavonóides apresentam uma variação estrutural não somente entre o número e complexidade dos substituintes, mas também nos níveis de oxidação do anel e exercem efeitos sobre metabolismo de hormónios sendo considerados fitoestrógenos. Nessa classe, a genisteína e a daidzeína são os mais consumidos na dieta, sendo encontrados em soja e alguns legumes. Além de possuírem atividade estrogênica na reposição hormonal pós-menopausa podem reduzir os níveis de LDL (Lipoproteína de baixa densidade), aumentar os de HDL (Lipoproteína de alta densidade). Também apresentam actividade antifúngica e antimicrobiana (Basica, Federal, & Preto, 2016).

2.2.2. Taninos

Taninos são compostos fenólicos de grande interesse económico e ecológico, altamente hidroxiladas que podem formar compostos insolúveis com carboidratos e proteínas. Apresentam solubilidade em água e peso molecular compreendido entre 500 e 3000. Os taninos são classificados em dois grupos: hidrolisáveis e condensados. Os hidrolisáveis consistem de ésteres

de ácidos gálicos e ácidos elágicos glicosilados, formados a partir do chiquimato, onde os grupos hidroxila do açúcar são esterificados com os ácidos fenólicos (OLIVEIRA, 2005).

Os taninos hidrolisáveis são ainda classificados em galotaninos e elagitaninos. Os galotaninos são compostos por unidades de ácido gálico unidos por ligações peptídicas entre elas. Este autor relata que os taninos são extremamente raros na dieta humana e principalmente extraídos de folhas e galhas de arbustos.

Os taninos hidrolisáveis, podem sofrer hidrólise por ação de ácidos e bases libertando o carboidrato correspondente e o respectivo ácido fenólico. Exemplos de galotaninos são os ésteres do ácido gálico com D-glicose unido ao ácido gálico de ocorrência em folhas e cascas de muitas espécies de plantas. Enquanto que os taninos condensados, são formados pela ligação de unidades de flavonóides, geralmente flavon-3-óis e/ou flavan-3,4-dióis, provenientes do metabolismo dos flavonóides. Eles são formados pela hidroxilação no C-3 de uma flavanona, seguida por redução(OLIVEIRA, 2005).

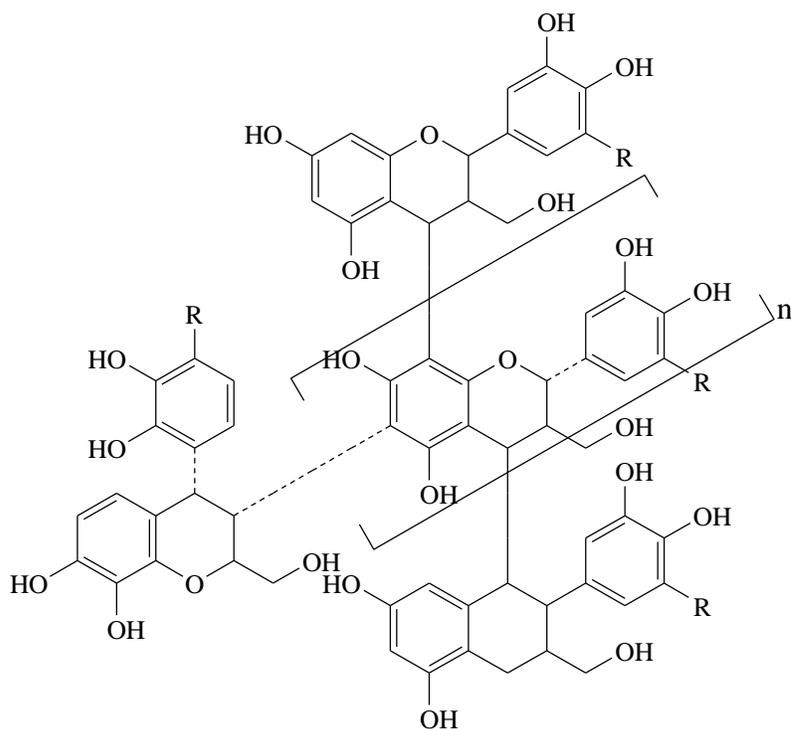


Fig. 10 Exemplo de tanino condensado

Os taninos condensados, os quais quimicamente compreendem um grupo de oligómeros de polihidroxi-flavan-3-ol ou de polímeros ligados por ligações carbono-carbono apresentam uma estrutura semelhante aos flavonóides. Possuem importância marcante em alimentos, pois suas presenças em baixas concentrações proporcionam características sensoriais desejáveis. No entanto, elevadas concentrações conferem aos frutos e outros alimentos, características adstringentes. A sensação de adstringência é gerada devido à propriedade que os taninos apresentam em precipitar proteínas, ou seja, quando em contacto com as proteínas presentes na saliva formam um complexo insolúvel que popularmente se caracterizam pela sensação adstringente e há relatos de que plantas ricas em taninos são usadas na medicina tradicional para o tratamento de diversas doenças como diarreia, hipertensão arterial, hemorragias, problemas estomacais (azia, náusea, gastrite e úlceras gástricas), queimaduras, problemas renais e do sistema urinário; processos inflamatórios em geral, tumores. bem como a actividade antibacteriana, antiviral, antihelmintica e antioxidante dos taninos(Pessoa, 2013) ((Di Carlo et al., 1999; Montoro et al., 2005).

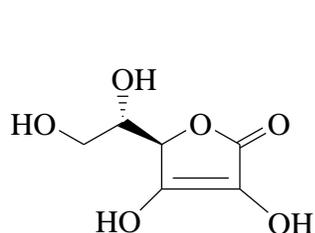
2.2.3. Actividade antioxidante

De forma geral, denominam-se antioxidantes as substâncias que presentes em concentrações baixas, comparadas ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato. Os radicais formados a partir de antioxidantes não são reativos para propagar a reacção em cadeia, sendo neutralizados por reacção com outro radical, formando produtos estáveis ou podem ser reciclados por outro antioxidante (Sousa et al., 2007). Os radicais formados a partir de antioxidantes não propagam a cadeia de reacções lipídicas oxidativas acima mencionadas mas, são neutralizadas por reacções com outros radicais para formar produtos estáveis, ou reciclados por outros antioxidantes (Rao, 2012b).

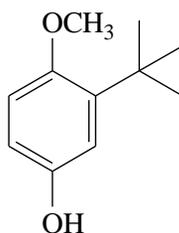
Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (Sousa et al., 2007). Os antioxidantes naturais são compostos fenólicos (tocoferóis, flavonóides, ácidos fenólicos), caratenóides e ácido ascórbico, são antioxidantes sintéticos com estruturas de fenóis com várias etapas de substituição alquil (Velioglu et al., 1998).

A actividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela acção de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (Sousa et al., 2007).

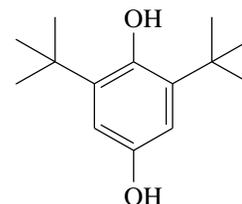
A minimização destes efeitos em humanos pode ser feita através da ingestão de antioxidantes naturais, principalmente através da dieta alimentar e outras fontes como suplementos alimentares. Alguns dos principais agentes antioxidantes são os tocoferóis (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C) (Sousa et al., 2007).



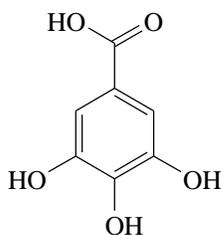
42. ácido ascórbico



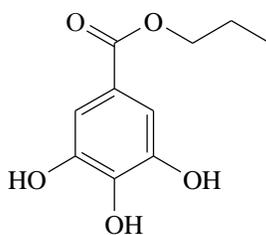
43. Hidróxianisolbutilato
(BHA)



44 Tolueno Hidróxibutilato
(BHT)



45. ácido gálico

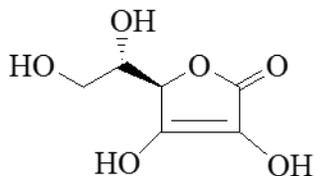


46. Propil gallato

Fig. 11 Antioxidantes naturais e sintéticos mais comuns

O ácido ascórbico (vitamina C), é amplamente conhecido por sua actividade antioxidante e éportanto usado em cosméticos e para tratamento de doenças degenerativas. A vitamina C possui várias funções fisiológicas entre elas o elevado poder antioxidante em reciclar a vitamina E em membrana lipoprotéica da peroxidação lipídica e *in vitro*, a vitamina C é acentuada. E sabe-se que a combinação de ascorbate e iões de ferro, geram radicais hidroxil os quais induzem a peroxidação

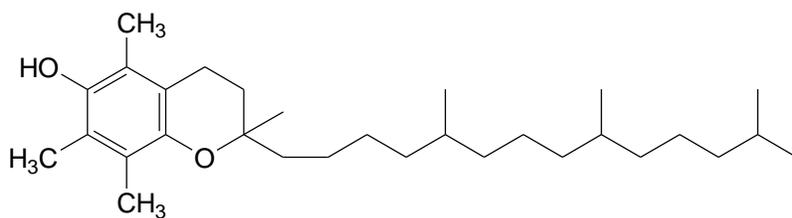
lipídica (Haslam, 1996) e a vitamina C é um poderoso antioxidante para radicais hidrofílicos, mas de menor acção contra radicais lipofílicos.



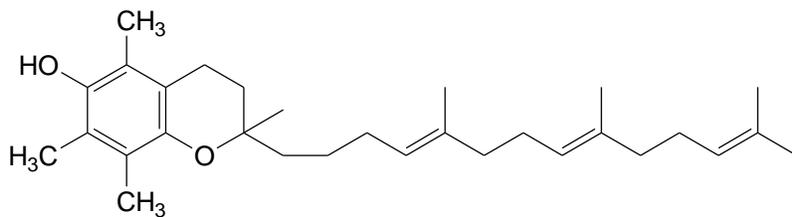
42. ácido ascórbico

Fig. 12 Estrutura de ácido ascórbico, antioxidante natural

Tocoferóis são extremamente distribuídos na natureza. A vitamina E é a designação dada a um grupo de compostos antioxidantes lipossolúveis, entre os quais o α -tocoferol que é a forma mais activa, é encontrada em lipoproteínas e membranas, actuando no bloqueio da reacção em cadeia da peroxidação lipídica, através do sequestro do radical peroxil intermediário gerado. O radical α -tocoferil é menos reactivo em atacar cadeias laterais de ácidos gordos e reconverte derivado de fenol através do ácido ascórbico, causando a roptura de reacções de cadeia (Eliana et al., 2013).



47. α – tocoferol



48. Tocotrienol analogo

Fig. 13 Antioxidantes lipossolúveis

Espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), ânion radical superóxido ($\text{O}_2\bullet^-$) e hidroperoxila ($\text{ROO}\bullet$), causam danos ao ácido desoxiribonucléico (DNA) ou podem oxidar lípidos e proteínas. Os EROs atacam as cadeias de ácidos gordos poliinsaturados dos fosfolípidos e do colesterol, abstraindo um hidrogênio do grupo metileno *bis*-alílico, iniciando assim o processo de peroxidação lipídica nas membranas celulares. Os radicais de carbono formados podem reagir com oxigênio originando radicais peroxila, que por sua vez podem atacar novas cadeias de ácidos gordos poliinsaturados, propagando a reação. O resultado deste processo é a oxidação de várias moléculas de ácidos gordos (Sousa et al., 2007).

Os radicais livres têm sido reportados como os causadores de muitas doenças relacionadas ao stress oxidativo nos seres humanos; eles estão envolvidos em um número considerável de doenças incluindo inflamação tumoral, choque hemorrágico, artrose, diabetes, infertilidade, úlceras gastrointestinais, asma, artrites reumatóides, doenças cardiovasculares, quistos fibrosos, doenças neurodegenerativas como por exemplo Parkinson, Alzheimer e HIV (Rao, 2012a).

A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena (por ex., superóxido dismutase), ou serem provenientes da dieta alimentar e outras fontes. Destas últimas destacam-se os tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis, selênio e carotenóides. Quando há limitação na disponibilidade de antioxidantes podem ocorrer lesões oxidativas de carácter cumulativo. Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células (Sousa et al., 2007).

De acordo com (Etelvina & Martins, 2016). os possíveis mecanismos de eliminação de radicais livres incluem: eliminação directa de espécies reativas de oxigênio (EROs); activação de enzimas antioxidantes; actividade quelante de metais; redução de radicais α -tocoferol; inibição de oxidases; mitigação do stress oxidativo causado pelo óxido nítrico; aumento dos níveis de ácido úrico e aumento das propriedades antioxidantes das defesas antioxidantes de baixo peso molecular. A reação de eliminação de espécies reativas de oxigênio flavonóides acontece quando o radical livre FI-O reage com um segundo radical com a formação de uma quinona estável (FI-quinona).

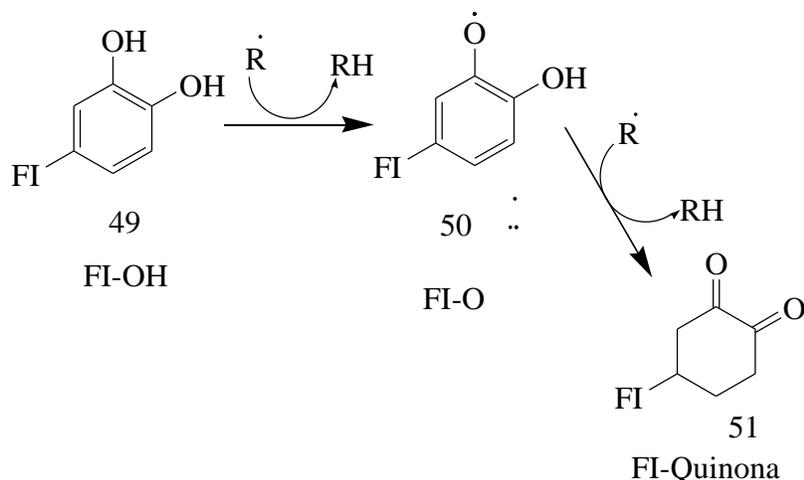


Fig. 14 Reacção de eliminação de espécies reactivas de oxigénio

Estudos, têm demonstrado a possibilidade destes antioxidantes apresentarem alguns efeitos tóxicos. Em função dos possíveis problemas provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, as pesquisas têm-se voltado no sentido de encontrar produtos naturais com actividade antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associação entre eles (Eliana et al., 2013). O galato de propila, por exemplo, quando em presença de peróxido de hidrogênio reage com íons ferrosos formando espécies reativas de oxigênio, as quais podem posteriormente atacar alvos biológicos e a demanda de antioxidantes naturais tem aumentado devido a percepção negativa que os consumidores tem a cerca do elevado periodo de segurança dos antioxidantes sintéticos (Sousa et al., 2007). Apesar de antioxidantes sintéticos, tais como hidroxianisolbutiato (BHA) e toluenohidroxibutilato (BHT), serem normalmente adicionados em produtos alimentares para retardarem a oxidação lipídica, ainda se recomenda o consumo regular de frutas e vegetais contendo antioxidantes naturais pois, estes estão relacionados com a redução de risco de doenças cardiovasculares (Jang et al., 2010).

