



UNIVERSIDADE E DUARDO MONDLANE
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



Dissertação de Mestrado
em
Química e Processamento de Recursos Locais

Caracterização Química e Avaliação da Actividade Antimicrobiana e Antioxidante das Polpas e Derivados dos Frutos de Massala (*Strychnos spinosa*) e Mapfilwa (*Vangueria infausta*)

Autor: Bonifácio José Maússe

Maputo, Novembro de 2015



UNIVERSIDADE E DUARDO MONDLANE
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



Dissertação de Mestrado
em
Química e Processamento de Recursos Locais

Caracterização Química e Avaliação da Actividade Antimicrobiana e Antioxidante das Polpas e Derivados dos Frutos de Massala (*Strychnos spinosa*) e Mapfilwa (*Vangueria infausta*)

Autor: Bonifácio José Maússe

Supervisores: Prof^a Doutora Amália Uamusse

Prof. Doutor François Munyemana

dra. Alice Manjate

Maputo, Novembro de 2015

Agradecimentos

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar o caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades. Aos meus pais Zaida e José (*in memoriam*) por me terem dado educação, valores e por me terem ensinado a andar.

Especialmente agradeço aos meus filhos Hélder, Éusio, Érica e Riana, os quais foram privados, algumas vezes, da minha presença e entenderam as minhas ausências e meu desejo de realizar esta pesquisa.

Aos meus irmãos que sempre me motivaram, entenderam as minhas faltas e momentos de afastamento e me mostraram o quanto era importante estudar.

À minha família em geral, a qual amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo.

Aos meus supervisores Prof^a Doutora Amália Uamusse, Prof. Doutor François Munyemana e dra. Alice Manjate, por acreditarem em mim e me mostrarem o caminho da ciência.

Aos professores do programa de Mestrado em Química e Processamento de Recursos Locais pelo apoio, ensino e incentivo.

À Prof^a Doutora Fung Dai Kin pelo apoio na revisão, análise e discussão de aspectos científicos do presente trabalho.

Ao Professor Doutor Carvalho Madivate, coordenador do programa de mestrado pelo apoio e incentivo.

Ao Prof. Doutor Arão Manhique, chefe do departamento de Química pelo apoio e incentivo.

Aos meus colegas da turma de Mestrado, pelos laços fortes e energia positiva construída e irradiada durante toda a nossa trajectória. Em especial á Josefina, pela paciência, carinho, companheirismo, palavras de incentivo e amizade.

Ao FNI pelo financiamento do Projecto Frutas Nativas que permitiu a aquisição de amostras, reagentes e materiais necessários para realização desta investigação.

À ASDI pela bolsa de mestrado concedida.

E a todos que, porventura, tenha esquecido de citar.

Declaração sob Palavra de Honra

Eu, **Bonifácio José Maússe**, declaro por minha honra que este trabalho nunca foi apresentado na sua essência para quaisquer fins e é resultado da minha investigação, estando indicadas, ao longo do texto e no capítulo de referências bibliográficas, todas as fontes por mim consultadas.

Maputo, Novembro de 2015

O Autor

Bonifácio José Maússe

Resumo

Em Moçambique, variedades de plantas silvestres alimentares, com elevado potencial nutricional e medicinal e que satisfazem as necessidades das famílias rurais, são largamente distribuídas por todo o país. Os frutos destas plantas são vendidos em mercados informais durante a época de colheita e consumidos de diversas formas. A sua importância na dieta depende da disponibilidade e varia de espécie, região e tradições culturais. Ultimamente, observaram-se diversas iniciativas de desenvolvimento e adaptação de tecnologias de processamento destes frutos nativos de ocorrência espontânea, para produtos derivados como licores, doces e jams, que têm uma declaração da sua aptidão para o consumo humano aprovada pelo MISAU, havendo necessidade de estudar a composição físico-química e fitoquímica, caracterizar e comparar as propriedades nutricionais dos frutos e seus derivados.

No presente trabalho, realizou-se a caracterização físico-química seguindo técnicas e normas descritas pelo Instituto Adolfo Lutz, fez-se a prospecção fitoquímica qualitativa usando métodos descritos por Araujo *et al.* e Silva *et al.* e usando reagentes específicos para identificação dos constituintes químicos, avaliou-se a actividade antimicrobiana pelo método de difusão em agar e avaliou-se a actividade antioxidante aplicando o método do sequestro de radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) das polpas e derivados (licor e jam) dos frutos de *Vangueria infausta* e *Strychnos spinosa*.

Os resultados deste trabalho mostram que o processamento dos frutos para seus derivados não altera em grande medida as suas propriedades físico-químicas. Na prospecção fitoquímica, verificou-se que há em comum nos dois frutos, presença de flavonóides e saponinas e uma diferenciação em relação a outros fitoquímicos analisados. Na avaliação da actividade antimicrobiana de extractos á concentração de 200 mg/ml, os dois frutos não apresentaram inibição ao crescimento das bactérias *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella thyphimurium*, *Staphylococcus aureus* e da levedura *Candida albicans*. Na avaliação da actividade antioxidante, as polpas de *V. infausta* e *S. spinosa* apresentaram maior actividade antioxidante que seus derivados.

Palavras-chave: frutos nativos, fitoquímica, actividade antioxidante, actividade antimicrobiana

Abstract

Mozambique possesses a widespread variety of edible wild plants with high nutritional and medicinal value. These plants are used to fulfil the basic needs of rural communities. Wild fruits are sold in informal markets during the harvesting and are consumed in different ways. The impact of these fruits in the diet depends on the availability, the species and varies according to the region and its cultural traditions. In recent years a number of initiatives have been developed and technologies adapted to process indigenous fruits of spontaneous occurrence into saleable products such as spirits (liquor), sweets and jams. These processed products are approved for human consumption by the ministry of health; however, there is a need of evaluating their physicochemical and phytochemical composition and nutritional properties.

In this study the physicochemical characterization of pulps and derivatives of *Vangueria infausta* and *Strychnos spinosa* fruits was carried out following Adolfo Lutz Institute standard methods. For qualitative phytochemical prospection, the methods described by Araujo *et al.* and Silva *et al.* were applied. The method of diffusion in agar and the method of free radical 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) sequestration were used for antimicrobial activity assessment and for antioxidant activity evaluation, respectively.

The results of this research work show that the processing the fruits to some derivatives did not change significantly the physicochemical properties. The phytochemical screening of the two fruits studied, revealed the presence of flavonoids and saponins in both fruits, while differences were found in other analysed phytochemicals. The evaluation of the antimicrobial activity showed that the two fruit extracts did not inhibit the bacterial growth of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella thyphimurium*, *Staphylococcus aureus* and the fungi *Candida albicans*. The pulps of *V. infausta* and *S. spinosa* exhibited higher antioxidant activity than the corresponding derivatives.

Key-words: native fruits, phytochemistry, antioxidant activity, antimicrobial activity

Índice

Agradecimentos	i
Declaração sob Palavra de Honra	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
1 Introdução	1
1.1 Objectivos.....	4
1.1.1 Geral.....	4
1.1.2 Específicos	4
2 Revisão Bibliográfica.....	5
2.1 Aspectos gerais das famílias Loganiaceae e Rubiaceae.....	5
2.1.1 Descrição da planta <i>Strychnos spinosa</i> e seu uso na medicina tradicional.....	7
2.1.2 Composição físico-química da <i>Strychnos spinosa</i>	8
2.1.3 Composição fitoquímica da <i>Strychnos spinosa</i>	9
2.1.4 Actividade biológica da planta <i>Strychnos spinosa</i>	10
2.1.5 Descrição da planta <i>Vangueria infausta</i> e seu uso na medicina tradicional.....	11
2.1.6 Composição físico-química da <i>Vangueria infausta</i>	13
2.1.7 Composição fitoquímica da <i>Vangueria infausta</i>	14
2.1.8 Actividade biológica da planta <i>Vangueria infausta</i>	14
2.2 Antimicrobianos naturais	16
2.2.1 Mecanismo de acção dos antimicrobianos naturais	17
2.2.2 Métodos de avaliação da actividade antimicrobiana dos extractos vegetais	17
2.2.2.1 Métodos de difusão em agar.....	18
2.2.2.2 Método de diluição em caldo	19
2.3 Métodos de avaliação da actividade antioxidante	20
2.3.1 Fontes de radicais livres.....	23
2.3.2 Mecanismo de acção dos antioxidantes	26
2.3.3 Método do radical DPPH	27

3	Metodologia	29
3.1	Material e Reagentes	29
3.2	Colheita de amostras e preparação de extractos.....	29
3.3	Determinação das propriedades físico-químicas.....	30
3.3.1	Teor de sólidos solúveis (°Brix)	30
3.3.2	Potencial de hidrogénio (pH).....	30
3.3.3	Grau alcoólico (%).....	31
3.3.4	Índice de refração.....	31
3.3.5	Densidade relativa.....	31
3.4	Triagem fitoquímica das amostras	31
3.4.1	Esteróides e Triterpenóides.....	31
3.4.2	Flavonóides	32
3.4.3	Taninos.....	32
3.4.4	Saponinas	32
3.4.5	Alcalóides	32
3.5	Determinação da actividade antimicrobiana	33
3.5.1	Microrganismos	33
3.5.2	Isolamento de colónias puras.....	33
3.5.3	Preparação dos inóculos.....	33
3.5.4	Preparação de soluções de extractos e fracções em diferentes concentrações.....	34
3.5.5	Preparação dos discos	34
3.5.6	Realização dos testes de sensibilidade.....	35
3.5.7	Inoculação das placas de teste.....	35
3.5.8	Aplicação de discos a placas de agar inoculadas	35
3.6	Determinação de fenóis totais	36
3.7	Determinação da actividade antioxidante	37
3.7.1	Construção da curva de calibração	37
3.7.2	Leitura das medidas de absorvância nas amostras.....	38
3.7.3	Determinação da percentagem de DPPH remanescente	38

3.7.4	Determinação da percentagem de inibição	38
3.7.5	Coeficiente de inibição (CI ₅₀)	39
3.7.6	Percentagem da actividade antioxidante (%AA)	39
4	Resultados	40
4.1	Resultados de extracção	40
4.2	Resultados de análises físico-químicas de <i>V. infausta</i> e <i>S. spinosa</i>	40
4.3	Resultados da triagem fitoquímica de <i>V. infausta</i> e <i>S. spinosa</i>	42
4.4	Resultados da avaliação da actividade antimicrobiana de <i>V. infausta</i> e <i>S. spinosa</i>	43
4.5	Resultados da determinação de fenóis totais.....	43
4.6	Resultados da avaliação da actividade antioxidante usando o método DPPH.....	45
4.6.1	Resultados da percentagem de DPPH remanescente	47
4.6.2	Resultados da percentagem de inibição	48
4.6.3	Resultados da determinação do coeficiente de inibição (CI ₅₀)	50
5	Discussão	52
6	Conclusões e Recomendações	57
6.1	Conclusões	57
6.2	Recomendações	57
	Referências Bibliográficas	59

Índice de tabelas

Tabela 1: Conteúdo de minerais do fruto da <i>Strychnos spinosa</i>	8
Tabela 2: Composição (%) e pH (25 °C) do fruto da <i>Strychnos spinosa</i>	9
Tabela 3: Constituintes fitoquímicos das folhas e casca de caule da <i>S. spinosa</i>	9
Tabela 4: Zona de inibição de extractos das folhas de <i>S. spinosa</i>	10
Tabela 5: Zona de inibição de extractos da casca do caule de <i>S. spinosa</i>	11
Tabela 6: Conteúdo de minerais do fruto da <i>Vangueria infausta</i>	13
Tabela 7: Composição do fruto da planta <i>Vangueria infausta</i>	13
Tabela 8: Constituintes fitoquímicos das folhas e raízes da planta <i>V. infausta</i>	14
Tabela 9: Actividade antimicrobiana do extracto aquoso de diferentes partes da planta <i>V. infausta</i>	15
Tabela 10: Actividade antimicrobiana do extracto metanólico de diferentes partes da planta <i>V. infausta</i>	15
Tabela 11: Resultados de extracções dos frutos das plantas <i>V. infausta</i> e <i>S. spinosa</i>	40
Tabela 12: Caracterização físico-química da polpa, jam e licor do fruto <i>V. infausta</i>	41
Tabela 13: Caracterização físico-química da polpa e licor do fruto de <i>S. spinosa</i>	41
Tabela 14: Constituintes fitoquímicos da polpa, licor e jam do fruto da <i>V. infausta</i>	42
Tabela 15: Constituintes fitoquímicos de extractos da polpa e licor do fruto de <i>S. spinosa</i>	42
Tabela 16: Compostos fenólicos totais nas polpas e derivados de <i>V. infausta</i> e <i>S. spinosa</i>	44
Tabela 17: Valores médios das absorvâncias das diferentes diluições dos extractos	46
Tabela 18: Percentagem de DPPH remanescente após 30 minutos de reacção.....	47
Tabela 19: Percentagem de inibição do DPPH pelas polpas e derivados de <i>V. infausta</i> e <i>S. spinosa</i>	49
Tabela 20: Equação das rectas usadas para calcular CI_{50} da actividade antioxidante das polpas e derivados de <i>V. infausta</i> e <i>S. spinosa</i>	51

Índice de figuras

Figura 1: Derivados de frutos nativos processados pela empresa Agro-serviços.....	3
Figura 2: Molécula de estricnina (1).....	5
Figura 3: Quinina (2), Emetina (3), Ioimbina (4) e Cafeína (5)	6
Figura 4: Fruto verde (A) e maduro (B) da <i>S. spinosa</i> (Fonte: World Agroforestry Centre – University of Greenwich)	7
Figura 5: Fruto verde (A) e maduro (B) da <i>V. infausta</i> (Fonte: http://toptropicals.com/).....	12
Figura 6: Esquema dos mecanismos de acção dos diversos antibióticos	17
Figura 7: Princípio do teste de susceptibilidade pela metodologia de difusão em agar	18
Figura 8: Medição do diâmetro de halo de inibição	19
Figura 9: Doenças associadas às espécies reactivas de oxigénio.	23
Figura 10: (1) Fontes endógenas (2) Fontes exógenas (fonte: Ramos, 2011)	24
Figura 11: Gráfico de decréscimo da absorvância do radical DPPH durante a reacção	27
Figura 12: Formação de 2,2-difenil-1-picril-hidrazina a partir de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil ..	28
Figura 13: Placas com discos impregnados com extractos a 200 mg/ml comprovando a ausência da actividade antimicrobiana.	43
Figura 14: Percentagem de DPPH remanescente após 30 minutos de reacção	48
Figura 15: Percentagem de inibição do DPPH pelas polpas e derivados de <i>V. infausta</i> e <i>S. spinosa</i>	49
Figura 16: Efeito da captura dos radicais livres DPPH pelas polpas e derivados de <i>V. infausta</i> e <i>S. spinosa</i>	50

Índice de esquemas

Esquema 1: Oxidação mostrando reacções de iniciação, propagação e terminação	21
Esquema 2: Formação de espécies reactivas de oxigénio	22
Esquema 3: Formação do radical hidroxilo a partir de peróxido de hidrogénio	22

Índice de gráficos

Gráfico 1: Curva de calibração do ácido gálico em mg/ml	45
Gráfico 2: Curva de calibração de DPPH em µg/ml.....	46

Índice de Anexos

Tabela A1-1: Dados usados para a construção da curva de calibração do ácido gálico.....	72
Tabela A1-2: Dados usados para a construção da curva de calibração de DPPH.....	72
Tabela A2-1: Réplicas das absorvâncias nas amostras da polpa de <i>Vangueria infausta</i>	73
Tabela A2-2: Réplicas das absorvâncias nas amostras do licor de <i>Vangueria infausta</i>	73
Tabela A2-3: Réplicas das absorvâncias nas amostras de jam de <i>Vangueria infausta</i>	73
Tabela A2-4: Réplicas das absorvâncias nas amostras da polpa de <i>Strychnos spinosa</i>	74
Tabela A2-5: Réplicas das absorvâncias nas amostras do licor de <i>Strychnos spinosa</i>	74

Lista de Abreviaturas, Acrónimos, Símbolos e Siglas

AA – Actividade Antioxidante

Abs – Absorvância

ABTS – 2,2'-azino-bis (Ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

A. digitata – *Adansonia digitata*

ADN – Ácido desoxirribonucleico

Alc – Alcalóides

BHA – Butilhidroxianisol

BHT – Butilhidroxitolueno

C. albicans – *Candida albicans*

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CI₅₀ – Coeficiente de Inibição a 50%

CUPRAC – “Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity”

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

EAG – Equivalentes de Ácido Gálico

E. coli – *Escherichia coli*

ERO – Espécies Reactivas de Oxigénio

Est – Esteróides

Fla – Flavonóides

FRAP – “Ferric Reducing Antioxidant Power”

LD – limite de detecção

LDL – “Low Density Lipoprotein”

MH – “Mueller-Hinton”

MISAU – Ministério de Saúde

NADPH – “Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate”

OMS – Organização Mundial de Saúde

ORAC – “Oxygen Radical Absorbance Capacity”

P. aerug – *Pseudomonas aeruginosa*

pH – potencial de Hidrogénio

S. birrea – *Sclerocarya birrea*

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

Sap – Saponinas

SIDA – Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

S. spinosa – *Strychnos spinosa*

SST – Sólidos Solúveis Totais

SRO – Substâncias Reactivas Oxigenadas

Tan – Taninos

TBARS – “2-Thiobarbituric Acid Reactive Substances”

TRAP – “Total Reactive Antioxidant Potential”

Trit – Triterpenóides

Trolox – Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

TSA –Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos

ufc – Unidade Formadora de Colónia

V. infausta – *Vangueria infausta*

UV – Ultra Violeta

UV-Vis – Ultra Violeta – Visível

1 Introdução

Já desde os primórdios, o homem se interessa pelos compostos provenientes da natureza. Simples extracções aquosas de flores, plantas e até mesmo de insectos foram usadas para isolar compostos cujo sabor, cor e odor pudessem ser utilizados para variados fins. Estes compostos eram usados, como venenos, no tratamento de doenças, para o fabrico de perfumes, estimulantes e muitas outras aplicações. Os produtos naturais são compostos químicos obtidos de fontes naturais, quer estas sejam de origem animal ou vegetal, no entanto a maioria dos produtos naturais são isolados a partir de plantas, devido à facilidade do processo de isolamento (Ramos, 2011).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) informou em 2001 que a fitoterapia serve à saúde de cerca de 80% da população mundial, especialmente para milhões de pessoas em vastas áreas rurais dos países em desenvolvimento (Masoko, 2013; Okullo *et al.*, 2014).

As plantas são utilizadas medicinalmente em diferentes países e são uma fonte de muitas e potentes drogas eficazes (Ugoh e Bejide, 2013). As plantas medicinais estão dentre os produtos naturais de grande interesse científico e funcionam como fábricas de compostos químicos, conhecidos como fitoquímicos, devido á possibilidade de serem empregues como fitofármacos (Palmeira *et al.*, 2010). Além disso, os compostos bioactivos de plantas têm servido de precursores para a síntese de drogas sintéticas, servindo também de base para a produção de medicamentos semi-sintéticos e sintéticos (Dias *et al.*, 2012; Passos *et al.*, 2009).

Estes compostos como glicosídeos, esteróides, alcalóides, terpenóides, saponinas, flavonóides, antocianinas, taninos, ácidos fenólicos, lignanas, ligninas entre outros, têm uma variedade de funções na vida vegetal incluindo a manutenção das funções fisiológicas da planta. Eles actuam ainda como defesa contra microrganismos patogénicos, como bactérias, fungos e também insectos (Rêgo Jr. *et al.*, 2011).

Em Moçambique cerca de 15% do total dos recursos genéticos vegetais (estimados em cerca de 5. 500 espécies de plantas) são usados pelas comunidades rurais para fins medicinais e desempenham um papel fundamental nos cuidados de saúde básicos. Para além do valor medicinal, as plantas medicinais constituem uma fonte de rendimento para os colectores e vendedores (Senkoro *et al.*, 2012).

Hoje em dia, as pesquisas buscam substâncias com actividades biológicas provenientes de fontes naturais que possam actuar sozinhas ou sinergicamente com outros aditivos; que funcionem como alternativa para prevenir a deterioração oxidativa de alimentos e limitem o uso dos antioxidantes sintéticos e agentes conservadores. Por um lado, devem possuir actividade letal ou inibitória contra muitas espécies microbianas responsáveis por muitas doenças e epidemias.

As pesquisas actuais em plantas medicinais, dão mais ênfase ao isolamento dos princípios activos, sua identificação, á verificação das suas aplicações em actividades da indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética, bem como na obtenção de diferentes extractos dos vegetais envolvidos (Cansian *et al.*, 2010b).

Pesquisas recentes têm demonstrado a existência de uma grande variedade de frutos indígenas com elevado potencial nutricional e medicinal que satisfazem as necessidades das famílias rurais (Magaia *et al.*, 2013a; Dimelu e Odo, 2013; Mothapo *et al.*, 2014; Okullo *et al.*, 2014).

Em Moçambique, variedades de plantas silvestres alimentares são largamente distribuídas por todo o País. Os frutos e as amêndoas destas plantas são vendidos em mercados informais durante a época de colheita e são consumidos de diversas formas. A importância dos frutos silvestres na dieta depende, em grande medida, da sua disponibilidade e a escolha de espécies de frutos varia de acordo com a região e as tradições culturais (Magaia *et al.*, 2013b; Chiau *et al.*, 2013).

