

Q. ORG 45

Q. ORG

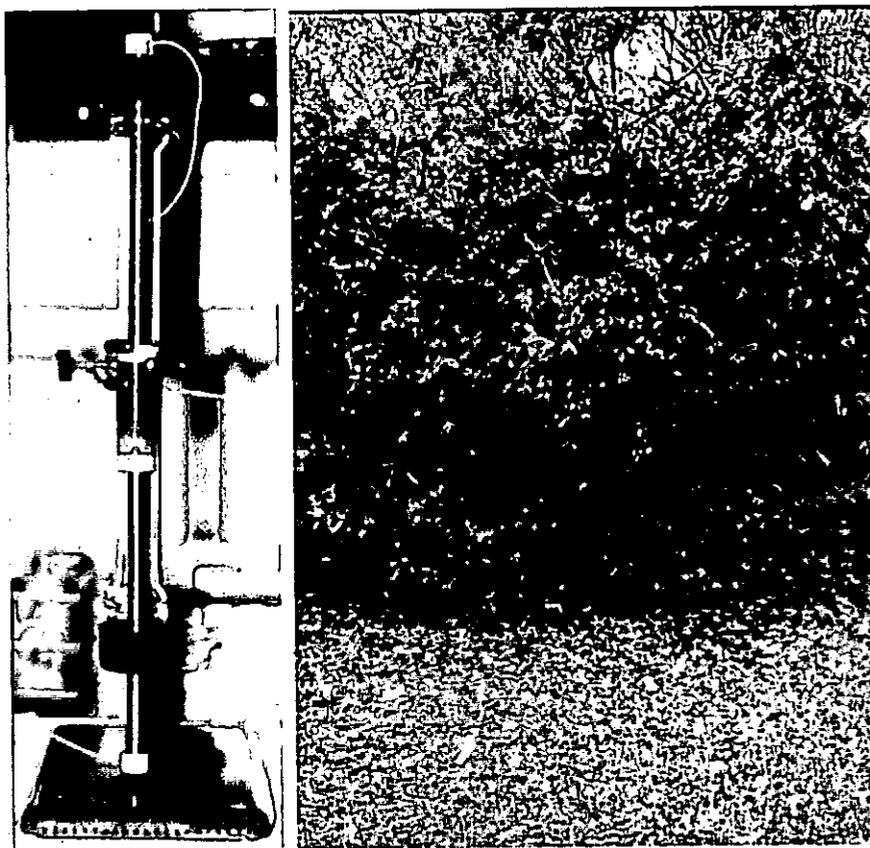


UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

RELATÓRIO DO TRABALHO LICENCIATURA

PLANTAS MEDICINAIS

**ESTUDO DA EFICIÊNCIA DE SOLVENTES NA EXTRACÇÃO DE COMPONENTES
DAS FOLHAS DA *BRIDELIA CATHARTICA* BERTOL F.**



EGÍDIO RAUL CHILAULE

UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

RELATÓRIO DO TRABALHO DE LICENCIATURA

PLANTAS MEDICINAIS

**ESTUDO DA EFICIÊNCIA DE SOLVENTES NA EXTRACÇÃO DE COMPONENTES
DAS FOLHAS DA *BRIDELIA CATHARTICA* BERTOL F.**

U. E. M. DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
BIBLIOTECA
R. E. 20-1.1
DATA 14. 07. 06
AQUISIÇÃO. DEFERIA
COTA.....

Supervisor: dr. Felisberto Pedro Pagula

Autor: Egídio Raul Chilaule

Maputo, Outubro De 2002

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar desejo expressar a minha gratidão e reconhecimento ao dr. Felisberto Pedro Pagula, supervisor deste trabalho, pela sábia orientação, apoio prestado e incentivo em todas as fases do trabalho.

Uma palavra de apreço ao Instituto de Investigação Agronómica (INIA), na pessoa do Sr. Mário Chaúque e da senhora Laurinda, pelo apoio na preparação das amostras.

Ao Dr. Bandeira e ao Sr. Júlio Dungo do Herbário do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Eduardo Mondlane da Faculdade de Ciências, pelo apoio na colheita e identificação das amostras os meus agradecimentos.

Os meus agradecimentos são extensivos também ao corpo docente, CTA e estudantes do Departamento de Química da Faculdade de Ciências da UEM com os quais tive o privilégio de lidar ao longo dos anos da minha formação. Particularmente, à Sra. Amélia Furvela pela assistência prestada na realização dos ensaios laboratoriais do presente trabalho.

A todos aqueles que directa ou indirectamente contribuíram para a minha formação e realização deste trabalho vão também o meu muito obrigado.

Outubro de 2002
Egídio Raul Chilaule
Egídio Raul Chilaule

DECLARAÇÃO SOB PALAVRA DE DE HONRA

O presente relatório do trabalho de Licenciatura foi elaborado pelo autor, com base nos recursos a que se faz referência ao longo do texto.

Maputo, Outubro de 2002

O autor,
Egídio Raul Chilaule
Egídio Raul Chilaule

RESUMO

O presente relatório do trabalho de Licenciatura vem na sequência de outros realizados no país, no âmbito da pesquisa sobre plantas medicinais, tão amplamente usadas, por praticantes da medicina tradicional.

Para além do valor científico que eventualmente possa representar na determinação dos princípios activos, o presente estudo visa essencialmente verificar as condições laboratoriais existentes no Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade Eduardo Mondlane para a pesquisa na área da Química dos Produtos Naturais particularmente as plantas medicinais.

Assim, dois métodos cromatográficos, designadamente a Cromatografia em Camada Fina (TLC) e a Cromatografia de Coluna de Média Pressão (MPLC) foram usados para a obtenção de resultados sobre a eficiência dos solventes na extracção de componentes da planta em estudo.

Do estudo conclui-se que há condições para a realização de estudos nesta área, como ilustram os resultados obtidos nomeadamente na extracção, na economia de solventes, mediante a aplicação da técnica de MPLC e a eficácia da análise por TLC na determinação do gradiente de polaridade e para monitorar o MPLC.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	i
DECLARAÇÃO SOB PALAVRA DE HONRA	ii
RESUMO	iii
ÍNDICE.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 As Plantas Mediciniais e A Saúde Pública.....	1
1.1.1 <i>Bridelia cathartica</i> Bertol F.	3
1.2 Os Métodos e Técnicas Analíticas Na Química Dos Produtos Naturais.....	4
1.3 Objectivos Do Trabalho.....	5
2. TÉCNICAS E MÉTODOS.....	6
2.1 Extracção.....	6
2.2 Cromatografia.....	8
2.2.1 Classificação Da Cromatografia.....	9
2.2.2 Cromatografia Líquido-sólido.....	9
2.2.2.1 Interações Na Cromatografia Líquido-sólido.....	10

2.2.2.2	Fase Estacionária	11
2.2.2.3	Fase Móvel	11
2.2.2.4	Eluição	13
2.2.2.5	O Cromatograma	14
2.2.2.6	Eficiência Da Coluna.....	16
2.2.2.7	Factores que Influenciam A Eficiência Da Coluna	17
2.2.2.8	Cromatografia de Coluna de Média Pressão (MPLC)	18
2.2.3	Cromatografia em Camada Fina	19
2.2.3.1	Fase Estacionária	20
2.2.3.2	Fase Móvel	21
2.2.3.3	Desenvolvimento das Placas	22
2.2.3.4	Técnicas de Visualização.....	22
2.2.3.5	Documentação	24
3.	PARTE EXPERIMENTAL	26
3.1	Colheita Das Amostras	27
3.2	Tratamento Das Amostras de Plantas	27
3.2.1	Determinação Da Humidade	27
3.2.2	Secagem e Moagem Das Amostras.....	28
3.3	Extracção	28
3.3.1	Maceração.....	28

3.3.2	Extracção e Fraccionamento em MPLC	29
3.3.2.1	Preparação Dos Eluentes	29
3.3.2.2	Enchimento e Montagem Da Coluna MPLC	29
3.3.2.3	Eluição.....	31
3.4	Cromatografia em Camada Fina	31
3.4.1	Material Usado	31
3.4.2	Condições Cromatográficas	32
3.4.2.1	Fase Estacionária.....	32
3.4.2.2	Fase Móvel	32
3.4.2.3	Aplicação Da Amostra.....	32
3.4.2.4	Desenvolvimento Das Placas	32
3.4.2.5	Sistema de Detecção e Documentação.....	32
4.	RESULTADOS	34
4.1	Humidade	34
4.2	Resultados Da Extracção por Maceração	34
4.3	Resultados Da Extracção e Fraccionamento em MPLC.....	34
4.4	Resultados Da Cromatografia em Camada Fina.....	35
4.4.1	Fracções de MPLC-1.....	35
4.4.1.1	TLC-1	35
4.4.1.2	TLC-2	36

4.4.1.3	TLC-3.....	36
4.4.2	Fracções de MPLC-2.....	37
4.4.2.1	TLC-4.....	37
4.4.2.2	TLC-5.....	38
4.4.2.3	TLC-6.....	39
5.	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	40
5.1	Extracção e Fraccionamento.....	40
5.2	Cromatografia em Camada Fina.....	40
6.	CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	41
7.	BIBLIOGRAFIA.....	42
	ANEXO: Cromatogramas.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação taxonômica da <i>Bridelia cathartica</i> Bertol F.....	3
Tabela 2. Percentagem de humidade da <i>B. Cathartica</i>	34
Tabela 3. Valores de R_f em função da polaridade da fase móvel a 10%.....	36
Tabela 4. Valores de R_f em função da polaridade da fase móvel a 40%.....	37
Tabela 5. Valores de R_f em função da polaridade da fase móvel a 20, 30 e 40%.....	38
Tabela 6. Valores de R_f calculados a partir dos cromatogramas TLC-5	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>B. cathartica</i> Bertol F.	3
Figura 2. Esquema geral para a extracção de material vegetal e fraccionamento em classes de compostos de acordo com a polaridade.	7
Figura 3. Esquema de classificação das técnicas cromatográficas com base no estado físico das fases.	9
Figura 4. Cromatograma em condições ideais.	15
Figura 5. Esquema do aparelho de MPLC.	19
Figura 6. Pulverizador.	23
Figura 7. Cromatograma de TLC para o cálculo de R_f	24
Figura 8. Esquema geral do trabalho.	26
Figura 9. Folhas da <i>B. cathartica</i> Bertol F. (a) com flores e (b) com frutos.	27
Figura 10. Fotografia de coluna de média pressão (MPLC).	30
Figura 11. Tina cromatográfica.	32

LISTA DE ABREVIATURAS

- CTA = Corpo Técnico Administrativo
- FE = Fase estacionária
- FM = Fase móvel
- GLC = Cromatografia gás líquido (gas-liquid chromatography)
- GSC = Cromatografia gás-sólido (gas-solid chromatography)
- HPLC = Cromatografia líquida de alta pressão (higher performance liquid chromatography)
- INIA = Instituto de Investigação Agronómica
- INLD = Instituto Nacional do Livro e Disco
- KTH = Instituto Real de Tecnologia (Suécia)
- LSC = Cromatografia líquido-sólido (liquid-solid chromatography)
- MPLC = Cromatografia de coluna de média pressão
- OUA = Organização da Unidade Africana
- p = Probabilidade
- PC = Cromatografia de papel (paper chromatography)
- PMT = Praticantes de medicina tradicional
- TLC = Cromatografia em cada fina (thin layer chromatography)
- UNICEF = Fundo das Nações Unidas para a Infância
- OMS = Organização Mundial de Saúde.