Na indústria alimentar, antioxidantes sintéticos tais como ácido ascórbico e BHT tem sido extremamente usado como aditivos para preservar e estabilizar alimentos e produtos para alimentação e refrescamento animal, valor nutritivo, sabor e cor. Ainda estudo recente mostrou que o BHT como potencial tóxico, especialmente em doses elevadas, fazendo isto importante e considerar o risco de saúde associado com o consumo de BHT em dietas e em periodos prologados (Oliveira et al., 2009a).

Nos últimos anos, enquanto tem sido criticada a toxicidade de antioxidantes químicos sintéticos, estudos recentes começaram a investigar o potencial de produtos de plantas para servirem como antioxidantes para protecção contra radicais livres. Fenóis, taninos, proantocianidinas e várias plantas e extractos de ervas tem sido reportados como sendo sequestradores de radicais que inibem a oxidação lipídica, porém, o consumo de alimentos ricos em antioxidantes tem reduzido os efeitos dos radicais livres nos seres humanos (Brito, 2015).

O estudo de antioxidantes é crescente nos últimos anos, devido aos efeitos benéficos proporcionados por essas espécies ao organismo humano, como também á prevenção de diversas doenças já citadas. Por serem compostos facilmente oxidáveis, os antioxidantes evitam a oxidação de outras moléculas importantes. Os antioxidantes podem ser de origem endógena ou podem ser adquiridos com a ingestão de determinados alimentos que possuem esses compostos. Um bom exemplo são frutas e vegetais diversas que são comprovadas fontes de compostos fenólicos (Etelvina & Martins, 2016).

2.2.4. Quantificação dos fenóis

Os fenóis totais foram determinados de acordo com (Diem, Elisa, Tran-nguyen, & Ju, 2013) (Subramanian, Subbramaniyan, & Raj, 2013) com algumas modificações. Em que o reagente de Folin-Ciocalteu interage com o ácido gálico e monitorada espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 760 nm usando o espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25 UV-Visible. A baixo a reacção que descreve o processo.

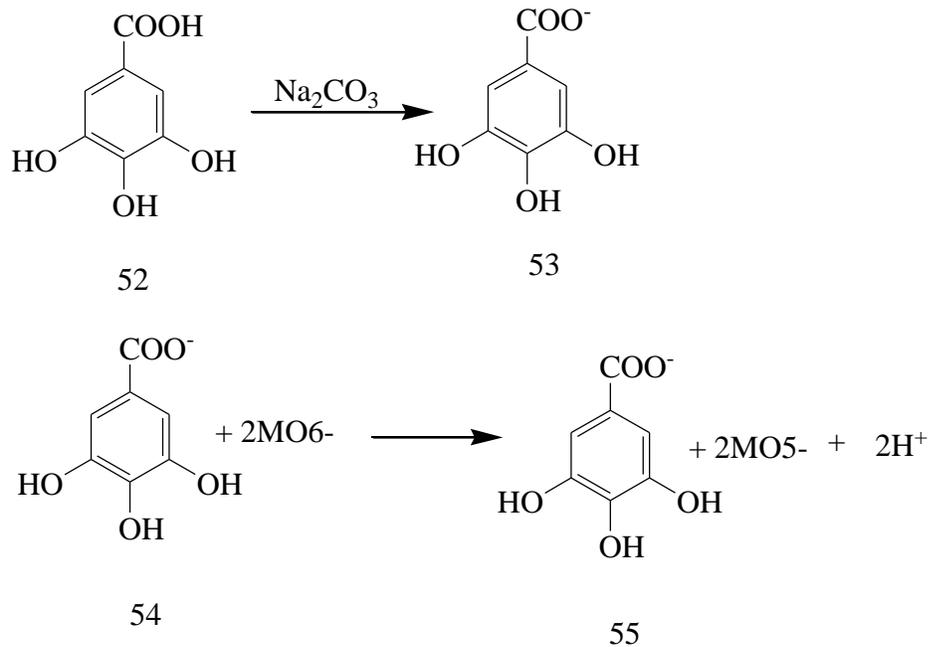


Fig. 15 reacção do ácido gálico com molibdénio, componente do reagente de Folin Cian Calteu

2.2.5. Avaliação da Actividade Antioxidante

Vários métodos são utilizados para determinar a actividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas, dentre eles o método Ferric Reducing Power (FRAP) é um método usado para avaliar a actividade antioxidante, é ampla e actualmente utilizado por (Subramanian et al., 2013) e (Diem et al., 2013) a baixos valores de pH descrito com algumas modificações onde as soluções preparadas a partir de extractos, o poder redutor foi investigado observando-se a redução do iões Fe^{3+} para Fe^{2+} , esta capacidade monitorada espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 700 nm usando o espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25 UV-Visible. A intensidade do poder redutor é directamente proporcional á absorvência da mistura da reacção.

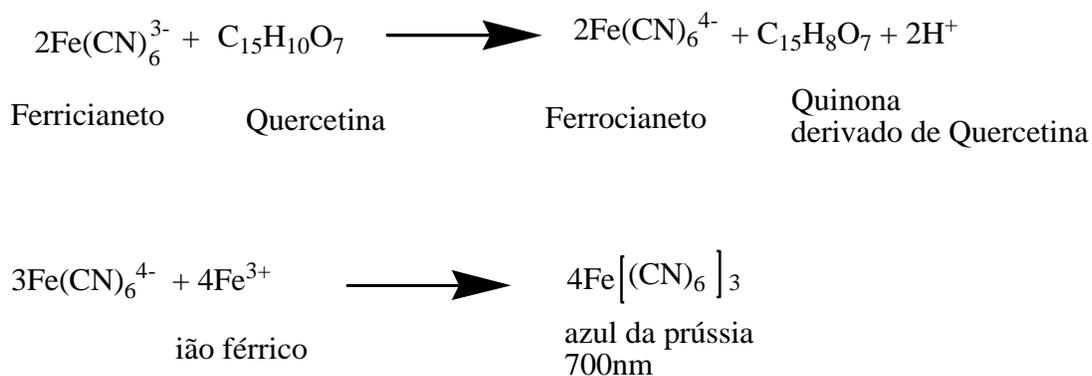


Fig. 16 reacção da redução envolvida na determinação do poder redutor dos antioxidantes.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. GENERALIDADES

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados solventes procedentes das marcas Merck, Fluka, Oxford Laboratory, BDH, Aldrich, Carlo Erba e Rochelle Chemical, com grau de pureza pró-análise (PA). Na cromatografia em camada fina (TLC) foram empregues placas de Alumínio e vidro recobertas por Sílica gel 60 Merck F254 com espessura de 0,25 mm e 1,00 mm, com as seguintes dimensões 10X10mm; 5X10mm e 20X20mm. As análises por TLC foram realizadas em tinas saturadas, com migração ascendente. Para a concentração dos extractos e recuperação dos solventes foi usado o rota-vapor Buchi B480, equipado com o banho-maria.

A detecção das substâncias sobre as placas cromatográficas foi feita sob a luz ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda 254 e 366 nm e pulverizadas com solução de anisaldeído (revelador universal), seguida de aquecimento na estufa a 105-110 °C por 10 minutos.

O critério de separação adoptado após a obtenção dos cromatogramas foi o aparecimento de uma única mancha quando eluídos em pelo menos, dois diferentes sistemas de solventes.

Neste trabalho, na cromatografia em coluna (CC) foi empregue uma coluna de vidro eluída normalmente sob pressão atmosférica. A fase estacionária utilizada foi sílica gel 60 Merck (70-230 Mesh). A proporção utilizada entre a amostra e a fase estacionária foi de 1:20.

3.2. COLHEITA E PRÉ-TRATAMENTO DAS PLANTAS

A escolha das plantas foi baseada na informação dos praticantes da medicina tradicional e as amostras foram colhidas nas províncias de GAZA (Distrito de Chipenhe, localidade de Chirindzene) e MAPUTO nos Municípios de Boane (Matutuine); Marracuene (Jardim Botânico e Bobole) e Namaacha (Cascatas) com o apoio de Sr Rogério, botânico, reformado do IIAM, no mês de Novembro de 2014.

O processo de secagem das amostras foi realizado no Instituto de Medicina Tradicional (IMT) – MISAU por possuir condições para o seu tratamento e sob condições que assegurem a integridade do princípio activo das amostras (temperatura ambiente, lugar seco, fresco e protegido da luz) durante quinze dias.

Depois do processo de higienização e secagem as amostras foram moídas no laboratório da faculdade de engenharias e conservadas em frascos hermeticamente fechados para análises subsequentes.

3.3. PROCEDIMENTO DE EXTRACÇÃO

Os extractos brutos foram obtidos através da maceração onde colocou-se 50,0 g do pó das folhas das plantas (*Cassipoupa Filiformis*, *Commiphora Schlegelii*, *Ochna Natalitius* e *Pavetta Kotzei*) e foram adicionadas sucessivamente 300 mL de n-Hexano 95,0 %; 300 mL DCM 99,5 %; 300 mL AcOEt 99,5 % e 300 mL MeOH/H₂O 99,5 % em que o volume do solvente cobriu totalmente o material vegetal durante 72 horas à temperatura ambiente e protegido da luz. Os extracto n-hex, DCM, AcOEt e hidrometanólicos assim obtidos foram filtrados por sucção e submetidos à evaporação sob pressão reduzida, usando rotavapor a 50°C até a obtenção dos extractos brutos secos.

3.4. FITOQUÍMICA QUALITATIVA

3.4.1. Triagem fitoquímica aplicando os reagentes específicos

Os quatro extractos brutos incluindo as fracções das quatro plantas em estudo, foram submetidos à triagem fitoquímica usando os reagentes específicos para detecção de metabolitos secundários nomeadamente esteróides, triterpenos, glicósidos, diterpenos com maior enfoque para fenis, flavonóides e taninos em todas as plantas em estudo.

3.4.2. Cromatografia em camada fina (TLC)

É um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, com base na migração diferencial de solutos num solvente ou numa mistura de solventes apropriados (fase móvel) através de uma camada fina e uniforme (fase estacionária), fixada num suporte (placa ou folhas) de vidro, de metal ou plástico. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é selectivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes.

O fluxograma que se segue apresenta todas as etapas do processo desde a colheita e identificação do material vegetal até a obtenção de cromatogramas por TLC tanto nos extractos como nas fracções.

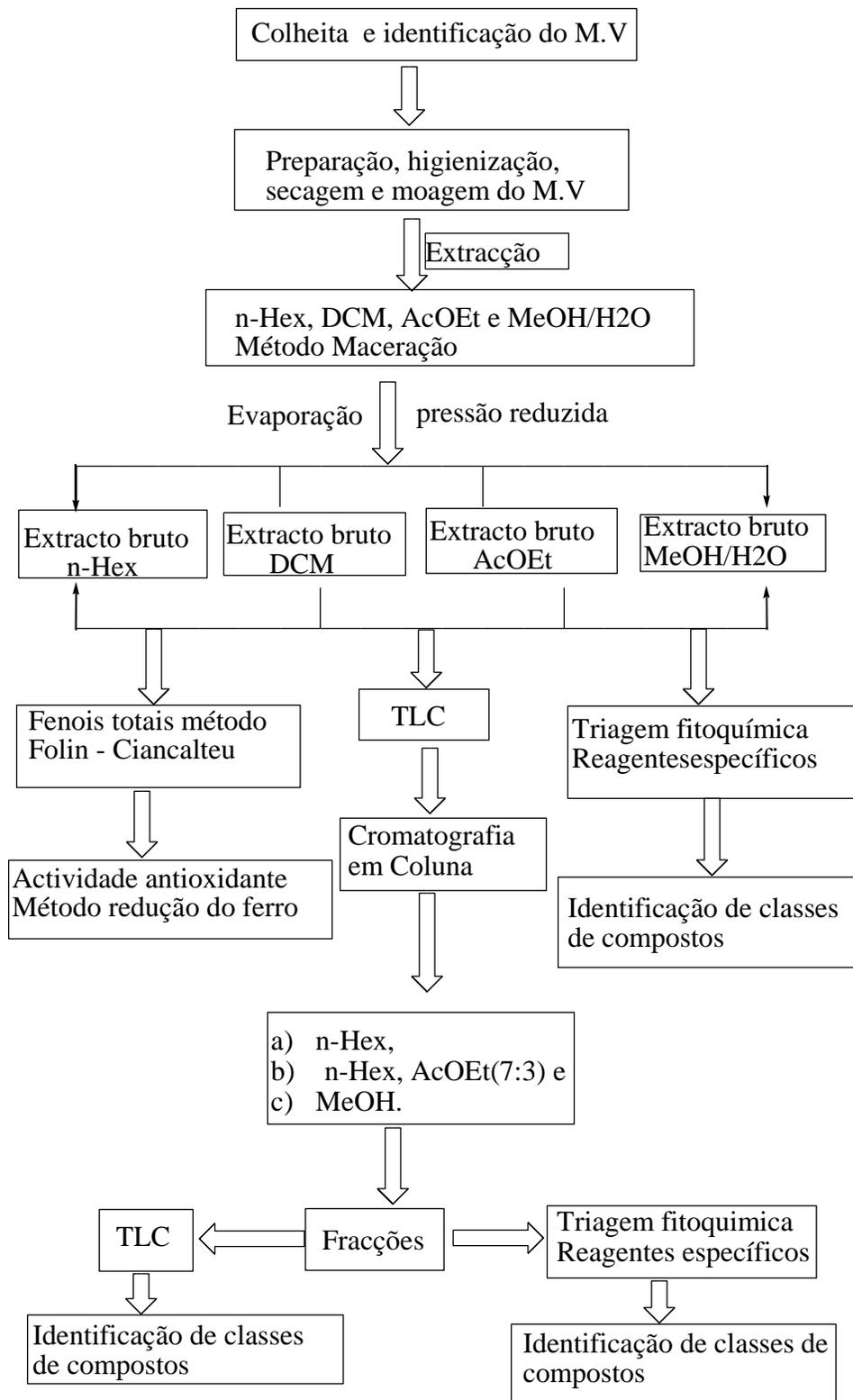


Fig. 17 Fluxograma do processo

3.4.3. Cromatografia em coluna

Enche-se a coluna até cerca de 7cm de altura com sílica e humedecer com hexano; quando parar de borbulhar significa que a sílica já está húmida. Escoar o solvente e deixar cerca de 0,5mL. Num almofariz, homogeneizar cerca de 0,8g do extracto bruto da amostra com o dobro da sílica (0,160g), humedecer com AcOEt e conservar. Levar a amostra para a coluna e colocar no fim algodão. Para a eluição foram usados 50,0 mL de cada um dos seguintes solventes: a) n- Hex., b) n-Hex. AcOEt (7:3) e c) MeOH. (vide) o fluxograma a baixo.

