

Agradecimentos

*Agradeço em primeiro lugar à Deus pelo dom da vida;
Aos meus pais pela boa educação desde a minha infância
Aos meus irmãos e a todos os que me são caros*

Um agradecimento particular à minha irmã ângela, pelo encorajamento que ela sempre deu

Ao meu esposo Joaquim Gamboa pelo tudo de bom que ele fez e continua fazendo por mim; um muito obrigada do fundo do coração.

Ao meu supervisor, Doutor François Munyemana pelo tempo despendido a procura de condições para que este trabalho tivesse um nível científico aceitável.

Ao Dr. Felisberto Pagula pela disponibilidade por ele prestada

A sr. Amélia Furvela, pela ajuda prestada durante a realização do trabalho experimental.

Os meus agradecimentos são extensivos ao meu tio, o Doutor Adelino Pimpão e a Sra. Marielle Rowan pelo apoio prestado durante todo o tempo.

Aos Senhores: Júlio Dungo do Departamento de Ciências Biológicas da UEM e Mário Júlio do Instituto Nacional de Investigação Agronómica (INIA), pela ajuda prestada.

Este agradecimento é extensivo a todos os docentes do Departamento de Química que deram o seu contributo para a minha formação.

As minhas colegas e amigas que partilharam comigo os bons e maus momentos, nomeadamente: Telma, Goreth, Irene, Noorjehan e Anatércia.

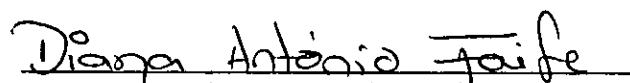
As senhoras Deolinda e Vitória pelo contributo por elas dado.

Por último, gostaria de agradecer a todos que não foram aqui mencionados, que directa ou indirectamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Declaração de Honra

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

O autor


Diana Antonio Faife

Maputo, Novembro de 2003

Abreviaturas

- PMT- Praticantes de Medicina Tradicional
OMS- Organização Mundial de saúde
OUA- Organização da União Africana
AcOEt- Acetato de etilo
DCM- Diclorometano
MeOH- Metanol
EB- extracto bruto
EP- Éter de petróleo
CGS- Cromatografia Gás Sólido
CGL- Cromatografia Gás Líquido
CLS- Cromatografia Líquido Sólido
CLL- Cromatografia Líquido Líquido
CP- Cromatografia em Papel
TLC- Cromatografia em Camada Fina
MPLC- Cromatografia Líquida de Média Pressão
RF- Factor de retardamento
P. Falciparum- Plasmodium falciparum
T. Cruzi- Tripanossoma cruzi
E. Hystolítica- Entamoeba Hystolítica
T. Brucei- Tripanossoma Brucei

RESUMO

As plantas do género *Asparagus* da família das Liliaceae são utilizadas em diferentes farmacopeias como antiprotozoários.

Em Moçambique são utilizadas pelos praticantes da medicina tradicional sobretudo para o tratamento de parasitoses intestinais, tuberculose, pneumonia, malária, Reumatismo, etc.

No presente trabalho iniciou-se o estudo fitoquímico da planta: *Asparagus Plumosus Baker* e realizou-se a comparação da composição fitoquímica dos extractos brutos das raízes e folhas da *Asparagus Plumosus Baker* e *Asparagus Africanus*. A *Asparagus Plumosus Baker* é originária da África do sul; em Moçambique ela é mais usada para fins de ornamentação.

Neste trabalho foram usados dois métodos de extracção: extracção por maceração e extracção com soxhlet usando os solventes: Éter de petróleo, Diclorometano, Acetato de etilo e Metanol.

As fracções de Diclorometano e Acetato de etilo foram escolhidas para o fraccionamento usando Cromatografia Líquida de Média Pressão (MPLC). As diferentes fracções foram analisadas por Cromatografia em Camada Fina.

Estudos realizados sobre plantas do género *Asparagus* foram focalizados sobre as raízes, é neste contexto que no presente trabalho foi realizado o estudo comparativo dos extractos das raízes e das folhas das plantas *Asparagus Plumosus Baker* e *Asparagus Africanus*.

A comparação das fracções de *Asparagus Plumosus Baker* e de *Asparagus Africanus* revelam que as fracções de *Asparagus Plumosus Baker* são mais complexas.

ÍNDICE

1. Introdução	1
2. Objectivo do trabalho	5
3. Metodologia	5
4. Actividade antiprotozoária	5
4.1. Protozoários	5
4.2. Alguns agentes antiprotozoários provenientes de plantas superiores, seus derivados sintéticos e semisintéticos	9
4.2.1. Alcalóides com actividade antiprotozoária	9
4.2.2. Terpenos com actividade antiprotozoária	11
4.2.3. Exemplo de Quinonas, produtos fenólicos e outros produtos secundários com actividade antiprotozoária	13
4.2.4. Actividade antiprotozoária das plantas do género <i>Asparagus</i>	14
5. Caracterização e descrição da planta em estudo	15
6. Técnicas e métodos de análise de plantas	16
6.1. Extração	17