Nos últimos anos, tem estado a observar-se em Moçambique diversas iniciativas de desenvolvimento e adaptação de tecnologias de processamento de frutos nativos de ocorrência espontânea. Um exemplo é o da Agro-serviços, empresa privada que desde 2004 vem criando fórmulas de licores, doces e jams produzidos com frutos que ocorrem de forma espontânea nas florestas de Moçambique, nomeadamente Mapfilwa (*Vangueria infausta*), Canhu (*Sclerocarya birrea*), Massala (*Strychnos spinosa*), Maracujá (*Passiflora spp*), Tamarindo (*Tamarindus indica*), Malambe (*Adansonia digitata*) e Jambalão (*Syzygium cordatum*).

A maioria dos referidos produtos já circula num formato comercial no mercado nacional, com destaque para a cidade de Maputo (figura 1). Os produtos possuem uma declaração da sua aptidão para o consumo humano atestada por laboratórios do MISAU, contudo existe a necessidade de estudar a sua composição físico-química, fitoquímica e uma completa caracterização das suas propriedades nutricionais.

É neste âmbito que no presente trabalho fez-se uma caracterização físico-química e fitoquímica bem como a avaliação da actividade antimicrobiana e antioxidante das polpas e derivados (licores e jams) dos frutos Massala (*Strychnos spinosa*) e Mapfilwa (*Vangueria infausta*).



Figura 1: Derivados de frutos nativos processados pela empresa Agro-serviços

1.1 Objectivos

1.1.1 Geral

Avaliar a composição físico-química e a actividade antioxidante e antimicrobiana dos frutos das plantas *Strychnos spinosa* (Massala) e *Vangueria infausta* (Mapfilwa) e seus derivados (licores e jam).

1.1.2 Específicos

Determinar a composição físico-química e fitoquímica da polpa dos frutos e seus derivados;

Testar a actividade antioxidante da polpa dos frutos e seus derivados;

Testar a actividade antimicrobiana da polpa dos frutos e seus derivados.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Aspectos gerais das famílias Loganiaceae e Rubiaceae

Loganiaceae é uma família angiospérmica que ocorre nas regiões dos trópicos e subtropicais (Basílio *et al.*, 2005). A família loganiaceae não possui um ancestral comum, por isso alguns géneros, antes pertencentes a esta família, foram agrupados em outras famílias.

As loganiaceae produzem muitos alcalóides indólicos, e a maioria dos alcalóides são tóxicos e também têm actividades farmacológicas importantes. Um desses alcalóides é a estricnina (**1**) (figura 2), muito conhecida pela população e famosa pelo seu elevado índice letal.

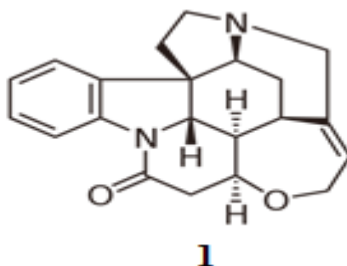


Figura 2: Molécula de estricnina (1)

A família é predominantemente lenhosa, com cerca de 20 árvores de espécies nativas na África Austral. As folhas são opostas, simples e muitas vezes reduzidas, por vezes apresentam uma linha entre as pétalas. Fazem parte desta família a *Strychnos decussata*, *Strychnos henningsii*, *Strychnos spinosa*, *Strychnos usambarensis*, *Strychnos abyssinica*, *Strychnos aculeata*, *Strychnos acuminata*, *Strychnos acuta*, *Strychnos acutissima*, *Strychnos ignatii* (Philipe *et al.*, 2005).

Plantas do género *Strychnos* tem sido utilizadas na medicina popular em muitas partes do mundo (Isa *et al.*, 2014a).

A família Rubiaceae engloba cerca de 637 géneros e cerca de 10700 espécies (Pereira e Barbosa, 2004). Rubiaceae é conhecida por ser uma família de difícil classificação a nível de subfamília (Margalho *et al.*, 2009), contudo são identificadas quatro subfamílias (Cinchonoideae, Ixoroideae, Antirheoideae e Rubioideae) e 44 tribos, essencialmente tropicais (Pereira e Barbosa, 2004; Margalho *et al.*, 2009).

Esta família (Rubiaceae) possui espécies de grande importância económica que são exploradas como alimentícias (*Coffea arabica* L. e *Genipa americana* L.), ornamentais (*Ixora spp.*, *Mussaenda spp.*, *Gardenia spp.*, entre outras) e também na indústria farmacêutica, como por exemplo *Cinchona pubescens* Vahl, produtora de quinina, empregada no tratamento da malária. Além disso, várias espécies são referidas popularmente como medicinais e/ou tóxicas, dentre as quais destacam-se: *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum.. Diversas espécies dos géneros *Borreria*, *Cinchona*, *Richardia*, são consideradas como medicinais e os géneros *Palicourea* e *Psychotria*, popularmente conhecidos como “mata-ratos”, são consideradas venenosos.

Quimicamente, a família destaca-se pela presença de alcalóides quinolínicos (Quinina (2)), isoquinolínicos (emetina (3)), indólicos (ioimbina (4)) e bases de purina como a cafeína (5) (figura 3), substâncias utilizadas mundialmente na indústria farmacêutica e alimentícia (Souza *et al.*, 2013; Coelho *et al.*, 2006).

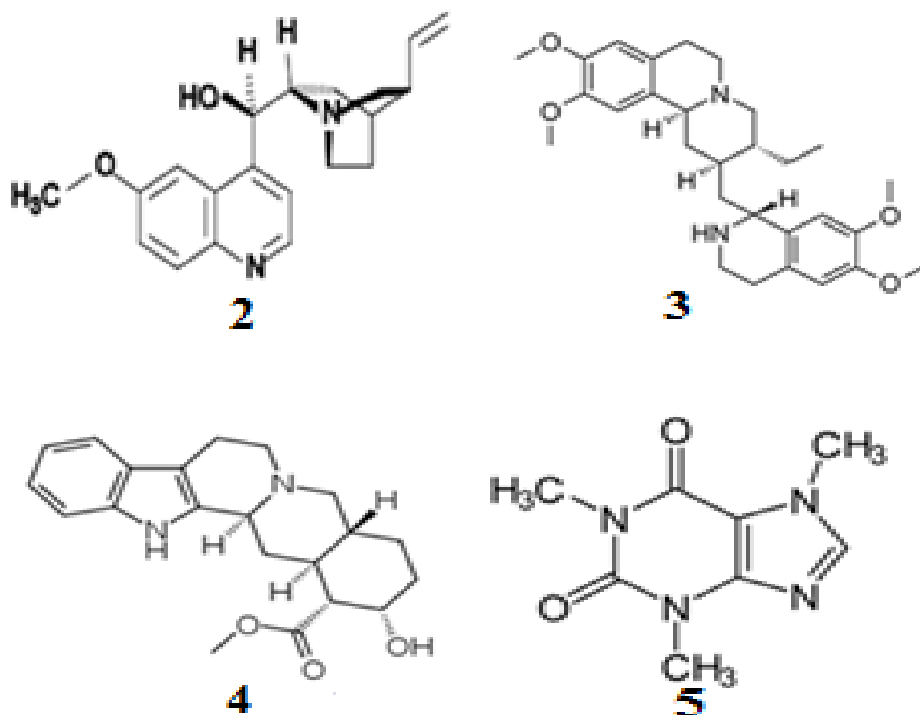


Figura 3: Quinina (2), Emetina (3), Ioimbina (4) e Cafeína (5)

Algumas espécies do género *Vangueria* (Rubiaceae) são utilizadas na medicina tradicional de vários países.

2.1.1 Descrição da planta *Strychnos spinosa* e seu uso na medicina tradicional

A planta *Strychnos spinosa* (de nomes locais N'sala ou Massala), uma árvore de tamanho pequeno com inúmeras folhas, ocorre em florestas ribeirinhas e costeiras. As hastes desta planta não são muito grossas e muitas vezes, descamam-se em pedaços colados. As folhas são elípticas, ovadas ou quase circulares, com tonalidade verde-escura na parte superior da folha e visivelmente pálida na parte inferior. As flores são pequenas e estão em cachos na parte terminal dos ramos principais ou dos ramos laterais. A floração ocorre em Agosto e a frutificação em finais do mês de Outubro até mês de Janeiro, dependendo do tipo de género desta família. Os frutos são largos (cerca de 12 cm de diâmetro), globosos, esféricos, amarelos a amarelos acastanhados quando maduros, de casca dura e lenhosa (Sitrit *et al.*, 2003) (figura 4).



Figura 4: Fruto verde (A) e maduro (B) da *S. spinosa* (Fonte: World Agroforestry Centre – University of Greenwich)

As partes da *Strychnos spinosa* mais utilizadas são os frutos e as folhas. Sendo assim, os frutos dessas espécies são comestíveis, e as folhas usadas como um analgésico (Philippe *et al.*, 2005).

A planta é utilizada na medicina tradicional no Senegal como um analgésico e no tratamento de doenças venéreas, doenças do estômago e mordeduras de cobras (Isa *et al.*, 2014a).

Uma decocção da folha ou raiz é utilizada como um analgésico na África Central. Na Gâmbia, as decocções das folhas como das cascas em pó desta planta, são utilizadas para o tratamento de feridas, enquanto nos Camarões as folhas secas e pulverizadas são misturadas com alimentos

para tratamento de danos no fígado. Os Zulus da África do Sul usam os frutos verdes como um antídoto para picada de cobra (Isa *et al.*, 2014a).

Reporta-se também na medicina tradicional no sul do Benin, o uso desta planta (folhas, galhos, parte aérea e raízes) para tratamento de dores de estômago, dores abdominais, cólicas, esterilidade, abscesso, doença do sono e malária (Bero *et al.*, 2009).

No Mali, cascas de caules e raízes são usadas para o tratamento de diarreia (Sanogo, 2011). A parte interna do fruto da *Strychnos spinosa* é usada para o tratamento das verrugas por esfregamento sobre a sua superfície e esta parte interna do fruto, quando combina com folhas de *Strychnos madagascariensis* é usada para tratamento das feridas (De Wet *et al.*, 2013).

Extracto aquoso das raízes das *Strychnos spinosa*, administrado oralmente, é usado tradicionalmente para o tratamento de doenças venéreas, hérnia e contra venenos de mordidas de cobras (Bruschi *et al.*, 2011).

2.1.2 Composição físico-química da *Strychnos spinosa*

A tabela 1 mostra o conteúdo de minerais encontrados no fruto da planta *Strychnos spinosa* enquanto a tabela 2 apresenta pormenores da composição do fruto desta planta em matéria seca, nomeadamente cinzas, ligninas, proteínas, fibras, pH, acidez e vitamina C (Amarteifio e Mosase, 2006; Legwaila *et al.*, 2011).

Tabela 1: Conteúdo de minerais do fruto da *Strychnos spinosa*

Minerais (mg/100g peso seco)		Minerais (mg/100g peso seco)	
Ferro	0.11	Zinco	0.22
Potássio	1370	Sódio	21.7
Cálcio	56.0	Fósforo	66.0
Magnésio	49.0		

Fonte: Amarteifio e Mosase, 2006; Legwaila *et al.*, 2011

Tabela 2: Composição (%) e pH (25 °C) do fruto da *Strychnos spinosa*

Composição	Em percentagem (%)	Composição	Em percentagem (%)
Matéria seca	19.7	Fibra em detergente neutro	6.20
Cinza	4.6	pH	3.96
Lignina em detergente ácido	3.3	Acidez	0.77
Proteína bruta	6.1	Vitamina C	88.0
Fibra em detergente ácido	4.4		

Fonte: Amarteifio e Mosase, 2006; Legwaila et al, 2011

2.1.3 Composição fitoquímica da *Strychnos spinosa*

A polpa é totalmente comestível mas as sementes apresentam compostos químicos tais como estricnina e outros alcalóides, que podem ser muito venenosos (Philippe *et al.*, 2005).

A análise qualitativa dos fitoquímicos dos extractos aquosos, etanólicos e metanólicos das folhas e casca de caule de *Strychnos spinosa* revelaram a presença de alcalóides, esteróides, terpenóides, taninos, açúcares redutores e saponinas (tabela 3) (Ugoh e Bejide, 2013).

Tabela 3: Constituintes fitoquímicos das folhas e casca de caule da *S. spinosa*

Componentes bioactivos	Extractos das folhas			Extractos da casca de caule		
	A	E	M	A	E	M
Alcalóides	+	+	+	+	+	+
Glicósidos	+	+	+	-	+	-
Terpenóides e Esteróides	+	+	+	+	+	+
Taninos	+	-	+	+	+	+
Açúcares redutores	+	-	+	+	+	+
Antraquinonas	-	+	+	-	-	+
Flobataninos	-	-	-	-	-	-
Saponinas	+	+	-	+	+	+

Chave: + = Presente, - = ausente (não detectado), A= aquoso, E= etanólico, M= metanólico

2.1.4 Actividade biológica da planta *Strychnos spinosa*

Várias propriedades farmacológicas como antimicrobiana, antiprotozoária, antiinflamatória, antioxidante, antialérgica, antiviral, entre outras, reportadas nesta planta, são relacionadas com a existência de vários metabólitos secundários como monoterpenos, triterpenóides, esteróis, alcalóides, flavonóides e compostos polifenólicos que ocorrem e já isolados de diferentes partes desta planta (Isa *et al.*, 2014a).

Extractos metanólicos da casca do caule e extractos etanólicos das folhas de *Strychnos spinosa* mostraram-se muito eficazes contra as bactérias *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente (Ugoh e Bejide, 2013).

Numa avaliação da actividade antiplasmódica de 19 espécies de *Strychnos* (Loganiaceae) *in vitro*, contra uma estirpe de *Plasmodium falciparum* susceptível á cloroquina, o extracto de acetato de etilo (EtOAc) e extracto metanólico (MeOH) da espécie *Strychnos variabilis* apresentaram inibição relativa contra esta estirpe (Philipe *et al.*, 2005).

Num estudo antimicrobiano realizado usando extractos aquosos, etanólicos e metanólicos das folhas e das cascas de caule de *Strychnos spinosa* sobre as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e o fungo *Candida albicans*, aplicando o método de difusão em agar e o método de microdiluição para a determinação da concentração inibitória mínima, os extractos mostraram boa actividade contra as bactérias *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e mínima actividade contra a bactéria *Staphylococcus aureus* e o fungo *Candida albicans* (tabelas 4 e 5) (Ugoh e Bejide, 2013).

Tabela 4: Zona de inibição (mm) de extractos das folhas de *S. spinosa*

Extractos das folhas	Conc. (mg/ml)	Organismos testados			
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aerug.</i>	<i>C. albicans</i>
Aquoso	200	7.0 ± 0.3	9.0 ± 0.7	22.0 ± 0.5	9.0 ± 0.7
Etanólicos		9.0 ± 0.3	9.0 ± 0.7	24.0 ± 0.5	10.0 ± 0.7
Metanólicos		9.0 ± 0.3	19.0 ± 0.7	23.0 ± 0.5	10.0 ± 0.7

Tabela 5: Zona de inibição (mm) de extractos da casca do caule de *S. spinosa*

Extractos casca do caule	Conc. (mg/ml)	Organismos testados			
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aerug.</i>	<i>C. albicans</i>
Aquoso	200	7.0 ± 0.3	19.0 ± 0.7	25.0 ± 0.5	9.0 ± 0.7
Etanólicos		9.0 ± 0.3	13.0 ± 0.7	16.0 ± 0.5	10.0 ± 0.7
Metanólicos		9.0 ± 0.3	26.0 ± 0.7	16.0 ± 0.5	10.0 ± 0.7

Avaliando-se a actividade dos extractos etanólicos da casca de caule sobre as bactérias *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e o fungo *Candida albicans*, nenhuma actividade foi verificada (Kubmarawa *et al.*, 2007).

Num outro estudo da actividade antimicrobiana de diferentes extractos e fracções de folhas de *Strychnos spinosa*, sobre diferentes fungos e bactérias gram-positivos e gram-negativos, mostraram uma actividade com concentração inibitória mínima que varia de 0,04 a 1,25 mg/ml, considerada baixa e moderada por vários autores (Isa *et al.*, 2014b).

Actividade antioxidante de diferentes extractos e fracções de folhas de *Strychnos spinosa* foi determinada usando os métodos DPPH e ABTS e os resultados mostraram valores de CI_{50} variados mais elevados em relação aos padrões usados que são o ácido ascórbico e Trolox (Isa *et al.*, 2014b).

2.1.5 Descrição da planta *Vangueria infausta* e seu uso na medicina tradicional

Vangueria infausta (família Rubiaceae e de nomes locais Pfilwa ou Mapfilwa) é uma árvore que cresce bem em solos semiáridos e em florestas tropicais, contudo tem uma distribuição mundial. Esta planta é encontrada principalmente na África do Sul, mas também é nativa do leste da África e Madagáscar (Abeer, 2011; Mbukwa *et al.*, 2007).

A frutificação da *Vangueria infausta* ocorre entre os meses de Janeiro e Maio. Esta planta serve como uma fonte de alimentos e remédios para comunidades rurais (Mothapo *et al.*, 2014). Os frutos da *Vangueria infausta* são consumidos por pessoas e animais selvagens enquanto diferentes partes da planta têm sido usadas tradicionalmente para o tratamento da malária, chagas, ciclo menstrual, problemas uterinos e inchaços genitais entre outras enfermidades

(Ramalingum e Mahomoodally, 2014; Mothapo *et al.*, 2014; Van Wyk, 2011; Abeer, 2011; Mbukwa *et al.*, 2007).

O fruto da *Vangueria infausta*, tem um diâmetro de aproximadamente 3 a 6 cm, sua cor varia de verde a castanho claro quando maduro, e contém 3 a 5 sementes embebidas na polpa (figura 5) (Chiau *et al.*, 2013).

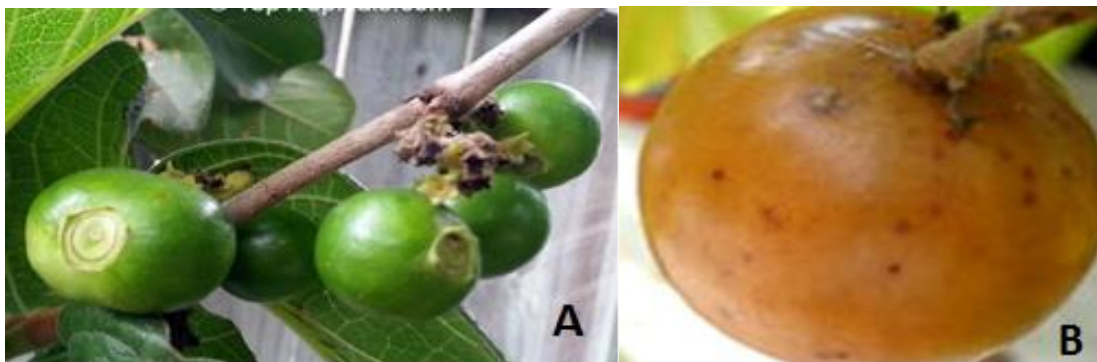


Figura 5: Fruto verde (A) e maduro (B) da *V. infausta* (Fonte: <http://toptropicals.com/>)

A folha, frutos, cascas do caule e casca da raiz são utilizados como um remédio para muitas doenças e as raízes são utilizadas para tratar a malária (Abosi *et al.*, 2006).

No Quênia a infusão dos frutos e das raízes são usados tradicionalmente para o tratamento de vermes parasitas (De Boer *et al.*, 2005).

Na Tanzânia, diferentes partes da espécie *Vangueria infausta* têm sido tradicionalmente utilizados para o tratamento da malária, feridas, problemas menstruais e uterinos (Ramalingum e Mahomoodally, 2014).

Na zona centro-sul do Zimbabwe, extractos aquosos das raízes de *Vangueria infausta* são usados na medicina tradicional para o tratamento de diarreias (Maroyi, 2013) e em Meru, um distrito central de Quênia, como anti-helmíntico (Gakuya *et al.*, 2013).

A infusão de raízes ou cascas de *Vangueria infausta* trituradas e misturadas com água quente ou fria (250 ml) e bebida três vezes por dia, diminui a incidência da diarreia (Wet *et al.*, 2010).

2.1.6 Composição físico-química da *Vangueria infausta*

A tabela 6 mostra o conteúdo de minerais encontrados no fruto da planta *Vangueria infausta* colhido na província de Maputo (Moçambique) (Magaia *et al.*, 2013a) e em Janeiro (período 1) e Março (período 2), na província do Limpopo (África do Sul) (Mothapo *et al.*, 2014).

Tabela 6: Conteúdo de minerais do fruto da *Vangueria infausta*

	Minerais do fruto da <i>Vangueria infausta</i> (mg/100g peso seco)											Referências
	Fe	K	Ca	Mn	P	N	Mg	Na	S	Se	Zn	
	3.0	1249	90	n.a.	92	n.a.	65	18	45	2.0	n.a.	Magaia <i>et al.</i> , 2013a
P1	20.1	2.2	0.2	47.4	0.3	0.9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Mothapo <i>et al.</i> , 2014
P2	21.6	1.8	0.2	46.0	0.3	0.9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	

n.a. = não analisado; P1 = período 1; P2 = período 2

A tabela 7 apresenta pormenores da composição em matéria seca, humidade, proteína, pH, teor de ácidos (%), teor de açúcares (°Brix), gordura e cinzas do fruto da planta *Vangueria infausta* colhido em 2008 (período 1) e em 2009 (período 2) na província de Maputo (Moçambique) (Magaia *et al.*, 2013a) e entre Janeiro e Fevereiro (período 1) e fora do período normal de frutificação (período 2) na província do Limpopo (África do Sul) (Mothapo *et al.*, 2014).