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais constituem o principal meio de sustentação dos seres vivos. O Homem sempre buscou na natureza os produtos para a sua subsistência, especialmente os de origem vegetal.

O uso de plantas com propriedades terapêuticas para o tratamento e prevenção de doenças é secular e tem sido acompanhado de intensa investigação científica: Serturmer (1805) isolou e identificou a morfina [2]; a quinina foi isolada pela primeira vez por Pelletier e Canvertou em 1820, e era o único remédio eficaz contra a malária [2].

O presente trabalho está inserido no programa de estudo de Plantas Medicinais e Aromáticas, em curso no departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade Eduardo Mondlane. A tese reporta o estudo da eficiência de solventes na extracção de componentes das folhas da *Bridelia cathartica* Bertol F., uma planta usada como remédio para o tratamento da malária no sul de Moçambique (Marracuene) [9].

1.1 As Plantas Medicinais e A Saúde Pública

Segundo Addae-Mensah, I. (1988) a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que entre 60 a 90% da população dos países desenvolvidos acredita nas plantas medicinais para a satisfação total ou parcial das suas necessidades em cuidados de saúde [1].

Ainda de acordo com Addae-Mensah, I. (1988), tanto a OMS como o UNICEF já reconheceram que os programas de saúde não terão impacto no estado de saúde em África sem o devido reconhecimento, desenvolvimento e integração da medicina tradicional nos sistemas de prestação de cuidados de saúde primários. Por outro lado, a "Inter-África Committee on Medicinal Plants and Africa Traditional Medicine" da Organização da Unidade Africana (OUA) decidiu implementar as recomendações da OMS sobre o programa "Saúde para Todos no Ano 2000" [1].

O uso de plantas medicinais em Moçambique abrange uma larga percentagem da população e, conseqüentemente, o país apresenta potencialidades naturais favoráveis ao desenvolvimento desta área.

Por outro lado, os dados científicos disponíveis sobre as plantas usadas por praticantes da medicina tradicional (PMT) quanto à eficácia, princípios activos, etc. não permitem o seu uso universal e seguro.

A aplicação de produtos naturais, em especial os de origem vegetal, como remédios na sua forma natural tem sido progressivamente preterida a favor de substâncias isoladas e sintéticas. A principal razão para esta tendência está baseada em dois factores: (1) o efeito biológico constante das substâncias puras e, daí, (2) a possibilidade de monitorio da actividade biológica quer do ponto de vista dos efeitos indesejáveis (toxicidade ou efeitos colaterais) como da sua acção em função da dosagem, etc.

O desenvolvimento da ciência e da técnica permitiram nas últimas décadas avanços significativos na medicina e na farmacologia com recurso a substâncias naturais. O exemplo mais ilustrativo são os antibióticos, ainda que não sejam de origem vegetal. Dentre muitos outros produtos naturais terapêuticos destacam-se ainda as vitaminas, antitumores e antileucémicos [2].

É reportado o uso da *Bridelia cathartica* (objecto de estudo neste trabalho) e da *Spirostachys africana* no tratamento da malária por PMT da região sul de Moçambique, nomeadamente em Marracuene [9].

Ao testar, *in vitro*, a actividade antimalárica contra o *Plasmodium falciparum* de extractos brutos de éter de petróleo, etanol e água, verificou-se que a excepção dos de éter de petróleo das folhas da *S. africana* e do caule da *B. cathartica*, todos os outros causaram uma significativa ($p > 0,01$) redução de esquizontes depois de 48 horas de incubação, comparado com o padrão (cultura de *Plasmodium falciparum* sem extractos) [9].

Algumas plantas africanas referidas também como tendo propriedades antimaláricas são: *Strychnos icaia* (da família das Strychnina), *Chryphillum albidan* (família: Chice),

Sclerocarya birrea (família: Cashew), *Clutia abyssinica* (família: Spurge), *Picralima nitida* (família: Dogbane).

1.1.1 *Bridelia cathartica* Bertol F.

A *B. cathartica*, representada na figura 1, é um arbusto com tronco muito ramificado com tendência para trepar e também ocorre como uma árvore com altura aproximadamente de 4 a 6 metros; caule liso, castanho ou cinzento; folhas elípticas e grosseiramente recortadas 3 a 9 x 1,5 a 4,5 cm (geralmente 3,5 x 1,6 cm). Ocorre em Moçambique e na faixa limitrofe na África do Sul e Zimbabwe com Moçambique.

Figura 1. *B. cathartica* Bertol F.



A classificação taxonómica da planta em estudo está resumida na tabela 1. [14].

Tabela 1. Classificação taxonómica da *Bridelia cathartica* Bertol F.

Nome científico	<i>Bridelia cathartica</i> Bertol F.
Nome vulgar	Munwganti (em Ronga)
Família	Euphorbiaceae
Género	<i>Bridelia</i>
Espécie	<i>Cathartica</i>

Além da actividade antimalárica da *B. cathartica* são igualmente reportadas as seguintes actividades biológicas [14]: remédio contra dores de cabeça, epilepsia, dores de estômago e antitumores.

1.2 Os Métodos e Técnicas Analíticas Na Química Dos Produtos Naturais

O uso dos produtos naturais está intimamente ligado à capacidade dos meios e métodos de separação, isolamento, purificação e identificação de compostos químicos disponíveis. Assim, a pureza e quantidade de substâncias químicas que podem ser isoladas quer de fontes naturais quer também de reacções de síntese depende muito das técnicas usadas aliadas às habilidades técnicas do pessoal envolvido.

Os métodos de separação desempenham, portanto, um papel importante na investigação em Ciências Naturais. Eles são geralmente o ponto de partida da análise e estão igualmente presentes em praticamente todas as fases do estudo analítico.

Os exemplos de métodos clássicos de separação são a extracção, filtração, sedimentação, centrifugação, precipitação, recristalização, secagem, sublimação e destilação [8].

Embora seja inquestionável a importância destas técnicas, estas podem não ser eficazes para a separação de compostos com propriedades físicas e químicas idênticas, em particular as amostras de produtos naturais, vegetais ou animais, ou misturas de reacções complexas.

A maior parte do tempo de trabalho de muitos laboratórios que lidam com química analítica e orgânica ou bioquímica é provavelmente dedicado ao isolamento e purificação de amostras [8].

As técnicas cromatográficas jogam um papel muito importante na eficácia e eficiência da análise e são largamente usadas na separação de amostras de plantas.

Apesar do desenvolvimento das técnicas analíticas que fornecem actualmente aparelhos extremamente sofisticados, os métodos cromatográficos mais simples continuam a ser usados amplamente e, basicamente, tal como foram desenvolvidos por M. Tswett, há cem anos [8].

Entretanto, esforços têm sido desenvolvidos para melhorar a sua eficiência quanto ao tempo e consumo de solventes. Uma redução de tempo de separação foi conseguida, sem prejuízo da eficácia, usando um sistema de vidro fechado carregado com um sólido de partículas grossas, e, realizando uma eluição a grande velocidade [8].

De um modo geral o presente trabalho aborda os aspectos teóricos e práticos da separação e isolamento de substâncias em amostras de plantas e a importância e possibilidade de investigação de plantas medicinais usadas no país por praticantes da medicina tradicional (PMT). Neste contexto os objectivos específicos são a seguir enunciados:

1.3 Objectivos Do Trabalho

O trabalho apresentado neste relatório tem como objectivos:

1. o estudo teórico e prático da cromatografia;
2. o estudo da eficiência de solventes na extracção e nos métodos cromatográficos;
3. a avaliação das possibilidades de estudo fitoquímico de plantas medicinais, em particular a *Bridelia cathartica* Bertol F..

2. TÉCNICAS E MÉTODOS

A contínua investigação e descoberta de substâncias de interesse em várias áreas, por um lado, e, por outro, a grande variedade e número de estruturas moleculares produzidas por plantas resultou no aprofundamento do conhecimento e uma mais ampla aplicação das técnicas analíticas já conhecidas e no desenvolvimento de novas para resolver os problemas que se levantavam.

A química das plantas desenvolveu-se como um ramo independente nos últimos anos e designada por Fitoquímica. A Fitoquímica é actualmente uma área específica das ciências naturais e complementa a Química dos produtos naturais e a Bioquímica. O maior desafio da Fitoquímica é coleccionar os dados existentes em cada classe particular de compostos [6].

A concretização deste objectivo depende em grande medida da escolha e aplicação criteriosa das técnicas e métodos de isolamento, separação e identificação dos inúmeros constituintes presentes nas plantas.

2.1 Extracção

A análise de plantas requer em primeiro lugar a extracção das substâncias nelas contidas. A técnica a usar depende da natureza do material vegetal e das substâncias a isolar.