6.1.1. Métodos de Extração	17
6.1.1.1. Maceração	18
6.1.1.2. Infusão	18
6.1.1.3. Decocção	18
6.1.1.4. Soxhlet	18
6.2. Métodos de análise usados	19
6.2.1. Métodos Cromatográficos	19
6.2.2. Classificação da cromatografia	20
6.2.2.1. Cromatografia em camada fina (TLC)	21
6.2.2.2. Cromatografia Líquida de Média Pressão (MPLC)	28
7. Parte experimental	30
7.1. Colheita, Secagem e Moagem das Amostras	32
7.1.1. Extração e fraccionamento	32
7.1.1.1. Ensaio preliminar	34
7.1.1.2. Extração e fraccionamento das raízes da <i>Asparagus plumosus Baker</i>	37
7.1.1.3. Extração com soxhlet da <i>Asparagus plumosus Baker</i> e <i>Asparagus africanus</i>	40
8. Discussão dos resultados	42
9. Conclusões e recomendações	44

9.1. Conclusões	44
9.2. Recomendações	45

10. Bibliografia	46
-------------------------	----

ANEXOS

Cromatogramas	49
---------------	----

1. INTRODUÇÃO

Neste princípio de século, o aproveitamento dos recursos naturais assumiu um valor estratégico.

Os seres vivos, em particular as plantas superiores, constituem uma riquíssima fonte para produção de novos e mais eficazes medicamentos. Um dos auxiliares mais importantes nesta busca são os conhecimentos tradicionais sobre efeitos curativos das plantas. Tanto este conhecimento como as espécies que integram o laboratório vivente da natureza devem ser explorados racionalmente para evitar a seu desaparecimento.[1]

Desde os primórdios, a prática da medicina tradicional está intrinsecamente ligada à vida das comunidades que habitaram o território Moçambicano. Esta prática baseia-se no tipo de organização social e económica que caracterizava estas comunidades, pois inúmeros eram os desafios que lhe impunham como as doenças, as secas, as epidemias, os ciclones e entre outros fenómenos naturais.

Deste modo, para fazer face a estas diversidades, os membros desta comunidade tiveram que adoptar formas de defesa e salvaguarda das suas famílias, pelo que as crenças, os ritos mágico-religiosos e outro tipo de práticas foram alguns dos meios por eles utilizados como formas de relacionamento com o mundo material. Paralelamente, o saber curativo, através da utilização de plantas e de produtos de origem animal e mineral constitui uma das práticas sagradas que foi passando de geração em geração.

Por outro lado, devido a rede de cobertura do serviço Nacional de Saúde estima-se que 60% da população no país utiliza os serviços fornecidos pela medicina tradicional para os cuidados de saúde. Apesar desta carga assistencial e do reconhecimento implícito da sua importância, a medicina tradicional não é um sistema oficialmente estabelecido.

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 satisfação total ou parcial das suas necessidades em cuidados de Saúde [2].

Na conferência de Alma-Ata (1978), a Organização Mundial da Saúde (OMS) dada a importância da medicina tradicional, exortou os governos a dar máxima importância ao uso desta e integrar aspectos de comprovada eficácia, promovendo sistemas tradicionais, cultivo e conservação de plantas medicinais disponibilizando assim uma fonte de cuidados de saúde, universalmente aceite e acessível as comunidades.

As plantas constituem um verdadeiro tesouro verde; elas carregam complexos coquetéis, os chamados princípios activos preparados pela engenharia química da natureza em milhões de anos de eventos e testes evolutivos; cuja natureza química exacta ainda não é conhecida.

O controle e conhecimento desses remédios são hoje motivo de muita cobiça do curandeiro que comercializa folhas na praça, assim como para o químico no seu grande laboratório.

As plantas chamadas medicinais são assim denominadas, quando à partir delas podem ser feitos ou extraídos produtos que tenham capacidade de curar, aliviar dores, ou problemas de saúde ou que de alguma forma possam ajudar o organismo humano ou animal.

X Após uma série de transformações tecnológicas que faz da planta medicinal uma droga vegetal, esta contém um certo número de substâncias que na maior parte dos casos, agem sobre o organismo humano. É a fitoquímica, que se encarrega de estudar estas substâncias activas, a sua estrutura, a sua distribuição na planta, as suas modificações e os processos de transformação que se produzem no decurso da vida da planta, durante a preparação do remédio vegetal e no período de armazenagem. A fitoquímica está em estreita ligação com a farmacologia (estudos dos efeitos das substâncias medicinais sobre o organismo humano, do mecanismo e da velocidade da sua acção, do processo de absorção e eliminação, das suas indicações, isto é, do uso contra determinadas doenças). A farmacologia por seu lado, é indissociável da medicina.[3]

Anatureza química da droga é determinada pelo seu teor em substâncias pertencentes aos seguintes grupos principais: alcalóides, glucosídeos, saponinas, princípios amargos, taninos, substâncias aromáticas, óleos essenciais e terpenos, óleos gordos, glucoquininas, mucilagens vegetais, hormonas, anti-sépticos vegetais, etc. [3]

Geralmente, estas substâncias não se encontram na planta em estado puro, mas sob a forma de complexos, cujos diferentes componentes se completam e reforçam na sua acção sobre o organismo. [3]

A flora Moçambicana é rica em recursos de origem vegetal, recursos estes que podem ser aproveitados para a investigação sobre plantas medicinais.

A população Moçambicana no geral, e principalmente a residente na zona rural basea-se nas plantas medicinais para o tratamento de certas doenças ou mesmo para a sua prevenção pois já provaram ou tentaram provar a sua eficácia.

Neste sentido torna-se pretinente a sociedade Moçambicana o estudo das plantas medicinais para o tratamento de doenças, pois ainda não foram feitos muitos estudos sobre plantas medicinais em moçambique.