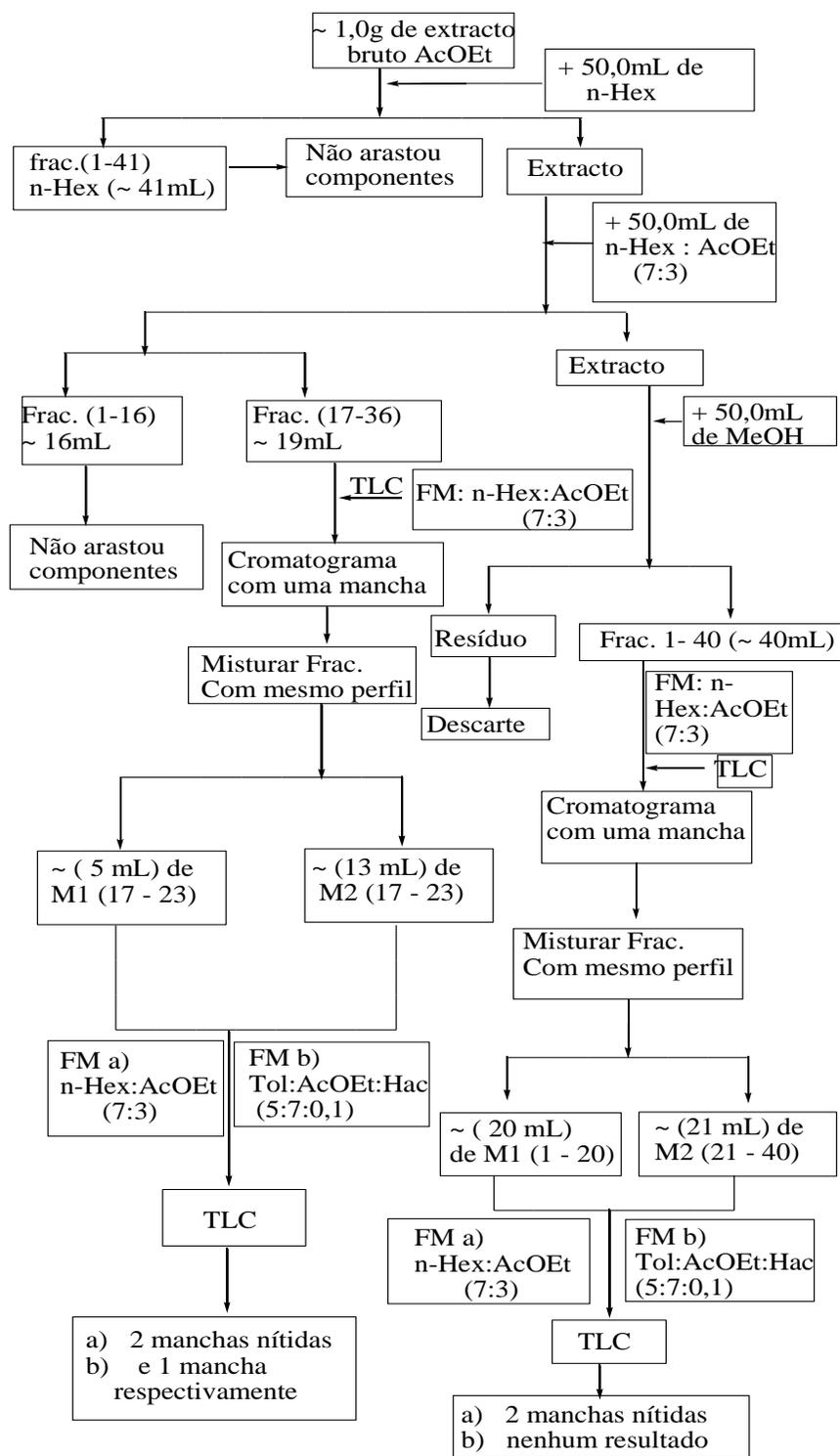


Fig. 18 Fluxograma do fracionamento dos extractos

3.5. DETERMINAÇÃO DOS FENÓIS TOTAIS

Foi feita a determinação das fenóis totais aplicando o método de Folin - Ciocalteu onde tomou-se 500 µL de cada extracto bruto de n-Hex, DCM, AcOEt e MeOH/H₂O de concentração (1mg/mL) e usou-se o metanol como solvente para a preparação de soluções. De seguida adicionaram-se os seguintes reagentes: 500 µL de reagente de Folin-Ciocalteu 10 % (v/v), 1,0 mL de solução de carbonato de sódio 7,5 % (m/v) e 8 mL de água destilada e uma posterior incubação (2 horas), as soluções resultantes, de coloração azul, foram lidas as absorvências usando o espectrofotómetro de UV-Vis tendo como “branco” o metanol e todos os reagentes, com a excepção da amostra. Todos os ensaios foram feitos em triplicado e o teor de fenóis totais calculado como média ± desvio padrão da média e expressos em miligramas equivalente de ácido gálico (mgEAG) por grama de extracto seco, calculados através da equação da curva de calibração (equação 1) do padrão deste ácido, traçada usando a metodologia proposta por (Diem et al., 2013)(Subramanian et al., 2013); com algumas modificações.

$$Y = 0.025X - 0.1056; R^2 = 0.9916(\text{equação 1}) \quad \text{Onde:}$$

Y – absorvência,

X – concentração (mg L⁻¹) e R² - quadrado de coeficiente de correlação de Pearson.

Para preparação da curva de calibração, diluiu-se 100, 200, 300, 500 e 1000 µL de uma solução stock de ácido gálico 50 mg mL⁻¹ em 100 mL, adiciona-se água destilada quantidade que baste. Estas soluções apresentam as concentrações de 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0 e 50.0 mg L⁻¹

As soluções da curva de calibração foram preparadas, pipetando-se uma alíquota de 2.0 mL para um balão volumétrico de 10 mL, adicionada 2.0 mL de água destilada e 2.0 mL de reagente de Folin - Ciocalteu e agitou-se vigorosamente com vórtex e deixadas em repouso por 10 minutos, seguida pela adição de 200 µL de solução de carbonato de sódio 7.5 % (Estas soluções contêm o fenol (ácido gálico) nas concentrações finais de 0,50 - 5,0 mg L⁻¹).

Após 2 horas, as absorvências das soluções foram determinadas a 760 nm contra o branco e plotadas contra concentrações das soluções. Todos os ensaios foram feitos em 3 réplicas, e as médias usadas para a construção da curva de calibração por regressão linear, usando o software Excel.

3.6. DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.6.1. Redução do ião férrico (método de cianeto férrico)

A determinação da actividade antioxidante foi realizada aplicando o método de cianeto férrico nos extractos brutos de n-Hex, DCM, AcOEt e mistura hidroalcolica (MeOH:H₂O). Para o efeito tomou-se 1 mL de amostra com 500 µg mL⁻¹ de tampão fosfato (pH = 6,6) e 2,5 mL de ferricianeto de potássio 1 %. A mistura da reacção foi incubada a 50°C por 20 minutos, de seguida adicionou-se 2,5 mL de ácido tricloroacético 10 % e centrifugada a 3000 rotações por minuto por 10 minutos. Ao sobrenadante tomou-se 2,5 mL e foi misturado sucessivamente com 2,5 mL de água destilada e 500 µL de cloreto férrico 0,1 %. Nas mesmas condições foi preparado 500 µg mL⁻¹ de rutina padrão. As soluções resultantes, foram lidas as absorvâncias usando o espectrofotómetro de UV-Vis. Todos os ensaios foram feitos em triplicado e os resultados do poder redutor (actividade antioxidante) são expressos como média ± desvio padrão. A absorvência das amostras foi medida a 700 nm contra o branco apropriado e estas comparadas com a absorvência do padrão rutina (equação 2).

$$\text{Poder redutor (\%)} = 100 - \left(\frac{A_p - A_a}{A_p} \right) \times 100 \text{ (equação 2)}$$

Onde: A_p - Absorvência do padrão

A_a - Absorvência da amostra

4. RESULTADOS

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos na fitoquímica qualitativa referentes a triagem fitoquímica usando reagentes específicos, CCF (vulgo TLC) e a quantificação dos fenóis totais nos extractos de folhas de *Cassytha Filiformis*, *Commiphora Schlechteri*, *Ochna Natalitias* e *Pavetta Kotdzei* e serão ainda apresentados os resultados referentes ao poder redutor (actividade antioxidante). O tratamento estatístico foi feito com recurso a softower excel e ANOVA, de duas vias (dois factores) de medidas repetidas. Todos os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média de três repetições usando o teste de *t-student* a um $P < 0.05$ e foram consideradas significativas as comparações. Nas quatro plantas e nos quatro solventes de extração, o teor em fenóis totais foi determinado por regressão linear pela equação ($y = ax + b$) da curva de calibração do ácido gálico e os resultados expressos em termos de miligrama-equivalente do ácido gálico.

O poder redutor dos extractos das quatro plantas obtidos nos quatro solventes, foi determinado aplicando o método de redução do ião férrico, expressa em termos de percentagem relativa calculada em função do padrão rutina (flavonóide), a qual foi atribuído a actividade máxima de 100 % enquanto que o (EC_{50}), que expressa a concentração mínima do extracto capaz de reduzir a concentração inicial de ferricianeto até 50 %, o teor de fenóis totais e actividade antioxidante dos extractos, foi calculado usando o software Excel.

4.1. FITOQUÍMICA QUALITATIVA

4.1.1. Triagem fitoquímica

As tabelas a baixo apresentam os resultados fitoquímicos obtidos nos extractos das folhas das plantas, usando reagentes específicos.

Tabela V: Fitoquímica de extractos de *Cassythia Filiformis* (folhas)

Classe de metabólitos secundários	Teste Fitoquímico	Extracto			
		n-Hexano	Diclorometano	Etilacetato	Hidroalcoólico
Fitosteróis	Salkowski (Tritepenos)	(-)	(-)	(-)	(+)
	Libermann-Burchard(Esteróide)	(+)	(+)	(+)	(-)
Glicósidos (Antraquinonas)	De Borntrager	(+)	(+)	(+)	(+)
Fenólicos	FeCl ₃	(+)	(+)	(+)	(+)
Taninos	FeCl ₃	(+)	(+)	(+)	(+)
	Acetato de Pb	(+)	(+)	(+)	(+)
Flavonóides	Reagente alcalino	(+)	(+)	(+)	(+)
	Acetato de Pb	(+)	(+)	(+)	(+)
	Shinoda	(+)	(+)	(+)	(+)
Diterpenos	Acetato de Pb	(-)	(-)	(-)	(+)

Legenda (+) = Presente; (-) = Ausente

Tabela VI: Fitoquímica de extractos de *Commiphora Schlechteri* (folhas)

Classe de metabólitos secundários	Teste Fitoquímico	Extracto			
		n-Hexano	Diclorometano	Etilacetato	Hidroalcoólico
Fitosteróis	Salkowski (Triterpenos)	(+)	(-)	(-)	(+)
	Libermann-Burchard (Esteróides)	(+)	(+)	(+)	(-)
Glicósidos (Antraquinonas)	De Borntrager	(-)	(+)	(+)	(+)
Fenólicos	FeCl ₃	(-)	(+)	(+)	(+)
Taninos	FeCl ₃	(-)	(+)	(+)	(+)
	Acetato de Pb	(-)	(+)	(+)	(+)
Flavonóides	Reagente alcalino	(-)	(+)	(+)	(+)
	Acetato de Pb	(-)	(+)	(+)	(+)
	Shinoda	(-)	(+)	(+)	(+)
Diterpenos	Acetato de Pb	(-)	(-)	(-)	(+)

Legenda (+) = Presente; (-) = Ausente

Tabela VII: Fitoquímica de extractos de *Ochna Natalítias* (folhas)

Classe de metabólitos secundários	Teste Fitoquímico	Extracto			
		n-Hexano	Diclorometano	Etilacetato	Hidroalcoólico
Fitosteróis	Salkowski(Tritepenos)	(-)	(+)	(+)	(+)
	Liebermann-Burchard(Esteróide)	(-)	(+)	(+)	(+)
Glicósidos (Antraquinonas)	De Borntrager	(-)	(-)	(-)	(+)
Fenólicos	FeCl ₃	(-)	(+)	(+)	(+)
Taninos	FeCl ₃	(-)	(+)	(+)	(+)
	Acetato de Pb	(-)	(+)	(+)	(+)
Flavonóides	Reagente alcalino	(-)	(+)	(+)	(+)
	Acetato de Pb	(-)	(+)	(+)	(+)
	Shinoda	(-)	(+)	(+)	(+)
Diterpenos	Acetato de Pb	(-)	(-)	(+)	(+)

Legenda (+) = Presente; (-) = Ausente

Tabela VIII: Fitoquímica de extractos de *Pavetta Kottzei* (folhas)

Classe de metabólitos secundários	Teste Fitoquímico	Extracto			
		n-Hexano	Diclorometano	Etilacetato	Hidroalcoólico
Fitosteróis	Salkowski (Tritepenos)	(-)	(+)	(+)	(+)
	Libermann-Burchard(Esteróide)	(+)	(+)	(+)	(+)
Glicósidos (Antraquinonas)	De Borntrager	(-)	(-)	(+)	(+)
Fenólicos	FeCl ₃	(-)	(+)	(+)	(+)
Taninos	FeCl ₃	(-)	(+)	(+)	(+)
	Acetato de Pb	(-)	(-)	(-)	(+)
Flavonóides	Reagente alcalino	(-)	(+)	(+)	(+)
	Acetato de Pb	(-)	(-)	(+)	(+)
	Shinoda	(-)	(-)	(+)	(+)
Diterpenos	Acetato de Pb	(-)	(-)	(+)	(+)

Legenda (+) = Presente; (-) = Ausente

4.1.2. Cromatografia em camada fina (TLC)

Os extractos brutos obtidos como acima descrito, depois do fracçãoamento, foi realizada uma série de ensaios de cromatografia em camada fina (TLC) aplicando dois sistemas de solventes para a eluição. A Fig.19 a 22 ilustram os cromatogramas obtidos após revelação com o reagente anisaldeído. De salientar que são aqui apresentadas apenas placas de fracções metanólicas das amostras eluídas nas fases a) FM: n-Hexç AcOEt (7:3) e b) FM: Tol: AcOEt: HAC (5: 7: 0,1) que apresentaram uma melhor resolução.