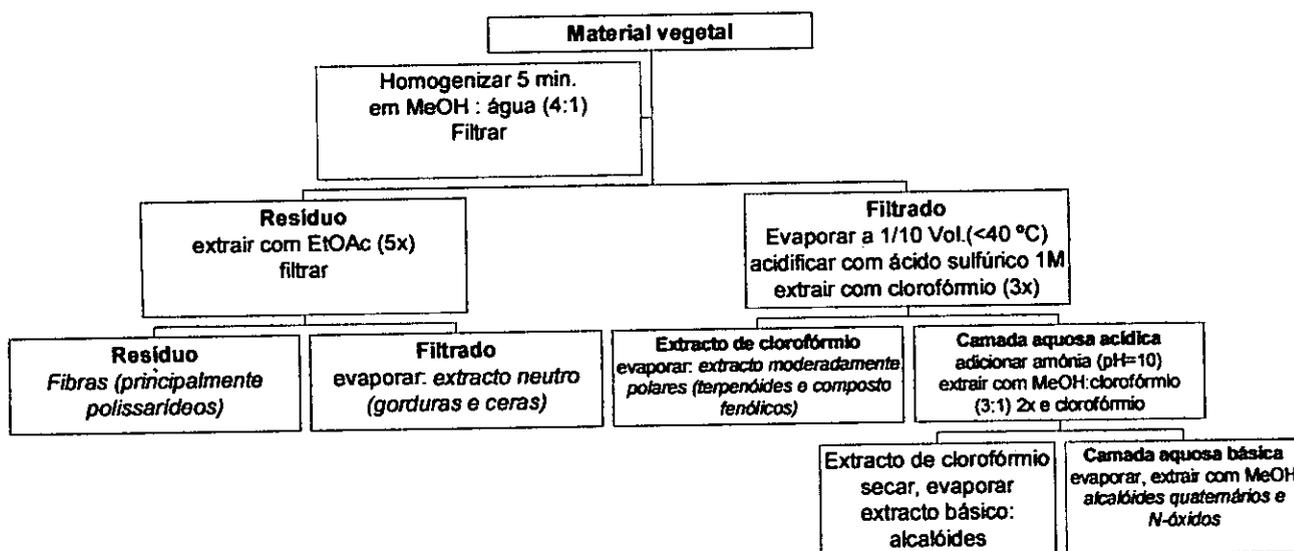
Extracção é uma técnica de separação de misturas usando solventes. Inclue não só a remoção selectiva de um ou mais componentes de um produto natural ou mistura como também a transferência selectiva de qualquer soluto ou impureza de um solvente para outro, de modo que seja analiticamente separado dos outros componentes [8]. Este processo é chamado extracção líquido-líquido e, geralmente usam-se solventes imiscíveis entre si ou parcialmente miscíveis, sendo um orgânico (fase orgânica) e outro aquoso (fase aquosa).

Em extracção líquido-líquido o procedimento comum consiste na adição de um solvente a uma solução contendo os componentes a separar. Agita-se a mistura e deixa-se em repouso até à separação das fases, que são decantadas ou filtradas.

Na análise de plantas, a extracção exaustiva para a obtenção de substâncias de tecidos de plantas secas é, geralmente, feita usando a técnica de extracção contínua num aparelho de soxhlet com um ou uma série de solventes, tais como o éter de petróleo e clorofórmio, para separar lípidos e terpenóides; álcool e acetato de etilo, para compostos mais polares [6].

Um esquema geral de extracção é apresentado na figura 2 [6].

Figura 2. Esquema geral para a extracção de material vegetal e fraccionamento em classes de compostos de acordo com a polaridade.



A maceração é outra técnica amplamente utilizada na análise de plantas. O material vegetal em pó é deixado em água ou outro solvente adequado por um certo tempo, conforme a idade e textura da amostra.

A extracção quantitativa pode não ser conseguida numa única operação. A lei de distribuição de Nernst, dada pela equação (1) define a distribuição de um dado analito "A"

entre dois solventes imiscíveis ou parcialmente miscíveis como a razão das concentrações em cada fase no estado de equilíbrio. Esta razão é constante para um dado sistema e denomina-se K_D , que depende da pressão e da temperatura.

$$(K_D)_{A(p, t \text{ sistema})} = \frac{[A]_{org}}{[B]_{aq}} \quad (1)$$

onde K_D é a razão de partição ou de distribuição, $[A]_{org}$ e $[A]_{aq}$ a concentração do analito em cada uma das fases no equilíbrio, p a pressão (atm) e T a temperatura ($^{\circ}\text{C}$).

A lei de distribuição de Nernst não tem em conta a forma química do soluto "A" ou seja é válida apenas no caso ideal. Por isso, na prática usa-se a constante D (coeficiente de distribuição ou de partição).

2.2. Cromatografia

A cromatografia é um método de separação no qual os componentes de uma mistura a serem separados são dinamicamente distribuídos entre duas fases imiscíveis sendo uma estacionária e outra móvel.

Durante a passagem pelo sistema, os componentes migram constantemente entre as duas fases e a quantidade ideal em cada uma é determinada pela constante de distribuição. A região da fase estacionária onde um ou mais elutos ou analitos (componentes da mistura a separar) são alocados chama-se zona ou banda. De acordo com a afinidade dos elutos em relação a cada uma das fases, eles levam mais ou menos tempo a percorrer uma certa distância da fase estacionária.

Assim, para um dado sistema cromatográfico, as zonas de dois elutos com diferentes constantes de distribuição migram a diferentes velocidades.

O processo de separação entre as bandas é crítica, devido ao alargamento durante a migração dos analitos. Assim, a separação de componentes cuja diferença entre os constantes de distribuição é pequena, torna-se difícil. Por isso a escolha do sistema cromatográfico deve ser tal que:

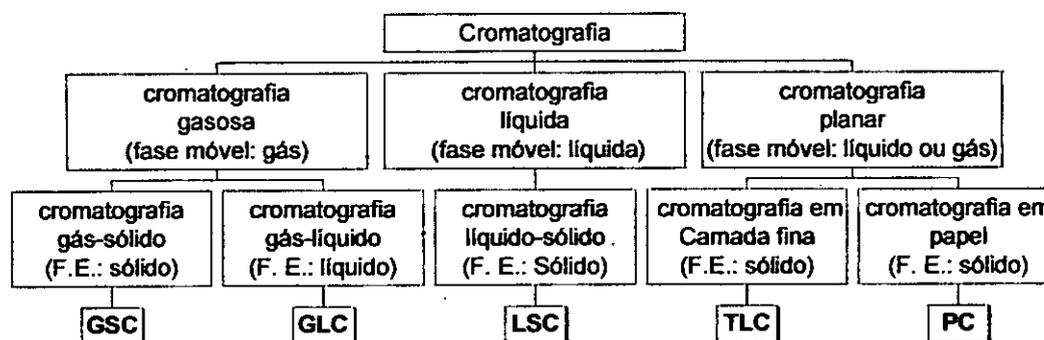
- i. os componentes tenham diferentes coeficientes de distribuição entre as fases.
- ii. Não reaja com os componentes.

Os tempos relativos que os elutos levam a percorrer uma mesma distância na fase estacionária são chamados tempos de retenção. Na prática a distribuição dos componentes no sistema é expressa, de preferência, pelas diferenças relativas das distâncias percorridas por cada componente em relação à fase móvel (valor referencial).

2.2.1. Classificação Da Cromatografia

Os métodos cromatográficos podem ser subdivididos em vários tipos conforme a natureza das fases, ou mecanismos de separação. No esquema (figura 3) a seguir, apresenta-se uma classificação da cromatografia baseada no estado físico das fases, móvel e estacionária.

Figura 3. Esquema de classificação das técnicas cromatográficas com base no estado físico das fases



Para o presente trabalho a cromatografia líquido-sólido (LSC) e a cromatografia planar em camada fina (TLC) têm particular interesse.

2.2.2. Cromatografia Líquido-sólido

Nesta parte do relatório trata-se a cromatografia líquido-sólido (LSC) que é uma das duas técnicas principais usadas no trabalho experimental.

2.2.2.1. Interações Na Cromatografia Líquido-sólido

As interações que podem ocorrer entre as partículas da fase estacionária sólida e as moléculas do líquido (fase móvel) por um lado e, por outro, entre os componentes da amostra a separar e ambas as fases determinam o mecanismo de separação e, consequentemente, a escolha do sistema cromatográfico a aplicar.

A separação em LSC está baseada na adsorção selectiva da amostra e na acção do sistema eluente (fase móvel) sobre a superfície do sólido adsorvente (fase estacionária). Assim, as moléculas do eluito estão num meio não isotrófico composto pelas moléculas da fase móvel e a superfície de separação da fase estacionária.

Quando a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, o processo é chamado cromatografia directa ou fase normal, no caso contrário é chamado cromatografia de fase invertida (reversed phase chromatography) [8]. Os adsorventes mais comuns são baseadas na sílica; incluem ainda a alumina, terras diatomáceas e células pulverizadas [10].

A separação é devida a interações individuais das moléculas do eluito com as moléculas de cada fase em diferente extensão. As forças que estão em jogo no processo de adsorção e logo na separação são por exemplo: forças indutoras (iónicas); electrostática (polar); ligações de hidrogénio, interações fracas ácido-base sem transferência de protões; transferência de carga; ligação covalente, interações do tipo Van Der Waals, entre outras.

Depreende-se, facilmente, da variedade das interações que o mecanismo cromatográfico de distribuição ou de adsorção é complexo mas de um modo geral das diferentes forças competitivas há uma que predomina. No presente trabalho o LSC opera com base na polaridade. Assim, os compostos mais polares, contendo grupos funcionais capazes de formar ligações de hidrogénio, serão mais fortemente adsorvidos na fase estacionária que os menos polares e, consequentemente, eluídos mais lentamente que estes.

2.2.2.1. Fase Estacionária

Várias substâncias podem ser usadas para o empacotamento da coluna cromatográfica. Já foi referido que a escolha do adsorvente depende quer da natureza dos componentes a separar quer do sistema eluente. O adsorvente em geral deve apresentar as seguintes características:

- i) estabilidade em relação ao sistema eluente;
- ii) não reagir irreversivelmente com a amostra.

2.2.2.3. Fase Móvel

A eficiência das separações por cromatografia líquida, quer do ponto de vista de resolução quer do consumo de solventes, depende em grande medida também da fase móvel. As características gerais dos solventes para separações cromatográficas são:

- i) não interagir quimicamente com a fase estacionária;
- ii) compatibilidade com o detector (se for requerido ou usado);
- iii) adequada solubilidade da amostra;
- iv) não interagir irreversivelmente com a amostra para viabilizar a sua recuperação.

Dois factores são determinantes na eficiência da separação dos componentes de uma mistura por cromatografia, a saber:

- a) as diferenças na velocidade de migração dos componentes;
- b) a extensão do inevitável alargamento da banda.

Assim, factor de retenção ou factor de capacidade k é um parâmetro importante para avaliar a migração dos elutos, definido pela equação (2)

$$k = \frac{T_r - T_o}{T_o} \quad (2)$$

Onde T_r é o tempo de retenção do eluito que é proporcional à solubilidade na fase móvel [13] e T_o o tempo inactivo, que é o tempo que leva o componente não retido a passar pelo sistema (geralmente este componente é o solvente).

Os valores de k dependem das fases do sistema eluente e das propriedades químicas dos compostos a separar. Em sistemas líquido-líquido os valores de k podem ser ajustados, escolhendo fases de diferentes miscibilidades ou adicionando ácidos, bases ou sais.

A distribuição de um eluito solúvel em dois solventes imiscíveis é dada pelo coeficiente de partição K :

$$K = \frac{\text{Solubilidade na fase de topo}}{\text{solubilidade na fase de base}} \quad (3)$$

Considerando os volumes de cada um dos solventes do sistema, pois estes podem influenciar a solubilidade do analito no eluente define-se a constante B , coeficiente de distribuição efectiva, pela equação (4):

$$B = K \cdot \frac{\text{volume da fase do topo}}{\text{volume da fase de base}} \quad (4)$$

Como já foi mencionado, na cromatografia de adsorção a separação está baseada na diferença de afinidade de adsorção da amostra e, por outro lado, na capacidade do sistema eluente remover os componentes ou arrastá-los da fase estacionária.