Nestes últimos anos, um interesse particular sobre plantas medicinais e medicina tradicional manifestou-se nos países Africanos sob recomendação e apoio da OMS e OUA. É assim que estudos etnobotânicos foram realizados na maioria dos países Africanos. Em Moçambique um estudo semelhante foi realizado em algumas províncias. É neste âmbito que no presente trabalho se propõe realizar o estudo fitoquímico duma planta medicinal com actividade antiprotozoária: *Asparagus Plumosus Baker* (família das Liliaceae).

2. OBJECTIVOS DO TRABALHO

- Estudar a composição fitoquímica das raízes da planta *Asparagus Plumosus Baker*
- Comparar a composição fitoquímica dos extractos das raízes e folhas de *Asparagus Plumosus Baker* e *Asparagus Africanus*

3. METODOLOGIA

O presente trabalho teve a seguinte sequência:

Pesquisa bibliográfica,

Recolha das amostras no campo,

Trabalho experimental que obedeceu a seguinte sequência:

- Preparação das amostras (secagem e moagem),
- Extracção e fraccionamento,
- Análise e discussão dos resultados

Elaboração do relatório final

4. ACTIVIDADE ANTIPROTOZOÁRIA

4.1. Protozoários

O sub-reino protozoa é constituído por cerca de 65.000 espécies conhecidas, das quais 50% são fósseis e o restante ainda vive hoje;

destes, aproximadamente 25.000 são de vida livre, 10.000 espécies são parasitas dos mais variados animais e apenas cerca de 30 espécies atingem o homem. [4]

Os protozoários parasitas são responsáveis por um grande número de doenças tropicais incluindo amebíase, leishmaníase, malária e tripanossomíase.

Leishmaníase e malária são responsáveis por uma grande morbidade e mortalidade.

O protozoário do género Leishmaníase causa uma complexidade de doenças que se estendem das lesões cutâneas que produz erupções pequenas ou grandes na pele dos pés, pernas, mãos ou rosto, e geralmente sara sozinha em alguns meses, a outra é mucocutânea, também chamada espúndia; pode afectar as membranas mucosas da boca e do nariz destruindo lábios, garganta, palato e laringe e produzindo deformações horríveis. A terceira é visceral, também chamada calazar, invade o fígado, baço, medula óssea; os sintomas aparecem dois meses ou mais depois da infecção e incluem febre, redução na taxa de glóbulos brancos, perda de peso e inchaço do fígado e do baço.

A malária é um dos grandes problemas de saúde pública, endémica em algumas partes de África, Ásia e América Latina. Só em África, esta doença é responsável pela morte de mais de um milhão de crianças por dia.[5]

A resistência do parasita da malária *Plasmodium falciparum* às drogas antimaláricos comumente usados e a resistência do vector anófele mosquito aos insecticidas explicam a persistência da malária. Todos estes factores levam os cientistas a continuarem com as investigações de novos

produtos antimaláricos sintéticos ou naturais. Daí a continuação das investigações de novos produtos antimaláricos sintéticos ou naturais.

Para o tratamento da tripanossomíase e disenteria amibiana, não existe ainda uma droga adequada disponível, daí a necessidade de continuar as investigações a procura de novas drogas.

O nifurtimox e benzimidazole usados nos casos agudos de doenças causadas pelo tripanossoma cruzi (América Latina) são pouco tolerados. A suramina ou melarsopol arsenical usados no tratamento de tripanossomíase africano (doença de sono) causada pela mosca tsé-tsé, causam sérias reacções secundárias nos pacientes.

Para o tratamento da disenteria amibiana usa-se frequentemente metronidazole mas não é tolerado por muitos pacientes.

Tabela 1. Algumas doenças causadas por protozoários, seus sintomas e modo de transmissão[6]

Doença	Sintomas	Transmissão
Amebíase	Úlceras intestinais, diarreia, colite, enfraquecimento	Ingestão de água ou alimentos contaminados com cistos eliminados com

		fezes humanas
Doença de sono	Lesões meningo-encefálicas, ingurgitamento de gânglios cervicais	Picada da mosca tsé-tsé (<i>Glossina</i>)
Doença de chagas	Miocardite, lesões da musculatura do tubo digestivo (esôfago)	Fezes do insecto percevejo <i>Triatoma</i> (barbeiro), através de lesões da pele
Leishmaniose tegumentar	Ulcerações no rosto (nariz, boca, faringe), braços e pernas. Necrose de tecidos conjutivos	Picada do mosquito-palha ou birigui (<i>Lutzomya</i> ou <i>Phlebotomus</i>)
Tricomoniase(DTS)	Prurido, vaginite, uretrite, corrimento	Relação sexual; água, toalha e objectos húmidos contaminados
Giardiase	Colite, com dores intestinais, diarreia	Ingestão de água ou alimentos contaminados com cistos, eliminados com fezes humanas
Balantidiase	Diarreia, febre, anorexia, cólicas abdominais, cefaléia, fraqueza	Ingestão de água ou alimentos contaminados com cistos, eliminados com fezes humanas

Malária	Febres, anemia, lesões no baço, figado e medula óssea	Picada da fêmea do mosquito-prego (Anófeles)
Toxoplasmose(congénita ou adquirida)	Alterações no volume craniano; calcificações cerebrais; corioretinite, retardamento mental	Água contaminada com cistos eliminados com fezes do gato. Ingestão de carne crua (porco, boi) com cistos