Tabela 7: Composição do fruto da planta *Vangueria infausta*

Composição	Mothapo <i>et al.</i> , 2014		Magaia <i>et al.</i> , 2013b			
	Período 1	Período 2	Período 1	Período 2	Período 1	Período 2
Matéria seca	19.3±4.0	80.9±8.9	37.4±0.5	30.0±0.1	37.3±0.9	34.5±0.7
Humidade	80.7±13.0	19.1±5.0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Proteína	5.40±0.2	5.80±0.2	2.9±0.5	2.2±0.3	4.7±0.4	3.3±0.8
pH	3.20±0.03	3.20±0.02	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Teor de ácidos	0.20±0.02	0.20±9.9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
°Brix	7.70 ± 0.4	3.90±0.7	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Gordura	n.a.	n.a.	0.5±0.8	0.7±0.1	0.7±0.2	0.2±0.0
Cinzas	n.a.	n.a.	7.8±0.6	5.3±0.0	5.7±0.4	3.2±0.2

n.a. = não analisado.

2.1.7 Composição fitoquímica da *Vangueria infausta*

No estudo fitoquímico dos extractos de folhas e raízes de *Vangueria infausta* (tabela 8), foram encontrados componentes químicos como taninos e saponinas e adicionalmente foram identificados nas folhas os flavonóides.

Tabela 8: Constituintes fitoquímicos das folhas e raízes da planta *V. infausta*

Parte planta	Constituintes fitoquímicos							Referências
	Alc	Flav	Sap	Com	Antr	Glic	Tan	
Folhas	–	+	+	–	–	–	+	Tafadzwa, 2012
Raízes	–	–	+	–	–	–	+	Tafadzwa, 2012
Folhas	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Mbukwa <i>et al.</i> , 2007
Folhas	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Abeer, 2011

Alc = Alcalóides, Flav = flavonóides, Sap = saponinas, Com = comarinas, Antr = antraquinonas, Gli = glicósidos, Tan = taninos, n.d. = não determinado, – = ausência, + = presença

2.1.8 Actividade biológica da planta *Vangueria infausta*

Recentes estudos farmacológicos têm demonstrado que extractos de folhas e da raiz desta planta apresentam uma significativa actividade antiplasmódica (Abeer, 2011; Mbukwa *et al.*, 2007).

Num teste antimicrobiano de extractos aquoso e metanólico de folhas, frutos (maduros e verdes) e sementes desta planta, realizado sobre as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e fungos *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, usando o método de difusão em agar (tabela 9 e 10), o extracto aquoso de frutos verdes apresentou actividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* e o extracto aquoso de frutos maduros apresentou actividade contra *Staphylococcus aureus* (tabela 9) (Ramalingum e Mahomoodally, 2014).

Tabela 9: Actividade antimicrobiana do extracto aquoso de diferentes partes da planta *V. infausta*

Microrganismos testados	Gram (+/-)	Padrão ^a	Diâmetro da zona de inibição (mm)			
			Extracto aquoso (50 mg/ml)			
			S ₁	S ₂	S ₃	S ₄
<i>S. aureus</i>	G+	26.33±0.58	–	–	10.67±1.15	–
<i>E. coli</i>	G-	21.67±3.79	–	12.67±0.58	–	–
<i>P. aeruginosa</i>	G-	15.33±1.53	–	–	–	–
<i>A. niger</i>	F	23.00±1.00	–	–	–	–
<i>C. albicans</i>	F	20.67±0.58	–	–	–	–

S₁: Folhas; S₂: frutos verdes; S₃: frutos maduros; S₄: sementes; G⁺: Gram positiva; G⁻: Gram negativo, F: fungos; (–): sem zona de inibição. ^(a):ampicilina.

Quanto aos extractos metanólicos, as folhas apresentaram actividade em bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e as sementes em *Staphylococcus aureus* (tabela 10) (Ramalingum e Mahomoodally, 2014).

Tabela 10: Actividade antimicrobiana do extracto metanólico de diferentes partes da planta *V. infausta*

Microrganismos testados	Gram (+/-)	Padrão ^a	Diâmetro da zona de inibição (mm)			
			Extracto metanólico (50 mg/ml)			
			S ₁	S ₂	S ₃	S ₄
<i>S. aureus</i>	G+	26.33±0.58	11.67±1.53	–	–	8.33±1.53
<i>E. coli</i>	G-	21.67±3.79	10.00±2.00	–	–	–
<i>P. aeruginosa</i>	G-	15.33±1.53	–	–	–	–
<i>A. niger</i>	F	23.00±1.00	–	–	–	–
<i>C. albicans</i>	F	20.67±0.58	–	–	–	–

S₁: Folhas; S₂: frutos verdes; S₃: frutos maduros; S₄: sementes; G⁺: Gram positiva; G⁻: Gram negativo, F: fungos; (–): sem zona de inibição. ^(a):ampicilina.

Material extraído de diferentes partes desta planta e usando como solventes acetona, acetato de etilo, metanol, água fria e água quente, apresentou actividade antimicrobiana em uma ampla gama de microorganismos seleccionados, contudo, o extracto de raízes foi inactivo para *Streptococcus grupo A* e *Pseudomonas aeruginosa* (Tafadzwa, 2012).

Usando o método de diluição, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), extractos acetónicos das folhas de *Vangueria infausta* mostraram boa actividade contra bactérias gram-positivas em vinte diferentes espécies destes microorganismos (Shai *et al.*, 2013).

Extractos das folhas *Vangueria infausta* mostraram menor conteúdo fenólico total, mas uma grande actividade antioxidante (Tafadzwa, 2012).

2.2 Antimicrobianos naturais

Substâncias antimicrobianas ou antibióticas constituem um grupo especial de agentes terapêuticos, geralmente produzidos e obtidos a partir de organismos vivos. São substâncias que, em pequenas concentrações, devem possuir actividade letal ou inibitória contra muitas espécies microbianas e, além de prevenir o desenvolvimento de microorganismos resistentes, devem apresentar ausência de efeitos indesejáveis ao hospedeiro e estabilidade química, entre outras características (Soares *et al.*, 2009; Barbosa, 2008). Muitos antimicrobianos naturais podem ser subdivididos em antibacterianos, antiprotozoários e antifúngicos.

O estudo desses agentes, com acção biológica, é importante no campo da saúde visto que se buscam, mundialmente, substâncias menos tóxicas e mais eficazes contra a resistência microbiana e capazes de combater novos patógenos (Pinho *et al.*, 2012; Palmeira *et al.*, 2010).

Com uma estrutura química que difere daquela dos antibióticos derivados de microorganismos, os antibióticos vegetais podem regular o metabolismo intermediário de patógenos, activando ou bloqueando reacções e síntese enzimática ou mesmo alterando a estrutura de membranas. Os fitoterápicos também têm baixo custo de produção e podem ser usados conjuntamente com medicina alopática (Pinho *et al.*, 2012).

Além disso, é também um modelo ecologicamente correcto de produção de substâncias que sejam eficazes e menos agressivas tanto para o meio ambiente como para o homem, contribuindo assim para uma melhor qualidade de vida (Palmeira *et al.*, 2010) e o seu uso ser inclusive incentivado pela Organização Mundial de Saúde (Pinho *et al.*, 2012).

2.2.1 Mecanismo de acção dos antimicrobianos naturais

São descritos cinco mecanismos de acção dos antimicrobianos, a saber: inibição da síntese da parede celular; inibição da síntese ou dano da membrana citoplasmática; inibição da síntese protéica nos ribossomas; alterações na síntese dos ácidos nucleicos; alteração do metabolismo celular (figura 6) (Baptista, 2013).

O mais importante mecanismo de actividade dos antibióticos naturais é a interferência com a síntese da parede celular bacteriana (Murray *et al.*, 2010).

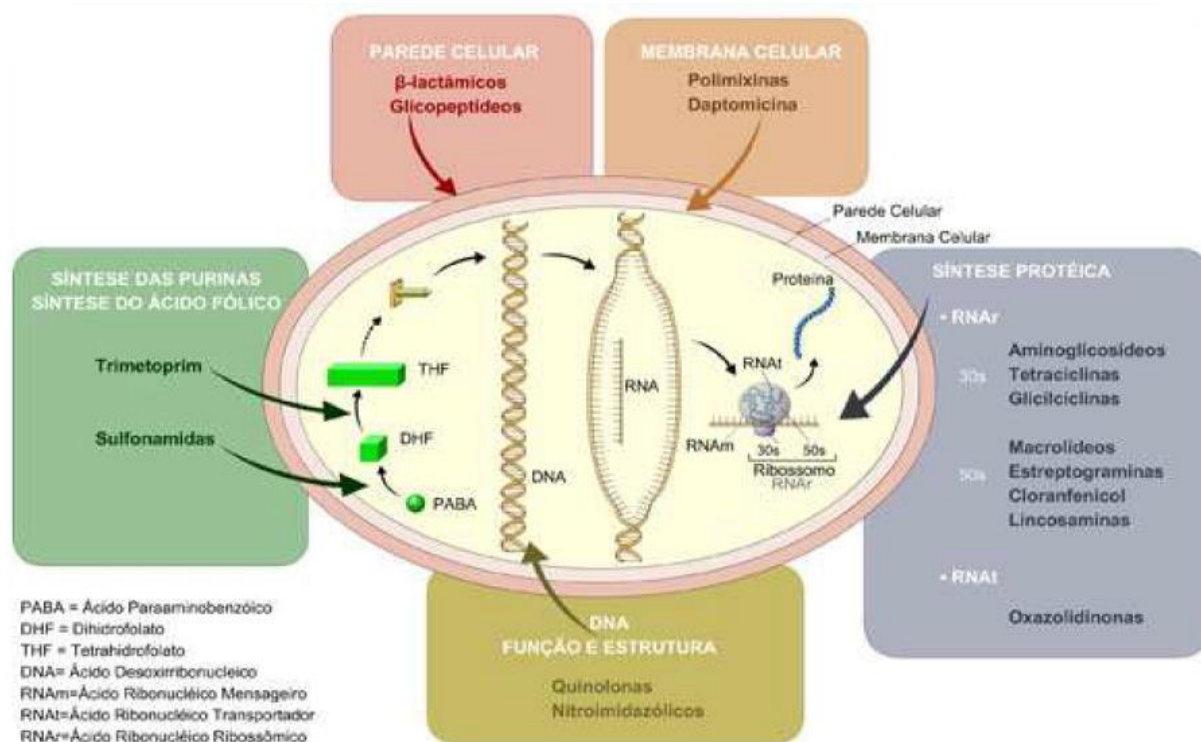


Figura 6: Esquema dos mecanismos de acção dos diversos antibióticos

2.2.2 Métodos de avaliação da actividade antimicrobiana dos extractos vegetais

Actualmente, existem vários métodos de teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA) usados para avaliar a actividade antimicrobiana dos extractos vegetais. Os mais conhecidos são método de difusão em agar (método qualitativo) e método de diluição em caldo (método quantitativo) (CLSI, 2012).

2.2.2.1 Métodos de difusão em agar

O teste de difusão em agar, também chamado de difusão em placas, é um método físico no qual, um microrganismo é colocado à prova contra uma substância biologicamente activa em meio de cultura sólido e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo testado com a concentração da substância ensaiada.

O teste fornece resultados qualitativos. É um dos métodos de susceptibilidade mais simples, confiável e mais utilizado pelos laboratórios de microbiologia. O seu princípio básico é a difusão do antimicrobiano na superfície do agar, a partir de um disco impregnado com o mesmo antimicrobiano (figura 7).

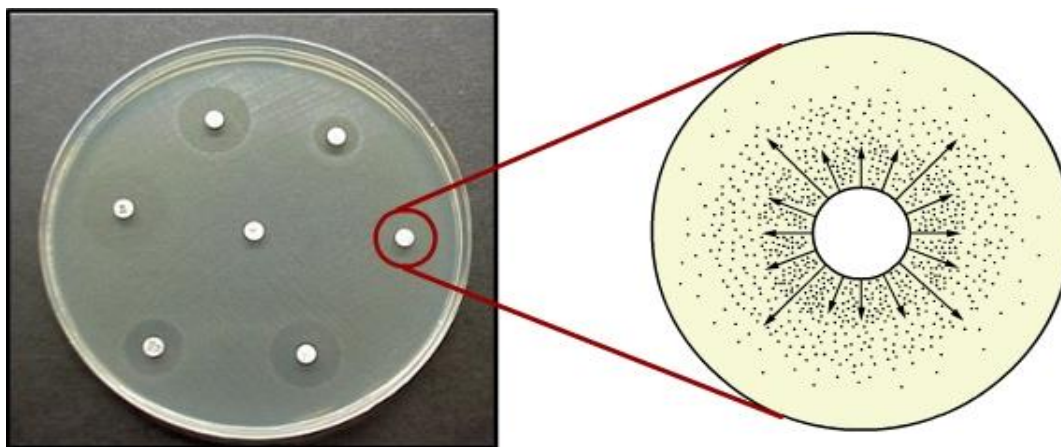


Figura 7: Princípio do teste de susceptibilidade pela metodologia de difusão em agar

O teste é realizado depositando os discos de papel-filtro, impregnados com antimicrobianos em concentrações fixas, sobre a placa de agar, após a sementeira do inóculo bacteriano com aproximadamente 1 a 2×10^8 ufc/ml (CLSI, 2012; Ostrosky *et al.*, 2008).

A avaliação é comparativa em relação a um padrão biológico de referência (controle positivo) e a zona ou o halo de inibição de crescimento é medida partindo-se da circunferência do disco ou poço, até a margem onde há crescimento de microrganismos. Após a incubação, os diâmetros dos halos de inibição produzidos são medidos com régua, paquímetro (figura 8) ou leitor de halos. De acordo com a dimensão dos halos, os microrganismos podem ser classificados como: sensíveis, moderadamente sensíveis ou resistentes.

O método de difusão apresenta como vantagens ser simples, rápido e de baixo custo. Entretanto, apresenta como desvantagem o facto de ser apenas qualitativo, é usado como método rotineiro em laboratórios de microbiologia.

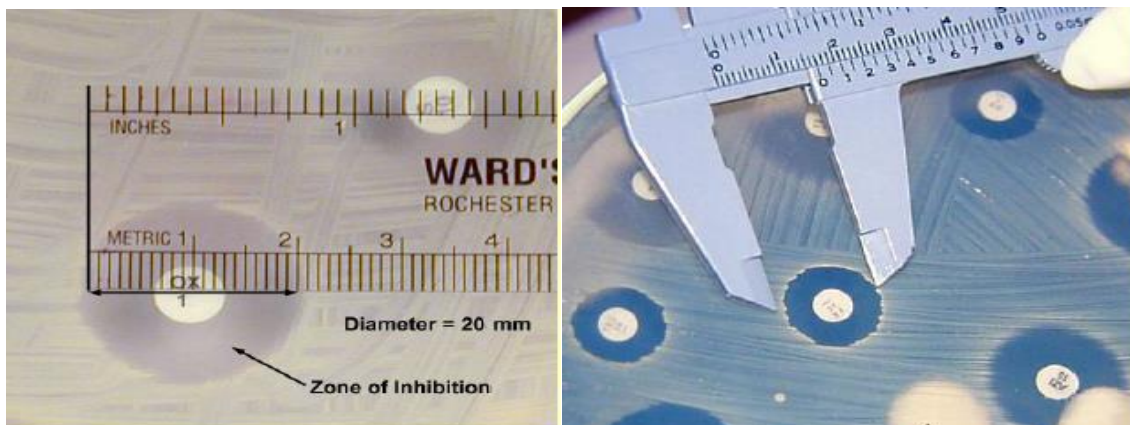


Figura 8: Medição do diâmetro de halo de inibição

2.2.2.2 Método de diluição em caldo

Para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) ou a concentração bactericida mínima (CBM) de extractos activos de plantas, tem-se utilizado um método sensível de diluição desenvolvido por Eloff em 1998. Este método pode ser realizado por metodologias de macro e microdiluição e expressa em números a menor concentração do antimicrobiano que é capaz de inibir o crescimento do microrganismo (CLSI, 2012; Ostrosky *et al.*, 2008).

O método de diluição em caldo considera a relação entre a proporção de crescimento do microrganismo posto a prova no meio líquido e a concentração da substância ensaiada. A avaliação é comparada em relação a um padrão biológico de referência. Entende-se por proporção, a densidade da turbidez provocada pelo crescimento microbiano. O método fornece resultados quantitativos e não é influenciado pela velocidade de crescimento dos microrganismos. A sua desvantagem é a dificuldade na detecção de contaminação no caso de teste de materiais clínicos. Como controle positivo, utiliza-se o caldo com o quimioterápico padrão com a suspensão padronizada do microrganismo em teste e, como controle negativo, o meio de cultura com o solvente usado para dissolução da amostra e a suspensão microbiana.

Duas metodologias podem ser usadas: macro e microdiluição (Sener e Dulger, 2009; Ostrosky *et al.*, 2008).

A microdiluição envolve testes em tubos de ensaio, com volume do meio de cultura variando de 1 e 10 ml. Por ser laborioso, consumir muito tempo, requerer muito espaço no laboratório e por gerar grande quantidade de resíduos, é usado pequeno número de réplicas (CLSI, 2012, Ostrosky *et al.*, 2008).

A microdiluição utiliza micro placas com 96 poços, com volume de meio de cultura entre 0,1 e 0,2 ml. O método de micro placas é barato, tem reprodutibilidade, é 30 vezes mais sensível que outros métodos usados na literatura, requer pequena quantidade de amostra, pode ser usado para um grande número das mesmas (CLSI, 2012; Sener e Dulger, 2009; Ostrosky *et al.*, 2008).

As variações referentes à determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extractos de plantas podem ser atribuídas a vários factores. Dentre estes factores, podemos citar a técnica aplicada, o microrganismo e a cepa utilizada no teste, a origem da planta, a época da colecta, se os extractos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas e a quantidade de extracto testada. Assim, não existe um método padronizado para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais (Cansian *et al.*, 2010a; Cansian *et al.*, 2010b; Auricchio *et al.*, 2007).

2.3 Métodos de avaliação da actividade antioxidante

A oxidação de lípidos em produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos, juntamente com o crescimento de microrganismos indesejáveis tem resultado no desenvolvimento de, principalmente, rancidez e deterioração, conduzindo a produtos não aceitáveis para consumo humano (Cansian *et al.*, 2010a).

A oxidação é um processo metabólico que leva à produção de energia necessária para as actividades essenciais das células. Entretanto, o metabolismo do oxigénio nas células vivas também leva à produção de espécies reactivas de oxigénio (radicais) (Oliveira *et al.*, 2009).

As espécies reactivas de oxigénio, tais como o radical hidroxilo (OH^\bullet), o anião radical peróxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e o radical hidroperóxido (ROO^\bullet), causam transformações no ADN, podem oxidar lípidos

e proteínas. As espécies reactivas de oxigénio atacam as cadeias de ácidos gordos polinsaturados dos fosfolípidos e do colesterol. Estas espécies retiram um hidrogénio do grupo metileno bis-alfílico, iniciando assim o processo de peroxidação lipídica nas membranas celulares. Os radicais de carbono formados reagem com o oxigénio originando radicais peroxilo que, por sua vez, podem atacar novas cadeias de ácidos gordos polinsaturados, propagando assim a reacção (Ramos, 2011).

O mecanismo da oxidação envolve alguns processos fundamentais tais como as reacções de iniciação (1), onde os radicais livres são gerados pelo calor, pela luz ou por acções combinadas; reacções de propagação (oxidação) (2), conduzindo aos radicais peroxi; reacções de quebra de cadeia, originando produtos da oxidação por reacções monomoleculares, pseudo-moleculares ou bimoleculares; e reacções de terminação (3), onde os radicais livres são eliminados do sistema reagindo entre si, quando uma redução na quantidade de oxigénio disponível é estabelecida, (esquema 1).

Os produtos da autoxidação primária são hidroperóxidos, que não apresentam gosto e nem odor, mas seus produtos de degradação (aldeídos, cetonas, entre outros) são potentes modificadores do gosto e do odor (Chorilli *et al.*, 2007; Del Ré e Jorge, 2012).



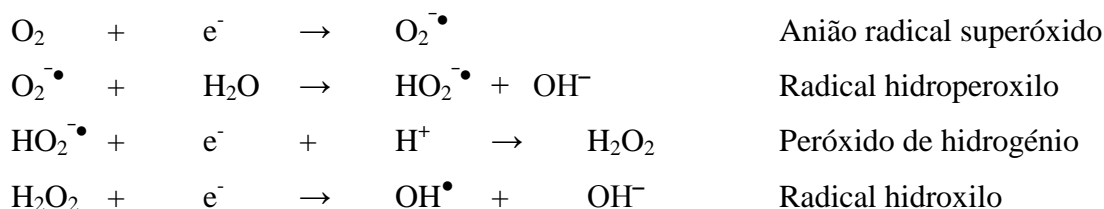
Esquema 1: Oxidação mostrando reacções de iniciação, propagação e terminação

Oxidantes são compostos produzidos pelo metabolismo normal do corpo e, se não forem controlados, podem provocar danos extensivos (Haida *et al.*, 2014, Oliveira *et al.*, 2009).