As interacções importantes a considerar são:

- i. interacções entre as moléculas da fase móvel e as moléculas adsorvidas do eluito;
- ii. interacção de grupos funcionais polares dos eluitos com a fase discreta de adsorção, na fase estacionária;
- iii. interacção entre as moléculas do solvente da fase móvel e as moléculas do eluito adsorvido;

iv. interação entre as moléculas do solvente adsorvido e as dos eluítos.

2.2.2.4 Eluição

A par das considerações feitas relativamente as interações entre as fases, estacionária e móvel, por um lado, e entre as fases e a amostra, por outro, a eluição por si tem influência na separação cromatográfica e na análise dos resultados:

a) Eluição Isocrática

A eluição isocrática é aquela em que a composição da fase móvel permanece constante, ao longo da separação.

Este método é o mais usado em cromatografia líquida e tem as vantagens de ser simples e fornecer dados cromatográficos com boa reprodutibilidade. A sua principal desvantagem é a baixa resolução quando aplicada a amostras, cujos componentes a separar apresentem tempos de retenção que difiram grandemente. Os picos dos primeiros componentes eluídos são mal resolvidos e os tempos de retenção inconvenientemente longos e para os componentes que são eluídos no fim, os picos são largos.

Esta situação é frequentemente referida como "o problema geral da eluição" [8].

b) Eluição em Gradiente

A eluição em gradiente diz respeito a variação (crescente ou decrescente) de uma propriedade do sistema eluente (por exemplo a polaridade). Isto pode ser obtido por uma adequada manipulação da composição da fase móvel aumentando ou diminuindo a concentração de um dos solventes ou de um aditivo apropriado.

As vantagens da eluição em gradiente estão relacionadas com a rapidez e o estreitamento dos picos dos componentes da amostra. O gradiente provoca o movimento da parte final da zona para a região de maior poder de eluição que a parte da frente e, além disso, como o poder de eluição do gradiente cresce vigorosamente, o valor de k decresce e a zona move-se mais rapidamente.

Usando um mecanismo especial, como por exemplo uma bomba, o gradiente pode ser dirigido contra a pressão ou sucção. Assim, é possível ter gradiente a diferentes pressões.

Um sistema de gradiente de alta pressão, no qual uma bomba por componente de eluente é alimentada por uma câmara de mistura entre a bomba e a coluna, é principalmente usado em HPLC (Higher Performance Liquid Chromatography) [8];

No sistema de mistura de gradiente a baixa pressão, o gradiente é misturado à pressão atmosférica, e introduzido na coluna por uma simples bomba [8]. Estes sistemas são mais simples de aplicar e, relativamente, baratos.

Muitos arranjos de câmaras de mistura e reservatórios têm sido sugeridos para a produção de um certo gradiente em cromatografia líquida. Os três mais conhecidos são:

- i. o método de Varigrad a volume constante (várias câmaras de mistura e um reservatório);
- ii. o método de eluição em gradiente crescente (uma câmara de mistura e vários reservatórios), figura 5;
- iii. o método de Varigrad sob condições de equilíbrio hidrostático (várias câmaras de mistura, sem reservatório).

No trabalho que o presente relatório reporta foi usado o método (ii), eluição em gradiente crescente, desenvolvido por Scott, por ser o mais versátil e poupar solventes.

2.2.2.5 O Cromatograma

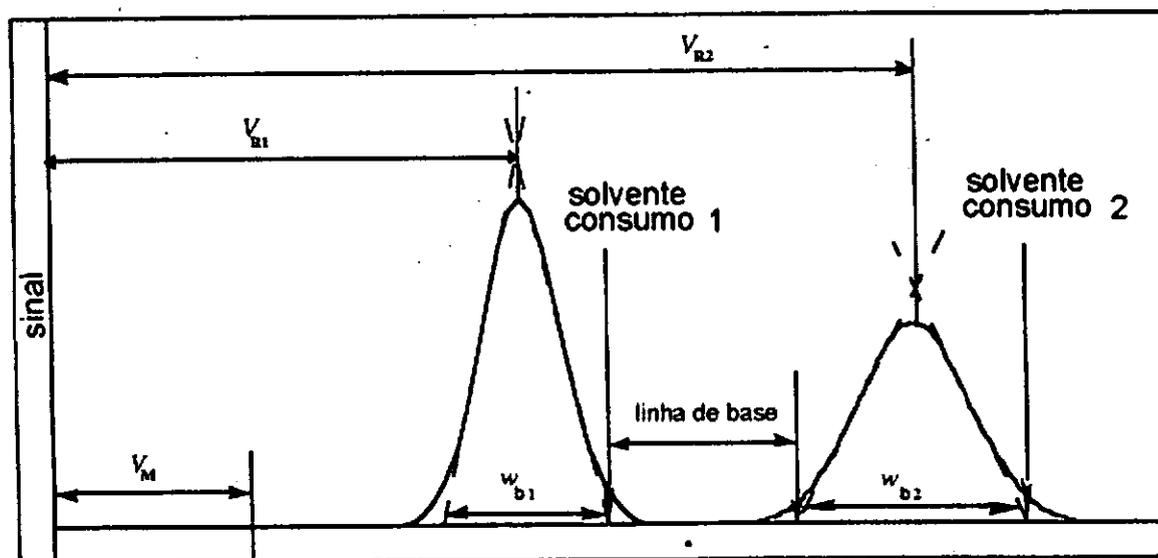
O cromatograma é o resultado de uma análise cromatográfica. Assim, originalmente o termo era usado para designar a própria coluna depois de desenvolvida ou, de igual modo, em cromatografia planar, a placa (TLC) ou o papel cromatográfico (PC) desenvolvidos.

Vários processos podem ser usados para dectetar as mudanças de composição que ocorrem durante o desenvolvimento cromatográfico, baseados na medição de propriedades físicas ou químicas que possam ser registados.

Actualmente, é comum expressar o resultado da análise cromatográfica na forma de um gráfico do percurso da mancha (zona) versus a unidade de comprimento, que pode ser convertido em unidades de tempo ou de volume.

No caso ideal, para tais cromatogramas, o traço de cada eluito terá uma forma gaussiana simétrica, donde vários parâmetros importantes podem ser determinados. Por exemplo o vértice do pico é usado para calcular o volume total de retenção (volume necessário para retirar metade do total do eluito de uma coluna) V_R . A figura 4 mostra um cromatograma em condições ideais.

Figura 4. Cromatograma em condições ideais



Quando o volume da fase móvel na coluna ou volume de carga (equivalente a T_0), V_M , e k são conhecidos, o volume de retenção (corresponde a T_r) pode ser calculado aplicando a equação (5) conhecida como a equação fundamental da cromatografia

$$V_R = V_M (1+k) \quad (5)$$

2.2.2.6 Eficiência Da Coluna

Várias considerações foram já feitas a respeito dos factores que determinam a eficiência e a eficácia da análise LSC. Aqui, trata-se da eficiência da coluna, tendo em atenção a teoria dos pratos da coluna de destilação, a qual é medida em unidades de pratos teóricos: quanto maior for o número de pratos teóricos, maior será a eficiência da separação. O número de pratos teóricos é dado pela equação (6)

$$N = 16 \cdot \frac{V_R^2}{W_b} \quad (6)$$

Onde V_R é o volume total de retenção (volume necessário para remover 50% do eluito de uma coluna) e w_b a largura do pico.

Da equação (6) vê-se que o número de pratos teóricos e, logo, a eficiência da coluna é função de volume total de retenção e da largura do pico.

Assim, importa, nesta fase, fazer algumas considerações em relação a estes parâmetros. A largura do pico, w_b , resulta da combinação de vários factores de que depende o alargamento da banda em cromatografia, nomeadamente:

- i) o comprimento da coluna L , que está relacionado com o parâmetro H do alargamento intrínseco à distribuição que depende de k . L e H estão relacionado pela equação $H = L/N$ (7);
- ii) a uniformidade da fase móvel;
- iii) a difusão longitudinal na fase móvel e na fase estacionária;
- iv) a lenta transferência de massa entre as duas fases, levando a condições de não equilíbrio. Na prática, esta é a causa dominante no alargamento da banda;
- v) as perturbações devidas ao calor envolvido na adsorção;

vi) o sistema de injeção da amostra e de detenção, que contribuem para o chamado o volume "extra coluna" que é o volume entre o ponto de injeção efectiva e o ponto de detecção efectiva, excluindo o volume da fase móvel na coluna.

Como o traço de cada eluto no cromatograma nem sempre obedece a distribuição gaussiana, a medição precisa da largura da banda w_b é difícil, e, por isso, muitas vezes se usa a meia largura do pico ($w_{b/2}$) em vez de w_b . Assim a equação (6) transforma-se em:

$$N = 5,54 \frac{(V_r)^2}{W_{b/2}} \quad (8)$$

Por outro lado, V_R pode ser substituído por T_r , tempo de retenção.

2.2.2.7 Factores que Influenciam A Eficiência Da Coluna

Desde as primeiras colunas de vidro alimentadas por gravidade muitas tentativas foram desenvolvidas para aumentar a eficiência da coluna.

Na técnica de coluna cromatográfica as bandas são removidas por extensão (cortando a coluna em fracções se for usada uma coluna de nylon) ou por escavação e os produtos separados do adsorvente por eluição com solvente adequado. A velocidade do fluxo depende do tamanho das partículas do adsorvente, da viscosidade da fase móvel, das dimensões da coluna e, principalmente, da força aplicada no escoamento da fase móvel.

Pode usar-se um vácuo na base da coluna ou pressão no topo para aumentar o fluxo. No método de "flash chromatography" (cromatografia instantânea) usa-se uma suave pressão no topo para aumentar o escoamento das amostras, bastando para isso dispor de uma válvula de controle de fluxo no topo da coluna clássica alimentada por um gás a pressão regulada.

Em geral, a tendência é o uso de adsorventes com partículas muito finas e compactadas, sendo a eluição a pressão acima da pressão atmosférica. Entretanto, duas técnicas cromatográfica têm sido amplamente usadas: (i) a cromatografia líquida de média pressão, MPLC ("medium pressure liquid chromatography"), e (ii) a cromatografia líquida

de alta pressão, HPLC ("higher performance liquid chromatography"). Na MPLC usam-se adsorventes com diâmetro das partículas entre 25 e 70 μm enquanto que na HPLC são usados adsorventes com diâmetro menor que 35 μm . Estas duas técnicas, além da eficiência relativamente ao tempo de separação, apresentam a vantagem de interações mais efectivas entre o soluto e a fase estacionária.