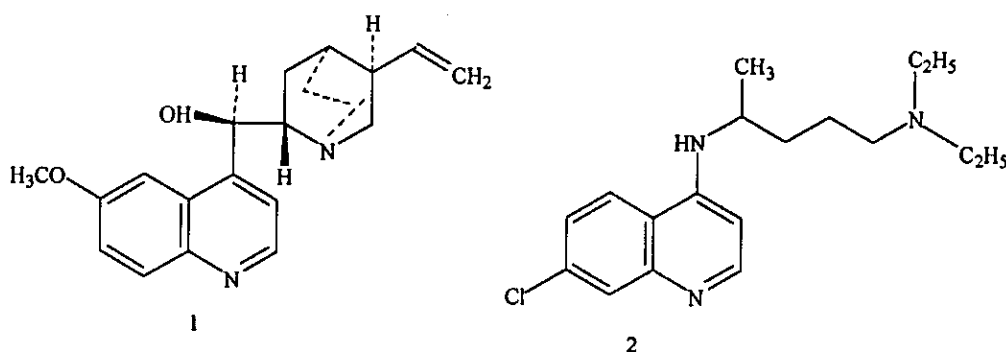
4.2. ALGUNS AGENTES ANTIPROTOZOÁRIOS PROVENIENTES DE PLANTAS SUPERIORES, SEUS DERIVADOS SINTÉTICOS E SEMISINTÉTICOS

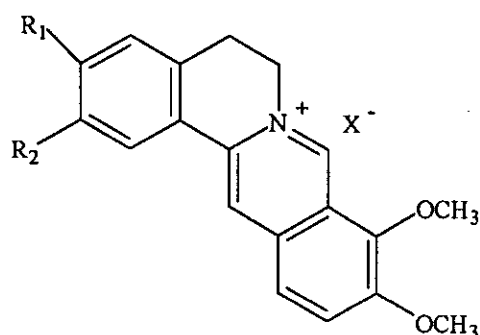
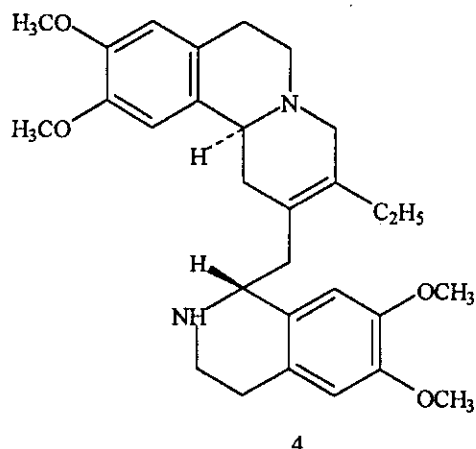
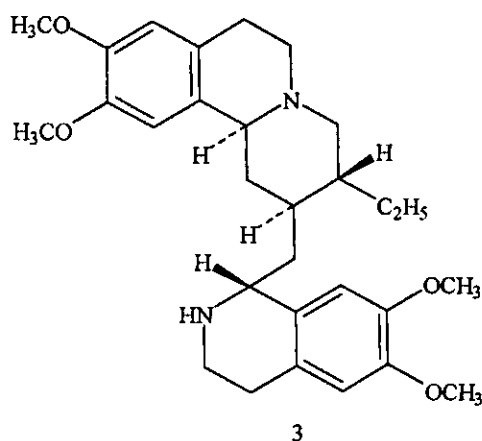
As plantas superiores tem produzido três maiores classes de drogas antiprotozoárias as quais são usadas na clínica actual: Alcalóides, terpenos, quinonas e produtos fenólicos.

4.2.1. Exemplos de Alcalóides com actividade antiprotozoária

Uma das drogas antimaláricas efectivas, é a quinina (1) a qual foi isolada a partir de cascas de várias espécies sul-americanas de cinchona. O conhecimento da estrutura química da quinina conduziu ao desenvolvimento das drogas antimaláricas sintéticas usando a molécula de quinina como modelo. Assim em 1920 várias drogas de

8-aminoquinolina, como a plasmoquina e mepacrina foram introduzidos na terrapia e mais tarde um número de 4-aminoquinolinas foram desenvolvidos incluindo a cloroquina (2) e amodiaquina. O alcalóide isoquinolínico, emetina (3), tem sido usado há muitos anos como uma droga amibica. A emetina é altamente irritante a quando é dada em injeição pode causar a morte de células no local injectado. Dehidroemetina (4) pode ser usado no lugar da emetina porque é rapidamente excretada. A berberina (5), que é usada na medicina tradicional para o tratamento de malária, amebíase e leishmaníase, ocorre em algumas famílias de plantas (ex: Annonaceae, Berberidaceae, Menispermaceae). Palmatina (6), jatrorrhizina (7), e columbamina (8) foram avaliados como sendo eficazes contra *p. Falciparum*. [7]





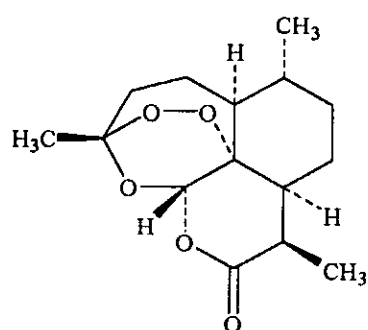
	R1	R2
5	-O-CH ₂ -O-	
6	H ₃ CO	H ₃ CO
7	HO	H ₃ CO
8	H ₃ CO	HO