As espécies reactivas mais estudadas nos sistemas biológicos incluem as espécies reactivas de oxigénio (ERO), espécies reactivas de nitrogénio, radicais derivados de tióis (RS[•]), espécies

reactivas de cloro, espécies reactivas de carbono e complexos de metais de transição, principalmente Fe, Cu, Mn e Cr (Oliveira *et al.*, 2009).

Pela sua configuração electrónica, o oxigénio tende a receber um electrão de cada vez, formando compostos intermediários altamente reactivos, destacando-se o anião radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o radical hidroxilo (OH^{\bullet}), (esquema 2).

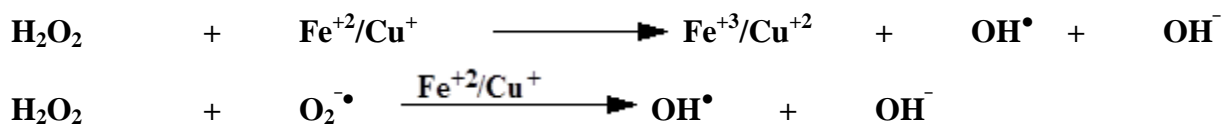


Esquema 2: Formação de espécies reactivas de oxigénio

O anião radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e radicais hidroxilo (OH^{\bullet}) são formados como resultado da sucessiva transferência de electrões isolados.

Pelo esquema, o anião radical superóxido é o primeiro intermediário de redução monovalente de oxigénio até água, sendo formado a partir dele, as demais ERO.

O radical hidroxilo é um dos mais potentes oxidantes, tendo a capacidade de atravessar membrana e reagir com moléculas tais como lípidos insaturados e ADN. Ele pode ser formado de outras formas, conforme pode ser visto no esquema 3 (Hirata *et al.*, 2004; Padmanabhan e Jangle, 2012):



Esquema 3: Formação do radical hidroxilo a partir de peróxido de hidrogénio

A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes os quais podem ter origem endógena, ou serem provenientes da dieta alimentar e de outras fontes. Quando há limitação na disponibilidade de antioxidantes podem ocorrer lesões oxidativas de carácter cumulativo. Assim, os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desactivar os

radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos das células (Ramos, 2011; Oliveira *et al.*, 2009).

O estresse oxidativo tem sido associado ao desenvolvimento de muitas doenças crónicas e degenerativas, incluindo o cancro, doenças cardíacas, doenças degenerativas como Alzheimer dentre outras, bem como está envolvido no processo de envelhecimento (Cansian *et al.*, 2010a; Roesler *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2009).

Foi descoberto que uma série de doenças entre as quais cancro, arterosclerose, diabetes, artrite, malária, SIDA, doenças do coração, entre outras, podem estar ligadas aos danos causados por formas de oxigénio extremamente reactivas denominadas espécies reactivas de oxigénio (ERO). Estas substâncias também estão ligadas com processos responsáveis pelo envelhecimento do corpo (figura 9) (Degáspari e Waszynskyj, 2004).

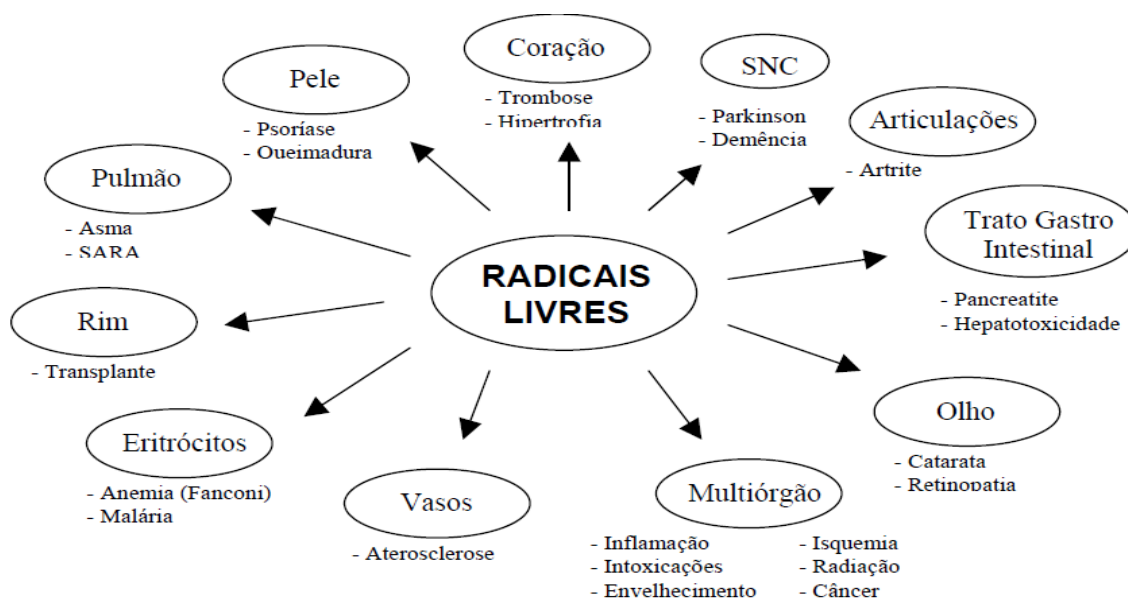


Figura 9: Doenças associadas às espécies reactivas de oxigénio.

2.3.1 Fontes de radicais livres

Existem dois tipos de fontes de radicais livres (figura 10) que podem enquadrar-se como endógenas, quando produzidas pelo próprio organismo como produto de uma determinada

reação metabólica, ou exógenas, quando são provenientes das condições do meio externo ao sistema biológico.

As fontes endógenas geradoras de radicais livres incluem as mitocôndrias e a actividade de algumas enzimas como xantina oxidase, citocromo P450-oxidase, monoaminoxidases, as enzimas envolvidas na via de produção de prostaglandinas, tromboxanos e a NADPH-oxidase da membrana plasmática de macrófagos. Podem também ser gerados nos leucócitos.

As fontes exógenas geradoras de radicais livres incluem o tabaco, poluição do ar, solventes orgânicos, dieta, anestésicos, pesticidas, radiações gama e ultravioleta.



Figura 10: (1) Fontes endógenas (2) Fontes exógenas (fonte: Ramos, 2011)

A actividade dos antioxidantes naturais é de interesse nutricional, uma vez que é associada à potencialização de efeitos promotores da saúde humana através da prevenção de várias doenças como diabetes, arteriosclerose, cancro, doença de Alzheimer, de Parkinson, SIDA e osteoporose. Em alguns casos, estes compostos também são empregues com propósitos terapêuticos, devido às suas propriedades farmacológicas tais como vasodilatadores, anti-inflamatória, bactericidas, estimuladores da resposta imune, antialérgicos e antivirais.

A actividade dos antioxidantes naturais é também de interesse tecnológico, pois o processamento de obtenção de alimentos com elevado teor destas substâncias supõe uma redução da utilização de antioxidantes sintéticos potencialmente cancerígenos, possibilitando a obtenção de alimentos mais saudáveis que podem ser incluídos no grupo dos alimentos funcionais (Ramos, 2011; Degáspari e Waszynskyj, 2004).

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, em pequenas concentrações, em comparação a substrato oxidável, retardam ou previnem significativamente o início ou a propagação da cadeia de reacções de oxidação. Estes compostos inibem não só a peroxidação dos lípidos, mas também, a oxidação de outras moléculas, como proteínas, ADN, entre outras e podem reduzir o dano oxidativo ao corpo humano (Sucupira *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2007; Degáspari e Waszynskyj, 2004; Ismail *et al.*, 2004).

Algumas características são necessárias para ser considerado um bom antioxidante, por exemplo, ter a presença de substituintes doadores de electrões ou de hidrogénio ao radical, em função do seu potencial de redução; capacidade de deslocamento do radical formando sua estrutura; capacidade de quelar metais de transição envolvidos no processo oxidativo; e acesso ao local de acção, dependendo da sua característica hidrofílica ou lipofílica e do seu coeficiente de partição (Sucupira *et al.*, 2012).

Existem algumas lacunas em relação aos antioxidantes, tais como: a inexistência de recomendação para cada antioxidante; falta de padronização quanto ao real valor antioxidante dos alimentos e possíveis efeitos tóxicos da administração de elevadas quantidades desses compostos.

Compostos químicos que possuem actividade antioxidante geralmente são aromáticos e contêm pelo menos um ião hidroxilo, podendo ser sintéticos como o butilhidroxianisol (BHA) e o butilhidroxitolueno (BHT), largamente utilizados pela indústria de alimentos (Duarte-Almeida *et al.*, 2006; Hinneburg *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2007) ou naturais que incluem os tocoferóis, vitamina C, carotenóides e compostos fenólicos (Haida *et al.*, 2014; Sushama e Nishteswar, 2014; Sucupira *et al.*, 2012).

Os antioxidantes naturais, denominadas substâncias bioactivas, incluem organosulfurados, os fenólicos (tocoferóis, flavonóides e ácidos fenólicos), os terpenóides, carotenóides e o ácido ascórbico que fazem parte da constituição de diversos alimentos (Oliveira *et al.*, 2007).

Diversos estudos têm demonstrado que o consumo de substâncias com poder antioxidante na dieta diária, pode produzir uma acção protectora efectiva contra os processos oxidativos que naturalmente ocorrem no organismo (Haida *et al.*, 2014).

2.3.2 Mecanismo de acção dos antioxidantes

Os antioxidantes proporcionam protecção contra os prejuízos oxidativos e vêm chamando atenção como um potencial agente quimiopreventivo. Eles agem interagindo com os radicais livres antes que estes possam reagir com as moléculas biológicas, evitando que ocorram as reacções em cadeia ou prevenindo a activação do oxigénio a produtos altamente reactivos (Pereira *et al.*, 2009; Bianchi e Antunes, 1999).

Os antioxidantes podem ser classificados, segundo o mecanismo de acção, em primários ou secundários. Os antioxidantes primários actuam interrompendo a cadeia da reacção através da doação de electrões ou hidrogénio aos radicais livres, enquanto os antioxidantes secundários actuam na complexação com metais, sequestro de oxigénio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radical, absorção da radiação ultravioleta ou desactivação de oxigénio singleto (Del Ré e Jorge, 2012).

As metodologias para a determinação da capacidade antioxidante são numerosas e podem estar sujeitas a interferências, além de se basearem em fundamentos diversos e não há qualquer método universal pelo qual a actividade antioxidante possa ser quantificada com precisão (Vignoli *et al.*, 2012; Andrade *et al.*, 2007).

Esta capacidade antioxidante pode ser expressa por meio de vários parâmetros que incluem a remoção de radicais peroxilo (ORAC e TRAP), a redução de metais (FRAP e CUPRAC), a remoção de radicais orgânicos (ABTS e DPPH) e a quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lípidos (TBARS, a oxidação do LDL, co-oxidação do β -caroteno). Os métodos FRAP, ABTS, DPPH e ORAC são mais utilizados para determinar a capacidade antioxidante *in vitro* (Sucupira *et al.*, 2012)

As mais comuns para se determinar a actividade antioxidante de modo prático, rápido e sensível são as que envolvem um radical cromóforo, simulando as espécies reactivas de oxigénio (ERO's), sendo o radical livre DPPH um dos mais utilizados (Vignoli *et al.*, 2012; Andrade *et al.*, 2007).

2.3.3 Método do radical DPPH

O DPPH é um método químico, aplicado para determinar a actividade antioxidante de um composto pelo sequestro de radicais livres, sendo um dos mais utilizados, pois ele é considerado um método rápido, prático e com boa estabilidade.

O DPPH é um radical de nitrogénio orgânico, estável, de cor violeta intensa, que possui absorção, em meio alcoólico, na faixa de 515-520nm (Andrade *et al.*, 2007).

A redução do radical DPPH é monitorada pelo decréscimo da absorvância durante a reacção, como se apresenta no gráfico representado na figura 11.

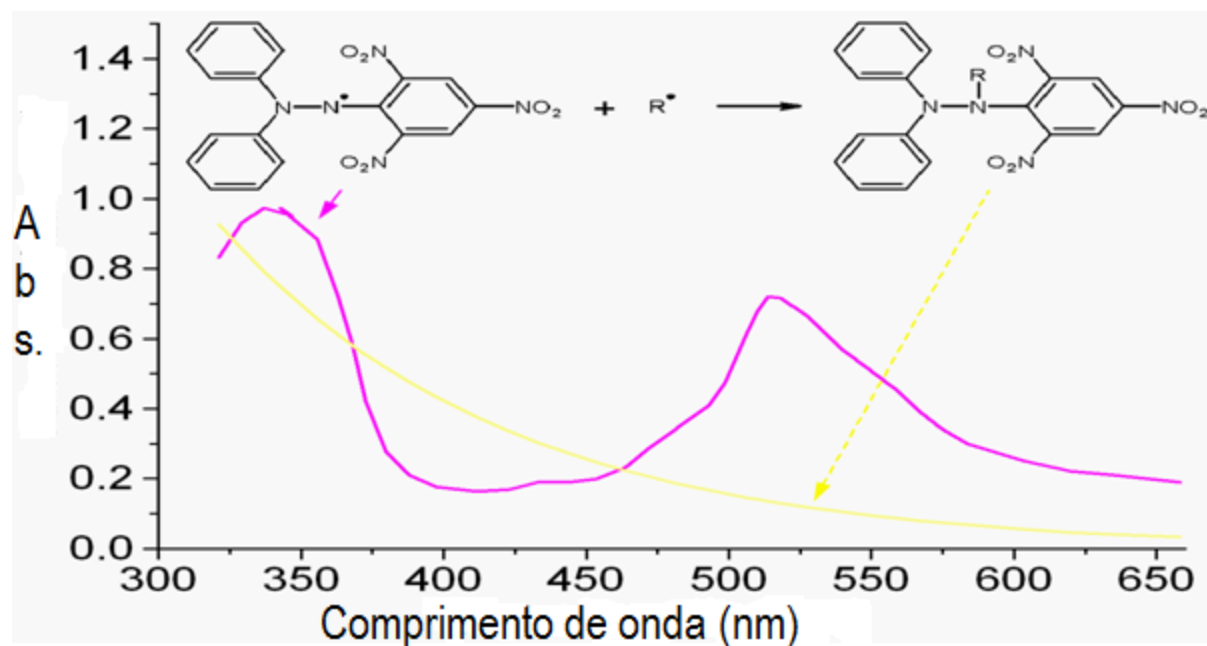


Figura 11: Gráfico de decréscimo da absorvância do radical DPPH durante a reacção

O método consiste em avaliar a actividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil – DPPH. Por acção de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R^{\bullet}), o DPPH é reduzido formando 2,2-difenil-1-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente desaparecimento da absorção (figura 12).

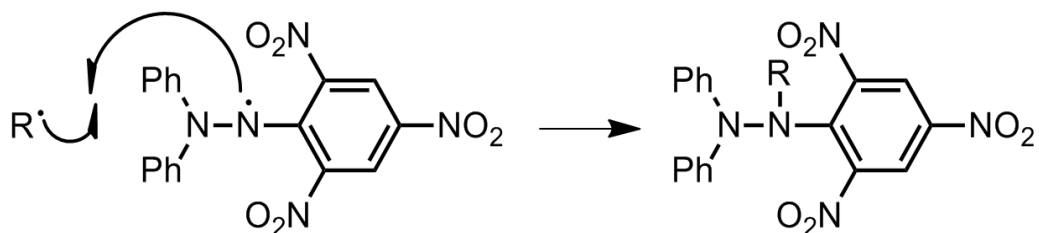


Figura 12: Formação de 2,2-difenil-1-picril-hidrazina a partir de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

O sequestro de radicais livres é um dos mecanismos reconhecidos pelo qual ocorre a acção dos antioxidantes. O método de sequestro do radical livre DPPH pode ser utilizado para avaliar a actividade antioxidante de compostos específicos ou de um extracto em curto período de tempo. O método DPPH tem sido muito utilizado para avaliar a actividade antioxidante de frutos (Roesler *et al.*, 2007).

A partir dos resultados obtidos determina-se a percentagem de actividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e a percentagem de DPPH remanescente no meio reaccional. A percentagem de actividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (CE₅₀), também chamada de concentração inibitória (CI₅₀) (Santos *et al.*, 2011).

Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CI₅₀ e maior a sua actividade antioxidante (Padmanabhan e Jangle, 2012; Molyneux, 2004).

3 Metodologia

3.1 Material e Reagentes

Todos os solventes e reagentes usados eram analiticamente puros. O reagente Folin-Ciocalteu foi preparado a partir de reagentes adquiridos da Merck, o radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) foi adquirido da Sigma-Aldrich, o ácido gálico adquirido da Merck, a vitamina C (ácido ascórbico) adquirido da Merck. As medidas de absorção foram feitas usando espectrofotómetro UV-Vis Spectroquant Pharo 300.

3.2 Colheita de amostras e preparação de extractos

Os frutos de *Vangueria infausta* (Mapilwa) foram colhidos na primeira quinzena do mês de Junho de 2013 na província de Gaza nos seguintes locais: (a) localidade de Chongoene no distrito de Xai-Xai; e (b) localidade de Chimodzo no distrito da Macia.

De seguida foi feita a pré-selecção, lavagem e refrigeração dos frutos a uma temperatura de 4°C no laboratório de Química dos Produtos Naturais e posteriormente realizou-se o despulpamento.

A polpa obtida foi depois submetida á secagem natural a temperatura ambiente, durante 48 horas e à secagem artificial em estufa de ar circulante, à uma temperatura de 40°C, durante 72 horas e, em seguida, pulverizada em moinho de marca IKA MF10.

Os frutos de *Strychnos spinosa* (Massala ou N'sala) foram colhidos em duas fases. A primeira colheita realizou-se na primeira quinzena do mês de Agosto de 2013 na província de Maputo, distrito de Moamba, no Bairro de Chiboene e a segunda colheita foi feita na última quinzena do mês de Dezembro do ano de 2013 também na província de Maputo, distrito da Manhiça na povoação de Esperança.

Após a colheita, seguiu-se a pré-selecção, lavagem e despulpamento. A conservação da polpa antes da extracção foi a uma temperatura de 4°C. A polpa dos frutos de *Strychnos spinosa* (Massala ou N'sala) não foi submetida a secagem.

Os derivados destes frutos (licores e jam) usados para este trabalho foram produzidos pela empresa Agro-serviços e adquiridos nas lojas de venda dos produtos desta mesma empresa.

Os princípios activos nas polpas foram extraídos pelo método Soxhlet usando como solvente o metanol a 99,5% e nos licores, foi usado o método de maceração e como solvente usou-se o

etanol absoluto a 99,9% após um prévio tratamento (filtração em papel de filtro Whatman n° 4 de 185 mm de diâmetro) e concentração a uma temperatura de 50° C em estufa de ar circulante. Em todos os extractos, a recuperação dos solventes de extracção foi realizada através de um vaporizador rotativo.

Os extractos foram submetidos a quatro tipos de testes (físico-química, fitoquímicos, antimicrobianos e antioxidantes) e para cada tipo de teste foram usadas metodologias específicas descritas na literatura.

3.3 Determinação das propriedades físico-químicas

Na determinação das propriedades físico-químicas seguiu-se técnicas e normas descritas pelo Instituto Adolfo Lutz, 2008. Todas as leituras foram realizadas em triplicado para a obtenção de resultados mais significativos.

3.3.1 Teor de sólidos solúveis (°Brix)

As amostras das polpas e jam foram homogeneizadas em triturador doméstico de marca Philips, quantificado em refractómetro de marca EXACTA-OPTECH e os resultados foram expressos em °Brix. A determinação dos sólidos solúveis totais (SST) foi realizada colocando-se uma gota do suco da polpa e do jam no prisma e fazendo-se uma leitura directa em °Brix. A cada leitura, zerava-se o aparelho com água destilada (Zillo *et al.*, 2013; Instituto Adolfo Lutz, 2008).

3.3.2 Potencial de Hidrogénio (pH)

A determinação do pH foi realizada em um potenciómetro de marca EUTECH - pH700. Para as análises, foi pesado 1 g das polpas e do jam, e de seguida dissolvidos em 50 ml de água destilada. Após a homogeneização fez-se leitura do pH. A leitura do pH nos licores foi realizada directamente, não houve necessidade de realizar as dissoluções, uma vez os licores encontrarem-se no estado líquido (Zillo *et al.*, 2013; Instituto Adolfo Lutz, 2008).

3.3.3 Grau alcoólico (%)

O grau alcoólico foi determinado apenas nas amostras dos licores pelo método de densitometria em picnómetro de vidro. O picnómetro foi calibrado com água destilada e as análises foram feitas a 20 °C (Instituto Adolfo Lutz, 2008; Caruso *et al.*, 2008, Labanca *et al.*, 2006).

3.3.4 Índice de refração

Para determinação do índice de refração utilizou-se o refractómetro ajustado com água destilada à temperatura de 25°C. O refractómetro de marca EXACTA-OPTECH foi calibrado em °Brix (g de sacarose/100g de amostra) e em água destilada depois foram feitas as medições (Instituto Adolfo Lutz, 2008; Cavalcanti *et al.*, 2006).

3.3.5 Densidade relativa

A determinação de densidade consistiu em medir o peso do picnómetro com volume conhecido, usando água pura a 20°C, previamente seco em estufa a 100°C. Depois da secagem em estufa, coloca-se nele a amostra, a 20°C e iniciam-se as medições (Instituto Adolfo Lutz, 2008).