2.2.2.8 Cromatografia de Coluna de Média Pressão (MPLC)

Esta é, juntamente com TLC, a técnica cromatográfica mais usada no presente trabalho. A técnica foi desenvolvida por uma equipa do Departamento de Química Orgânica do Instituto Real de Tecnologia (KTH) sueca liderada por Baeckström, que usou a expressão "cromatografia líquida de mínimo esforço" na perspectiva de, com esforço colectivo, fazer uma cromatografia de coluna preparativa tão eficiente quanto possível, usando equipamento de baixo custo [8].

Baeckström inspirado na cromatografia gasosa, onde o gradiente de temperatura é usado rotineiramente, concebeu a coluna BAECKSTRÖM & SEPARO AD. Uma coluna curta, que, alimentada continuamente com um gradiente de polaridade crescente, através de uma bomba de alta velocidade de eluição permitia reduzir o tempo de separação e evitar a distorção das bandas [8].

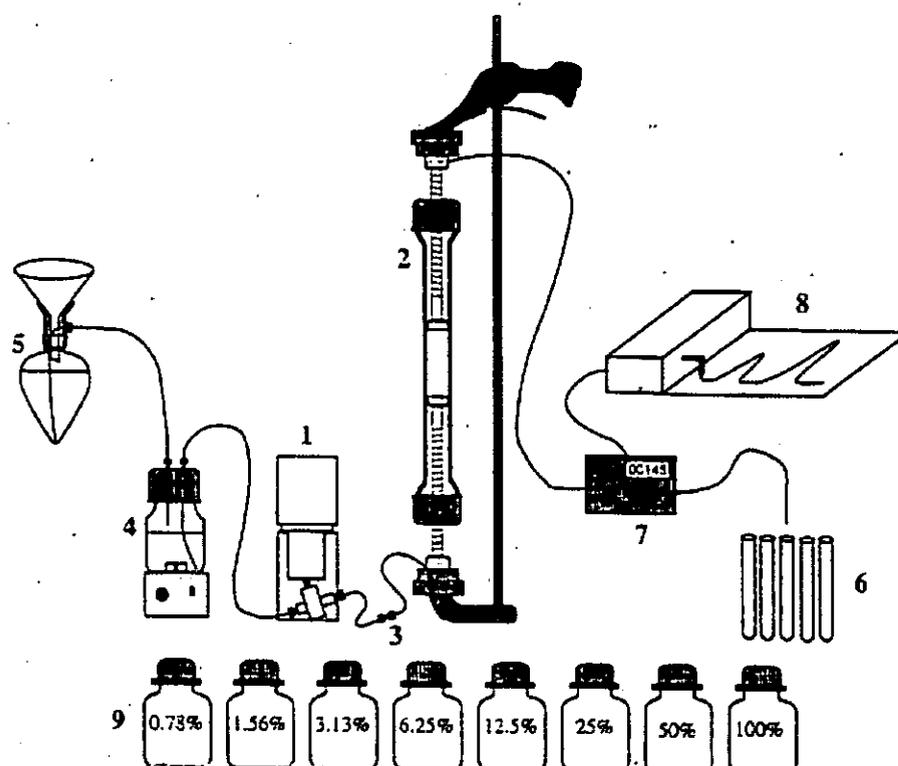
A figura 5 mostra o esquema do aparelho de MPLC, semelhante ao usado neste trabalho.

Entretanto, algumas questões se levantam na aplicação da coluna de MPLC, a saber:

- i. o sentido de bombeamento do solvente: a remoção de bolhas de ar é favorecida pelo sentido ascendente do bombeamento de solvente bem como a prevenção da contracção do adsorvente na coluna.
- ii. o reabastecimento da câmara de mistura é relativamente difícil, podendo levar a variações importantes no nível da mistura de solventes ou à variação mais ou menos brusca do gradiente de polaridade;

iii. a agitação na câmara de mistura cria um remoinho e varia a distância que vai do fim do sistema à superfície do líquido, provocando a adição de mais solvente que a média introduzida na câmara de mistura.

Figura 5. Esquema do aparelho de MPLC: 1- Bomba; 2- Coluna; 3- adaptador de ligações; 4- Câmara de mistura; 5- Reservatório; 6- Colector de fracções; 7- Detector (UV); 8- Registador (papel); 9- gradiente de solvente.



Alguns parâmetros a ter em conta para a obtenção de um crescimento exponencial do gradiente são o factor de diluição, o volume e a concentração inicial da mistura na câmara e o volume de cada mistura de solvente.

2.2.3 Cromatografia em Camada Fina

A cromatografia em camada fina (TLC) é uma técnica de separação muito aplicada e foi um dos dois métodos mais usados neste trabalho.

De acordo com a classificação adoptada no presente relatório, a TLC é uma técnica de cromatografica de adsorção planar.

O adsorvente (fase estacionária) é aplicado em placas de vidro ou alumínio inerte que servem de suporte. A separação está baseada na adsorção selectiva dos componentes a separar na fase estacionária sobre a qual são arrastados, de acordo com a afinidade, pela fase móvel, que por acção capilar se move ao longo do adsorvente. As interacções envolvidas no mecanismo de separação é no essencial idêntico ao descrito para LSC.

A cromatografia em camada fina apresenta algumas vantagens comparativamente aos outros métodos cromatográfico nomeadamente:

- i. simplicidade e rapidez;
- ii. alta sensibilidade e reprodutibilidade dos resultados;
- iii. baixo custo.

2.2.3.1 Fase Estacionária

Uma das desvantagens da cromatografia em camada fina original é a dificuldade de pulverização uniforme do adsorvente nas placas de suporte [13]. Actualmente, existem no mercado placas já pulverizadas que asseguram uma distribuição mais uniforme e maior reprodutibilidade dos resultados.

A sílica-gel é o adsorvente mais comum mas as camadas cromatográficas podem ser feitas, usando outras substâncias como alumina (óxido de alumínio); celulose; poliamida; terras diatomacias, etc..

O grau de separação depende da espessura e da uniformidade de distribuição da camada adsorvente. Em TLC analítica a espessura é de 0,10 a 0,25 mm enquanto a escala preparativa a espessura da camada é maior que 1,0 mm [13]. Os parâmetros a considerar na escolha do adsorvente são [8]:

- i. a natureza dos componentes a separar;
- ii. a técnica de pulverização;
- iii. a espessura e estabilidade desejada para a camada;
- iv. as características da fase móvel;
- v. a técnica de detecção a usar.

2.2.3.2 Fase Móvel

As considerações já feitas em relação as interações que envolvem a fase móvel são, no geral, válidas para a cromatografia em camada fina.

Entretanto, algumas características são aqui enfatizadas:

- i. os solventes usados como fase móvel não devem reagir com o adsorvente;
- ii. devem ter estabilidade física e química adequada que garanta a reprodutibilidade dos resultados;
- iii. devem ser selectivos em relação aos componentes a separar.

A polaridade dos solventes joga um papel importante na eficácia da separação em cromatografia de adsorção: os componentes mais polares interagem mais fortemente com a fase estacionária sendo necessário, por isso, eluentes de alta polaridade para arrastá-los. A regra "semelhante dissolve semelhante" é um princípio aplicável quando se trata de escolher os solventes adequados a TLC. Por outro lado, os solventes devem ter uma volatilidade suficientemente alta para evitar que se espalhem na placa, arrastando consigo os elutos.

Muitos outros parâmetros devem ser tidos em conta na selecção dos solventes a aplicar em TLC. Em geral, quando as características físicas e a solubilidade das amostras são conhecidas, a escolha pode ser feita com base nas informações fornecidas por livros

de referência como "Merck Index" e "Handbook of Chemistry and Physics" [8]; de outro modo, é necessário efectuar testes preliminares, por tentativas.

2.2.3.4 Desenvolvimento Das Placas

O desenvolvimento das placas é a expressão normalmente usada em cromatografia em camada (também em PC) para referir o processo no qual a fase móvel percorre, por capilaridade, a camada adsorvente provocando a separação dos eluitos.

A técnica de desenvolvimento das placas é normalmente feita no sentido ascendente, em tanques de tamanho adequado (por exemplo uma tina ou copo de precipitação de vidro, plástico ou outro material), previamente saturadas com o sistema eluente para atingir as condições de equilíbrio, evitando-se que este se evapore da placa para o ambiente do tanque de desenvolvimento [13].

Embora a técnica ascendente seja a mais popular devido a sua simplicidade de execução e dos equipamentos requeridos, o desenvolvimento pode ser feito no sentido descendente ou horizontal.

As técnicas de desenvolvimento das placas podem também ser classificadas de acordo com o número de componentes do sistema eluente que constitui a fase móvel ou conforme o número de vezes que a eluição é repetida. Assim, o desenvolvimento pode ser múltiplo, realizando por etapas uma ou muitas vezes, usando um solvente puro ou mistura de solventes, ou, então, eluindo por etapas ou continuamente. A opção depende da separação desejada e da complexidade e conhecimento da amostra cujos componentes se pretende separar. A eluição pode ser em condições isocráticas ou em gradiente. A literatura disponível descreve com boa profundidade as técnicas de desenvolvimento das placas [13].

2.2.3.5 Técnicas De Visualização

As manchas dos eluitos numa placa desenvolvida podem não ser visíveis, se os componentes não apresentarem características detectáveis, como por exemplo uma cor.

Nestes casos recorre-se a métodos próprios, chamadas técnicas de visualização, para localizar na placa desenvolvida os componentes eluídos.

Uma técnica de visualização ideal para um cromatograma em TLC deve ser capaz de [8]:

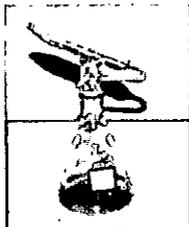
- i. permitir visualizar (ou detectar) quantidades em microgramas de substâncias separadas;
- ii. dar uma área visualizada que seja estável na sua aparência;
- iii. formar uma área visualizada que tenha um contraste satisfatório com o fundo;
- iv. dar uma área suficientemente estável e adequada a medidas quantitativas, se for necessário.

Os métodos de visualização podem ser divididos em dois tipos: métodos físicos e métodos químicos. Nos métodos físicos destaca-se o uso da luz ultravioleta que aplicada a placas contendo material fluorescente dá diversas cores características para classes particulares de compostos. Os vapores de iodo, soluções de ácido sulfúrico são exemplo de algumas substâncias usadas na visualização por métodos químicos. As técnicas de visualização podem ser ainda subdivididas em destrutivos e não destrutivos.

Os equipamentos ou aparelhos usados para a detecção dos eluídos no cromatograma são simples: uma simples câmara provida de uma lâmpada como fonte de radiação UV é comumente usada; na visualização através de reagentes um dispositivo simples de pulverização utilizado neste trabalho é mostrado na figura 6.

A escolha da técnica de visualização depende essencialmente da estabilidade desejada.