Cassytha Filiformis

A) MeoH^{dcm} - FM: n-Hex: AcOEt (7:3)

B) MeoH^{AcOEt} - FM: Tol: AcOEt: HAC (5: 7: 0,1)

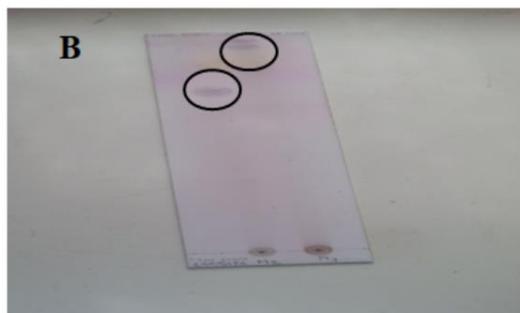


Fig. 19 - Cromatograma das fracções

Commiphora Schlechteri

A) MeoH^{dcm} - FM: n-Hex: AcOEt (7:3)

B) MeoH^{AcOEt} - FM: Tol: AcOEt: HAC (5: 7: 0,1)

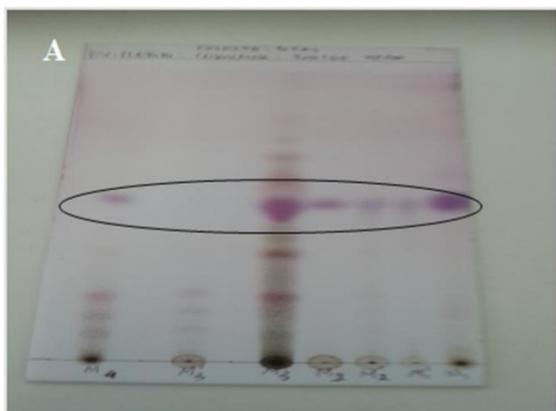
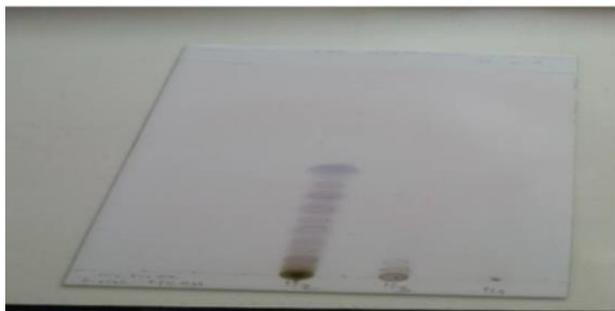


Fig. 20 - Cromatograma das fracções

Ochna Natalitias

A) MeoH^{dcm} - FM: n-Hex: AcOEt (7:3)



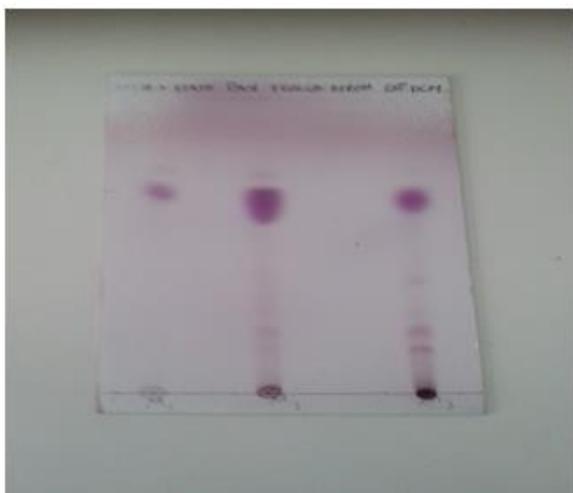
B) MeoH^{AcOEt} - FM: Tol: AcOEt: HAC (5: 7: 0,1)



Fig. 21 - Cromatograma das fracções

Pavetta Kottzei

A) MeoH^{dcm} - FM: n-Hex: AcOEt (7:3)



B) MeoH^{AcOEt} - FM: Tol: AcOEt: HAC (5: 7: 0,1)

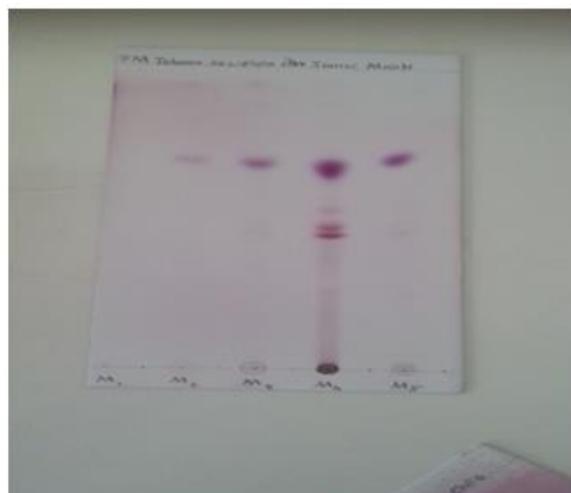


Fig. 22 - Cromatograma das fracções

4.2. FITOQUÍMICA QUANTITATIVA DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

4.2.1. Quantificação dos fenóis

Tabela IX: Fitoquímica dos extractos de folhas de *C. filiformis*, *C. schlechteri*, *O. Natalitias* e *P. kottzei*

Fenóis Totais (mgEAG/g)*				
Amostra	<i>Cassyla filiformis</i>	<i>C.ommiphora schlechter</i>	<i>Ochna Natalitias</i>	<i>Pavetta kottzei</i>
n-Hex	185.897 ± 0.458 ^{aA}	202.043 ± 0.917 ^{bA}	204.688 ± 0.794 ^{bA}	231.684 ± 0.794 ^{cA}
DCM	271.647 ± 0.458 ^{aB}	297.323 ± 0.459 ^{aB}	316.117 ± 0.917 ^{bB}	408.217 ± 0.916 ^{cB}
AcOEt	443.947 ± 0.917 ^{aC}	464.853 ± 0.917 ^{bC}	465.643 ± 0.458 ^{bC}	469.307 ± 0.046 ^{bC}
MeOH/H ₂ O	473.854 ± 0.794 ^{aD}	561.723 ± 0.458 ^{bC}	685.909 ± 0.200 ^{cD}	687.282 ± 0.630 ^{cC}

*Valores representam a média de triplicata ± o desvio padrão, seguidas de letras diferentes, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem estatisticamente entre si pelo teste *t-student* a um $P < 0.05$. Legenda: n-Hex - extractos brutos de n-hexano; DCM- extractos brutos de diclorometano; AcOEt – extractos brutos de acetato de etilo; MeOH/H₂O – extractos brutos hidrometanólicos

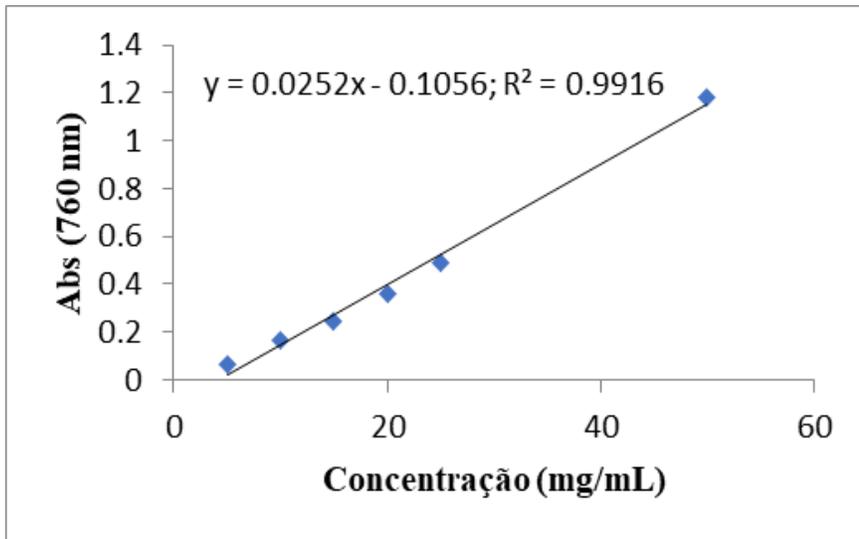


Fig. 23 - Curva de calibração do ácido gálico

Legenda: Onde, X – concentração (mg/L) e R2 – quadrado de coeficiente de correlação de Pearson.

4.3. ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE

No presente estudo, os extractos brutos de *Cassytha Filiformis*, *Commiphora Schlechteri*, *Ochna Natalitias* e *Pavetta Kotzei* foram usados como fonte de substâncias bioactivas e estão resumidas na tabela XI. Os dados apresentados neste estudo, demonstram que os extractos hidrometanólicos das plantas possuem propriedades antioxidantes, o que provavelmente pode causar efeito protector contra algumas doenças que podem ser causadas por radicais livres em humanos.

Actividade Antioxidante de extractos brutos de folhas de *Cassytha Filiformis*, *Commiphora Schlechter*, *Ochna Natalitias* e *Pavetta Kotzei*

Tabela X: Actividade Antioxidante de extractos brutos de folhas (*n- Hex*)

Poder redutor (%) redução do ião férrico (método de cianeto férrico)				
Conc. µg.mL⁻¹	<i>C. Filiformis</i>	<i>C. Schlechtei</i>	<i>O. Natalitias</i>	<i>P. Kotdzei</i>
2.5	0.717 ± 0.380 ^{aA}	2.774 ± 0.299 ^{bB}	1.339±0.166 ^{cC}	0.861 ± 0.143 ^{dD}
5.00	1.530± 0.299 ^{bB}	4.017 ±0.497 ^{cC}	2.296±0.287 ^{dD}	1.482 ± 0.219 ^{bB}
10.0	2.965 ± 0.219 ^{cC}	4.735 ±0.143 ^{dD}	3.922±0.299 ^{dD}	2.009 ± 0.287 ^{eE}
25.00	3.635 ± 0.219 ^{dD}	9.421 ± 0.647 ^{eE}	9.708±0.414 ^{eE}	6.982 ± 0.600 ^{fF}
50.00	4.878 ± 0.759 ^{eE}	16.882 ± 0.503 ^{fF}	27.690±0.717 ^{gG}	12.626 ± 0.657 ^{hH}
75.00	10.7604± 0.380 ^{fF}	21.090 ±0.287 ^{gG}	52.654±0.380 ^{hH}	28.886 ± 0.438 ^{iI}
100.00	12.578 ± 0.083 ^{gG}	26.351 ±0.299 ^{hH}	59.349±0.299 ^{iI}	51.937± 0.143 ^{jJ}
125.00	18.938 ± 0.759 ^{hH}	32.950 ±0.331 ^{iI}	90.530±0.380 ^{jJ}	66.284 ± 0.380 ^{kK}

Legenda: %PRFFe³⁺ - poder redutor dos extractos face ao ião férrico em percentagem de rutina. As médias com a mesma letra não apresentam diferenças significativas para P<0,05

Tabela XI: Actividade Antioxidante de extractos brutos de folhas (DCM)

Poder redutor (%) redução do ião férrico (método de cianeto férrico)				
Conc. µg/mL	<i>C. Filiformis</i>	<i>C. Schlechteri</i>	<i>O. Nataliñas</i>	<i>P. Kotdzei</i>
2.5	4.859±0.461 ^{aA}	2.774±2.298 ^{bB}	6.552±0.772 ^{cC}	2.199±0.1167 ^{bB}
5.00	5.055±0.219 ^{bB}	4.017±0.759 ^{cC}	5.882±0.759 ^{dD}	2.678±0.361 ^{eE}
10.0	5.069±0.299 ^{cC}	4.734±0.143 ^{cC}	8.895±0.143 ^{dD}	3.635±0.580 ^{cC}
25.00	6.934±0.298 ^{dD}	9.421±0.647 ^{eE}	24.103±0.143 ^{fF}	5.931±0.361 ^{gG}
5.0	8.513±0.597 ^{eE}	16.021±1.534 ^{fF}	36.489±0.219 ^{gG}	8.571±0.461 ^{eE}
75.00	10.904±0.143 ^{fF}	21.093±0.287 ^{gG}	65.567±0.143 ^{hH}	11.573±0.298 ^{fF}
100.00	12.508±0.083 ^{gG}	26.351±0.297 ^{hH}	82.664±0.109 ^{iI}	14.926±0.083 ^{ij}
125.00	14.252±0.597 ^{hH}	32.957±0.331 ^{iI}	119.273±0.438 ^{jj}	18.104±0.597 ^{kk}

Legenda: %PRFFe³⁺ - poder redutor dos extractos face ao ião férrico em percentagem de rutina. As médias com a mesma letra não apresentam diferenças significativas para P<0,05

TabelaXII: Actividade Antioxidante de extractos brutos de folhas (AcOEt)

Poder redutor (%) redução do ião férrico (método de cianeto férrico)				
Conc µg.mL⁻¹	<i>C. Filiformis</i>	<i>C. Schlechteri</i>	<i>O.Natalitias</i>	<i>P Kkottzei</i>
2.5	4.02 ± 0.745 ^{aA}	1.626±0.166 ^{bB}	1.339±0.166 ^{cC}	0.861±0.143 ^{dD}
5.00	4.88 ± 0.290 ^{bB}	2.2 ± 0.082 ^{cC}	2.30±0.287 ^{cC}	1.482±0.219 ^{dD}
10.0	6.07 ± 0.708 ^{cC}	5.069 ± 0.166 ^{dD}	3.922±0.299 ^{eE}	2.009±0.287 ^{fF}
25.00	7.70 ± 0.543 ^{dD}	8.847 ± 0.083 ^{eE}	11.095±1.730 ^{fF}	6.982±0.580 ^{dD}
50.0	12.91 ± 0.941 ^{eE}	19.99 ± 0.911 ^{fF}	25.921±0.361 ^{gG}	12.626±0.657 ^{eE}
75.00	19.89 ± 0.678 ^{fF}	19.99 ± 0.911 ^{fF}	48.972±0.361 ^{gG}	28.168±0.219 ^{hH}
100.00	22.81 ± 0.517 ^{gG}	19.99 ± 0.911 ^{hH}	59.541±0.287 ^{iI}	37.5897±0.143 ^{jJ}
125.00	30.13 ± 0.287 ^{hH}	74.51 ± 0.166 ^{iI}	90.196±0.219 ^{jJ}	56.719±0.219 ^{kK}

Legenda: %PRFFe³⁺ - poder redutor dos extractos face ao ião férrico em percentagem de rutina. As médias com a mesma letra não apresentam diferenças significativas para P<0,05

Tabela XIII: Actividade Antioxidante de extractos brutos de folhas (MeOH/H₂O)

Poder redutor (%) redução do ião férrico (método de cianeto férrico)				
Conc. µgmL⁻¹	<i>C. Filiformis</i>	<i>C. Schlechter</i>	<i>O. Natalitias</i>	<i>P. Kottzei</i>
2.5	5.452 ± 0.143 ^{aA}	3.176±0.708 ^{bB}	25.007±0.447 ^{cC}	8.431±0.313 ^{dD}
5.00	6.934 ± 0.299 ^{bB}	6.528±0.299 ^{bB}	36.198±0.738 ^{cC}	10.325±0.147 ^{dD}
10.0	10.378 ± 0.219 ^{cC}	19.947±0.219 ^{dD}	51.330±1.060 ^{eE}	17.920±0.241 ^{fF}
25.00	39.694 ± 0.290 ^{dD}	63.764±0.299 ^{eE}	109.584±0.307 ^{fF}	31.712±0.651 ^{gG}
50.00	68.771 ± 0.299 ^{eE}	123.257±0.299 ^{fF}	199.369±0.273 ^{gG}	57.877±0.775 ^{hH}
75.00	124.773 ± 0.580 ^{fF}	198.412±0.580 ^{gG}	336.671±0.727 ^{hH}	94.983±0.876 ^{iI}
100.00	147.633 ± 0.430 ^{gG}	243.859±0.430 ^{hH}	430.722±1.018 ^{iI}	129.307±0.649 ^{jJ}
125.00	169.201 ± 0.438 ^{hH}	306.083±0.438 ^{iI}	561.4491±0.000 ^{jJ}	162.114±0.642 ^{kK}