3.4 Triagem fitoquímica das amostras

Para a realização da prospecção fitoquímica preliminar qualitativa, foram usadas metodologias descritas por Araújo *et al.* (2010); Silva *et al.* (2010), Matos (1997) e reagentes habituais de identificação dos constituintes químicos. Os extractos foram submetidos à triagem fitoquímica preliminar para detecção das principais classes de metabólitos secundários através de reacções químicas que resultam no desenvolvimento de coloração e/ou formação de precipitado, característico para cada classe de substâncias.

3.4.1 Esteróides e Triterpenóides

Os testes para Esteróides e Triterpenóides foram realizados pela reacção de Lieberman- Burchard (anidrido acético + ácido sulfúrico concentrado), tomando 2 ml do extracto e misturando-o á 2 ml de clorofórmio, em seguida a solução clorofórmica foi filtrada gota a gota em um funil com

algodão coberto com alguns decigramas de Na_2SO_4 anidro. Em tubo de ensaio, adicionou-se 1 ml de anidrido acético, agitando suavemente, e acrescentou-se cuidadosamente três gotas de H_2SO_4 concentrado, agitando suavemente e observando-se o desenvolvimento de cores.

3.4.2 Flavonóides

Foram identificados através do teste de cianidina ou Shinoda (HCl concentrado e magnésio). Foi adicionado a 2 ml do extracto, aproximadamente 0,5 cm de magnésio em fita com 2 ml de ácido clorídrico concentrado. O fim da reacção deu-se pelo término de efervescência.

3.4.3 Taninos

Em um tubo de ensaio contendo 2 ml do extracto adicionou-se três gotas de solução alcoólica de FeCl_3 , agitando fortemente, observando-se uma variação de cor.

3.4.4 Saponinas

Em 2 ml do extracto adicionou-se 2 ml de clorofórmio e 5 ml de água destilada e depois filtrou-se a mistura para um tubo de ensaio. Em seguida a solução foi agitada permanentemente por 3 minutos observando-se a formação de espuma.

3.4.5 Alcalóides

Utilizou-se 2 ml do extracto metanólico em tubo de ensaio, alcalinizado com quinze gotas de hidróxido de sódio a 1% e acrescido de 2 ml de água, e adicionou-se 2 ml de clorofórmio. A fracção aquosa foi desprezada e a fracção clorofórmica acrescida de quinze gotas de ácido clorídrico a 1%, em seguida extraída com 2ml de água. Essa fracção clorofórmica foi desprezada e os testes foram realizados com a fracção aquosa ácida, onde se acrescentou três gotas do reagente de Dragendorff para a verificação da presença de alcalóides.

3.5 Determinação da actividade antimicrobiana

3.5.1 Microrganismos

Os microorganismos usados para a determinação da actividade antimicrobiana dos extractos, pelo método de difusão em agar ou método de Kirby-Bauer foram os seguintes: (1) *Escherichia coli* (Gram-negativa) isolada de uma hemocultura, (2) *Escherichia coli* (Gram-negativa) isolada numa amostra de urina, (3) *Klebsiella pneumoniae*, (5) *Salmonella thyphimurium* (Gram-negativas), (6) *Staphylococcus aureus* (Gram-positivo), estas bactérias são potencialmente patogénicas ou patógenos primários e a levedura *Candida albicans* (4) que é um fungo oportunista.

3.5.2 Isolamento de colónias puras

Uma pequena porção de colónias foi subcultivada em placas contendo os meios de cultura agar Mac Conkey para o isolamento das bactérias Gram negativas, agar Sangue para as Gram positivas e agar Sabouraud Dextrosa para a levedura. Após a inoculação as placas contendo as bactérias foram incubadas na estufa a 37°C, durante 24 horas. Este tempo é o necessário para a obtenção dum crescimento bacteriano óptimo, e as com leveduras foram incubadas a 29°C por 72 horas. Findo o tempo de incubação, as placas foram examinadas para a identificação das características morfológicas das colónias, e também para a realização dos testes bioquímicos e outras provas que permitiram a identificação das espécies bacterianas desejadas.

3.5.3 Preparação dos inóculos

Três a quatro colónias de bactérias, bem isoladas, do mesmo tipo morfológico, foram seleccionadas das placas de isolamento agar com auxílio de uma ansa bacteriológica a superfície de cada colónia, e os microorganismos foram transferidos para um tubo de ensaio contendo 5 ml de solução fisiológica estéril. A suspensão de bactérias foi preparada com auxílio de um densitómetro e comparada a turvação com uma solução padrão a 0,5 na escala de McFarland. A suspensão resultante teve o equivalente a 1 a 2 X 10⁸ ufc/ml.

3.5.4 Preparação de soluções de extractos e fracções em diferentes concentrações

Preparou-se uma solução de 200 mg/ml, pesando-se num frasco estéril 1,0 g de extracto e solubilizou-se em 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Esta solução é de concentração máxima ou a 100%. O procedimento foi o mesmo para a preparação de todas as soluções das cinco amostras nomeadamente: extracto metanólico da polpa dos frutos da *Vangueria infausta*, extracto etanólico do licor dos frutos da *Vangueria infausta*, extracto metanólico do jam dos frutos da *Vangueria infausta*, extracto metanólico da polpa dos frutos da *Strychnos spinosa* e extracto etanólico do licor dos frutos da *Strychnos spinosa* designados por A, B, C, D e E, respectivamente.

3.5.5 Preparação dos discos

Para a preparação dos discos foi usado papel de filtro tipo "Whatman No.1". Com auxílio de um furador de papel comum, foram preparados os discos. Os discos resultantes foram uniformes quanto a tamanho, e aceitavelmente circulares. Posteriormente, os discos foram etiquetados usando um lápis de grafite. Os discos preparados foram depois acondicionados em placas de Petri para permitir a esterilização por calor seco, numa estufa de Pasteur (Thermo scientific) por 2 horas a uma temperatura de 170°C.

Seguidamente, os discos foram impregnados com soluções de diferentes concentrações de extracto previamente preparadas, tendo-se usado o volume de 20µl para cada disco. Todo o procedimento foi realizado perto da chama do bico de Bunsen para garantir a esterilidade dos discos.

Após a impregnação, nas soluções preparadas, os discos foram postos a secar numa estufa a 37°C e depois conservados numa geleira a 4°C.

Os discos preparados foram depois submetidos a testes de sensibilidade seguindo os procedimentos descritos no método de Kirby-Bauer (Laborclin Produtos para Laboratório, 2011).

3.5.6 Realização dos testes de sensibilidade

Para a realização dos testes antimicrobianos, foi utilizada a metodologia de difusão em disco (difusão em agar). A metodologia consistiu em colocar os discos de papel de filtro impregnados com extractos, sobre o meio de cultura sólido, Agar Muller-Hinton, previamente inoculado com diferentes cargas microbianas, 10^8 ufc/ml para bactérias.

A disposição dos discos foi tal que, a sua distância até à lateral da placa fosse maior que 15 mm e de modo a não haver sobreposição das zonas de inibição.

O pH do meio de cultura usado estava entre 7,2 e 7,4 e a espessura era de aproximadamente 4 mm.

3.5.7 Inoculação das placas de teste

Uma zaragatoa estéril foi mergulhada num tubo contendo a suspensão de bactérias ajustada. A zaragatoa foi girada várias vezes e apertada firmemente contra a parede interna do tubo, acima do nível do líquido, de modo a retirar qualquer excesso de inóculo na zaragatoa.

Depois deste processo, as placas de agar Muller-Hinton foram inoculadas esfregando a zaragatoa por estrias em toda a superfície estéril do agar, girando varias vezes a placa até que o inóculo estivesse uniformemente distribuído. As placas foram depois tapadas e deixadas entreabertas cerca de três a cinco minutos, de maneira a permitir que qualquer excesso de humidade fosse absorvido antes de se aplicar os discos impregnados com os extractos.

3.5.8 Aplicação de discos a placas de agar inoculadas

Um conjunto de 5 discos contendo diferentes extractos a testar mas à mesma concentração foram colocados numa superfície de uma placa de agar semeada. Cada disco foi pressionado de encontro à placa, de maneira a assegurar contacto completo com a superfície de agar. Os discos foram distribuídos por igual distância. Após 24 horas de incubação, as placas foram examinadas. As condições de incubação recomendadas são de uma temperatura entre 35-37 °C para bactérias durante 24 a 48 horas (Palmeira *et al.*, 2010; CLSI, 2012; Ostrosky *et al.*, 2008).

Se a placa foi satisfatoriamente semeada, os halos de inibição resultantes serão uniformemente circulares e haverá um tapete confluyente de crescimento. Os diâmetros dos halos de inibição foram observados a olho nú.

Para o caso de extractos de plantas, não existe um critério padrão de comparação, tornando-se difícil (ou impossível) usar os termos sensível e intermédio. Os padrões de comparação usados foram padronizados para os laboratórios clínicos onde os discos usados têm também concentrações padronizadas.

Assim, a interpretação dos resultados dos testes de determinação da actividade antimicrobiana dos extractos, foi baseada na medição dos halos de inibição e na observação e registo da presença ou não do mesmo. Neste caso, como controlo positivo, foi usado um quimioterápico padrão, e como controle negativo um solvente utilizado para a dissolução dos extractos.

3.6 Determinação de fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais presentes nas amostras de extractos metanólico e etanólico das polpas dos frutos de *Vangueria infausta* e *Strychnos spinosa* e seus derivados (licores e jam) foi feita por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin – Ciocalteu com modificações (Alhakmani *et al.*, 2013; Blainski *et al.*, 2013; Moraes-de-Souza *et al.*, 2011; Sousa *et al.*, 2007).

O extracto metanólico para as polpas de *Vangueria infausta* e *Strychnos spinosa* e para jam de *Vangueria infausta* e o extracto etanólico para os licores de *Vangueria infausta* e *Strychnos spinosa* (0,1 g), foram dissolvidos em metanol, transferidos quantitativamente para um balão volumétrico de 100 ml e o volume final foi completado com metanol. Uma alíquota de 7,5 ml desta solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 ml; esta segunda solução teve o seu volume acertado novamente com metanol. Uma alíquota de 100 µl desta última solução foi agitada com 500 µl do reagente de Folin- Ciocalteu e 6 ml de água destilada por 1 minuto; passado este tempo 2 mL de Na₂CO₃ a 15% foram adicionados à mistura e agitada por 30 segundos. Finalmente, a solução teve o seu volume acertado para 10 ml com água destilada.

Após 2 horas, a absorvância das amostras foi medida a 750 nm utilizando-se cuvetas de vidro, tendo como “branco” o metanol e todos os reagentes, menos o extracto.

O teor de fenóis totais (FT) foi determinado por interpolação da absorvância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (0 a 350 mg/ml) preparado dissolvendo 0,5 gramas em 100 ml numa mistura de água e metanol (10 ml e 90 ml de água destilada) e expresso como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extracto dos frutos e derivados, obtido a partir da aplicação da equação 1. Todas as análises foram realizadas em triplicado.

$$EAG = \frac{CxV}{m} \quad (1)$$

onde **EAG** é equivalentes gramas de ácido gálico em mg/g, **C** é concentração de ácido gálico em mg/mL, **V** é volume do extracto usado no teste em mL e **m** é massa do extracto em g.

3.7 Determinação da actividade antioxidante

A capacidade antioxidante dos extractos brutos das polpas e seus derivados foi avaliada, utilizando-se o método do sequestro de radicais livres do DPPH, que se baseia em um ensaio fotométrico onde o radical livre DPPH, que apresenta coloração roxa intensa em solução alcoólica, se reduz em presença de moléculas antioxidantes, formando o 2,2-difenil-1-picrilhidrazina, que é incolor (Vargas *et al.*, 2008; Iha *et al.*, 2008).

3.7.1 Construção da curva de calibração

Foram preparados 50 ml de solução estoque de DPPH em metanol na concentração de 40 µg/ml, mantida sob refrigeração e protegida da luz. Depois foram feitas diluições de 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 1 e 0 µg/ml. A curva de calibração foi construída a partir dos valores da absorvância a 515 nm de todas as soluções (0 a 40 µg/ml), medidas em cuvetas de vidro com percurso óptico de 1 cm e tendo como “branco” o metanol. As medidas de absorvância foram efectuadas em intervalos de 1 min entre cada leitura.

3.7.2 Leitura das medidas de absorvância nas amostras

As soluções dos extractos metanólicos (100 mg/l) e dos controles positivos em metanol foram diluídas nas concentrações de 75, 50, 25 mg/l. As medidas das absorvâncias das misturas reaccionais (0,3 ml da solução da amostra ou do controle positivo e 2,7 ml da solução estoque de DPPH na concentração de 40 µg/ml) foram feitas a 515 nm, após 30 minutos. A mistura de metanol (2,7 ml) e solução metanólica do extracto (0,3 ml) foi utilizada como branco.

3.7.3 Determinação da percentagem de DPPH remanescente

É possível determinar qual a quantidade de DPPH restante após a reacção ter sido completada. A partir da equação da curva de calibração e dos valores de absorvância no tempo de 30 min para cada concentração testada, foram determinadas as percentagens de DPPH remanescentes (% DPPH_{REM}), conforme a equação 2:

$$\% \text{DPPH}_{\text{REM}} = [\text{DPPH}]_{\text{T=t}} / [\text{DPPH}]_{\text{T=0}} \times 100 \quad (2)$$

onde $[\text{DPPH}]_{\text{T=t}}$ corresponde à concentração de DPPH no meio (30 minutos), após a reacção com o extracto e $[\text{DPPH}]_{\text{T=0}}$ é a concentração inicial de DPPH, ou seja, 40 µg/ml.

3.7.4 Determinação da percentagem de inibição

A capacidade de determinado composto inibir a oxidação de substrato oxidável pode ser simulada por meio da redução química do radical DPPH, obtida pela doação de prótons de hidrogénio do composto ao radical. Essa simulação tem sido denominada “percentagem de inibição” ou “percentagem de sequestro de DPPH” sendo calculada pela equação 3:

$$\% \text{ Inibição} = ((\text{Abs}_{\text{DPPH}} - \text{Abs}_{\text{Extr}}) / \text{Abs}_{\text{DPPH}}) \times 100 \quad (3)$$

onde Abs_{DPPH} é a absorvância da solução de DPPH a 40 µg/ml e Abs_{Extr} é a absorvância da amostra em solução. Abs_{Extr} foi calculada com base na diferença da absorvância da solução de amostra em teste com o seu branco.

3.7.5 Coeficiente de inibição (CI₅₀)

O coeficiente de inibição (CI₅₀), ou seja, a concentração necessária para se inibir 50% da oxidação do substrato oxidável foi obtido pela equação da recta gerada das percentagens de inibição associadas a quatro níveis de concentração (100, 75, 50 e 25 mg/l) para cada amostra. Quanto menor o CI₅₀, melhor é a actividade antioxidante (Moraes-de-Souza *et al.*, 2011). A concentração da amostra, equivalente a 50% da absorvância do DPPH, foi calculada graficamente (Santos *et al.*, 2011).

3.7.6 Percentagem da actividade antioxidante (%AA)

Os valores de absorvância em todas as concentrações testadas, no tempo de 30 min, podem ser também convertidos em percentagem de actividade antioxidante (% AA), determinada pela equação 4:

$$\%AA = \{[Abs_{controle} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})] \times 100\} / Abs_{controle} \quad (4)$$

onde $Abs_{controle}$ é a absorvância inicial da solução metanólica de DPPH e $Abs_{amostra}$ é a absorvância da mistura reaccional (DPPH + amostra).

4 Resultados

4.1 Resultados de extracção

Os resultados do processo de extracção usando o metanol como solvente para as polpas e jam aplicando a metodologia de Soxhlet e usando o solvente etanol para os licores, aplicando a metodologia de maceração, são apresentados na tabela 11.

Na extracção das amostras de *V. infausta*, obteve-se maiores quantidades de extractos na amostra da polpa quando comparada com jam. Nas amostras de licores, obteve-se maiores quantidades de extractos nas amostras de *V. infausta* comparada com os de *S. spinosa*.

Tabela 11: Resultados de extracções dos frutos das plantas *V. infausta* e *S. spinosa*

Fruto extraído	Amostra	Extracto	Solvente
Polpa da <i>Vangueria infausta</i>	100 g	43,990 g	500 ml
Polpa da <i>Strychnos spinosa</i>	300 g	31,039 g	500 ml
Jam da <i>Vangueria infausta</i>	100 g	39,149 g	500 ml
Licor de <i>Vangueria infausta</i>	200 ml	63,825 g	500 ml
Licor de <i>Strychnos spinosa</i>	200 ml	60,361 g	500 ml

4.2 Resultados de análises físico-químicas de *V. infausta* e *S. spinosa*

Os resultados das análises físico-químicas (pH, grau alcoólico, °Brix, índice de refração e densidade relativa) da polpa e derivados dos frutos *V. infausta* e *S. spinosa* são mostrados nas tabelas 12 e 13, respectivamente.

Nas amostras de *V. infausta*, o licor apresenta valor de pH maior quando comparado com os valores da polpa e do jam, o jam tem o °Brix maior em relação à polpa e licores e o índice de refração obtido no licor é maior que os índices da polpa e jam. O grau alcoólico e a densidade foram determinados apenas nos licores (tabela 12).

Tabela 12: Caracterização físico-química da polpa, jam e licor do fruto *V. infausta*

Parâmetros determinados	Polpa de <i>V. Infausta</i>	Licor de <i>V.Infausta</i>	Jam de <i>V. Infausta</i>	Método
pH	3,186 ± 0,046	3,550 ± 0,006	3,245 ± 0,064	pH-metro
Grau alcoólico (%)	n.d.	16,90 ± 0,12	n.d.	Alcoolímetro
(°Brix)	36,44 ± 0,68	37,40 ± 0,12	49,67 ± 0,58	Refractometria
Índice de refração	1,209 ± 0,346	1,394 ± 0,001	1,340 ± 0,006	Refractometria
Densidade relativa	n.d.	1,073 ± 0,056	n.d.	Picnómetro

(°Brix) – sólidos solúveis totais, n.d. – não determinado, valores obtidos por meio da média ± desvio padrão

Nas amostras de *S. spinosa*, obtiveram-se valores maiores de pH, °Brix e de índice de refração no licor que na polpa (tabela 13).

Esta diferença entre os valores das polpas e seus derivados era de esperar, uma vez que, o fabricante adiciona açúcar durante o processo de produção destes derivados.

Tabela 13: Caracterização físico-química da polpa e licor do fruto de *S. spinosa*

Parâmetros determinados	Polpa de <i>S.spinosa</i>	Licor de <i>S.spinosa</i>	Método
pH	3,220 ± 0,160	4,30 ± 0,02	pH-metro
Grau alcoólico (%)	n.d.	15,60 ± 0,10	Alcoolímetro
(°Brix)	33,78 ± 0,34	35,00 ± 0,00	Refractometria
Índice de refração	1,310 ± 0,025	1,390 ± 0,006	Refractometria
Densidade relativa	n.d.	1,103 ± 0,104	Picnómetro

(°Brix) – sólidos solúveis totais, n.d. – não determinado, valores obtidos por meio da média ± desvio padrão

4.3 Resultados da triagem fitoquímica de *V. infausta* e *S. spinosa*

Utilizando a metodologia de prospecção preliminar realizou-se testes para classes de metabólitos secundários: esteróides, triterpenóides, saponinas, taninos, alcalóides e flavonóides. Os testes foram realizados em extractos das polpas, licores e jam de *V. infausta* e em extractos das polpas e licores de *S. spinosa* e os resultados estão apresentados nas tabelas 14 e 15.

Nos extractos da polpa, licor e jam do fruto de *V. infausta* há presença de flavonóides e saponinas e ausência de taninos e alcalóides. No licor não foram detectados esteróides e triterpenóides, mas estes fitoquímicos estão presentes na polpa e no jam deste fruto (tabela 14).

Tabela 14: Constituintes fitoquímicos da polpa, licor e jam do fruto da *V. infausta*

Amostras	Solventes	Constituintes químicos					
		Est	Trit	Fla	Tan	Sap	Alc
<i>V. Infausta</i>							
Polpa	Metanol	+	+	+	-	+	-
Licor	Etanol	-	-	+	-	+	-
Jam	Metanol	+	+	+	-	+	-

Est – esteróides, Trit – triterpenóides, Fla – flavonóides, Tan – taninos, Sap – saponinas e Alc – alcalóides, + = presença, - = ausência.

Os extractos da polpa e licor do fruto da planta *S. spinosa* mostraram, através deste rastreamento fitoquímico, a presença de esteróides, triterpenóides, flavonóides, taninos, saponinas e alcalóides (tabela 15).

Tabela 15: Constituintes fitoquímicos de extractos da polpa e licor do fruto de *S. spinosa*

Amostras	Solventes	Constituintes químicos					
		Est	Trit	Fla	Tan	Sap	Alc
<i>S. spinosa</i>							
Polpa	Metanol	+	+	+	+	+	+
Licor	Etanol	+	+	+	+	+	+

Est – esteróides, Trit – triterpenóides, Fla – flavonóides, Tan – taninos, Sap – saponinas e Alc – alcalóides, + = presença

4.4 Resultados da avaliação da actividade antimicrobiana de *V. infausta* e *S. spinosa*

A concentração máxima preparada dos extractos das polpas, jam e licores (*V. infausta*) e das polpas e licores (*S. spinosa*) para os testes antimicrobianos foi de 200 mg/ml.

Nenhum dos extractos inibiu o crescimento dos microrganismos testados, isto é, as amostras impregnadas nos discos para avaliar actividade antimicrobiana não induziram a formação de halos de inibição frente aos microrganismos testados (figura 13).