Figura 6. Pulverizador



2.2.3.6 Documentação

Em análise cromatográfica, tal como em qualquer análise química, o registo e interpretação dos resultados é uma fase particularmente decisiva.

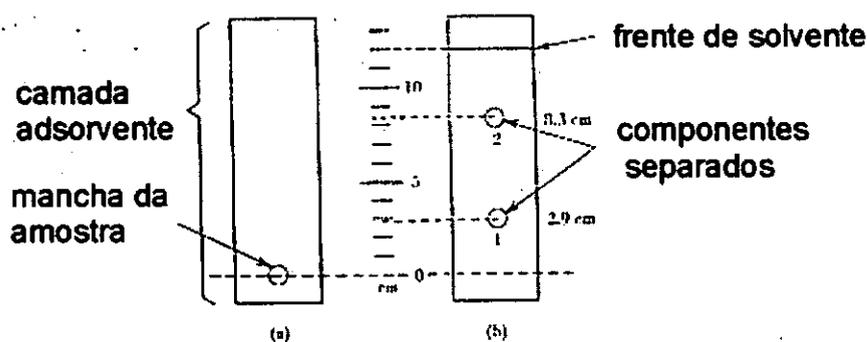
Como já foi referido, o cromatograma é o resultado de uma análise cromatográfica e, em TLC, pode ser registada de diversas formas [8]: como fotografia ou fotocópia, desenho, dados quantitativos obtidos do cromatograma como por exemplo o factor de retardamento, R_f .

O valor de R_f de cada mancha é calculado usando a equação (9)

$$R_f = \frac{\text{distância da origem ao centro da mancha do componente}}{\text{distância da origem à frente do solvente}} \quad (9)$$

O R_f é característico para um dado composto na mesma fase estacionária, usando a mesma fase móvel para desenvolver a placa. Assim, os valores conhecidos de R_f podem ser comparados àqueles de substâncias desconhecidas para a sua identificação.

Figura 7. Cromatogramas de TLC para o cálculo de R_f : (a) antes da eluição e (b) depois da eluição.



O valor do factor de retardamento depende da temperatura, do solvente e do tipo de fase móvel usada na experiência; O modo mais efectivo para identificar um composto é o desenvolvimento simultâneo, lado a lado, da amostra (composto desconhecido) e o

composto cujo comportamento em TLC seja conhecido (padrão). A posição relativa da amostra e do padrão (seja X) pode ser calculado pela equação (10):

$$R_x = \frac{\text{distância da origem ao centro da mancha do componente da amostra}}{\text{distância da origem ao centro da mancha do padrão}} \quad (10)$$

O cromatograma de uma TLC pode ser usada para avaliar a pureza dos componentes. Uma impureza na amostra, muitas vezes, é desenvolvida como duas ou mais manchas. Porém, mesmo quando a amostra se desenvolve como uma única mancha pode ser ou não pura, uma vez que os componentes podem não ser separáveis nas condições experimentais. Por isso, é recomendável o uso de outras técnicas complementares, como por exemplo a espectroscopia para a identificação dos compostos.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Nesta parte do presente relatório apresenta-se o procedimento seguido no trabalho de campo (colheita de amostras) e na realização de ensaios laboratoriais em conformidade com os objectivos preconizados na introdução face as condições técnicas e materiais disponíveis.

Assim, com base no estudo bibliográfico cujo resumo é apresentado no capítulo 2 foi realizado o trabalho prático, seguindo o esquema geral na figura 8:

Figura 8. Esquema geral do trabalho



3.1 Colheitas Das Amostras

As amostras de raízes, folhas e caule da *Bridelia cathartica* Bertol F., foram colhidas de plantas adultas na cidade de Maputo, autenticadas e depositadas no Herbário do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Eduardo Mondlane. Após um estudo prévio das características gerais e a sistemática da planta, o trabalho de campo foi executado em dois momentos diferentes.

Esta planta ocorre em abundância na cidade de Maputo, local onde foram colhidas na manhã do dia 21 de

Janeiro de 2000 as amostras de raízes, folhas e caule, no terreno junto às instalações do Jardim Botânico da Departamento de Ciências Biológicas da UEM. Uma nova colheita de folhas foi feita a 28 de Janeiro de 2000, pela manhã, no mesmo local.

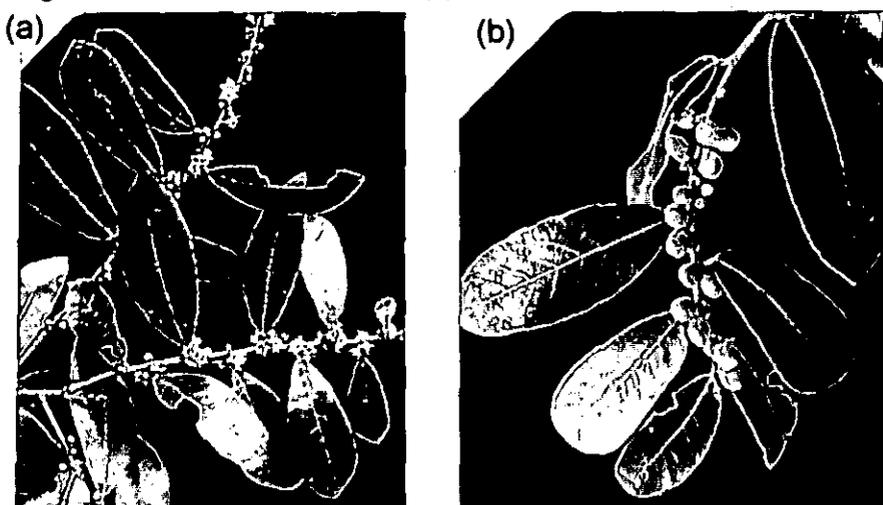
Das amostras das três partes da *B. cathartica* colhidas, foram apenas analisadas folhas. A figura 9 mostra as folhas da *B. cathartica*.

3.2 Tratamento Das Amostras de Plantas

3.2.1 Determinação Da Humidade

A determinação da humidade das folhas da planta em estudo foi realizada no Laboratório da Centro de Formação Profissional de Águas e Saneamento, de acordo com a técnica seguinte:

Figura 9. Folhas da *B. cathartica*: (a) com flores e (b) com frutos



Pesa-se um cadinho vazio depois de limpo, seco, calcinado e arrefecido a 105° C na estufa durante 30 minutos e arrefecido no excicador. Seja m_0 a sua massa. Em seguida pesa-se neste cadinho um grama de folhas frescas. Seja m_1 a sua massa. Coloca-se o cadinho com as folhas na estufa a 105° C até peso constante m_2 . A diferença de peso $\Delta m = m_1 - m_2$ dá o teor de água a partir da qual se calcula a percentagem de humidade, segundo a equação:

$$\% H = \frac{\Delta m}{m_1 - m_0} \cdot 100 \quad (11).$$

3.2.2 Secagem e Moagem Das Amostras

O material vegetal foi deixado secar a temperatura ambiente, à sombra, no laboratório arejado, durante cerca de 30 dias para as folhas e 2 meses para as raízes e o caule.

3.3 Extracção

Para a preparação de extracto das folhas da *B. cathartica* no presente trabalho foram seguidos dois procedimentos técnicos baseados na cromatografia de coluna de média pressão (MPLC). Um, em que o material vegetal seco e em pó é sujeito a extracção e fraccionamento directo na coluna, e outro, no qual o material vegetal é previamente macerado durante 72 horas, num solvente adequado.

3.3.1 Maceração

As folhas secas e em pó foram submetidas ao método de extracção por maceração em éter de petróleo, álcool metílico e, finalmente, em água.

60,0 gramas de folhas foram maceradas naqueles solventes num volume total de 1 litro durante 72 horas com agitação num Erlenmeyer de 500 mL. Depois da filtração, o filtrado foi concentrado no rotavapor até quase à secura, seguido de secagem a temperatura ambiente e pressão atmosférica. O resíduo obtido, após análise em TLC, foi submetido à extracção e fraccionamento em MPLC.

Ao resíduo da filtração foi adicionado uma nova porção de solvente, tendo-se o cuidado de deixá-lo secar previamente.

3.3.2 Extração e Fraccionamento em MPLC

A técnica consiste na extração e fraccionamento simultâneos em coluna cromatográfica de média pressão usado como fase estacionária a sílica-gel 60 F₂₅₄ e fase móvel soluções de clorofórmio, CHCl₃, em éter de petróleo.

Esta técnica tem as seguintes vantagens:

- i. execução-fácil e rápida;
- ii. extração e fraccionamento simultâneos;
- iii. economia de reagentes.

3.2.2.1 Preparação Dos Eluentes

Foram preparadas soluções de 5; 10; 20; 30; 40; 70 e 100% de clorofórmio em éter de petróleo que é o solvente menos polar.

Num balão aferido de 250 mL introduz-se um volume de clorofórmio, necessário para preparar uma solução de concentração desejada da mistura eluente, e perfaz-se o volume com éter de petróleo. Concretamente foram medidas com ajuda de uma proveta 10; 20; 40; 60; 80 e 140 mL de clorofórmio, obtendo-se assim 6 misturas de clorofórmio e éter de petróleo nas proporções de 10:190; 20:180; 40:160; 60:140; 80:120 e 140:60 respectivamente, correspondendo a 5; 10; 20; 30; 40 e 70%.