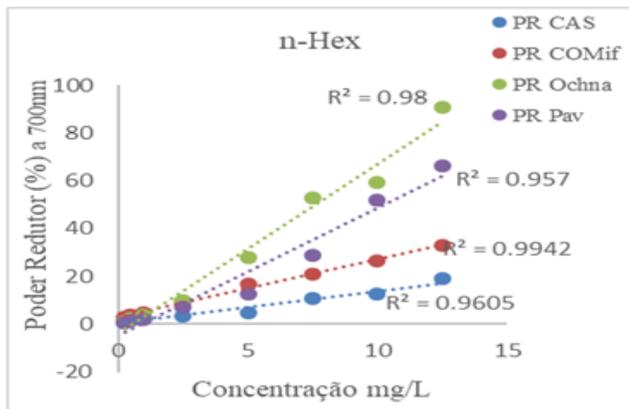
Legenda: %PRF_{Fe³⁺} - poder redutor dos extractos face ao ião férrico em percentagem de rutina. As médias com a mesma letra não apresentam diferenças significativas para P<0,05

Tabela XIV: Concentração eficiente dos quatro extractos brutos

$CE_{50} \mu\text{g.mL}^{-1}$				
Amostras	<i>C. Filiformis</i>	<i>C. Schlechteri</i>	<i>O. Natalitias</i>	<i>P. Kottzei</i>
n-Hex	36.765 ± 0.510 ^{aA}	19.535 ± 0.201 ^{bA}	7.602±0.032 ^{cA}	37.600 ± 0.611 ^a
DCM	57.791± 1.064 ^{aB}	19.513 ± 0.185 ^{bA}	5.620±0.008 ^{cB}	37.600 ± 0.611 ^d
AcOEt	22.536 ± 0.315 ^{aC}	9.147 ± 0.059 ^{bB}	7.726±0.036 ^{bA}	12.216±0.020 ^{cE}
MeOH/H ₂ O	3.392± 0.011 ^{aD}	2.090±0.121 ^{bC}	2.090±0.122 ^{bC}	1.008±0.004 ^{cC}

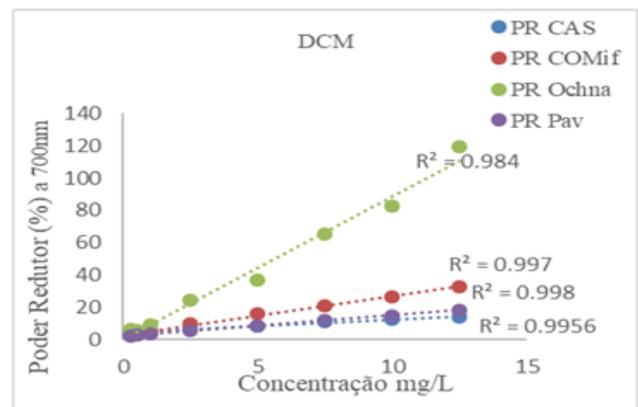
Legenda: EC50 – concentração eficiente $\mu\text{g.mL}^{-1}$; As médias com a mesma letra não apresentam diferenças significativas para $P < 0,05$

A) Correlação PR X Concentração n-Hex.



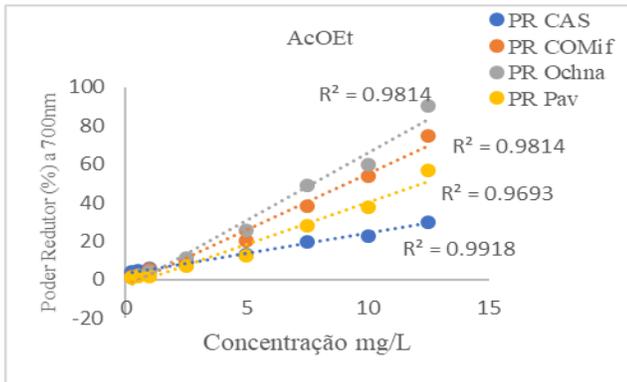
Legenda: PR CAS poder reedutor de Cassytha, PR COMif Poder reedutor de Commiphora, PR Ochnnapodreductor, de Ochnna e PR PAV: poder reedutor de paveta

B) Correlação PR X Concentração DCM



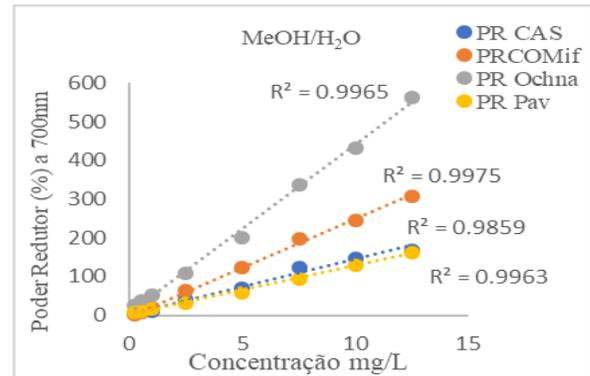
Legenda: PR CAS poder reedutor de Cassytha, PR COMif. Poder reedutor de Commiphora, PR Ochnna podre reedutor de Ochnna e PR PAV: poder reedutor de Paveta

C) Correlação PR X Concentração AcOEt



Legenda: PR CAS poder reedutor de Cassytha, PR COMif. Poder redutor de Commiphora PR Ochnna, poder redutor de Ochnna e PR PAV: poder redutor de paveta

D) Correlação PR X Concentração MeOH/H₂O



Legenda: PR CAS poder reedutor de Cassytha, PR COMif. Poder redutor de Commiphora PR Ochnna, podre edutor de Ochnna e PR PAV: poder redutor de paveta

Fig.24 Curva de poder Redutor X Concentração

5. DISCUSSÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

As plantas possuem compostos que não são essenciais à sua sobrevivência. Esses, por sua vez, são conhecidos por metabolitos secundários. Esses compostos são responsáveis por ajudarem na adaptação das plantas em ambientes onde se encontram, sendo responsáveis por fontes de substâncias biologicamente activas (Brito, 2015).

A triagem fitoquímica possibilita o conhecimento dos compostos químicos e avaliação da presença dos mesmos numa determinada espécie vegetal. Esta é responsável pelo estudo e análise de metabolitos secundários e pela descoberta das funções que os mesmos desempenham nas plantas. Esses metabolitos secundários são constituídos por pequenas moléculas complexas e diversificadas (Brito, 2015).

5.1. FITOQUÍMICA QUALITATIVA

Dos testes fitoquímicos realizados nos quatro extractos brutos e nas respectivas fracções, foi possível identificar fitoesteróides, taninos, triterpenos, glicósidos, diterpenos, fenóis e flavonóides em todas as plantas em estudo; na planta *Cassytha Filiformis* todos os extractos evidenciaram presença de fitoesteróis, glicósidos antraquinônicos, fenóis (taninos e flavanóides) enquanto que os diterpenos e triterpenos apenas foram detectados nos extractos hidrometanólicos o que de certa forma vêm a confirmar estudos realizados por (Mythili et al., 2011) e (Sathiavelu & Arunachalam, 2012). Na espécie *Cassytha Filiformis*, em que extractos de acetato de etilo e metanólicos revelaram a presença de metabolitos secundários tais como flavonóides, alcalóides, glicósidos, terpenóides, esteróides, óleos e gorduras, carboidratos, taninos e saponinas.

Na planta *Commiphora Schlechteri* foram identificados os triterpenos os diterpenos nos extractos n-Hex e hidrometanólico respectivamente. O destaque vai para os fitoesteróis que deram reacção positiva em todos os extractos. Contudo todos os outros extractos evidenciaram a presença de outros metabolitos como é o caso de glicósidos, fenóis (flavanóides e taninos). (Sarup et al., 2015) estudaram óleos e resinas de espécies do género *Commiphora* e a fitoquímica de extractos éter de petróleo, etanólicos e de acetato de etilo revelaram a presença de diterpenóides, triterpenóides, esteróides, carboidratos e ésteres de cadeia alifática; Todavia, na planta *Ochna Natalitias* nos extractos n-Hex, DCM, AcOEt e hidrometanólicos foram detectados fitoesteróis, triterpenos, fenóis, taninos, flavonóides com a excepção dos glicósidos que apenas foram detectados no extracto

hidrometanólico bem como os diterpenos que deram reacção positiva nos extractos AcOEt e hidrometanólicos. Enquanto que dos estudos realizados por (Makhafola et al., 2012) e (Brito, 2015) no género *ochmna*, a triagem fitoquímica revelou a presença de fenóis (flavonoides e taninos) entre outros;

Por último na planta *Pavetta Kotdzei* nos extractos n-Hex, DCM, AcOEt e MeOH/H₂O foi possível detectar a presença de fenóis, fitoesteróis, flavanóides seguida de taninos nos extractos DCM, AcOEt e MeOH/H₂O; os glicósidos apenas foram detectados nos extractos hidrometanólicos e os diterpenos no extracto MeOH/H₂O. Por seu turno, trabalhos realizados por (Gupta et al., 2013) e (Ibekwe et al., 2012) os extractos aquosos e metanólicos do género *Pavetta* evidenciaram a presença de alcalóides, flavonóides, terpenos, esteróides, antraquinonas e carboidratos. As tabelas VI, VII, VIII e IX acima apresentam os resultados fitoquímicos obtidos nas quatro plantas.

5.1.1. Cromatografia em camada fina (TLC)

Os cromatogramas obtidos no teste de cromatografia em camada fina (TLC) realizados nos quatro extractos brutos demonstram a presença de manchas nítidas e separadas que provavelmente podem pertencer a uma das classes destes metabolitos: fitoesteróides, triterpenos, diterpenos, fenóis (taninos e flavonóides). Todavia, trabalhos realizados por (Dávalos et al., 2009) (Rijke et al., 2006) e (Sathiavelu & Arunachalam, 2012). A cromatografia em camada fina de extractos metanólicos de folhas revelou a presença das classes de metabolitos acima referidos. Contudo, no presente trabalho, na cromatografia de coluna, foram isolados quatro compostos, sendo dois na planta *Cassiytha Filiformis* nos extractos brutos de DCM e AcOEt, na fracção metanólica e dois na planta *Pavetta Kotdzei*, nos extractos brutos de DCM e AcOEt, nas fracções metanólicas. Não foi possível proceder-se a caracterização destes compostos.

5.2. FITOQUÍMICA QUANTITATIVA

Compostos fenólicos e flavonóides são amplamente difundidos no reino vegetal e são reconhecidos pela sua actividade antioxidante; compostos fenólicos tais como ácidos fenólicos(ácido gálico) e flavonóides (quercetina e rutina) foram identificados nos extractos brutos das folhas (Alta et al., 2017).

Os compostos fenólicos estão fortemente dispersos pelo reino vegetal e também se encontram em microrganismos, participando do metabolismo animal. Porém, os animais como não são capazes de sintetizar o anel aromático, utilizam os que se encontram inseridos na dieta alimentar (Brito, 2015).

O teor de fenóis totais determinado nos quatro extractos foi avaliado usando o reagente de Folin-Ciancalteu, o qual têm sido amplamente usado para a quantificação dos compostos fenólicos em diversos extractos de plantas. O reagente é composto pelos ácidos fosfotungsténico e fosfomolibdénico em que estes ácidos sofrem a redução do seu potencial de oxidação de +6 para +5, quando em contacto com os extractos que contenham na sua composição os compostos fenólicos, formando colorações azuladas. O teor dos fenóis totais foi determinado usando ácido gálico como padrão o qual foi submetido a reacção com Reagente de Folin-Ciancalteu em diferentes concentrações. Foi determinada a análise de regressão linear $Y = 0.025X - 0.1056$; $R^2 = 0.9916$. A Fig.23, ilustra a recta determinada na faixa de concentrações de 0.0 – 60,0 mg L⁻¹.

Os valores dos fenóis totais nos extractos MeOH/H₂O variaram de 473.854 ± 0.794 mgGAE/g para 687.282 ± 0.630 mgGAE/g desde a *cassytha até Pavetta* (tabela IX); observou-se que nos extracto AcOEt houve um aumento significativo no teor de fenóis, de 443.947 mgGAE/g a 469.307 mgGAE/g da planta *cassytha* para a *Paveta*; bem como de 271.647 mgGAE/g a 408.217 mgGAE/g no extracto DCM. No extracto n-Hex os teores de fenóis nas plantas *cassytha* (185.897 mgGAE/g), *Commiphora* (202.043 mgGAE/g), *Ochna* (204.688 mgGAE/g) e *Pavetta* (231.684 mgGAE/g), não apresentaram diferença significativa entre elas para (P<0.05). Assim, o teor de fenóis totais foi decrescendo na ordem: MeOH/H₂O > AcOEt > DCM > n-Hex, Analisando o teor de fenois totais (tabela IX) nota-se que há uma tendência e sempre crescente dentro do mesmo solvente assim como entre plantas visto que a medida que diminui a polaridade do solvente de extracção, o teor de fenóis totais também tem a tendência de diminuir. Este facto pode ser devido a compostos como carboidratos e triterpenos que podem estar em maiores concentrações no

extractos MeOH/H₂O e conseqüentemente contribuir para o elevado teor de fenóis mais nestes que em outros extractos. Também pode ser devido a possível formação de complexos de fenóis nestes extractos que são solúveis em metanol e água e estes compostos podem conter mais grupos fenol ou elevado peso molecular que os compostos presentes nos outros extractos. Estes resultados são similares aos demonstrados por (Diem et al., 2013).

Estudos realizados no género *Cassytha*, não fazem menção ao teor de fenóis totais, porém, (Edewor et al., 2016) determinaram o teor de saponinas em extractos metanólicos do género *Cassytha*; 561.723 mgEAG \pm 0.458. Enquanto que estudo realizado por (Eliana et al., 2013) em extractos metanólicos do género *Commiphora* revelaram teores baixos de fenóis totais (1,176 \pm 0,263mgEAG.g⁻¹) contudo, (Sousa et al., 2007) obtiveram teores altos de fenóis totais (483,63 mg de EAG.g⁻¹ \pm 26,00) em extractos etanólicos de outras espécies; 685.909 mgEAG/g \pm 0.200 *O. Natalitias* todavia, (Federal & Catarina, 2008) obtiveram teores baixos de fenóis totais em extractos de AcOEt de (333,8 mg EAG.g⁻¹ \pm 20,5). No género *Ochna* quando comparados com os do presente estudo e 687.282 mgEAG.g⁻¹ \pm 0.630 de *Pavetta klotzkei* em relação ao género devido à pouca literatura disponível. Dos escassos trabalhos publicados deste género não se fez a determinação dos fenóis totais e conseqüentemente não há termo de comparação.

Regra geral, o aumento de polaridade do solvente causa o aumento dos compostos fenólicos e por seu turno, a polaridade do solvente tem efeito na concentração de teor de compostos fenólicos e nota-se que a fitoquímica demonstrou estarem presentes em todas as fracções e extractos brutos os compostos fenólicos.

5.3. ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os compostos fenólicos sempre foram os responsáveis pela actividade antioxidante. O teor de fenóis totais mostrou-se directamente proporcional à sua actividade antioxidante. A actividade antioxidante das plantas é geralmente relacionada ao teor de seus compostos fenólicos. Por esta razão alguns estudos têm avaliado a relação existente entre a actividade antioxidante dos produtos das plantas e seus teores em fenóis totais. Neste estudo foi encontrada a relação entre eles, pois os resultados demonstraram que existe relação entre o teor de fenóis totais e a actividade antioxidante o que entra em concordância com a ideia de que compostos fenólicos desempenham papel importante nos sistemas de redução de radicais livres. Contudo, estes resultados devem ser interpretados com cautela pois, o método usado para a determinação de fenóis totais é pouco selectivo devido ao reagente Folin-Ciancalteu que reage positivamente com diferentes antioxidantes (compostos fenólicos e substâncias não fenólicas) (Zemmouri, Ammar, & Boumendjel, 2014).