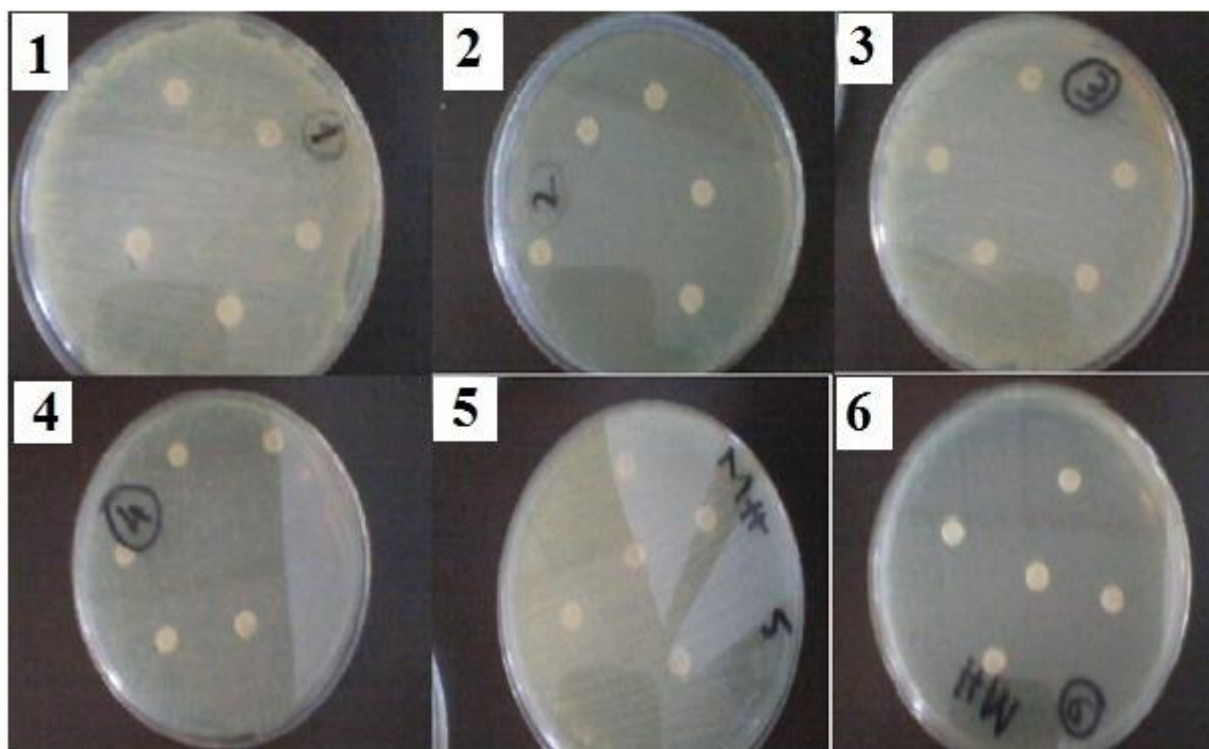


Figura 13: Placas com discos impregnados com extractos a 200 mg/ml comprovando a ausência da actividade antimicrobiana

4.5 Resultados da determinação de fenóis totais

A quantificação de compostos fenólicos foi realizada através de curva de calibração do ácido gálico, representada pelo gráfico 1. A equação da recta $y = 0,0024x + 0,1111$, foi usada para determinar a concentração em mg de ácido gálico, onde x corresponde a concentração de ácido gálico e y corresponde á absorvância da amostra ($R^2 = 0,9572$).

As concentrações de compostos fenólicos totais em mg de ácido gálico/g de extracto (EAG), obtidas para as polpas e derivados dos frutos *V. infausta* (Mapfilwa) e *S. spinosa* (Massala) encontram-se na tabela 16.

Tabela 16: Compostos fenólicos totais nas polpas e derivados de *V. infausta* e *S. spinosa*

	<i>Vangueria infausta</i>			<i>Strychnos spinosa</i>	
	Polpa	Licor	Jam	Polpa	Licor
Abs (amostra)	0,128±0,001	0,055±0,008	0,084±0,012	0,176±0,006	0,078±0,012
Con A.G (mg/ml)	7,04±0,42	< LD	< LD	27,04±2,53	< LD
EAG (mg/g)	0,528±0,030	< LD	< LD	2,028±0,190	< LD

Valores obtidos por meio da média ± desvio padrão, < LD = menor que limite de detecção

O método de Folin-Ciocalteu permite quantificar compostos fenólicos e antocianinas presentes nas amostras, os quais têm a capacidade de ligar-se a radicais livres, inibindo processos oxidativos. Os extractos metanólicos das polpas de *V. infausta* e de *S. spinosa* apresentaram valores de teores de compostos fenólicos de 0,528±0,030 e 2,028±0,190 mg EAG por grama de extracto, respectivamente. Tendo em conta o gráfico 1, não foram determinados os teores dos compostos fenólicos dos derivados (licor e jam de *V. infausta* e licor de *S. spinosa*) porque apresentaram valores de absorvância menores que a registada para o branco que foi de aproximadamente 0,1.

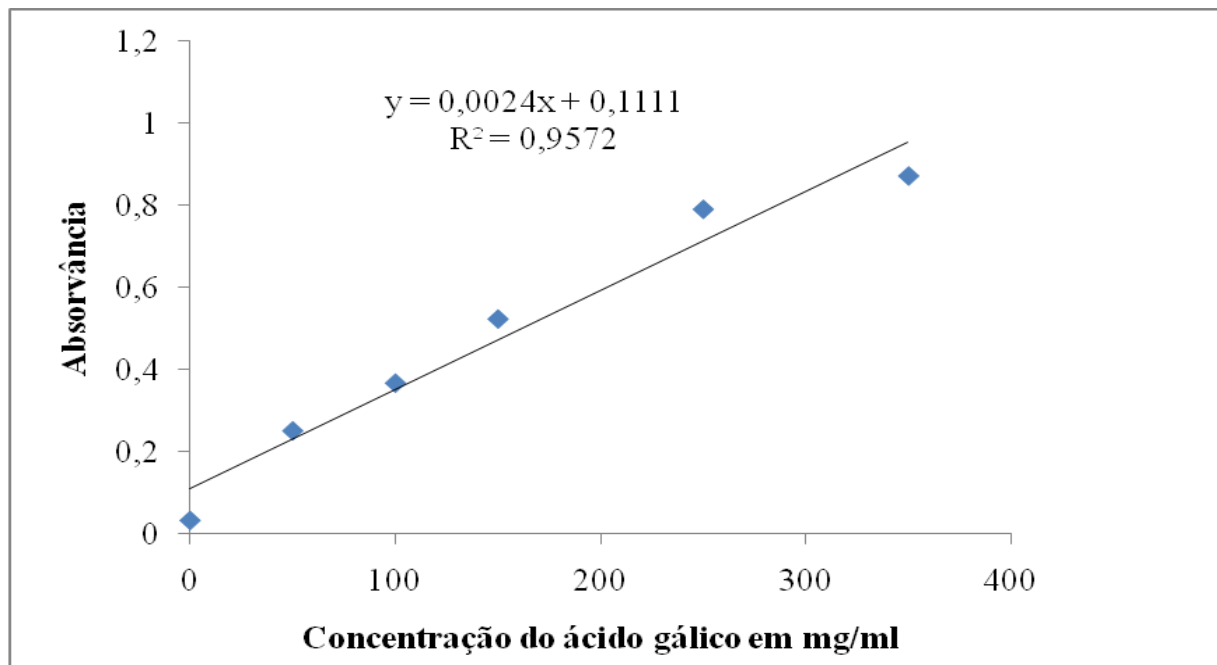


Gráfico 1: Curva de calibração do ácido gálico em mg/ml

4.6 Resultados da avaliação da actividade antioxidante usando o método DPPH

Neste estudo, a actividade antioxidante foi analisada segundo método de sequestro do radical estável DPPH, onde o composto antioxidante transfere electrões para o DPPH e este perde a coloração púrpura característica. O ensaio foi escolhido por se tratar de método simples e sensível. A curva de calibração foi construída a partir dos valores da absorvância a 515 nm das soluções (0 a 40 $\mu\text{g/ml}$) de DPPH (gráfico 2).

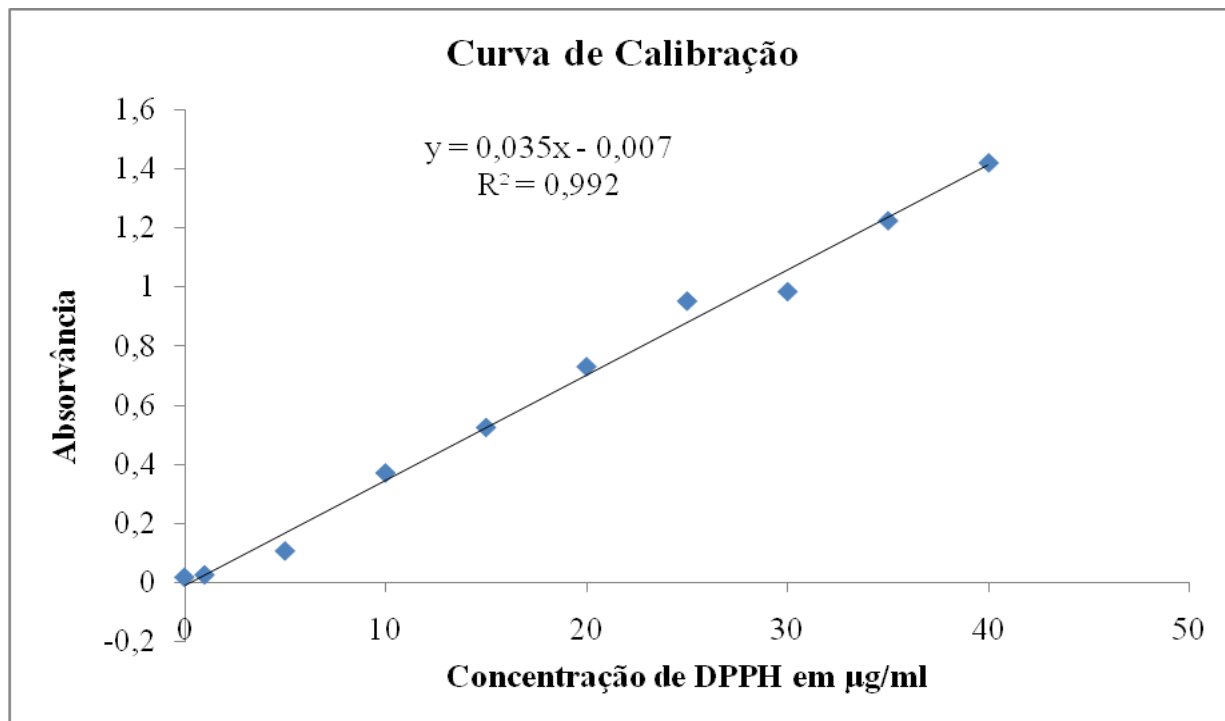


Gráfico 2: Curva de calibração de DPPH em µg/ml

A tabela 17 apresenta os valores das absorvâncias, em triplicado, a 515 nm, a diferentes concentrações das amostras das polpas e derivados dos frutos das plantas *V. infausta* e *S. spinosa*.

Tabela 17: Valores médios das absorvâncias das diferentes diluições dos extractos

Amostras		Abs DPPH	Abs Branco	Concentrações (mg/l)				
				6,25	25	50	75	100
<i>V. infausta</i>	Polpa	1,419	0,119		0,682±0,074	0,297±0,108	0,174±0,075	0,115±0,019
	Licor	1,419	0,088		1,227±0,019	1,212±0,004	1,121±0,039	1,109±0,082
	Jam	1,419	-0,001		1,133±0,034	0,936±0,012	0,805±0,009	0,621±0,023
<i>S. spinosa</i>	Polpa	1,419	0,019		0,658±0,039	0,274±0,010	0,131±0,009	0,123±0,018
	Licor	1,419	0,007		1,134±0,035	0,980±0,011	0,843±0,004	0,719±0,025
	Vit. C	1,419	0,035	0,068±0,004				

^cAbsorvância exprimida em média de três medições ± desvio padrão

4.6.1 Resultados da percentagem de DPPH remanescente

A tabela 18 apresenta valores da percentagem de DPPH remanescente após 30 minutos de reacção, obtidos a partir da equação da curva de calibração (grafico 2) e da equação 2.

Tabela 18: Percentagem de DPPH remanescente após 30 minutos de reacção

Amostra		% DPPH Remanescente por concentração				
		Concentração em mg/l				
		6,25	25	50	75	100
<i>Vangueria infausta</i>	Polpa		49,21	21,71	12,93	8,71
	Licor		88,14	87,07	80,57	79,71
	Jam		81,43	67,36	58	44,86
<i>Strychnos spinosa</i>	Polpa		47,5	20,07	9,86	9,29
	Licor		81,5	70,5	60,71	51,86
	Vit. C	5,36				

Destes resultados observa-se que os extractos das polpas a concentrações de 75 e 100 mg/l foram mais eficientes, apresentando a percentagem da concentração DPPH após 30 minutos de reacção muito inferior e a sua eficiência é próxima a verificada na vitamina C, padrão usado neste estudo, em relação ao mesmo radical. Em forma de diagrama, estes resultados podem ser observados na figura 14.

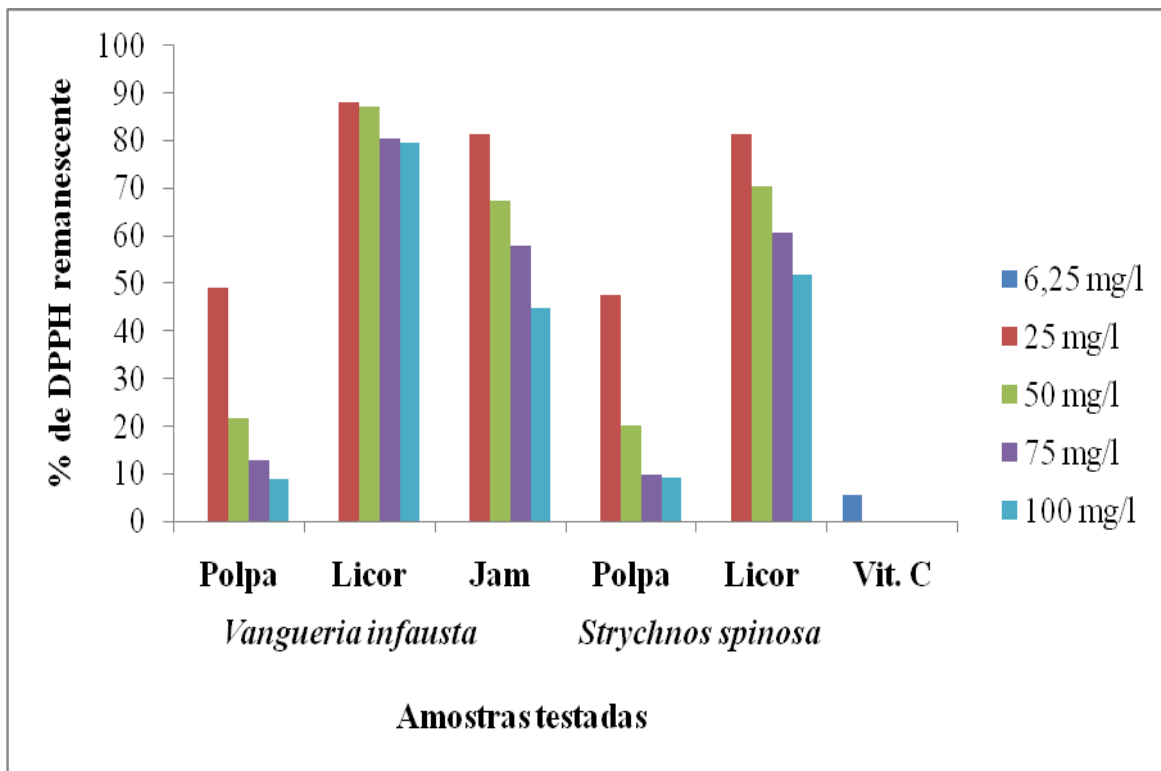


Figura 14: Percentagem de DPPH remanescente após 30 minutos de reacção

4.6.2 Resultados da percentagem de inibição

A tabela 19 apresenta os resultados obtidos a partir da equação 3, que mostram a capacidade antioxidante dos extractos das polpas e derivados de *V. infausta* e *S. spinosa*, a diferentes concentrações e como controle positivo foi usado a vitamina C.

Pelo ensaio, observa-se que todos os extractos têm a capacidade sequestradora do radical DPPH. Contudo, a maior eficiência foi verificada nos extractos das polpas a concentrações superiores (75 e 100 mg/l). A figura 15 mostra os resultados em forma de diagrama.

Tabela 19: Percentagem de inibição do DPPH pelas polpas e derivados de *V. infausta* e *S. spinosa*

Amostras		% de Inibição do DPPH				
		Concentração em mg/l				
		6,25	25	50	75	100
<i>Vangueria infausta</i>	Polpa		51,94	79,07	87,74	91,89
	Licor		13,53	14,59	21,00	21,85
	Jam		20,16	34,04	43,27	56,24
<i>Strychnos spinosa</i>	Polpa		53,63	80,69	90,77	91,33
	Licor		20,08	30,94	40,59	49,33
	Vit. C	95,21				

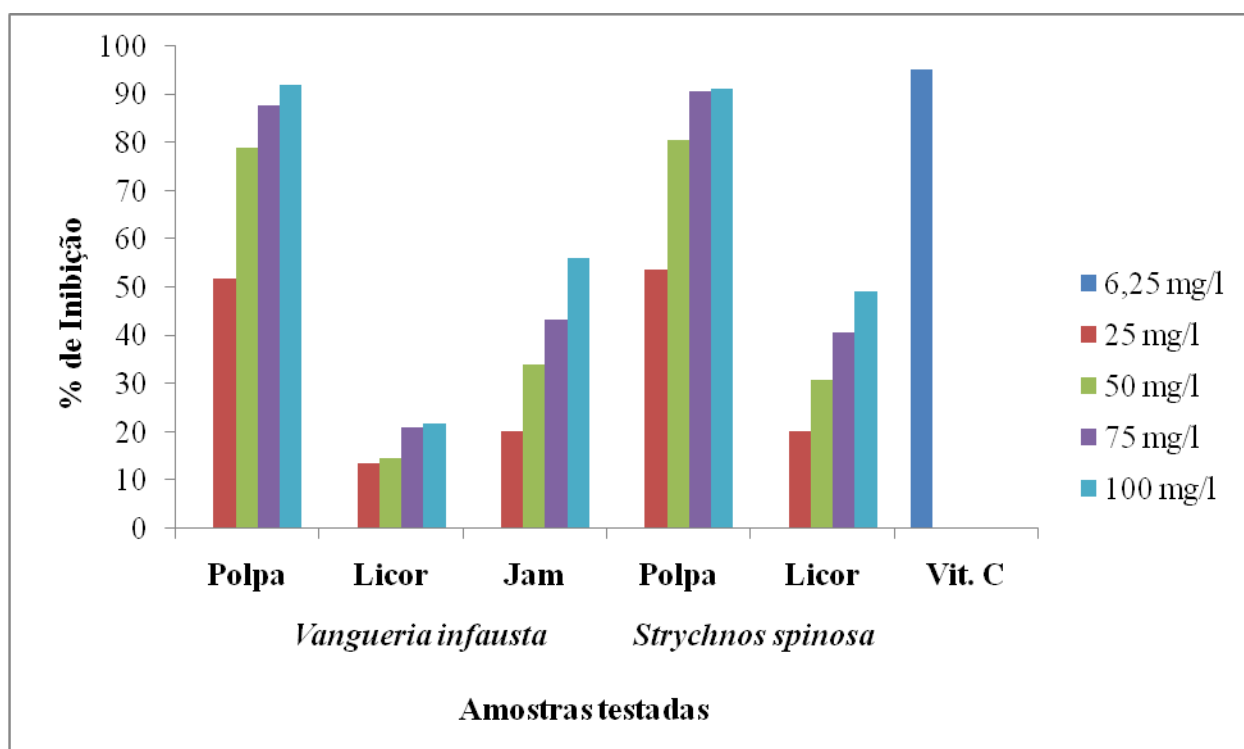


Figura 15: Percentagem de inibição do DPPH pelas polpas e derivados de *V. infausta* e *S. spinosa*

4.6.3 Resultados da determinação do coeficiente de inibição (CI₅₀)

Os valores de CI₅₀ de cada extracto estão apresentados na tabela 20 e, para o seu cálculo, utilizou-se as equações das rectas obtidas a partir dos gráficos da figura 16, onde foi substituído o valor de y por 50 para obter a concentração da amostra com capacidade de reduzir 50% do DPPH.