3.2.2.2 Enchimento e Montagem Da Coluna MPLC

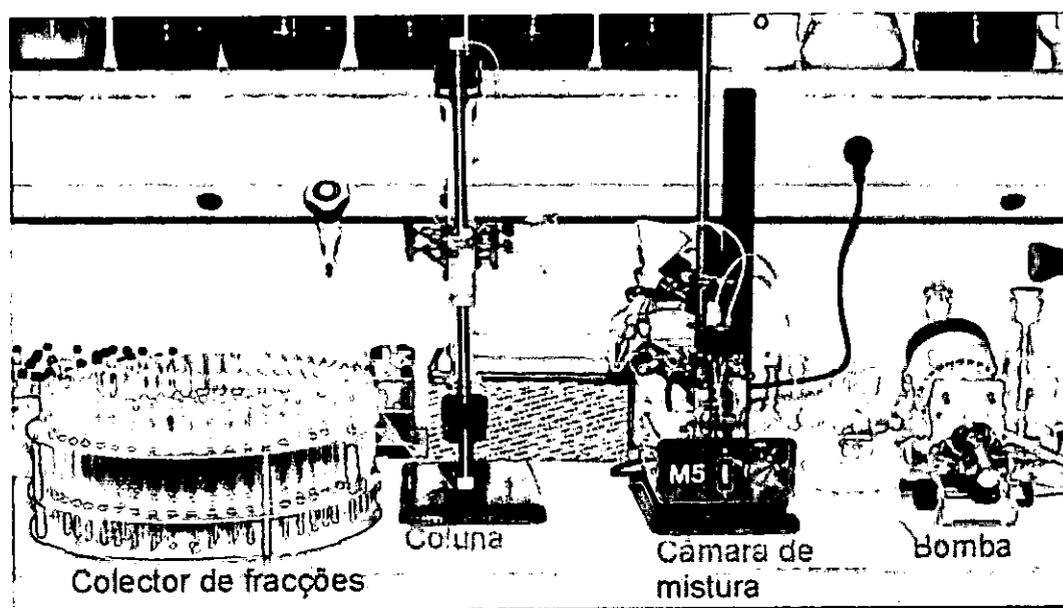
Para o enchimento da coluna foi usado o seguinte material:

- i. Uma coluna cromatográfica e os respectivos acessórios;
- ii. dois suportes com as respectivas garras;

- iii. um agitador magnético;
- iv. uma bomba de média pressão;
- v. dois funis;
- vi. tubos de ensaio com capacidade de 10 mL dispostos um a seguir ao outro num suporte circular (carrousel);

Fixa-se o pistão numa das extremidades da coluna cromatográfica e a seguir introduz-se o filtro. Monta-se a coluna no suporte com o pistão firmemente apoiado na base do suporte. Coloca-se, então, na extremidade superior aberta da coluna cromatográfica um funil de haste larga e introduz-se sílica-gel 60 até uma altura de 6 cm. Comprime-se muito bem, vibrando a coluna e com a ajuda de um ponteiro, de modo a obter-se uma distribuição uniforme e compacta da fase estacionária. Igual procedimento é seguido na introdução da amostra na coluna. Introduzida e compactada a amostra sobre a sílica-gel, coloca-se o outro filtro na extremidade superior e pressiona-se com o ponteiro até assentar na amostra. Em seguida, introduz-se cuidadosamente o pistão e fixa-se firmemente o pistão e a tampa. Monta-se a coluna para a eluição conforme o esquema da figura 10.

Figura 10. Fotografia de cromatografia de coluna de média pressão (MPLC)



Seguindo os procedimentos descritos, 7,00 gramas de folhas de *Bridelia cathartica* em pó foram introduzidos na coluna. De igual modo, os extractos obtidos da maceração de folhas de *B. Cathartica* previamente misturados e homogeneizados com sílica-gel 60 na proporção de 1:3 em massa respectivamente num almofariz, foram colocados na coluna cromatográfica.

3.2.2.3 Eluição

Deitam-se 20 mL de éter de petróleo, que é o solvente menos polar, no frasco de alimentação da bomba. Liga-se a bomba e, um pouco antes de se esgotar o eluente, adiciona-se uma nova porção até perfazer 200 mL. Esta operação é repetida com as misturas de eluentes do menos polar ao mais polar (100% de clorofórmio). No fim deita-se no frasco de alimentação da bomba 20 mL de metanol para a lavagem do sistema.

As fracções são recolhidas nos tubos de ensaio (colector de fracções).

3.4 Cromatografia em Camada Fina

As fracções de extractos de folhas de *B. cathartica* foram submetidas à cromatografia em camada fina (TLC), com o objectivo de monitorar os resultados da MPLC, por um lado, e, por outro, fraccioná-los.

Foram igualmente analisadas em TLC as fracções obtidas do fraccionamento directo das folhas da *B. cathartica* em MPLC, com o objectivo de estudar a eficiência dos solventes.

3.4.1 Material Usado

- i. placas comerciais de alumínio 20 × 20 cm com camada adsorvente de sílica-gel 60;
- ii. tina cromatográfica para o desenvolvimento das placas (figura 11):
- iii. tubos capilares;
- iv. compressor de ar;

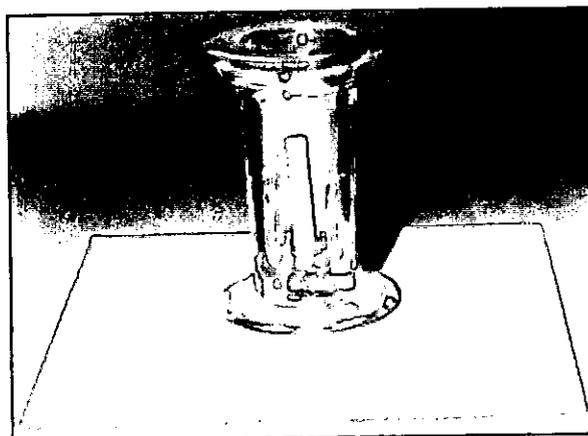
v. frasco de spray;

vi. canivete;

vii. régua;

viii. lápis.

Figura 11. Tina cromatográfica



3.4.3 Condições Cromatográficas

3.4.3.1 Fase Estacionária

Sílica-gel 60 F₂₅₄ sobre placas comerciais de alumínio (MERCK).

3.4.3.2 Fase Móvel

Ciclohexano : clorofórmio, em gradiente de polaridade.

3.4.3.3 Aplicação Da Amostra

As amostras obtidas quer das fracções de MPLC quer as preparadas dissolvendo o extracto bruto das folhas da *B. cathartica* em ciclohexano foram aplicadas nas placas de TLC, usando capilares de 2 μ L, duas vezes, na linha de origem a 5 mm da extremidade inferior, mantendo uma separação mínima de 5 mm entre os pontos de aplicação.

3.4.3.4 Desenvolvimento Das Placas

A eluição foi feita no sentido ascendente em tinas de tamanho adequado, saturadas previamente, durante cerca de 30 minutos, com o eluente a usar em cada caso.

3.4.3.5 Sistema de Detecção e Documentação

Para a revelação das placas desenvolvidas foi usada uma mistura de 3 gramas de vanilina dissolvidas em 1 mL de ácido sulfúrico concentrado e álcool etílico, até perfazer um volume de 100 mL (mistura reveladora) [13].

As placas desenvolvidas, depois de deixadas secar a temperatura ambiente durante algum tempo, aplicou-se a mistura reveladora com a ajuda do frasco de spray. A activação foi feita por aquecimento sobre uma placa de fogão eléctrico, coberto com papel de alumínio.

Para a documentação foram feitas fotocópias e fotografias dos cromatogramas.

4. RESULTADOS

4.1 Humidade

Na tabela seguinte são indicados os resultados da determinação da humidade a partir de folhas frescas de *B. cathartica*:

Ensaio	Humidade na Folha <i>Bridelia cathartica</i> (%)
1	76,1
2	75,8
3	76,0
Média	76,0

Tabela 2. Percentagem de humidade da *B. cathartica*

4.2 Resultados Da Extração por Maceração

Os extractos da folha de *B. cathartica* em éter de petróleo apresentam cristais de cor verde amarelado no fundo do balão, após a concentração no rotavapor.

Após a evaporação do éter de petróleo sobrenadante ficou no fundo do balão um resíduo de cor castanho amarelado, que, posteriormente foi submetido a MPLC.

Foram macerados em álcool metílico e depois em água os resíduos da filtração da extração com éter de petróleo, tendo se obtido extractos de cor castanha escura.

4.3 Resultados Da Extração e Fraccionamento em MPLC

Do fraccionamento e extração directa das folhas de *B. cathartica* (MPLC-1) foram obtidas 72 fracções mais ou menos distintas na cor que varia de incolor, passando por verde, amarelo, a castanho. Nalgumas fracções formaram-se precipitados amorfos de cor acastanhada.

As primeiras 36 fracções foram posteriormente submetida a análise por TLC.

Os extractos em éter de petróleo foram fraccionados em MPLC, três colunas (MPLC-2; MPLC-3 e MPLC-4), rigorosamente nas mesmas condições. Foram recolhidas 67 fracções. Em geral, as fracções recolhidas em cada uma das colunas apresentavam as mesmas características nomeadamente uma coloração de incolor a amarelo. Praticamente todas as fracções continham cristais de cor variável: brancos as primeiras fracções (baixa polaridade do sistema eluente), amarelos as de fracções obtidas com a mistura eluente de polaridade média; A cor amarela dos cristais torna-se escura com o aumento da polaridade do eluente.

Algumas destas fracções foram analisadas em TLC e, posteriormente, misturadas sempre que apresentassem o mesmo comportamento.

4.4 Resultados Da Cromatografia em Camada Fina

4.4.1 Fracções de MPLC-1

As primeiras 36 fracções foram analisadas em TLC, tendo se obtido os resultados a seguir indicados, ilustrados com cromatogramas seleccionados em anexo.

4.4.1.2 TLC-1

Fase móvel: clorofórmio em ciclohexano a 10%.

Fase estacionária: Sílica-gel 60 F₂₅₄ em placas de alumínio.

Revelação: valinila + ácido sulfúrico + álcool etílico.

Os cromatogramas das fracções 1 a 7 não apresentam nenhuma mancha.

A oitava fracção apresenta uma mancha única.

Das fracções 9 a 16 foram reveladas cromatogramas com duas manchas pouco nítidas, mas distintas uma da outra, com as mesmas características e, por isso,

foram misturadas e submetidas a nova MPLC em coluna pequena. As fracções obtidas foram guardadas para análise posterior em TLC.

4.4.1.3 TLC-2

Fase móvel: clorofórmio em ciclohexano a 20%.

Fase estacionária: Sílica-gel 60 F₂₅₄ em placas de alumínio.

Revelação: vanilina + ácido sulfúrico + álcool etílico

Os cromatogramas das fracções 1 a 7 não apresentam nenhuma mancha, tal como os da série TLC-1. A oitava fracção nestas condições tem uma única mancha ($R_f = 0,4$) o que sugere poder tratar-se de um componente isolado.

Os cromatogramas das fracções de 23 a 36, nestas condições cromatográficas, mostram existirem componentes pois, apresentam uma mancha densa que, no entanto, praticamente não sai do ponto de aplicação das amostras. Por isso, foram eluidas a polaridade mais alta (40%). Os resultados obtidos foram designados por TLC-3.

A tabela seguinte mostra os valores de R_f calculados nas condições cromatográficas de TLC-2, resultante do fraccionamento de extractos brutos obtidos da maceração:

Fracção	R_f	
	10% de CHCl ₃ em ciclohexano	20% de CHCl ₃ em ciclohexano
9 a 16	0,1 0,2	0,3 0,5
17 e 18	0,1 0,3	0,3
19 a 22	0,1 0,3	0,1 0,2

Tabela 3. Valores de R_f para polaridade da fase móvel a 10%

4.4.1.3 TLC-3

Fase móvel: clorofórmio em ciclohexano a 40%.

Fase estacionária: Sílica-gel 60 F₂₅₄ em placas de alumínio.

Revelação: valinila + ácido sulfúrico + álcool etílico.

A fracção 23, cromatograma TCL-3A, mostra 4 manchas isoladas. Três manchas isoladas foram reveladas com a fracção 24 (TLC-3B). Os resultados constam da tabela 4.