Compostos fenólicos são metabolitos secundários das plantas os quais estão presentes em todas as plantas e produtos das plantas. A maioria dos compostos fenólicos têm demonstrado conter elevados níveis de actividade antioxidante. Estes compostos presentes nas plantas actuam como antioxidantes devido ao seu grupo hidroxil o qual contribui directamente para a acção antioxidante. Assim, os compostos fenólicos são efectivos doadores de hidrogénio, fazendo deles bons antioxidantes (Subramanian et al., 2013).

Os compostos fenólicos são um grupo selectivo de antioxidantes que se ajustam à classe de fenóis simples. A actividade antioxidante destes compostos está relacionada com a sua estrutura química e propriedades reductoras. Os intermediários formados pelos compostos fenólicos possuem elevada estabilidade devido a ressonância do anel aromático (Alta et al., 2017).

Antioxidantes derivados de plantas, especialmente polifenóis e flavonóides têm sido descritos por possuírem várias propriedades tais como anticâncer, antidiabético, antiangínico, prevenção de doenças cardiovasculares entre outras. Acredita-se que a acção dos polifenóis é devido às propriedades redox as quais jogam um papel preponderante na absorção e neutralização de radicais livres, sequestrando os oxigénios singlete e tripleto ou decompondo os peróxidos. Os flavonóides também, possuem actividade de manutenção harmonal nas células condição extrema para a

produção hormonal. As plantas possuem compostos fenólicos, tais como taninos e flavonóides que, devido ao seu elevado teor o são lhes conferidas propriedades antioxidantes naturais resultantes da sua habilidade de sequestrar radicais livres e espécies reactivas de oxigénio. Possuem estrutura perfeita para o efeito, pois agem como antioxidante de forma mais efectiva do que algumas vitaminas, tais como a vitamina C, E e A. O poder dos flavonóides agirem como antioxidante está ligada ao poder de oxidação dos mesmos (Sathiavelu & Arunachalam, 2012) (Brito, 2015).

Há evidências de que a formação excessiva de radicais e conseqüentemente, o stress oxidativo podem causar diversas doenças como aterosclerose, infertilidade, doenças cardiovasculares, envelhecimento, diabetes mellitus, imunossupressão, perda de cabelos, angina, doenças neurodegenerativas tais como doenças de Alzheimer e Parkinson entre outras (Etelvina & Martins, 2016) e o organismo humano possui mecanismos de defesa para conter os radicais livres das enzimas como superóxido dismutato, catalase e peroxidase glutathionica, vitaminas C e E, selénio, β -caroteno, licopeno, luteína e outros carotenóides que tem sido usados como antioxidantes suplementares (Olutayo et al., 2013).

Neste estudo, a avaliação do poder redutor nos quatro extractos brutos com diferentes polaridades foi investigada usando o método de redução do ião férrico. O princípio do método baseia-se na reacção do Fe^{3+} do complexo ferricianeto para a sua forma mudando a sua coloração gradualmente de amarelo esverdeado para azul da prússia. A mudança gradual de coloração indica que a amostra contém agentes antioxidantes (Rhazi et al., 2015). A redução do ião férrico nos quatro extractos brutos das quatro amostras de plantas foi determinado em comparação com o padrão **rutina** a uma concentração de $125\mu g mL^{-1}$ a qual foi atribuída um poder redutor de 100%. Usando a equação 2, o poder redutor foi determinado na faixa de concentrações que variam de 2.5 a $125\mu g mL^{-1}$. O aumento dos valores de absorvência nos extractos a 700nm indica o aumento da habilidade reductiva dos extractos brutos (Subramanian et al., 2013).

Os resultados do doseamento do poder redutor expressos em $\mu g mL^{-1}$ tabela XIV indicam que todos os extractos mostraram efeitos reductivos. O poder redutor dos extractos variou significativamente ($P < 0.05$) em todos os extractos.

No presente trabalho, os quatro extractos das quatro plantas foram capazes de reduzir o ião férrico para o ferroso. Assim, os extractos DCM, AcOEt e MeOH/H₂O foram mais activos quando comparados com os de n-Hex pois nestes extractos a quantidade de fenóis totais determinado foi reduzido quando comparado com o de outros extractos daí a actividade antioxidante detectada nestes extractos ser devido a existência de compostos como aminas e outros antioxidantes como a vitamina C. E também pelo facto de este solvente arastar óleos e gorduras. Os fitoesteróis são conhecidos como precursores hormonais e os resultados do poder reductor dos extractos brutos de diferentes polaridades obedeceram a ordem decrescente de polaridade, isto é, **MeOH/H₂O > AcOEt > DCM > n-Hex**. Portanto, o presente estudo teve também por objectivo demonstrar que houve correlação entre os fenóis totais e actividade antioxidante o que é concordante com a maioria dos estudos já realizados (Review, 2014).

Dados obtidos neste estudo, mostraram que existe correlação entre os fenóis totais e a actividade antioxidante nos extractos das folhas das plantas em que o aumento da polaridade dos solventes leva a um aumento do teor em fenóis e consequentemente da actividade antioxidante. Os extractos de *C. Filiformes*, *C. Schelcher*, *O. Natalítias* e *P. Kottdzei* na Fig.24 mostram o aumento do poder reductor em função do aumento concentração.

Durante o rastreio fitoquímico, no extracto n-Hex quase não foram detectados compostos fenólicos. O poder reductor destes compostos, assim como a sua actividade antioxidante podem ser devido à presença de aminas e de outros antioxidantes tais como a vitamina C.

Á capacidade medida do poder reductor, pela transformação induzida pelos extractos etanólicos de Fe³⁺ para Fe²⁺, o método aplicado por (Siheem et al., 2015), no intervalo de concentração em análise, mostrou que o poder reductor de cada extracto aumenta linearmente com a concentração

Nos extractos MeOH/H₂O o género que obteve melhor resultado para o parâmetro em análise é a *Pavetta*, destacando-se com um teor de (CE₅₀ de 1.008±0.004 µg mL⁻¹) seguida dos géneros *Commiphora* e *Ochna* com valores de CE₅₀ de 2.090±0.121µg mL⁻¹ e 2.090±0.121µg mL⁻¹ respectivamente. De referir que entre estes géneros não houve diferença significativa nos resultados do poder reductor. Por fim o género *Cassytha* apresentou o valor de CE₅₀ de 3.392 ±0.011 µg mL⁻¹. Nos extractos de n-Hex e DCM o destaque vai para o género *Cassytha* com teores baixos de CE₅₀ que variam de 36.765±0,510 e 57.791±1.064µg mL⁻¹ respectivamente.

Os resultados da avaliação quantitativa da actividade antioxidante (%PR) dos extractos n-Hex, DCM, AcOEt e MeOH/H₂O de folhas de *Cassytha Filiformis*, *Commiphora Schlechter*, *Ochna Natalitias* e *Pavetta Kotdzei* estão apresentados nas tabelas XI, XII, XIII e XIV respectivamente. As diferenças na capacidade antioxidante dos extractos pode ser atribuída a variabilidade qualitativa dos compostos. Por exemplo, a actividade antioxidante dos ácidos fenólicos e seus derivados tais como ésteres, depende do número de grupos hidroxil nas moléculas. Em adicção, têm sido reportados que a potência antioxidante dos flavanóides é directamente proporcional ao número de grupos hidroxil e é positivamente afectada pela presença de o-dihidroxil maioritariamente no anel B. Para os extractos hidrometanólicos, esta particularidade é explicada pela elevada capacidade antioxidante dos extractos hidrometanólicos. Mais ainda, a elevada capacidade antioxidante foi também reportada por (Zemmouri et al., 2014). Nos compostos identificados em extractos etanólicos e aquosos. geralmente assume-se que a habilidade de agir como doador de hidrogênio e como inibidor da oxidação é devido à sinergias entre os antioxidantes contidos nas amostras os quais fazem com que a capacidade antioxidante dependa não apenas da concentração dos fenóis, mas também da sua estrutura bem como da interação entre eles (Zemmouri et al., 2014). Assim, é possível deduzir que o poder redutor dos extractos n-Hex e DCM é baixo que nos extractos MeOH/H₂O devido ao baixo teor de fenóis nos referidos extractos. Observou-se uma correlação positiva entre o poder redutor e a concentração dos extractos de folhas de *Cassytha Filiformis*, *Commiphora Schlechter*, *Ochna Natalitias* e *Pavetta Kotdzei* conforme mostrado na figura 23. No entanto, os extractos de DCM dos géneros *Cassytha* e *Pavetta* têm um ponto de intersecção o que significa que as mesmas experimentam a mesma actividade quando a concentração é igual (5,85mg mL⁻¹). Logo, existe uma relação com tendência linear com os valores dos quadrados de coeficiente de correlação de Pearson (R^2 que variam de 0.957 a 0.998) nos quatro solventes de extracção das folhas das plantas em análise. (Mythili et al., 2011) reportaram que extractos de n-Hex, AcOEt e MeOH de *Cassytha Filiformes*, foram usados para a determinação da actividade antioxidante e enfatizaram o facto de os extractos metanólicos possuírem potente actividade antioxidante em comparação com o toluenohidroxil butilato (BHT). os extractos metanólicos foram também avaliados aplicando o método de redução do ferro e os resultados obtidos sugerem que os extractos metanólicos possuem um potencial terapêutico promissor e podem ser aplicados como uma fonte primária para o desenvolvimento de novos medicamentos pelas indústrias farmacêuticas. A maior parte de compostos fenólicos particularmente os dietéticos

presentes no género *Cassytha*, tem sido reportados por possuírem substancial actividade anticancerígena e antimutagénica e a maior parte destes compostos fenólicos ocorre naturalmente e reteêm as actividades antioxidante e quimioprotectivas. Entretanto, (Iluz et al., 2010) reportaram que estudos preliminares do género *Commiphora* revelaram possuir actividade antibacteriana a qual valida o uso desta planta nas comunidades indianas para o tratamento de feridas. Todavia, (Makhafola et al., 2012) reportaram que nas espécies do género *Ochna* foram isolados flavanóides e biflavanóides com actividades antimalárica, anti HIV e antibacteriana; enquanto que (Gupta et al., 2013) reportaram a actividade antimicrobiana dos fitoconstituíntes como fenóis, taninos, terpenóides, óleos essenciais, alcalóides, saponinas e flavonóides nas folhas da espécie pavetta e além de descrever a planta, estudos farmacológicos deste género revelaram actividades antiplasmódio, antimalárica bem como a actividade hipotensiva e in vitro actividades antimicrobiana, antiprotozoária e antitumor.

A tabela XIV sumariza as propriedades de todas amostras e os valores de EC₅₀ expressos forma de ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para comparação. Nesta base, em média associa-se o baixo poder redutor com os valores elevados de EC₅₀. Isto verifica-se nos extractos n-Hex nas plantas *Cassytha* e *Pavetta*; extractos DCM das plantas *Cassytha*, *Commiphora* e *Pavetta* bem como os nos extractos AcOEt nas plantas *Cassytha* e *Paveta* com valores elevados de EC₅₀; os níveis de antioxidantes presentes nos extractos MeOH/H₂O são suficientemente elevados que podem garantir sua exploração nas formulações nutracêuticas e alimentos.

A correlação de Pearson analisa a relação entre o teor de fenóis e a actividade antioxidante que se verifica nas amostras estudadas. Mas, pequenas considerações foram dadas devido a existência de variações qualitativas e ou quantitativas no perfil dos fenóis. Mais ainda, o teor de fenóis totais é reportado como sendo responsável pela actividade antioxidante (Zemmouri et al., 2014). Assim, a avaliação da correlação entre a actividade antioxidante e o perfil dos compostos fenólicos demonstrados na tabela XIV. Fazendo a análise de dados pela correlação de Pearson. A correlação mais pronunciada foi observada nos extractos MeOH/H₂O com o destaque para as plantas *Commiphora* ($r = 0.9975$), *Ochna* ($r = 0.9965$) e *Paveta* com ($r = 0.9963$) com excepção da planta *Cassytha* cujo ($r = 0.9859$) no mesmo extracto. Estes resultados sugerem que os fenóis os quais constituem a maior parte dos compostos presentes nos extractos que habilitam a potente actividade antioxidante. Porque estes são altamente reactivos como hidrogénio e doadores deste. A menor correlação foi observada apenas nos extractos n-Hex ($r = 0.957$) planta *Pavetta*.

De um modo geral pode se dizer que a mistura MeOH/H₂O como solvente de extracção, pode ter facilitado na extracção de todos os compostos solúveis em ambos solventes. Este solvente pode arastar mais compostos fenólicos e em concentrações elevadas que sejam responsáveis por causar efeito redutor. Com base nestes factos, pode se afirmar que o melhor solvente para a extracção de compostos fenólicos é a mistura MeOH/H₂O.

Admitindo que as plantas em estudo contêm substâncias naturais que podem ser responsáveis pela protecção contra os riscos de muitos processos patológicos, os resultados descritos neste trabalho estimulam a continuidade dos estudos para isolar, caracterizar e avaliar a acção antioxidante nas folhas das espécies *Cassytha Filiformis*, *Commiphora Schlechter*, *Ochna Natalitias* e *Pavetta Kkotdzei*.

Os resultados dos extractos investigados neste trabalho, mostram a presença de vários fitoquímicos com destaque para fenóis, flavanóides e triterpenos; com estes fitoconstituíntes este facto aliado ao número de compostos fenólicos presentes e os valores do poder redutor encontrados nos extractos MeOH/H₂O deste trabalho sugerem para uma investigação mais aprofundada em termos de isolamento e caracterização destes fitoconstituíntes. De referir que até ao presente momento esta é a primeira vez que se investiga sobre o conteúdo dos fenóis e a actividade antioxidante das espécies estudadas.

6. CONCLUSÕES

Com base no estudo realizado, no presente trabalho foi feita a triagem fitoquímica nos extractos brutos e nas fracções de AcOEt e MeOH/H₂O monitoradas pela cromatografia em camada fina, foram quantificados os fenóis totais pelo método de Folin - Ciancalteu bem como do poder redutor aplicando o método de redução do ferro em todos os extractos brutos das folhas nas quatro plantas estudadas. Todos os extractos e as fracções das plantas estudadas revelaram a presença de fitoesteróis, fenóis, flavanóides, triterpenos, taninos e diterpenos:

- Na triagem fitoquímica, na planta *Cassytha Filiformis* todos os extractos evidenciaram a presença de fitoesteróis, glicósidos, fenóis (taninos e flavanóides) enquanto que os diterpenos e triterpenos apenas foram detectados nos extractos MeOH/H₂O;
- Na planta *Commiphora Schlechteri* os fitoesteróis e triterpenos foram identificados no extracto n-Hex e os diterpenos positivos no mesmo extracto, contudo todos os outros extractos evidenciaram a presença de outros metabólitos.
- Na planta *Ochna Natalitias* em todos os extractos foram detectados os fitoesteróis, glicósidos, fenóis, taninos, flavaóides com a excepção dos triterpenos que se mostraram presentes nos extractos n-Hex e hidrometanólicos, bem como os diterpenos deram positivo no extracto hidrometanólico;
- por último na planta *Pavetta Kotzei* todos os extractos mostraram presença de fenóis, fitoesteróis e flavanóides enquanto que os glicósidos apenas foram detectados nos extractos hidrometanólicos e n-Hex respectivamente.