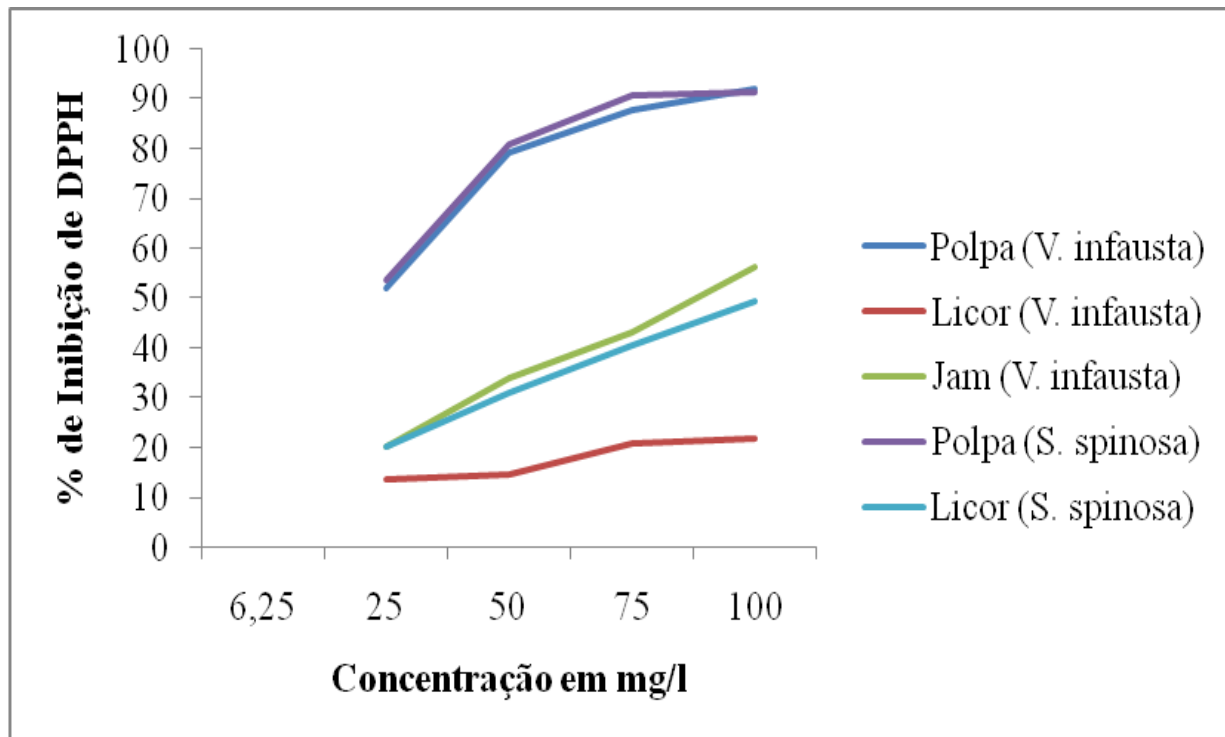


Figura 16: Efeito da captura dos radicais livres DPPH pelas polpas e derivados de *V. infausta* e *S. spinosa*

Comparando a polpa, jam e licor de *V. infausta*, podemos observar que o extracto da polpa destaca-se na inibição de DPPH, apresentando um valor de CI₅₀ baixo (CI₅₀ = 1,348 mg/l), em relação aos extractos de licor (CI₅₀ = 13,786 mg/l) e de jam (CI₅₀ = 4,485 mg/l). Quanto à polpa e licor de *S. spinosa*, o extracto da polpa apresenta também um valor de CI₅₀ = 1,137 mg/l e baixo que o CI₅₀ do extracto do licor (CI₅₀ = 5,016 mg/l).

Tabela 20: Equação das rectas usadas para calcular CI_{50} da actividade antioxidante das polpas e derivados de *V. infausta* e *S. spinosa*

Amostras		Equação da recta	R^2	CI_{50} (mg/l)
<i>Vangueria infausta</i>	Polpa	$Y = 12,854x + 32,671$	0,8536	1,348
	Licor	$Y = 3,136x + 6,7653$	0,8916	13,786
	Jam	$Y = 11,748x - 2,692$	0,9946	4,485
<i>Strychnos spinosa</i>	Polpa	$Y = 12,319x + 35,99$	0,8097	1,137
	Licor	$Y = 9,7393x + 1,1487$	0,9976	5,016

5 Discussão

Os valores encontrados de sólidos solúveis totais neste estudo foram de $36,44 \pm 0,68$, $37,40 \pm 0,12$ e $49,67 \pm 0,58$ para polpa, licor e jam de *V. infausta* (tabela 12) respectivamente e Chiau *et al.* (2013) na análise da polpa do mesmo fruto colhido na província de Maputo (Moçambique) encontraram teores de sólidos solúveis totais de $35,5 \pm 0,2$. Na polpa e licor de *S. spinosa*, os valores encontrados de sólidos solúveis totais são $33,78 \pm 0,34$ e $35,00 \pm 0,00$, respectivamente (tabela 13).

O pH baixo e acidez elevada é uma característica desejável e dispensa a etapa de acidificação durante o processamento. Neste estudo, os valores de pH obtidos foram de $3,186 \pm 0,046$, $3,550 \pm 0,006$ e $3,245 \pm 0,064$ para polpa, licor e jam de *V. infausta*, respectivamente (tabela 12). Amarteifio e Mosase (2006) analisaram a polpa dos frutos de *V. infausta* colhidos em Botswana e obtiveram um valor de 3,38, Chiau *et al.* (2013) analisaram a polpa dos frutos colhidos na província de Maputo (Moçambique) e obtiveram valor de pH de $3,300 \pm 0,003$ e Mothapo *et al.* (2014) analisando frutos de *V. infausta* colhidos em dois períodos diferentes, entre Janeiro e Fevereiro (período 1) e fora do período normal de frutificação desta planta (período 2), na província do Limpopo (África do Sul) obtiveram valores de pH de $3,20 \pm 0,03$ e $3,20 \pm 0,02$ (tabela 7). Em relação a *S. spinosa*, os valores de pH obtidos nesta análise são de $3,22 \pm 0,16$ e $4,30 \pm 0,02$ para polpa e licor, respectivamente (tabela 13) e no mesmo fruto colhido em Botswana, o valor determinado por Amarteifio e Mosase (2006) foi de 3,96.

O índice de refração é uma propriedade física importante de sólidos, líquidos e gases. Pode ser usado para determinar a concentração de uma solução, pois varia com a concentração (Instituto Adolfo Lutz, 2008; Cavalcanti *et al.*, 2006). No presente estudo, os valores de índice de refração da polpa, licor e jam de *V. infausta* são $1,209 \pm 0,346$, $1,394 \pm 0,001$ e $1,340 \pm 0,006$, respectivamente (tabela 12) e da polpa e licor de *S. spinosa* são $1,310 \pm 0,025$ e $1,390 \pm 0,006$, respectivamente (tabela 13).

Neste estudo foi determinada a densidade apenas nos licores *V. infausta* e *S. spinosa* e os valores foram de $1,073 \pm 0,056$ (tabela 12) e $1,103 \pm 0,104$, respectivamente (tabela 13).

Na prospecção fitoquímica, depois dos testes específicos (tabelas 14 e 15), observou-se que os extractos variaram da coloração azul para verde, o que indicou a presença de esteróides/triterpenóides (reação de Lieberman- Burchard), o aparecimento de coloração que variou de parda a vermelha indicou a presença de flavonóides (teste de cianidina ou Shinoda), a

formação do precipitado de tonalidade azul indicou a presença de taninos hidrolisáveis, e verde a presença de taninos condensados (reação com cloreto férrico), o surgimento de espuma persistente e abundante, indicou a presença de saponinas (teste de espuma) e a formação de precipitados insolúveis e floculosos confirmou a presença de alcalóides (teste de Dragendorff).

Em extractos das folhas e da casca do caule *S. spinosa*, Ugoh e Bejide (2013) (tabela 3) observaram a presença de alcalóides, esteróides e terpenóides, taninos, açúcares redutores e saponinas, Mbukwa *et al.* (2007) e Abeer (2011) (tabela 8) em extractos das folhas de *V. infausta*, a presença de flavonóides. Tafadzwa (2012) em extractos de folhas de *V. infausta* verificou a presença de flavonóides, saponinas e taninos e em extractos das raízes de *V. infausta*, a presença de saponinas e taninos (tabela 8). Em extractos das raízes da planta *V. infausta*, Abosi *et al.* (2006) mostraram a presença de flavonóides, cumarinas, taninos, terpenóides, antraquinonas e saponinas e McGaw *et al.* (2008) em extractos de folhas e raízes de *V. infausta* identificaram a presença de esteróis.

Na avaliação da actividade antimicrobiana, optou-se por tomar a concentração máxima de 200 mg/ml de extractos da polpa, jam e licor do fruto de *V. infausta* e da polpa e licor do fruto de *S. spinosa* e, aplicando o método de difusão em agar, nenhum extracto inibiu o crescimento dos microrganismos testados (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella thyphimurium*, *Staphylococcus aureus* e a levedura *Candida albicans*), isto é, as amostras impregnadas nos discos para avaliar actividade antimicrobiana não induziram a formação de halos de inibição frente aos microrganismos testados (figura 13).

Segundo De Bona *et al.* (2014), a ausência de uma zona de inibição não significa necessariamente que o extracto seja inactivo perante ao microrganismo testado, mas sim, provavelmente, que a difusão não tenha sido completa, especialmente para os compostos menos polares que se difundem mais lentamente no meio de cultura.

Embora Pinho *et al.* (2012) refiram que, nos extractos das plantas, os metabólitos secundários são responsáveis pela actividade antimicrobiana e vários estudos reportarem acção antimicrobiana de extractos de diferentes partes das plantas *V. infausta* e *S. spinosa*, não foram encontrados estudos que relacionam directamente esta actividade as polpas dos seus frutos.

Philippe *et al.* (2005) verificaram que o extracto de acetato de etilo do caule e galhos de *S. spinosa* não apresenta nenhuma actividade em estirpes de *Plasmodium falciparum*, mas Bero *et al.* (2009), num estudo sobre extracto de diclorometano das folhas de *S. spinosa* observaram actividade em estirpes de *Plasmodium falciparum*.

Em óleos essenciais extraídos das folhas de *S. spinosa* foram isolados 15 compostos químicos com actividade antitripanossómica (Monzote *et al.*, 2012; Hoet *et al.*, 2006). Num outro estudo, em extracto lipofílico das folhas de *S. spinosa* foram isolados oito triterpenóides e esteróis que também mostraram actividade antitripanossómica (Hoet *et al.*, 2007). Sem indicação da parte da planta analisada, Mbaya e Ibrahim (2011) reportam actividade de extractos da *S. spinosa* contra tripanossomas hormonais. Aplicando o método de difusão em agar e o método de microdiluição para a determinação da concentração inibitória mínima, Ugoh e Bejide (2013) observaram boa actividade de extractos aquosos, etanólicos e metanólicos das folhas e das cascas do caule de *S. spinosa* sobre as bactérias *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e mínima actividade contra a bactéria *Staphylococcus aureus* e o fungo *Candida albicans* (tabelas 4 e 5). Kubmarawa *et al.* (2007), avaliando a actividade dos extractos etanólicos da casca de caule sobre as bactérias *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e o fungo *Candida albicans*, não observaram nenhuma actividade. Na avaliação da actividade de diferentes extractos e fracções de folhas de *S. spinosa*, sobre diferentes fungos e bactérias gram-positivas e gram-negativas, Isa *et al.* (2014b) determinaram uma concentração inibitória mínima, que varia de 0,04 a 1,25 mg/ml, considerada baixa e moderada por vários autores. Em relação à aplicação medicinal dos frutos de *S. spinosa*, Madzimure *et al.* (2013) reportaram o seu uso como carracida sobre carrapatos bovinos.

Na planta *V. infausta*, vários estudos realizados sobre extractos das diferentes partes mostraram actividade antimicrobiana. De Boer *et al.* (2005), usando seis diferentes microrganismos de teste entre fungos e bactérias (*Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Erwinia amylovora*, *Fusarium culmorum*, *Pseudomonas syringae* e *Staphylococcus aureus*) patogénicos para humanos e para vegetais testaram actividade de extractos de acetato de etil, metanol, água fria e água quente da planta *V. infausta* e verificaram que estes são activos contra um ou mais dos organismos testados, mas que esta actividade não tem relação com aplicação tradicional reportada para esta planta. Abosi *et al.* (2006) verificaram actividade de extracto butanólico e fracção clorofórmica de casca da raiz de *V. infausta* em *Plasmodium falciparum* cultivado *in*

vitro. Pillay *et al.* (2008) em extracto da mistura diclorometano e metanol na proporção de 1:1 verificaram actividade contra *Plasmodium falciparum in vitro*. Ramalingum e Mahomoodally (2014) avaliando actividade antimicrobiana de extractos aquosos e metanólicos de folhas, frutos (maduros e verdes) e sementes desta planta usando o método de difusão em agar sobre as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e fungos *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, verificaram que os extractos aquosos de frutos verdes têm actividade sobre *Escherichia coli* e os extractos aquosos de frutos maduros em *Staphylococcus aureus* (tabela 9) e em extractos metanólicos das folhas verificaram actividade sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e em extractos metanólicos das sementes sobre *Staphylococcus aureus* (tabela 10).

O teor de compostos fenólicos das polpas dos frutos de *V. infausta* e de *S. spinosa* determinado é de $0,528 \pm 0,030$ e $2,028 \pm 0,190$ mg EAG por grama de extracto, respectivamente (tabela 16). Nos derivados dos dois frutos, o teor dos compostos fenólicos não foi determinado porque apresentaram valores de absorvância menores que a registada para o branco (gráfico 1).

Em relação a actividade antioxidante, expressa em coeficiente de inibição (CI_{50}), os extractos das polpas de *V. infausta* e de *S. spinosa* apresentaram CI_{50} de 1,348 e 1,137 mg/l, respectivamente, os derivados de *V. infausta* apresentaram um CI_{50} de 13,786 mg/l (licor) e de 4,485 mg/l (jam) e o licor de *S. spinosa* um CI_{50} de 5,016 mg/l (tabela 20). Estes resultados apontam para um poder antioxidante alto das polpas que os seus derivados.

Segundo Rocha (2011) e Sousa *et al.* (2007), quanto maior o consumo de DPPH por amostra, menor será a sua concentração inibitória e maior será a sua actividade antioxidante e esta acção é identificada por Andrade *et al.* (2007) como responsável pela neutralização das espécies reactivas de oxigénio, protegendo deste modo, o aparecimento de muitas doenças crónicas no organismo humano.

Mbukwa *et al.* (2007), isolaram das folhas de *V. infausta* flavonóides que apresentaram maior actividade na eliminação de radicais DPPH e usaram o ácido ascórbico como padrão.

Legwaila *et al.* (2011) comprovaram que vitamina C, presente em grandes quantidades nas frutas de *V. infausta*, *S. spinosa*, *A. digitata*, *S. birrea*, é responsável pela sua actividade antioxidante.

Abeer (2011) em extractos de folhas de *V. infausta* isolou alguns flavonóides com actividade antioxidante e os oxidantes usados para avaliação foram o DPPH e H₂O₂ e como padrão usou-se a rutina.

Vários autores encontraram forte relação entre compostos fenólicos e actividade antioxidante, mas outros não têm evidenciado esta correlação. Estes últimos acreditam que a actividade antioxidante de um extracto não pode ser explicada apenas com base no seu teor de compostos fenólicos totais, sendo necessária também a caracterização da estrutura do composto activo. Contudo, baseando-se no mecanismo de acção do radical DPPH e com conhecimento prévio da composição fitoquímica e teor de compostos fenólicos de extractos dos frutos de *V. infausta* e *S. spinosa*, é possível deduzir que a actividade antioxidante que apresentam pode estar relacionada, em parte, com a presença de compostos fenólicos.

As principais limitações deste estudo foram: a falta de alguns equipamentos laboratoriais, inacessibilidade dos laboratórios devido a obras de reabilitação do edifício do departamento de Química, desde 2014 e dificuldades para a realização dos ensaios microbiológicos.

6 Conclusões e Recomendações

6.1 Conclusões

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios e da discussão dos resultados conclui-se que:

1. Os metabólitos secundários presentes em comum nas polpas e nos derivados destes dois frutos são flavonóides e saponinas.
2. O processamento dos frutos para seus derivados não altera em grande medida as suas propriedades físico-químicas.
3. O conteúdo de compostos fenólicos presentes nos extractos da polpa é maior que nos extractos derivados dos dois frutos.
4. Os extractos não apresentaram nenhuma actividade antimicrobiana contra os microrganismos testados.
5. O coeficiente de inibição (CI_{50}) demonstrou que os extractos das polpas dos dois frutos têm maior capacidade antioxidante do que os extractos dos seus derivados.
6. A avaliação fitoquímica e farmacológica dos frutos e derivados de *Vangueria infausta* e *Strychnos spinosa* realizada neste trabalho permitiu um maior conhecimento sobre a natureza dos metabólitos secundários presentes, assim como das suas possíveis propriedades funcionais.

6.2 Recomendações

Com base neste trabalho, recomenda-se:

1. A obtenção dos extractos das polpas e derivados destes frutos usando outros solventes ou técnicas.
2. A realização da avaliação da actividade antimicrobiana dos extractos das polpas e derivados destes frutos com concentrações de extracto acima da usada neste estudo.

3. A realização de estudos de avaliação da actividade antimicrobiana dos extractos das polpas e derivados destes frutos usando outros métodos.
4. A realização de mais estudos para isolar os compostos responsáveis pela actividade antioxidante.

Referências Bibliográficas

- Abeer, T. (2011). Flavanoidal content of *Vangueria Infausta* extracts grown in Egypt: Investigation of its antioxidant activity. *International research Journal of pharmacy*, **2** (3): 157–161.
- Abosi, A.O., Mbukwa, E., Majinda, R.R.T., Raseroka, B.H., Yenesw, A., Midiwo, J.O., Akala, H., Liyala, P. e Waters, N.C. (2006). *Vangueria infausta* root bark: *in vivo* and *in vitro* antiplasmodial activity. *British Journal of Biomedical Science*, **63** (3): 129 – 133.
- Alhakmani, F., Kumar, S. e Khan, S.A. (2013). Estimation of total phenolic content, in-vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of flowers of *Moringa oleifera*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **3** (8): 623 – 627.
- Amarteifio, O. e Mosase, M.O., (2006). The Chemical Composition of Selected Indigenous Fruits of Botswana. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, **10** (2): 43 – 47.
- Andrade, C.A., Costa, C.K., Bora, K., Miguel, M.D., Miguel, O.G., Kerber, V.A. (2007). Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da actividade antioxidante de *Acácia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **17** (2): 231–235.
- Araújo, M.G.F., Cunha, W.R. e Veneziani, R.C.S. (2010). Estudo fitoquímico preliminar e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de extracto obtido de frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill (Solanaceae). *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, **31** (2): 205 – 209.
- Auricchio, M.T., Bugno, A., Barros, S.B.M. e Bacchi, E.M. (2007). Actividades Antimicrobiana e Antioxidante e Toxicidade de *Eugenia uniflora*. *Latin American Journal of Pharmacy*, **26** (1): 76 – 81.

Baptista, M.G.F.M. (2013). *Mecanismos de Resistência aos Antibióticos*. Tese apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas ao Curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa. 51pp.

Barbosa, D.B. (2008). *Avaliação das Atividades Antimicrobiana, Antioxidante e Análise Preliminar da Mutagenicidade de Extrato Aquoso das Folhas de Anacardium humile* St. Hill. (Anacardiaceae). Tese de Mestrado em genética e bioquímica – Universidade Federal de Uberlândia, Brasil. 82pp.

Basílio, I.J.L.D., Nurit, K. e Agra, M.F. (2005). Estudo Farmacobotânico das Folhas de três Espécies do Gênero *Strychnos* L. (Loganiaceae) do Nordeste do Brasil. *Acta Farmacêutica Bonaerense*, **24** (3): 356 – 365.

Bero, J., Ganfon, H., Jonville, M-C., Frédérich, M., Gbaguidi, F., Patrick DeMol, P., Moudachirou, M. e Quetin-Leclercq, J. (2009). *In vitro* antiplasmodial activity of plants used in Benin in traditional medicine to treat malaria. *Journal of Ethnopharmacology*, **122**: 439 – 444.

Bianchi, M.L.P. e Antunes, L.M.G. (1999). Radicais Livres e os Principais Antioxidantes da Dieta. *Revista de Nutrição*, **12** (2): 123 – 130.

Blainski, A., Lopes, G.C. e De Mello, J.C.P. (2013). Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules*, **18**: 6852 – 6865.

Bruschi, P., Morganti, M., Mancini, M. e 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**: 543 – 563.

Cansian, R.L., Mossi, A.J., de Oliveira, D., Toniazzo, G., Treichel, H., Paroul, N., Astolfi, V. e Serafini, L.A. (2010a). Actividade Antimicrobiana e Antioxidante do Óleo Essencial de ho-sho

(*Cinnamomum camphora* Nesse Eberm Var. *Linaloolifera fujita*). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **30** (2): 378 – 384.

Cansian, R.L., Mossi, A.J. Paroul, N., Toniazzo, G., Zboralski, F., Prichoa, F.C., Kubiak, G.B. e Lerin, L.A. (2010b). Antioxidant and Antimicrobial Activity of Cinnamon Sassafras Extracts (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rowher). *Revista Perpectiva*, **34** (127): 123 – 133.

Caruso, M.S.F., Nagato, L.A.F. e Alaburda, J. (2008). Avaliação do teor alcoólico e componentes secundários de cachaças. *Revista de Instituto Adolfo Lutz*, **67** (1): 28 – 33.

Cavalcanti, A.L., Oliveira, K.F., Paiva, P.S., Dias, M.V.R., Costa, S.K.P. e Vieira, F.F (2006). Determinação dos Sólidos Solúveis Totais (°Brix) e pH em Bebidas Lácteas e Sucos de Frutas Industrializados. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*, **6** (1): 57 – 64.