4.2.2. Exemplos de terpenos com actividade antiprotozoária

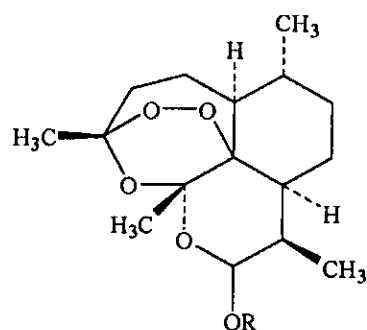
Um interesse nas plantas como fonte potencial de novas drogas antimaláricas tem sido estimulado pelo isolamento e uso clínico do endoperóxido sesquiterpeno artemisinina(9), isolado da planta *Artemisia Annua*(Asteraceae). As lactonas sesquiterpénicas são constituintes comuns de algumas espécies de plantas mas a particularidade da artemisinina reside na presença da parte endoperóxido na sua molécula. A redução do grupo C=O da lactona na artemisinina e a preparação do éter (exemplo: Artemer, (10) e éster (exemplo: Artesunato de sódio, 11)

têm resultado em drogas com um melhor valor fármaco-cinético. Análogos sintéticos foram preparados usando este como referência.

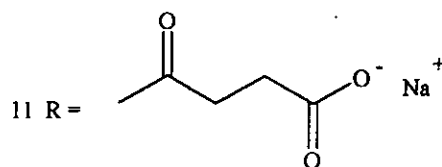
A série dos terpenos, yingzhaosu (12 à 15) foram isolados a partir duma erva medicinal chinesa *Artabotrys uncioatus* (Annonaceae). [7]



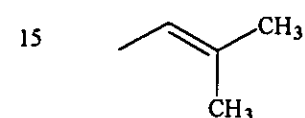
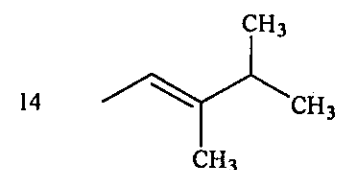
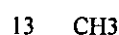
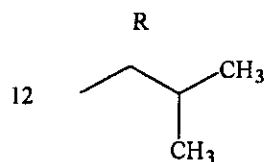
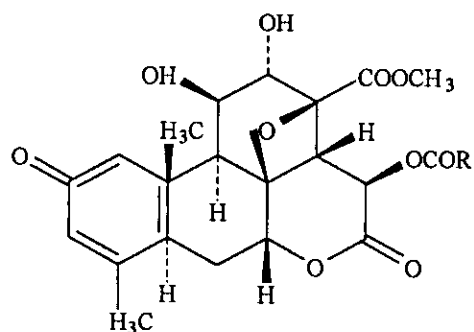
9



10 R = CH₃

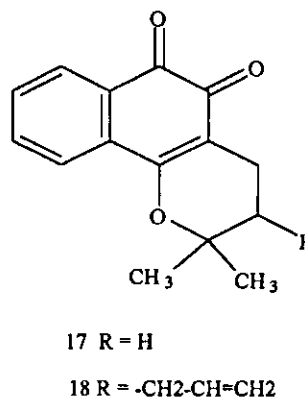
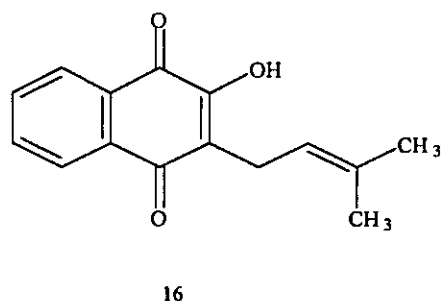


11 R =



4.2.3. Exemplos de Quinonas, produtos fenólicos e outros produtos secundários com actividade antiprotozoária

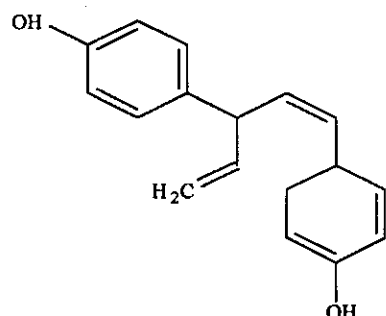
Várias naftoquinonas são activas contra *P. Falciparum*, *E. Histolytica*, e *T. Cruzi*. Lapachol (16) da espécie *Bignoniaceae*, é activo contra *T. Brucei* epimastigotes mas β -lapacona (17) e alil- β -lapacona (18) são potencialmente activos contra *T. Brucei* epimastigotes.[7]



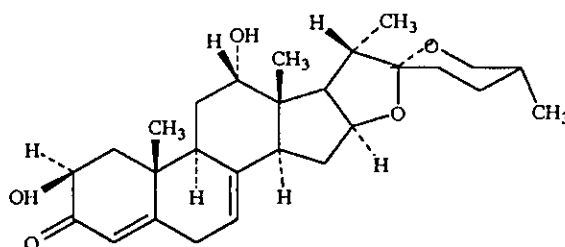
4.2.4. Exemplos de produtos isolados das plantas do género *Asparagus* com actividade antiprotozoária

O Nyasol (19) é uma lignane que foi isolada das raízes das plantas *Asparagus Africanus*, ele inibe potencialmente o crescimento da Leishmaníase e inibe moderadamente o *Plasmodium Falciparum*. A Muzanzagenina (20), uma sapogenina esteroideal possui uma actividade moderada contra Leishmaníase e Malária. [5]

Da planta *Asparagus Conchichinensis*, usada na medicina tradicional em Hong Kong para o tratamento de tuberculose pulmonar e câncer da mama; também foi isolado o Nyasol.