Com base na cromatografia de coluna, foram isolados quatro compostos, sendo dois na planta *Cassytha Filiformis* na fracção MeOH, extractos brutos de DCM e AcOEt, e dois na planta *Pavetta Kotzei*, nas fracções metanólicas, extractos brutos de DCM e AcOEt. Não foi possível fazer-se a caracterização destes compostos.

Neste estudo, foram determinadas as propriedades (antioxidante e fenóis totais) nos extractos n-Hex, DCM, AcOEt e MeOH/H₂O nas plantas *C. Filiformes*, *C. Schelcherer*, *O. Natalítia* e *P. Kotzei*. Os elevados teores de fenóis totais foram observados nos extractos hidrometanólicos com

destaque para a planta *P. Kotdzei* e o teor de fenóis demonstrou a ordem *P. Kotdzei* > *O. Natalitia* > *C. Schercherer* > *C. Filiformis*;

O maior poder redutor observou-se nos extractos brutos hidrometanólicos. Este facto é justificado pelo teor elevado de fenóis que os extractos apresentaram e ainda pela tendência linear que as variáveis poder redutor e concentração apresentaram. Este facto é secundado também pelos valores de CE₅₀ mostraram-se baixos nestes mesmos extractos para as plantas *C. Schelcher*, *O. Natalitias* e *P. Kotdzei*, o que era de se esperar. Assim, a actividade antioxidante e o teor dos fenóis totais nas plantas obedeceram a mesma ordem *Pavetta Kotdzei* > *Ochna Natalitias* > *Commiphora Schlechter* > *Cassitha Filiformis*.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que as quatro plantas possuem potente actividade antioxidante bem como a existência de fitoconstituíntes que contribuem particular e efectivamente para a acção redutora, o que justifica a utilização destas plantas na medicina tradicional para o tratamento de doença degenerativas tais como as cardiovasculares, cancerígenas, diabéticas, reumáticas, infertilidade entre outras e também considerando que substâncias naturais podem ser responsáveis pelo efeito de protecção contra os riscos de muitos processos patológicos.

7. RECOMENDAÇÕES

Os metabolitos secundários detectados pelos testes fitoquímicos bem como pela Cromatografia em Camada Fina (TLC), podem ser responsáveis pelos efeitos antioxidantes observados nos extractos das plantas estudadas, contudo estes são ainda resultados preliminares deste trabalho de investigação a pesar de se conhecer a composição destes extractos até agora, ainda não é conhecida a configuração absoluta destes compostos isolados a partir destas espécies.

Assim, abre-se um amplo campo de investigação científica necessário para realizar mais estudos relacionados com as etapas de isolamento e caracterização de cada um dos compostos fenólicos responsáveis pela actividade antioxidante e podem ser ainda mais exploradas as aplicações nas áreas farmacêutica, cosmetologia e nutricional;

Deste modo, que se aplique métodos mais avançados de separação tal como é o caso da Cromatografias Gasosa (GC) e a líquida de alta eficiência (ACLAE) acoplados a espectrometros de massa e de RMN; Estes, iriam contribuir para o isolamento, identificação bem como para a elucidação estrutural sem nenhum equívoco dos componentes das plantas aqui estudadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alakali, J. S., Ismaila, A. R., Alaka, I. C., Faasema, J., & Yaji, T. A. (2016). Quality Evaluation of Herbal Tea Blends from Ginger and Pavetta crassipes, *I2(4)*, 1–8.
<https://doi.org/10.9734/EJMP/2016/23706>
- Alta, U. D. E. C., Regional, U., Noroeste, D. O., Estado, D. O., Grande, R. I. O., & Sul, D. O. (2017). caracterização de compostos fenólicos do extrato da casca de Schinus lentiscifolius (anacardiaceae) e seu efeito sobre a resposta celular ao estresse em caracterização de compostos fenólicos do extrato da casca de schinus lentiscifolius (anacardiaceae .
- Basica, C. F., Federal, D. U., & Preto, O. (2016). Flavonóides : potencial terapêutico no estresse oxidativo Flavonóides : potencial terapêutico no estresse oxidativo, (October).
- Bello, I. A., Ndukwe, G. I., Audu, O. T., & Habila, J. D. (2011). A bioactive flavonoid from Pavetta crassipes K . Schum, 1–5.
- Brito, N. (2015). avaliação fitoquímica e antioxidante de plantas MEDICINAIS DO, (January 2013).
- Bruschi, P., Morganti, M., Mancini, M., & Signorini, M. A. (2011). Traditional healers and laypeople : A qualitative and quantitative approach to local knowledge on medicinal plants in Muda (Mozambique). *Journal of Ethnopharmacology*, *138(2)*, 543–563.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.09.055>
- Ciências, F. D. E., & Mendes, D. G. (2011). Departamento de Química e Bioquímica Valorização das plantas medicinais em termos dos seus princípios activos Departamento de Química e Bioquímica Valorização das plantas medicinais em termos dos seus princípios activos.
- Dafreville, S., & Humeau, L. (2013). Genetic and floral variation in two closely related Jumella spp .(Orchidaceae) in Mascarene Islands, (January).
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.02.140>
- Dávalos, J. H., Lomelí, M. G., López, F. S., Sahagún, A. R., Morales, A., Río, D., ... Sánchez, T.

- (2009). screening fitoquímico y capacidad antiinflamatoria de hojas de *Tithonia tubaeformis*, 53–60.
- Development, D. (n.d.). evaluation of pharmacognostic parameters and hepatotoxic effects of extracts of *Cassipouira filiformis* Linn on paracetamol-induced liver disorders in wister rats
evaluation of pharmacognostic parameters and *filiformis* Linn on paracetamol-induced liver.
- Diem, Q., Elisa, A., Tran-nguyen, P. L., & Ju, Y. (2013). ScienceDirect Effect of extraction solvent on total phenol content , total flavonoid content , and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(3), 296–302.
<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001>
- Edewor, T. I., Owa, S. O., Ologan, A. O., & Akinfemi, F. (2016). *Journal of Coastal Life Medicine*, 4(2), 154–156. <https://doi.org/10.12980/jclm.4.2016j5-210>
- Eliana, C., Lara, D., Valota, R., Gebara, K. S., Cesar, R., Silva, D. L., & Simionatto, E. (2013). Avaliação da atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos em extrato metanólico obtido de folhas da *Commiphora Myrrha* Evaluation of antioxidant activity and phenolic compounds content in methanol extract obtained from leaves *Commiphora Myrrha*, 117–124. <https://doi.org/10.5433/1679-0375.2013v34n1p117>
- Etelvina, U., & Martins, C. (2016). Determinação da composição de fenólicos e atividade antioxidante de espécies de plantas utilizadas na medicina popular brasileira.
- Federal, U., & Catarina, D. E. S. (2008). e s t u d o f i t o q u í m i c o d e o c h n a s e r r u l a t a m o n i t o r a d o p o r b i o e n s a i o s s i m p l e s .
- Gupta, V. K., Kaur, C., Simlai, A., & Roy, A. (2013). Antimicrobial activity of *Pavetta indica* leaves, 3(04), 78–82. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2013.3414>
- Hanuš, L. O., Řezanka, T., & Dembitsky, V. M. (2005). MYRRH – COMMIPHORA CHEMISTRY, 149(1).
- Ho, Y., Huang, S., Deng, J., Lin, Y., Chang, Y., & Huang, G. (2012). In vitro antioxidant properties and total phenolic contents of wetland medicinal plants in Taiwan, 55–66.
- Hoet, S., Block, S., Wautier, M. C., & Stévigny, C. (2004). Studies on *Cassipouira filiformis* from

- Benin : isolation , biological activities and quantification of aporphines, 81–107.
- Ibekwe, N. N., Orishadipe, A. T., Boshoff, H., Adesomoju, A. A., Okogun, J. I., & Barry, C. E. (2012). In vitro antimycobacterial studies on the leaf extracts and fractions of *Pavetta crassipes* K . Schum, *6*(2), 55–58. <https://doi.org/10.5897/AJPAC11.094>
- Iluz, D., Hoffman, M., Gilboa-garber, N., Amar, Z., & Israel, R. (2010). Medicinal properties of *Commiphora gileadensis*, *4*(August), 516–520.
- Investigation, E., Five, O. F., In, U., & Folkloric, investigation of five plants, *4*(4), 230–236.
- Jan, M. T. (2009). Chemical and biological characterization of antibacterial compounds present in *Ochna pretoriensis* (*Ochnaceae*) leaf extracts, (November).
- Kumar, A., & Mahato, R. (2013). Note on the Distribution of *Commiphora stocksiana* Engl . In *Kachchh : A Rare Medicinal Plant of India Need Conservation*, (August 2016).
- Luís, P., & Moraes, R. De. (2005). Sinopse das lauráceas nos estados de goiás e tocantins, brasil, *5*, 1–18.
- Makhafola, T. J., Eloff, J. N., Programme, P., & Sciences, V. (2012). Five *Ochna* species have high antibacterial activity and more than ten antibacterial compounds, *108*, 1–6.
- Medica, P., Abdillahi, H., Society, C., & Africa, S. (2013). Application of Medicinal Plants in Maternal Healthcare and Infertility : A South African Perspective Application of Medicinal Plants in Maternal Healthcare and Infertility : A South African Perspective, (April).
- Mythili, S., Gajalakshmi, S., Sathiavelu, A., & Sridharan, T. B. (2011). Pharmacological Activities of *Cassipourea Filiformis* : A Review, *1*(1), 77–83.
- Ndoile, M. M. (2012). Structure , Synthesis and Biological Activities of Biflavonoids Isolated from *Ochna serrulata* (*Hochst .*) Walp ., (May).
- Olutayo, O., Doyinsola, I., Simon, O., Abayomi, O., Science, S., & Shestco, T. C. (2013). Phytochemical and antioxidant properties of some Nigerian medicinal plants, 328–332. <https://doi.org/10.5251/ajsir.2013.4.3.328.332>
- Palhares, R. M., Drummond, M. G., & Alves, S. (2015). Medicinal Plants Recommended by the World Health Organization : DNA Barcode Identification Associated with Chemical

- Analyses Guarantees Their Quality, 1–29. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127866>
- Paul, M. D. (2002). *A Biosynthetic Approach. Pharmaceutical Sciences* (Vol. 0471496405). <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.01.005>
- Pessoa, U. F. (2013). Atividades Biológicas dos Flavonoides : Atividade Antimicrobiana.
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Hartmann-Schmidlin, S., Kähkönen, M., Heinonen, M., Määttä-Riihinen, K., & Oksman-Caldentey, K. M. (2005). Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 98(4), 991–1000. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02547.x>
- Rao, V. (2012a). – *a global perspective of their role in Edited by Venketeshwer Rao*. <https://doi.org/10.5772/1387>
- Rao, V. (2012b). *Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*. <https://doi.org/10.5772/2375>
- Review, P. (2014). study of total phenolics , flavonoids contents and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of different polarities fruits crude extracts of D atura metel L . C omparative, 4(5), 378–383. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60591-0](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60591-0)
- Rhazi, N., Hannache, H., Oumam, M., Sesbou, A., Charrier, B., Pizzi, A., & Bouhtoury, F. C. (2015). Green extraction process of tannins obtained from Moroccan Acacia mollissima barks by microwave : Modeling and optimization of the process using the response surface methodology rsm. *arabian journal of chemistry*.<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.04.032>
- Ribeiro, A., Romeiras, M. M., Tavares, J., & Faria, M. T. (2010). Ethnobotanical survey in Canhane village, district of Massingir, Mozambique: medicinal plants and traditional knowledge. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 6, 33. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-6-33>
- Rijke, E. De, Out, P., Niessen, W. M. A., Ariese, F., Gooijer, C., & Th, U. A. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids, 1112, 31–63. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.019>
- Sarup, P., Bala, S., & Kamboj, S. (2015). Pharmacology and Phytochemistry of Oleo-Gum Resin

of *Commiphora wightii* (Guggulu), 2015.

Sathiavelu, M., & Arunachalam, S. (2012). High performance thin layer chromatography profile of *Cassytha filiformis*.

Sihem, D., Samia, D., Gaetano, P., Sara, L., Giovanni, M., Hassiba, C., ... Ahmed, H. (2015). *Scientia Horticulturae* In vitro antioxidant activities and phenolic content in crop residues of Tunisian globe artichoke. *Scientia Horticulturae*, 190, 128–136.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.04.014>

Sousa, C. M. D. M., Rocha, H., Vieira-jr, G. M., Ayres, M. C. C., Costa, L. S., Araújo, D. S., ... Moore, M. H. E. (2007). *Artigo*, 30(2), 351–355.

Steenkamp, V. (2003). Traditional herbal remedies used by South African women for gynaecological complaints, 86, 97–108. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00053-9](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00053-9)

Subramanian, R., Subbramaniyan, P., & Raj, V. (2013). Antioxidant activity of the stem bark of *Shorea roxburghii* and its silver reducing power, 2(1), 1. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-28>

Thesis, M. (2012). Graduate Institute of Pharmacognosy College of Pharmacy Taipei Medical University Study of ethnobotany and phytochemistry of *Pavetta crassipes* leaves and *Calotropis procera* bark from, (July).