Chiau, E., Da Cruz Francisco, J., Bergenståh, B. e Sjöholm, I. (2013). Softening of dried *Vangueria infausta* (African medlar) using maltodextrin and sucrose. *African Journal of Food Science*, **7** (10): 382 – 391.

Chorilli, M., Leonardi, G.R. e Salgado, H.R.N. (2007). Radicais livres e antioxidantes: Conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas. *Revista Brasileira de Farmácia*, **88** (3): 113 – 118.

Coelho, V.P.d'M., Agra, M.d'F. e Barbosa, M.R.d'V. (2006). Estudo farmacobotânico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltl.) K.Schum. (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **16** (2): 170 – 177.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2012). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard— Eleventh Edition*. CLSI document M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; Wayne, Pennsylvania, USA.

De Boer, H.J., Kool, A., Broberg, A. Mziray, W.R., Hedberg, I. e Levenfors, J.J. (2005). Anti-fungal and anti-bacterial activity of some herbal remedies from Tanzania. *Journal of Ethnopharmacology*, **96**: 461 – 469.

De Bona, E.A.M., Pinto, F.G.S., Fruet, T.K., Jorge, T.C.M. e Moura, A.C. (2014). Comparação de métodos para avaliação da actividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extractos vegetais aquosos e etanólicos. *Arquivos do Instituto Biológico*, **81** (3): 218 – 225.

De Wet, H., Nciki, S. e van Vuuren, S. F. (2013). Medicinal plants used for the treatment of various skin disorders by a rural community in northern Maputaland, South Africa. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, **9** (51): 1 – 35.

Degáspari, C.H. e Waszynskij, N. (2004). Propriedades Antioxidantes de Compostos Fenólicos. *Visão Acadêmica*. **5** (1): 33 – 40.

Del Ré, P.V. e Jorge, N. (2012). Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, **14** (2): 389-399.

Dias, D. A., Sylvia Urban, S. e Ute Roessner, U. (2012). A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. *Metabolites*, **2**: 303 – 336.

Dimelu, M.U. e Odo, R.N. (2013). Production preference and importance of fruit species in home garden among rural households in Igbo-Eze North Agricultural Zone of Enugu State, Nigeria. *African Journal of Agricultural Research*, **8** (46): 5733 – 5740.

Duarte-Almeida, J.M., Santos, R.J., Genovese, M.I. e Lajolo, F.M. (2006). Avaliação da actividade Antioxidante Utilizando Sistema β -Caroteno/Ácido Linoleico e Método de Sequestro de Radicais DPPH. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **26** (2): 446 – 452.

Gakuya, D.W., Itonga, S.M., Mbaria, J.M., Muthee, J.K. e Musau, J.K. (2013). Ethnobotanical survey of biopesticides and other medicinal plants traditionally used in Meru central district of Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*, **145**: 547 – 553.

Haida, K.S., Silva, F.S., Coelho, S.R.M., Lima, D.S., Abrão, R.M. e Haida, K.Y. (2014). Caracterização Físico-Química e Actividade Antioxidante de Amoreira-Preta (*Morus nigra* L.). *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, **12** (40): 21 – 28.

Hinneburg, I., Dorman, H.J.D. e Hiltunen, R. (2006). Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chemistry*, **97**: 122 – 129.

Hirata, L.L., Sato, M.E.O. e Santos, C.A.de M. (2004). Radicais Livres e o Envelhecimento Cutâneo. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, **23** (3): 418 – 426.

Hoet, S., Stévigny, C., Herent, M-F e Quetin-Leclercq, J. (2006). Antitrypanosomal Compounds from the Leaf Essential Oil of *Strychnos spinosa*. *Planta Medica*, **72**: 480 – 482.

Hoet, S., Pieters, L., Muccioli, G.G., Habib-Jiwan, J-L., Opperdoes, F.R. e Quetin-Leclercq, J. (2007). Antitrypanosomal Activity of Triterpenoids and Sterols from the Leaves of *Strychnos spinosa* and Related Compounds. *Journal of Natural Products*, **70**: 1360 – 1363.

Iha, S.M., Migliato, K.F., Velloso, J.C.R., Sacramento, L.V.S., Pietro, R.C.L.R., Isaac, V.L.B., Brunetti, I.L., Corrêa, M.A. e Salgado, H.R.N. (2008). Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **18** (3): 387 – 393

Instituto Adolfo Lutz (2008). *Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos*. Vol. 4. 4ª ed. digital. Imprensa Oficial do Estado de São Paulo. São Paulo. pp 94 – 110.

Isa, A.I., Adebayo S.A., Mohammed, A., Magaji, R.A., Ayo, J.O., Suleiman, M.M., Saleh, M.I.A., Sadau, Y. e Eloff, J.N. (2014a). *In-Vitro* Lipoyxygenase Inhibitory Activity and Total Flavonoid of *Strychnos spinosa* Leaf Extracts and Fractions. *Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **13** (1): 01 – 08.

Isa, A.I., Awouafack, M.D., Dzoyem, J.P., Aliyu, M., Magaji, R.A., Ayo, J.O. e Eloff, J.N. (2014b). Some *spinosa* (Loganiaceae) leaf extracts and fractions have good antimicrobial activities and low cytotoxicities. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **14** (456): 1 – 8

Ismail, A., Marjan, Z.M. e Foong, C.W. (2004). Total Antioxidant Activity and Phenolic Content in Selected Vegetables. *Food Chemistry*, **87**: 581 – 586.

Kubmarawa, D., Ajoku, G. A., Enwerem, N. M. e Okorie, D. A. (2007). Preliminary phytochemical and antimicrobial screening of 50 medicinal plants from Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, **6** (14): 1690 – 1696.

Labanca, R.A., Glória, M.B.A., Gouveia, V.J.P. e Afonso, R.J.C.F. (2006). Determinação dos Teores de Cobre e Grau Alcoólico em Aguardentes de Cana produzidas no Estado de Minas Gerais. *Química Nova*, **29** (5): 1110 – 1113.

Laborclin Produtos para Laboratório (2011). Manual para Antibiograma – Difusão em Disco (Kirby& Bauer). Brasil.

Legwaila, G.M., Mojeremane, W. Madisa, M.E., Mmolotsi, R.M. e Rampart, M. (2011). Potential of traditional food plants in rural household food security in Botswana. *Journal of Horticulture and Forestry*, **3** (6): 171 – 177.

Madzimure, J., Nyahangare, E.T., Hamudikuwanda, H., Hove, T., Belmain, S.R., Stevenson, P.C. e Mvumi, B.M. (2013). Efficacy of *Strychnos spinosa* (Lam.) and *Solanum incanum* L. aqueous fruit extracts against cattle ticks. *Tropical Animal Health and Production*, **45** (3): 1 – 9.

Magaia, T., Uamusse, A., Sjöholm, I. e Skog, K. (2013a). Dietary fiber, organic acids and minerals in selected wild edible fruits of Mozambique. *Springer Plus*, **2** (88): 1 – 8

Magaia, T., Uamusse, A., Sjöholm, I. e Skog, K. (2013b). Proximate Analysis of Five Wild Fruits of Mozambique. *The Scientific World Journal*, **6**: 1 – 6

Margalho, L.F, Rocha, A.E.S e Secco, R.S. (2009). Rubiaceae Juss. da restinga da APA de Algodual/Maiandeuá, Maracanã, Pará, Brasil. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais*, **4** (3): 303 – 339.

Maroyi, A. (2013). Traditional use of medicinal plants in south-central Zimbabwe: review and perspective. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, **9**:31: 1 – 18

Masoko, P (2013). Ethnobotanical study of some selected medicinal plants used by traditional healers in Limpopo Province (South Africa). *American Journal of Research Communication*, **1** (8): 8 – 23.

Matos, F.J.A. (1997). *Introdução á Fitoquímica Experimental*. 2ª Edição. Edições UFC. Brasil.

Mbaya, A.W. e Ibrahim, U.I. (2011). In vivo and *in vitro* Activities of Medicinal Plants on Haemic and Humoral Trypanosomes Review. *International Journal of Pharmacology*, **7** (1): 1 – 11.

Mbukwa, E., Chacha, M. e Majinda, R.R.T. (2007). Phytochemical constituents of *Vangueria infausta*: their radical scavenging and antimicrobial activities. *ARKIVOC* (ix) 104 – 112.

McGaw, L.J., Lall, N., Meyer, J.J.M. e Eloff, J.N. (2008). The potential of South African plants against *Mycobacterium* infections. *Journal of Ethnopharmacology*, **119**: 482 – 500.

Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, **26** (2): 211 – 219.

Monzote, L., Alarcón, O. e Setzer, W. N. (2012). Antiprotozoal Activity of Essential Oils. *Agriculturae Conspectus Scientifi cus*, **77** (4): 167 – 175.

Moraes-de-Souza, R.A., Oldoni, T.L.C., Cabral, I.S.R.S e Alencar, E.M. (2011). Compostos Fenólicos Totais e Actividade Antioxidante de Chás Comercializados no Brasil. *Boletim do CEPPA Curitiba*, **29** (2): 229 – 236.

Mothapo, M.J., Mafeo, T.P e Mamphiswana, N.D. (2014). Physico-Chemical Properties and Selected Nutritional Components of Wild Medlar (*Vangueria infausta*) Fruit Harvested at Two Harvesting Times. *World Journal of Dairy & Food Science*, **9** (1): 79 – 85.

Murray, P.R., Rosenthal, K.S. e Pfaller, M.A. (2010). *Microbiologia Medica*. Rio de Janeiro (Brasil), Mosby-Elsevier Editora Ltda.

Okullo, J.B.L., Omujal, F., Bigirimana, C., Isubikal, P., Malinga, M., Bizuru, E., Namutebi, A., Obaa, B.B. e Agea, J.G. (2014). Ethno-Medicinal Uses of Selected Indigenous Fruit Trees from the Lake Victoria Basin Districts in Uganda. *Journal of Medicinal Plants Studies*, **2** (1): 78 – 88.

Oliveira, A.C., Valentim, I.B., Goulart, M.O.F., Silva, C.A., Bechara, E.J.H. e Trevisan, M.T.S. (2009). Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, **32** (3): 689 – 702.

Oliveira, M.S., Dors, G.C., Souza-Soares, L.A. e Badiale-Furlong, E. (2007). Actividade antioxidantes e antifúngicos de extractos vegetais. *Alimentos Nutricionais*, **18** (3): 267 – 275.

Ostrosky, E.A., Mizumoto, M.K., Lima, M.E.L., Kaneko, T.M., Nishikawa, S.O. e Freitas, B.R. (2008). Método para avaliação da actividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de plantas medicinais. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **18** (2): 301 – 307.

Padmanabhan, P. e Jangle, S. N. (2012). Evaluation of DPPH Radical Scavenging Activity and Reducing Power of Four Selected Medicinal Plants and Their Combinations. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, **4** (2): 143– 146.

Palmeira, J.D., Ferreira, S.B., de Souza, J.H., de Almeida, J.M., Figueiredo, M.C., Pequeno, A.S., Arruda, T.A., Antunes, R.M.P. e Catão, R.M.R. (2010). Avaliação da actividade antimicrobiana *in vitro* e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extractos hidroalcoólicos de angico sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, **42** (1): 33 – 37.

- Passos, C.S., Arbo, M.D., Rates, S.M.K. e von Poser, G.L. (2009). Terpenóides com actividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **19** (1A): 140 – 149.
- Pereira, A.L.F., Vidal, T.F. e Constant, P.B.L. (2009). Antioxidantes Alimentares: importância química e biológica. *Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição*, **34** (3): 231 – 247.
- Pereira, M.S. e Barbosa, M.R.V (2004). A família Rubiaceae na Reserva Biológica Guaribas, Paraíba, Brasil. Subfamílias Antirheoideae, Cinchonoideae e Ixoroideae. *Acta Botânica Brasileira*, **18** (2): 305 – 318.
- Philippe, G., Angenot, L., De Mol, P., Goffin, E., Hayette, M-P., Tits, M. e Frédérich, M. (2005). *In vitro* screening of some strychnos species for antiplasmodial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, **97**: 535 – 539.
- Pillay, P., Maharaj, V.J. e Smith, P.J. (2008). Investigating South African plants as a source of new antimalarial drugs. *Journal of Ethnopharmacology*, **119**: 438 – 454.
- Pinho, L., Souza, P.N.S., Sobrinho, E.M., Almeida, A.C. e Martins, E.R. (2012). Actividade antimicrobiana de extractos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. *Ciência Rural*, **42** (2): 326 – 331.
- Ramalingum, N. e Mahomoodally, M.F. (2014). *Vangueria madagascariensis* J.F. Gmelin (Rubiaceae) - an under-utilised African traditional medicinal food plant with potential applications. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, **3** (1): 45 – 48.
- Ramos, A. F. G. (2011). *Extracção e determinação da actividade antioxidante de produtos naturais*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Química Industrial – Universidade da Beira Interior, Brazil. 53 pp.

Rêgo Jr, N.O., Fernandez, L.G., Castro, R. D., Silva, L.C. e Gualberto, S.A. (2011). Compostos bioactivos e actividade antioxidante de extractos brutos de especies vegetais da caatinga. *Brazilian Journal of food Tchnology*, **14** (1): 50 – 57.

Rocha, M.S. (2011). *Compostos Bioactivos e Actividade Antioxidante (in vitro) de Frutos do Cerrado Piauiense*. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição - Universidade Federal do Piauí, Brazil. 94pp.

Roesler, R., Malta, L.G., Carrasco, L.C., Holanda, R.B., Sousa, C.A.S. e Pastore, G.M. (2007). Antioxidant activity of cerrado fruits. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **27** (1): 53 – 60.

Sanogo, R. (2011). Medicinal Plants Traditionally used in Mali for Dysmenorrhea. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, **8** (S): 90 – 96.

Santos, S.N., Castanha, R.F., Haber, L.L., Marques, M.O.M., Scramim, S. e Melo, I.S. (2011). Metodologia Científica: Determinação quantitativa da actividade antioxidante de extractos brutos de microrganismos pelo método de captura de radical livre DPPH. *Comunicado Técnico online*, **50**: 1–5.

Sener, A. e Dulger, B. (2009). Antimicrobial activity of the leaves of *Verbascum sinuatum* L. on microorganisms isolated from urinary tract infection. *African Journal of Microbiology Research*, **3** (11): 778 – 781.

Senkoro, A., Barbosa, F., Da Silva, A.F., Manjate, A., Samuel, V.M.S., Maquia, I., Muocha, I., Moura, I., Goulao, L.F. e Ribeiro, A. (2012). Estudo e Conservação de Plantas Medicinais em Moçambique. *Atas do Congresso Internacional Saber Tropical em Moçambique: História e Memória e Ciência*. IICT – JBT/Jardim Botânico Tropical. Lisboa (Portugal). 1 – 5.

Shai, L.J., Chauke, M.A., Magano, S.R., Mogale, A.M. e Eloff, J.N. (2013). Antibacterial activity of sixteen plant species from Phalaborwa, Limpopo Province, South Africa. *Journal of Medicinal Plants Research*, **7** (26): 1899 – 1906.

Silva, N. L. A., Miranda, F. A. A. e Da Conceição G. M. (2010). Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. *Scientia Plena*, **6** (2): 1 – 17.

Sitrit, Y., Loison, S., Ninio, R., Dishon, E., Bar, E., Lewinsohn, E. e Mizrahi, Y. (2003). Characterization of Monkey Orange (*Strychnos spinosa* Lam.), a Potential New Crop for Arid Regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 6256 – 6260.

Soares, M. L., Bustamante, K. G. L., Figueiredo, A. D. L., Pimenta, F.C., Fiuza, T.S., Bara, M. T. F., Tresvenzol, L. M. F. e Paula, J. R. (2009). Análise da atividade antimicrobiana das folhas de *Davilla elliptica* St.-Hil. (Dilleniaceae). *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, **30** (2): 55 – 58.

Sousa, C.M.M., Silva, H.R. Vieira-Jr., G.M., Ayres, M.C.C., Costa, C.L.S., Araújo, D.S., Cavalcante, L.C.D., Barros, E.D.S., Araújo, P.B.M., Brandão, M.S. e Mariana H. Chaves, M.H. (2007). Fenóis Totais e Actividade Antioxidante de cinco Plantas. *Química Nova*, **30** (2): 351 – 355.

Souza, R.K.D, Mendonça, A.C.M. e Da Silva, M.A.P. (2013). Aspectos etnobotânicos, fitoquímicos e farmacológicos de espécies de Rubiaceae no Brasil. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, **18** (1): 140 – 156.

Sucupira, N.R., Da Silva, A.B., Pereira, G. e Da Costa, J.N. (2012). Methods for Measuring Antioxidant Activity of Fruits. *Unopar Científica Ciências Biológicas e a Saúde*, **14** (4): 263 – 269.

Sushama, B. e Nishteswar, K. (2014). Review of Anti-Oxidant Herbal Drugs W.S.R to Madhuraskandha (Charakasamhita). *International journal of ayurvedic & herbal medicine*, **4** (3): 1480 – 1493.

Tafadzwa, M. (2012). Screening of some Traditional Medicinal Plants from Zimbabwe for Biological and Anti-microbial Activity. A thesis presented to the University of Zimbabwe in

partial fulfillment for the requirements of the MPhil Degree - University of Zimbabwe. Acedido em 08 de Dezembro 2014, em: <http://ir.uz.ac.zw/jspui/>.

Ugoh, S.C. e Bejide, S.O. (2013). Phytochemical Screening and Antimicrobial Properties of the Leaf and Stem Bark Extracts of *Strychnos Spinosa*. *Nature and Science*, **11** (9): 123 – 128.

Van Wyk, B.-E. (2011). The potential of South African plants in the development of new food and beverage products. *South African Journal of Botany*, **77**: 857 – 868.

Vargas, P.N., Hoelzel, S.C. e Rosa, C.S. (2008). Determinação do Teor de Polifenóis Totais e Actividade Antioxidante em Sucos de Uva Comerciais. *Alimentos e Nutrição*, **19** (1): 11 – 15.

Vignoli, J.A., Bassoli, D.B. e Benassi, M.T. (2012). Actividade Antioxidante de Cafés Torrado e Solúvel: Padronização e Validação de Métodos. *Coffee Science*, **7** (1): 68 – 75.

Wet, H., Nkwanyana, M.N. e van Vuuren S.F. (2010). Medicinal plants used for the treatment of diarrhoea in northern Maputaland, KwaZulu-Natal Province, South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, **130**: 284 – 289.

World Agroforestry Centre – University of Greenwich. Pesticidal Plant Leaflet (*Strychnos spinosa* Lam). Acedido 08 de Dezembro 2014 em: <http://projects.nri.org/>.

Zillo, R.R., Silva, P.P.M., Zanatta, S., Carmo, L.F. e Spoto, M.H.F. (2013). Qualidade Físico-química da Fruta *in Natura* e da polpa da Uvaia Congelada. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, **15** (3): 293 – 298.

Anexos

Tabela A1-1: Dados usados para a construção da curva de calibração do ácido gálico

Conc. (mg/ml)	0	50	100	150	250	350
Absorvância	0,033	0,251	0,367	0,523	0,790	0,871

Tabela A1-2: Dados usados para a construção da curva de calibração de DPPH

Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	0	1	5	10	15	20	25	30	35	40
Absorvância	0,016	0,024	0,105	0,369	0,523	0,729	0,951	0,983	1,223	1,419

Tabela A2-1: Réplicas das absorvâncias nas amostras da polpa de *Vangueria infausta*

Conc (mg/l)	25	50	75	100
Medição 1	0,647	0,184	0,234	0,099
Medição 2	0,633	0,401	0,198	0,111
Medição 3	0,767	0,306	0,090	0,137
Média	0,682 ± 0,074	0,297 ± 0,108	0,174 ± 0,075	0,115 ± 0,019

Tabela A2-2: Réplicas das absorvâncias nas amostras do licor de *Vangueria infausta*

Conc (mg/l)	25	50	75	100
Medição 1	1,213	1,214	1,139	1,203
Medição 2	1,240	1,209	1,149	1,063
Medição 3	-	-	1,076	1,060
Média	1,227 ± 0,019	1,212 ± 0,004	1,121 ± 0,039	1,109 ± 0,082

Tabela A2-3: Réplicas das absorvâncias nas amostras de jam de *Vangueria infausta*

Conc (mg/l)	25	50	75	100
Medição 1	1,107	0,949	0,796	0,599
Medição 2	1,172	0,927	0,805	0,644
Medição 3	1,120	0,932	0,815	0,619
Média	1,133 ± 0,034	0,936 ± 0,012	0,805 ± 0,009	0,621 ± 0,023

Tabela A2-4: Réplicas das absorvâncias nas amostras da polpa de *Strychnos spinosa*

Conc (mg/l)	25	50	75	100
Medição 1	0,661	0,284	0,120	0,119
Medição 2	0,696	0,264	0,134	0,107
Medição 3	0,618	0,273	0,138	0,143
Média	0,658 ± 0,039	0,274 ± 0,010	0,131 ± 0,009	0,123 ± 0,018

Tabela A2-5: Réplicas das absorvâncias nas amostras do licor de *Strychnos spinosa*

Conc (mg/l)	25	50	75	100
Medição 1	1,161	0,990	0,845	0,692
Medição 2	1,147	0,981	0,839	0,723
Medição 3	1,095	0,969	0,846	0,741
Média	1,134 ± 0,035	0,980 ± 0,011	0,843 ± 0,004	0,719 ± 0,025