(19) Nyasol



(20) Muzazangenina

5. CARACTERIZAÇÃO E DESCRIÇÃO DA PLANTA EM ESTUDO

Asparagus Plumosus Baker pertence a família Liliaceae, família esta que compreende cerca de 400 espécies agrupadas em mais de 280 géneros e é formada maioritariamente por ervas providas de bolbos, risomas e tubérculos. Muitas delas são plantas de jardim, utilizam-se para a elaboração de produtos medicinais e cosméticos. Outras como alho (*allium sativum*), cebola (*allium cepa*) e o espargo comestível (*asparagus officinalis*) se utilizam para alimentação. Os géneros mais significativos são: *Allium*, *Androcymbium*, *Anthericum* e *Asparagus*.

Asparagus Plumosus Baker é um bom diurético e laxativo.

A parte utilizada é a raíz. O seu método de utilização é cortar a raíz em pedaços, cozer e tomar; para adultos $\frac{1}{4}$ do copo 3 vezes por dia, crianças 1 colher 3 vezes por dia. Usa-se para curar tuberculose, pneumonia, malária, reumatismo e parar vómitos.[8]

Tabela 2. DESCRIÇÃO BOTÂNICA DA ASPARAGUS PLUMOSUS BAKER E DA ASPARAGUS AFRICANUS

	ASPARAGUS PLUMOSUS BAKER	ASPARAGUS AFRICANUS
Sinónimo	Asparagus setaceus	Asparagus Asiaticus
Nome comum	Asparagus ornamental	Asparagus fern, lukungwisa
Descrição	É um planta trepadeira que pode atingir 5m de comprimento; possui folhas escamosas nao duras, flores simples branco esverdeado.	É um arbusto extenso, largo, com espinhos e possui 1-3m de comprimento.
Propagação	Por semente, expansão da fruta de plantas antigas por pássaros	Sem informação
Origem	África do Sul	África do sul

6. TÉCNICAS E MÉTODOS DE ANÁLISE DAS PLANTAS

O assunto da fitoquímica, ou química das plantas, foi desenvolvida há poucos anos, como um ramo independente e destina-se ao estudo das plantas.

As operações patentes para estas operações são: métodos de separação, purificação e identificação de muitos e diferentes constituintes presentes nas plantas.

6.1. EXTRAÇÃO

A extração é uma técnica usada para separar uma ^{substância} substância de uma mistura usando solventes. O modo de extração depende do tipo de substância, da textura e da quantidade de água que a planta possui. Pode definir-se como a separação de um componente de uma mistura por meio de um solvente.

Para a extração usam-se vários solventes tais como: éter de petróleo, clorofórmio, metanol, acetato de etilo, etc.[9]

A extração pode ser líquido-líquido ou sólido-líquido.

Na prática, a extração líquido-líquido é utilizada para separar substâncias de soluções ou suspensões líquidas; a extração sólido-líquido é utilizada para separar substâncias de um sólido por meio de um solvente

6.1.1. Métodos de Extração

Os métodos de extração sólido-líquido conhecidos, dos quais alguns foram usados neste trabalho são os seguintes: Maceração, Infusão, Decocção e soxhlet.[10]

6.1.1.1. Maceração – consiste em submeter um material sólido previamente moído à acção de um solvente à temperatura ambiente.

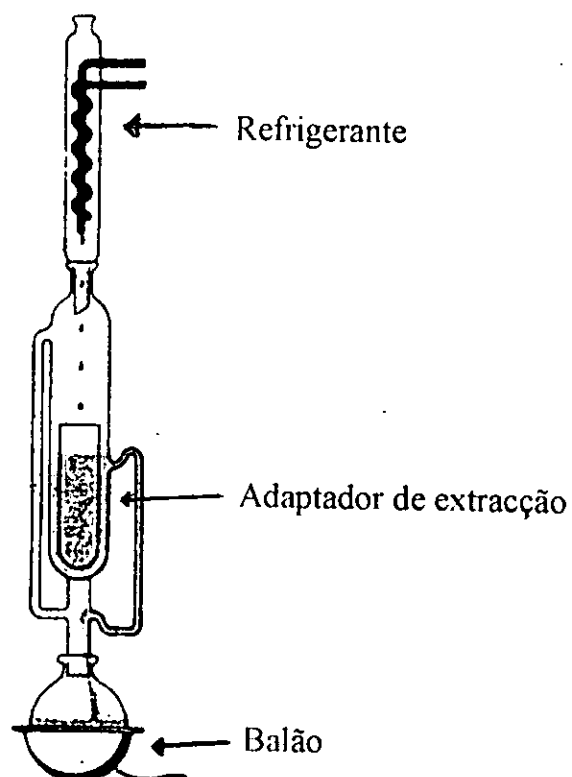
Certas substâncias do sólido solubilizam-se no solvente de acordo com a polaridade.

6.1.1.2. Infusão – Consiste em impregnar um solvente em ebulição sobre um material sólido previamente moído, deixando ficar em contacto durante certo tempo.

6.1.1.3. Decocção- Consiste em ferver substâncias para lhes extrair princípios activos. Se o material é sólido, previamente moído, junta-se-lhe o solvente adequado e submete-se a fervura.

6.1.1.4. Soxhlet – é uma extração exaustiva de um sólido por meio de um líquido e consiste em fazer refluxo durante certo tempo até a descoloração do material de extração contido no interior de um cartucho.