Zemmouri, H., Ammar, S., & Boumendjel, A. (2014). Chemical composition and antioxidant activity of *Borago officinalis* L . leaf extract growing in Algeria. *arabian journal of CHEMISTRY*. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.11.059>

ANEXOS

1. Preparação do material vegetal



a) Secagem

b) Moagem

c) Conservação

2. Tratamento do material vegetal até á obtenção do extracto seco



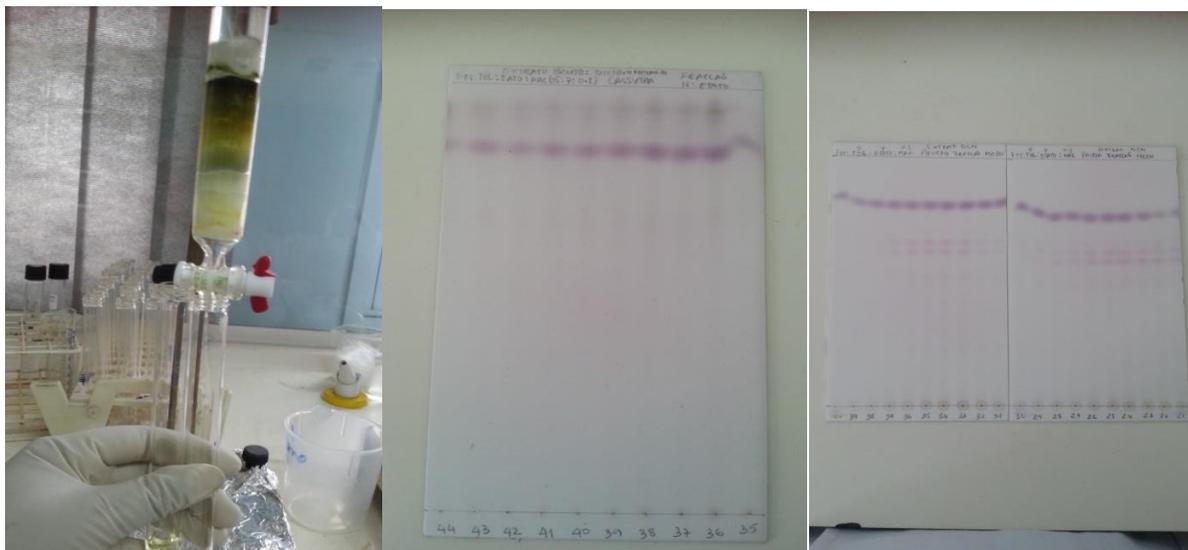
d) Maceração

e) Filtração

f) Evaporação

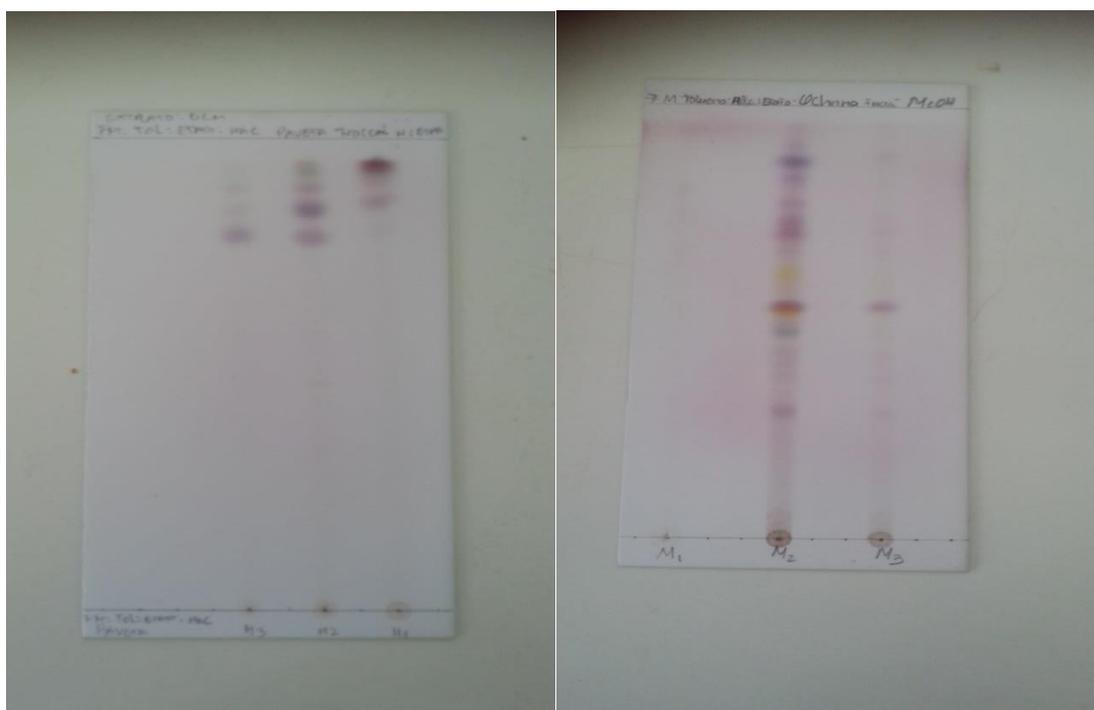
g) Extracto bruto seco

3. Cromatografias de Coluna e de Camada Fina



h) Fraccionamento

i) Cromatogramas de fracções com mesmo perfil

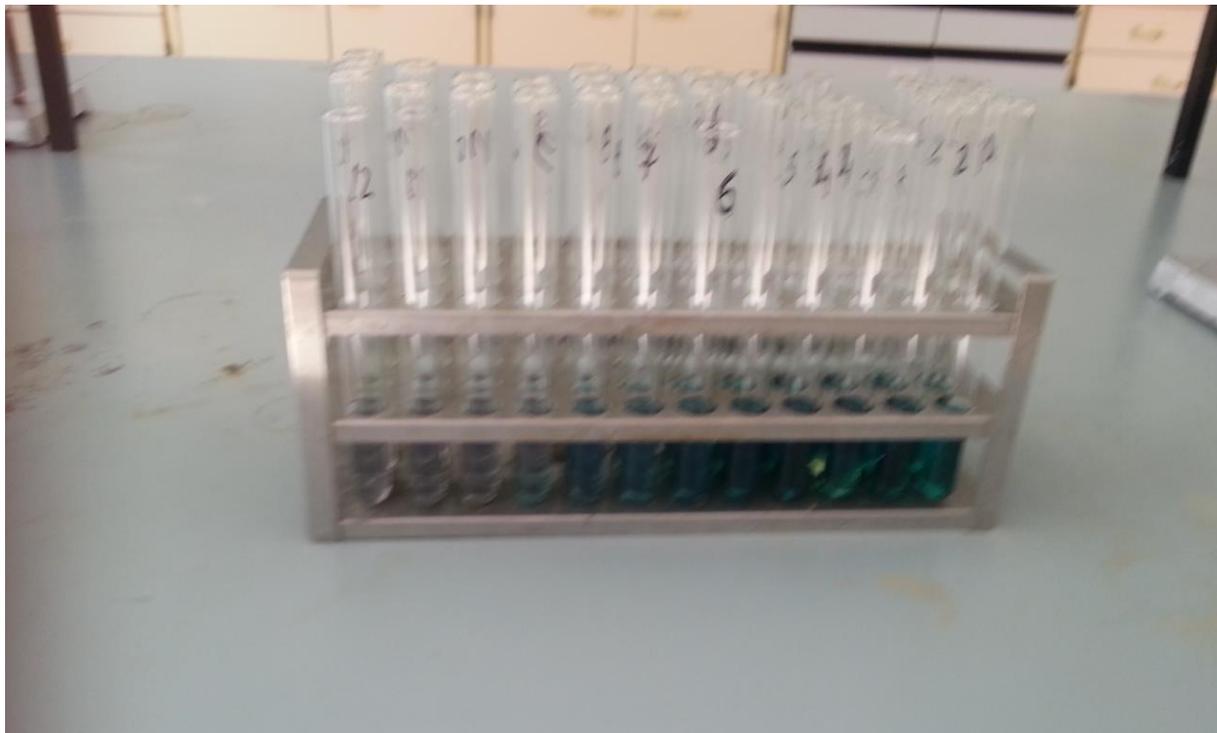


j) Cromatogramas de misturas de fracções

4. Quantificação dos fenóis

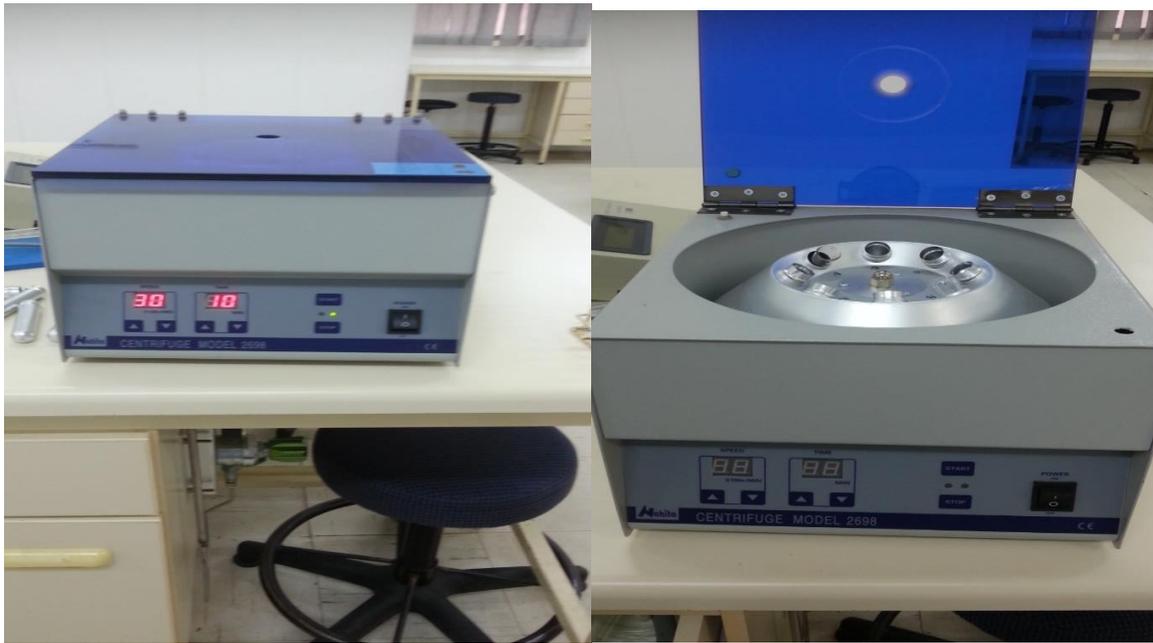


k) amostras preparadas a partir de extractos e incubação por (2 horas)



l) Após 2 horas de incubação → coloração azul → UV/Vis 760 nm

5. Actividade antioxidante



m) Centrifugação de amostras preparadas a partir de extractos



n) Amostras contendo ião férrico → redução → azul da prússia → UV-Vis 700nm

Tabela: Material e reagentes para identificação fitoquímica

MATERIAIS	REAGENTES
<ul style="list-style-type: none">• Beckers de 500ml• Balança analítica “Mettler Toledo ML 204”• Erlenmeyers de 300ml• Balões de fundo redondo de 500ml• Rotavapor“ BUCHI B - 480”• Funis de vidro• Papel de filtro• Garras• Suportes• Varetas de vidro• Tubos de ensaio• Pipetas graduadas• Pipetas volumétricas• Almofarizes• Mão de almofariz• Vidros de relógio• Conta gotas• Cápsulas de porcelana• Tinas• Reveladores• Placas de vidro• Micropipetas• Papel de alumínio• Provetas graduadas (25, 50, 100, 250 e 500mL)	<ul style="list-style-type: none">• n-Hexano 95 %• Anidrido acético $\geq 98,5\%$• Clorofórmio $\geq 99,8\%$• Acetato de etil 99,5%• Metanol $\geq 99,8\%$• Etanol absoluto 99,7-100%• Tolueno $\geq 99,9\%$• Diclorometano 99,5%• Solução saturada de ácido pícrico• Solução de iodeto de bismuto e potássio-K [BiI₄]• Reagente de Meyer: Solução de HgCl₂/KI• Reagente de Wagner: Solução de I₂/KI• FeCl₃ a 10 %• Reactivo de Liebermann: CH₃COOH a 10%/FeCl₃ a 10 %/ H₂SO₄• Reactivo de Borntraeger: NH₄OH a 5%• Ácido sulfúrico concentrado 98%• Solução aquosa de acetato de chumbo 10% Ácido clorídrico 37%• Ácido Acético glacial• Solução de anisaldeído

Tabela : *Material e reagentes para determinação da actividade anti-oxidante e fenóis totais*

MATERIAIS	REAGENTES
<ul style="list-style-type: none">• Estufa de secagem• Centrífoga• Espátulas• Pontas para pipetas automáticas• Pipetas automáticas (200, 500 e 1000μL)• Banho ultrassónico Co – Parmer 5L• Tubos de ensaio• Placas para agitação• Suportes para tubos de ensaio• Balões volumétricos de 10,25,50,100, 200, 500 e 1000mL)• Balança analítica “Mettler Toledo ML 204”• Geleira• Espectrofotómetro Lambida 25	<ul style="list-style-type: none">• Reagente de Folin 10%• Ácido gálico• Na₂CO₃ 7,5%• Água destilada• Reagente de Prússia: C₆ N₆ Fe K₃• FeCl₃ a 0,1 %• Ácido tricloro acético 10%• Potássio férric cianide 1%• NaHPO₄.H₂O• Na₂HPO₄

Tabela : *Sistemas de Solventes usados para a eluição das fracções.*

Extracto	Solvente usado para amostra	Fase móvel (FM)	Solução para confirmação
Hexano	Hexano	a) FM: H:AcOEt(7:3) b) FM: Tol: AcOEt: HAC (5: 7: 0,1)	Solução de anisaldeído
Diclorometano	DCM	a) FM:H:AcOEt(7:3) b) FM: Tol: AcOEt: HAC (5: 7: 0,1)	Solução de anisaldeído
Acetato de etilo	Hex.: AcOEt	a)FM: AcOEt (7:3) b) FM: Tol: AcOEt: HAC (5: 7: 0,1)	Solução de anisaldeído
Hidroalcoólico	MeOH/H ₂ O	a)FM: Hex.: AcOEt (7:3) b) FM: Tol: AcOEt: HAC (5: 7: 0,1)	Solução de anisaldeído

Preparação das soluções para os testes fitoquímicos

Solução de cloreto férrico a 5% (p/v) FeCl₃

Pesou-se 5g de cloreto férrico e dissolveu-se num balão volumétrico de 100 mL e perpez-se o volume.

Solução alcoólica de cloreto férrico a 1% (p/v) FeCl₃

Pesou-se 1g de cloreto férrico e e dissolveu-se num balão volumétrico de 100 mL e perpez-se o volume.

Gelatina a 1% (p/v)

Pesou-se 0,5g de gelatina e dissolveu-se num balão volumétrico de 50 mL e fez-se o volume.

Solução de NaCl a 10%

Pesou-se 5g de NaCl e dissolveu-se num balão volumétrico de 100 mL e fez-se o volume.

Solução de NaOH a 10%

Pesou-se 10g de NaOH e dissolveu-se num balão volumétrico de 100 mL e fez-se o volume.

Solução de Acetato de Chumbo [Pb(CH₃COO)₂] a 10%

Pesou-se 10g de acetato de chumbo e dissolveu-se num balão volumétrico de 100 mL e fez-se o volume.

Solução de NH₄OH a 10 %

Numa proveta de 50 mL mediu-se 20 mL da solução de amónia a 25% e introduziu-se num balão volumétrico de 100mL e fez-se o volume com água destilada.

Reagente de Dragendorff'

Solução A: 1.7 g Nitrato básico bismuto dissolver em 80 ml de água destilada e adicionar 20 ml de ácido tartárico.

Solução B: 16 g iodeto de potássio foram dissolvidos em 40 ml de água destilada.

Misturar solução A e B na proporção 1: 1.

Reagente de Mayer

1.36g de HgCl₂ foram dissolvidos em 60 ml de água destilada e adicionar 5g de KI e fazer o volume de 100 ml

Reagente de Wagner

Dissolver 2g de iodo e 6g de KI em água destilada e fazer o volume até 100 ml.

Reagente de Hager

Pesou-se 1,4g de ácido pícrico e dissolveu-se num balão volumétrico de 50 mL e fez-se o volume.

Solução de anisaldeído

Misturar 0,5mL de anisaldeído + 10mL HAC + 85mL MeOH + 5mL H₂SO₄ conc.