Fracção	R _f			
	40% de CHCl ₃ em ciclohexano			
23	0,2	0,4	0,6	0,8
24	0,2	0,4	0,6	
19 a 22	0,1	0,3		

Tabela 4. Valores de R_f para polaridade da fase móvel 40%

Os cromatogramas das fracções seguintes, 26 a 30, apresentam três manchas muito densas, enquanto que de 31 a 36 apresentam duas manchas igualmente densas.

4.4.2 Fracções de MPLC-2

As primeiras fracções obtidas da coluna usando extracto bruto das folhas de *B. cathartica* macerada em éter de petróleo foram também submetidas a análise em TLC, nas mesmas condições usadas anteriormente, variando onde fosse recomendado a polaridade do sistema eluente clorofórmio em ciclohexano.

4.4.2.1 TLC-4

Esta série refere-se a cromatogramas de referência obtidos, dissolvendo completamente uma pequena porção do extracto bruto em ciclohexano e desenvolvendo as placas a 10; 20; 30 e 40% por forma a seleccionar a polaridade adequada. Os cromatogramas foram respectivamente designados por 8A; 8B; 8C e 8D.

- a) O cromatograma **8A** revelou uma mancha densa esverdeada que praticamente não sai da linha de origem;
- b) **8B**: três manchas distintas, a mais densa e escura praticamente não sai da linha de origem; a intermediária apresenta uma cor azul e a de maior R_f uma cor verde escura;
- c) **8C** e **8D** são idênticas a **8B** e entre si diferindo ligeiramente na distância que as três manchas percorrem na fase estacionária.

A tabela 5 resume os resultados obtidos, donde se verifica que para matrizes de amostras muito complexa o aumento da polaridade não produziu nas manchas detectadas:

	Percentagem de CHCl_3 em ciclohexano								
	20			30			40		
R_f	0,06	0,1	0,2	0,06	0,1	0,2	0,06	0,1	0,2

Tabela 5. R_f com a polaridade da fase móvel 20, 30 e 40%

4.4.2.2 TLC-5

Fase móvel: clorofórmio em ciclohexano a 10%.

Foram misturadas as fracções 1 e 2 (M_1); 3, 4 e 5 (M_2) e, por fim, 6 e 7 (M_3) por apresentarem características semelhantes na análise em TLC conforme se vê pelos valores de R_f na tabela que se segue:

R_f	Fracções		
0,6	1	2	
0,4	3	4	5
0,2	6	7	

Tabela 6. Valores de R_f calculados a partir dos cromatogramas TLC-5

Os cromatogramas das fracções 8, 9, 10 e 11 apresentam manchas densas e longas de cor violeta muito vivo.

4.4.2.3 TLC-6

Fase móvel a 20% de clorofórmio em ciclohexano.

Nestas condições foram analisadas as fracções 11 a 16 tendo sido revelada uma mancha de cor violeta muito viva e muito densa, o que indica tratar-se de uma mistura complexa de componentes. Por isso foram misturadas e fraccionadas posteriormente em MPLC. A análise em TLC com fase móvel a 40% de clorofórmio em ciclohexano das fracções 15 a 18 revelou duas manchas violeta a de menor R_f (0,5) e azul esverdeada a de maior R_f (0,6). Estas fracções também foram misturadas para posterior fraccionamento em MPLC. As fracções 19 e 20 deram cromatogramas com uma longa mancha azul esverdeada e outra de cor violeta vivo.



5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1 Extracção e Fraccionamento

Os resultados obtidos da extracção e fraccionamento directo e simultâneo em MPLC das amostras das folhas mostrou-se menos eficaz, comparativamente a maceração prévia das folhas seguida do fraccionamento em MPLC, devido provavelmente ao número relativamente elevado de compostos.

Assim, as fracções obtidas a partir do primeiro procedimento continham poucos cristais enquanto que as outras, obtidas de amostras previamente maceradas, continham cristais relativamente abundantes e de forma mais definida, sugerindo que alguns pudessem estar no estado de pureza considerável.

5.2 Cromatografia em Camada Fina

A maior parte das fracções analisadas revelam conter componentes cujo estudo seria de interesse aprofundar-se.

Algumas fracções, no entanto, revelaram manchas nítidas, isoladas e, algumas, com cor bem nítida. Embora a técnica em si não tenha permitido identificar os componentes ela revela ser um recurso importante nomeadamente na monitorio da MPLC e, contra padrão forneceria provavelmente indicações fiáveis quanto a natureza dos componentes, cuja identificação poderia ser comprovada usando outras técnicas de análise tais como a espectroscopia.

A polaridade dos sistemas de eluentes é outro factor que tem influência na análise e nos resultados obtidos. Conforme ilustram os valores de R_f calculados a partir dos cromatogramas da análise em TLC tabela 5.

6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

A bibliografia consultada na fase inicial do presente trabalho reporta a importância dos métodos cromatográficos e a sua ampla aplicação na extracção, isolamento e análise de amostras de plantas. Vários autores discutem a eficiência dos métodos do ponto de vista de consumo de solventes na extracção e da simplificação dos extractos obtidos.

Os resultados obtidos nos ensaios laboratoriais mostram que a maceração prévia das amostras concorre para um melhor fraccionamento e extracção, usando a técnica de MPLC. Por outro lado, o consumo de solventes é menor.

As dimensões da coluna cromatográfica são um factor importante no fraccionamento e extracção, em MPLC.

A análise por TLC permitiu avaliar a ocorrência de compostos que eventualmente, com mais extracções e fraccionamento, seria possível obter componentes, cujo grau de pureza permitissem identificá-los, comparando com padrões ou, então, recorrendo a outros métodos de identificação. A técnica de TLC foi também usada para escolher o gradiente de polaridade mais adequado para a extracção e fraccionamento em MPLC.

Globalmente o trabalho permitiu concluir que seria possível desenvolver-se no Departamento de Química estudos na área de análise de plantas, em particular as medicinais usadas por praticantes de medicina tradicional. No entanto, as condições técnicas para a identificação, determinação da estrutura química e da actividade biológica deveriam ser melhoradas.

7. BIBLIOGRAFIA

- [1]. Addae-Mensah, I. (1988). The Impact and Implication of Traditional Africa Medicine on Health Care Delivery. 1 – 7 pp. Legon, Chemistry Departament.
- [2]. Dopke, W. (1983). Significado dos Compostos Naturais na Produção de Medicamentos. In "Ciclo de Palestras sobre Compostos Naturais e sua Importância na Produção de Medicamentos", 12, 1983, Maputo, Universidade Eduardo Mondlane.
- [3]. Eaton, D. C. (1989). Laboratory Investigations in Organic Chemistry, 929 pp. New York, McGraw-Hill Book Company.
- [4]. Ettre, L. S. e Zlatkis, A. (1967). The Practice of Gas Chromatography, 591 pp. New York, Interscience Publishers.
- [5]. Gelfand, M., S. Mavi, Drummond, R. B. & Ndemera, B. (1985). The Tradicional medical Pactitioner: His Principles of Practice and Pharmacognosy. 441 pp. Harare, Mambo Press.
- [6]. Harborne, J. B (1991). Phytochemical Methods: A Guide To Modern Techniques of Plant Analysis, 2nd edition. London, Chapman and Hall.
- [7]. Jansen, P. C. M. e Mendes, O. (1984). Plantas Medicinais – Seu uso tradicional em Moçambique, Tomo 1 – 4. Maputo, INLD.
- [8]. Jirón, Z. (1995). Approaching Optimal Condições for Running Liquid Adsorption Column Chromatography Using Simple Computational Models. Tese de Mestrado. 67 pp. Stockholm, Department of Chemistry, Organic Chemistry, Royal Institute of Technology.
- [9]. Jurg, A., Tomás, T. e Pividal, J. (1991). Antimalarial activity of some Plant Remedies in use in Marracuene, Southern Mozambique. Journal of Ethnopharmacology, 33 (1-2) : 79 - 83.

- [10]. Ohlweiler, O. A. (1982). Química Analítica Quantitativa, Volume I, 3ª edição. 229 pp. Rio de Janeiro, LivrosTécnicos e Científicos editora, Ltda.
- [11]. Palgrave, K. C. (1983). Trees of Southern Africa. 2nd edition. 959 pp, Cape Town, Struik Publishers (PTY) Ltd.
- [12]. Scholer, H. J., Leimaer, R. and Richle, R. (1984). Sulphonamids and sulphonas in: Peters, W. and Richards (editores) (Anitmalarial Drugs) Volume 68/II. 206 pp. Berlin, Springer-Verlag.
- [13]. Touchstone, J. C. e M. Dobbins, F. (1983). Practice of Thin Layer Chromatography, 2nd edition, 405 pp. New York, John Willey and Sons, Inc.
- [14]. Wyk., P. V. e Wyk, B. V. (1997). Field Guide Trees of Southern Africa. 1st edition. 536 pp. Cape Town, Struik Publishers (PTY) Ltd.

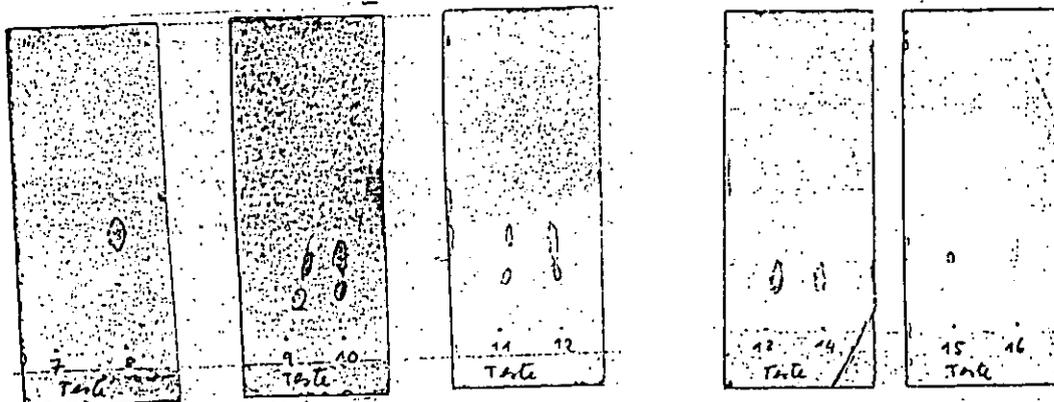
ANEXO: Cromatogramas

Apresentam-se a seguir as fotocópias dos cromatogramas citados ao longo do relatório.

As condições cromatográficas são:

- fase estacionária: sílica-gel 60 F₂₅₄ em placas de alumínio;
- fase móvel: clorofórmio em ciclohexano de polaridade indicada nos cromatogramas;
- sistema revelador: vanilina + ácido sulfúrico concentrado + álcool etílico.

TLC-1: Fase móvel a 10%



TLC-2: Fase móvel a 20%