Figura 1. Esquema do extractor com soxhlet



6.2. MÉTODOS DE ANÁLISE USADOS

6.2.1. Métodos Cromatográficos

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.

O processo de separação entre as bandas é crítica, devido ao alargamento durante a migração dos anólitos. Assim, a separação de componentes cuja diferença entre as 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.

6.2.2. Classificação da Cromatografia

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

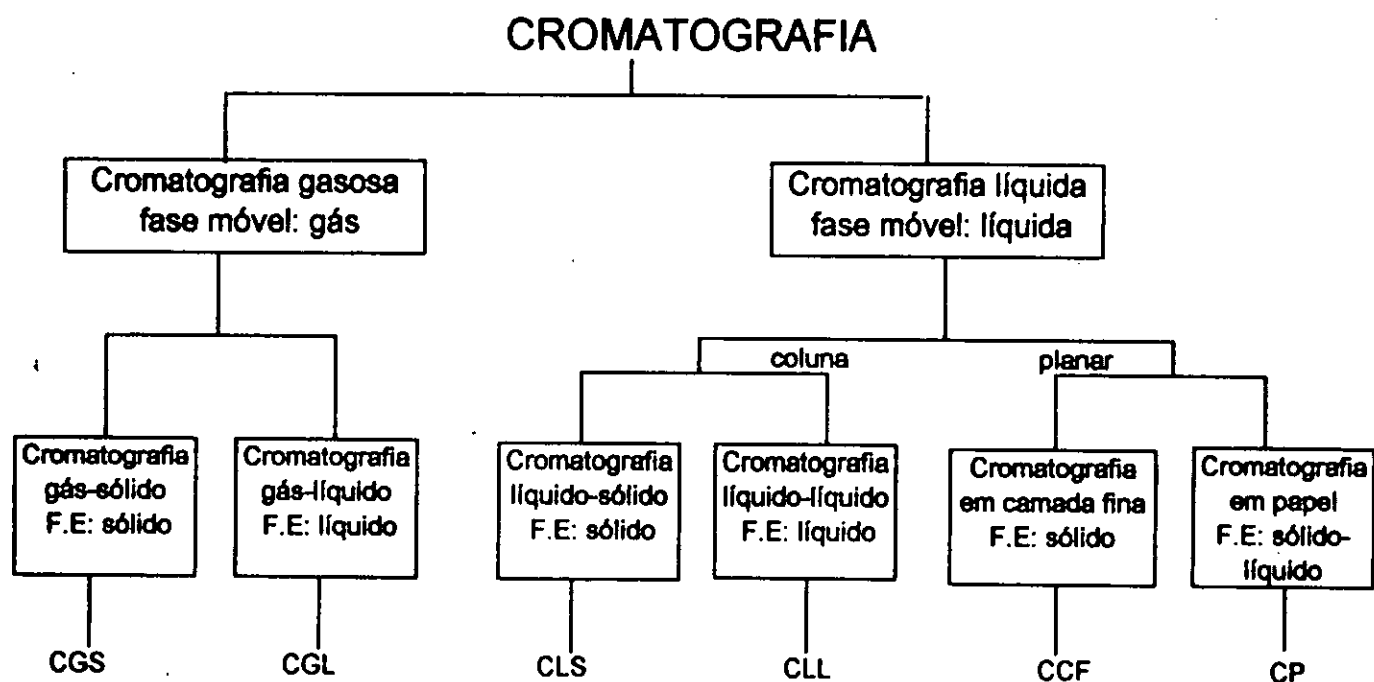


Figura 2. Esquema de classificação das técnicas cromatográficas com base no estado físico das fases

6.2.2.1. Cromatografia em camada fina (TLC)

A cromatografia em camada fina (TLC) é uma técnica de separação muito aplicada em fitoquímica. Segundo a classificação, a Cromatografia em Camada Fina (TLC) é uma técnica cromatográfica de adsorção planar.

Consiste numa camada fina de sorvente (por ex:Silica gel ou celulose) que reveste um material de suporte, rígido e inerte como uma chapa de vidro ou uma folha de plástico, de modo que o processo de separação ocorre numa superfície plana, essencialmente bidimensional, e é baseada

na adsorção selectiva dos componentes a separar na fase móvel, que por acção capilar move-se ao longo do adsorvente.

A cromatografia em camada fina apresenta algumas vantagens comparativamente a outros métodos cromatográficos nomeadamente:

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

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

Fase Estacionária

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 diatomicas, 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 de camada é maior que 1,0 mm. Os parâmetros a considerar na escolha do adsorvente são:

- i. a natureza do composto 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.

Fase Móvel

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

No entanto deve-se ter em conta o seguinte:

- 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 cromatografia em Camada Fina (TLC).[10]

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 cromatografia em Camada Fina (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; de outro modo, é necessário efectuar testes preliminares, por tentativas.

Desenvolvimento das Placas

O desenvolvimento das placas e a expressão normalmente usada em cromatografia em camada fina (também em Cromatografia em papel) 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 um 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.

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 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.

Técnicas de visualização

As manchas dos elutos numa placa desenvolvida podem 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 eluidos.

Uma técnica de visualização ideal para um cromatograma em Cromatografia em Camada Fina (TLC) deve ser capaz de:

- 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 à 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 as 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 destrutivas e não destrutivas.

Os equipamentos ou aparelhos usados para a detecção dos eluitos no cromatograma são simples: uma simples câmara provida de uma lâmpada como fonte de radiação UV é comumente usada; [?]na ~~usam~~-se reagentes específicos através de um dispositivo simples de pulverização.

A escolha da técnica de visualização depende essencialmente do tipo de composto a isolar ou a detectar.

Reagentes Específicos

- Anisaldeído-ácido sulfúrico(AS): Detecção de Terpenóides, Propilpropanóides, Saponinas e princípios amargos.[11]
- Cloreto de Antimónio-III(SbCl_3): Detecção de glicosídeos cardíacos, saponinas.[11]
- Fast blue salt reagent (FRS): Detecção de compostos fenólicos.[11]
- Reagente de Liebermann-Burchard (LB): Detecção de Triterpenos, esteróides (saponinas e princípios amargos).[11]
- Vanilina-ácido fosfórico (VP): Detecção de Terpenoides, lignanes e curcubitacinas.[11]

- Vanilina-ácido sulfúrico (VS): Detecção de componentes de óleos essenciais (terpenóides, fenilpropanóides).[11]

Em análise cromatográfica como é 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 Cromatografia em Camada Fina (TLC), pode ser registada de diversas formas :

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 (1)

$$\text{equação(1)} : R_f = \frac{\text{distância da origem ao centro da mancha do componente}}{\text{distância da origem a frente do solvente}}$$

O valor do factor de retardamento depende da temperatura, do solvente e do tipo de fase móvel usada na experiência.

O cromatograma de uma Cromatografia em Camada Fina (TLC) pode ser usado 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.

6.2.2.2. Cromatografia Líquida de Média Pressão (MPLC)

Esta é, juntamente com a Cromatografia em Camada Fina (TLC), a técnica 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.[12]

Baeckstrom 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.

A figura (3) mostra o esquema do aparelho de MPLC, semelhante ao usado neste trabalho.

No entanto, algumas questões se levantam na aplicação da coluna de MPLC, a saber:

- i. O sentido do bombeamento do solvente: a remoção de bolhas de ar é favorecida pelo sentido ascendente do bombeamento de solvente bem como a prevenção da contração 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 a 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 a superfície do líquido, provocando a adição de mais solvente que a média introduzida na câmara de mistura.

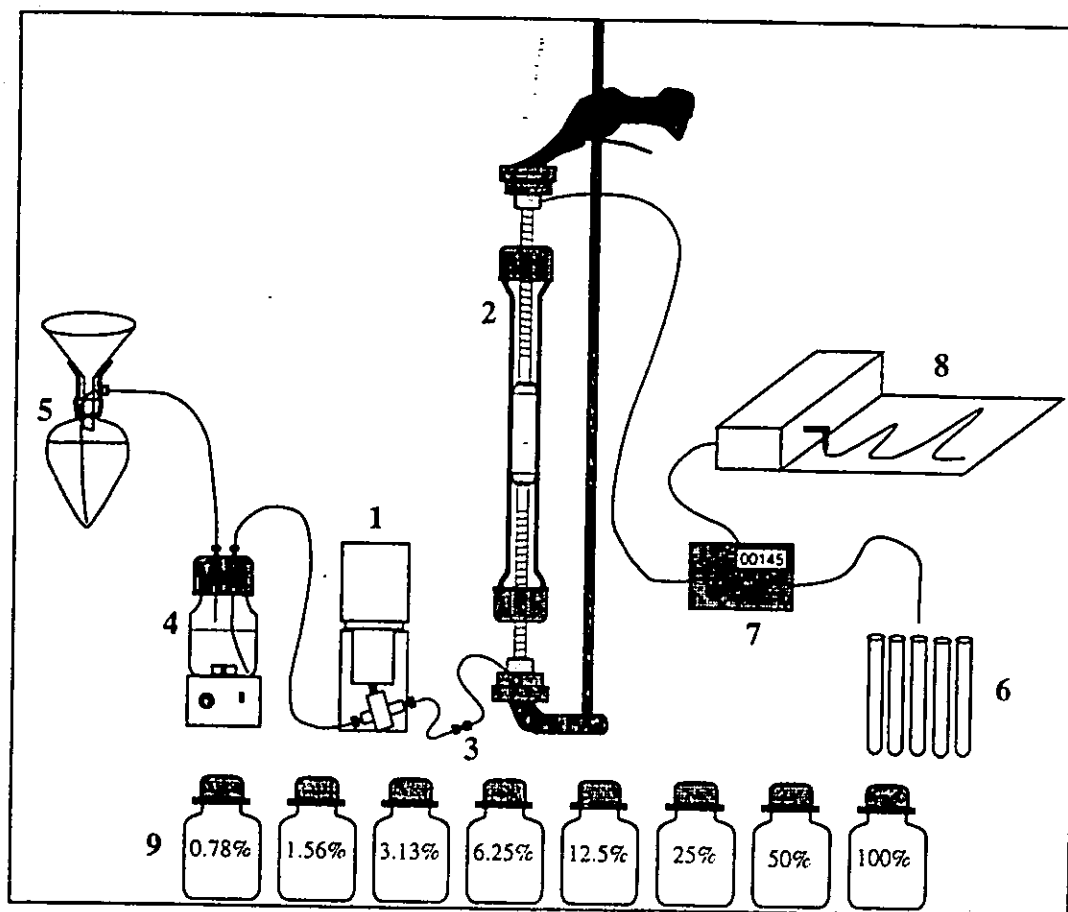


Figura 3. Esquema do aparelho de MPLC

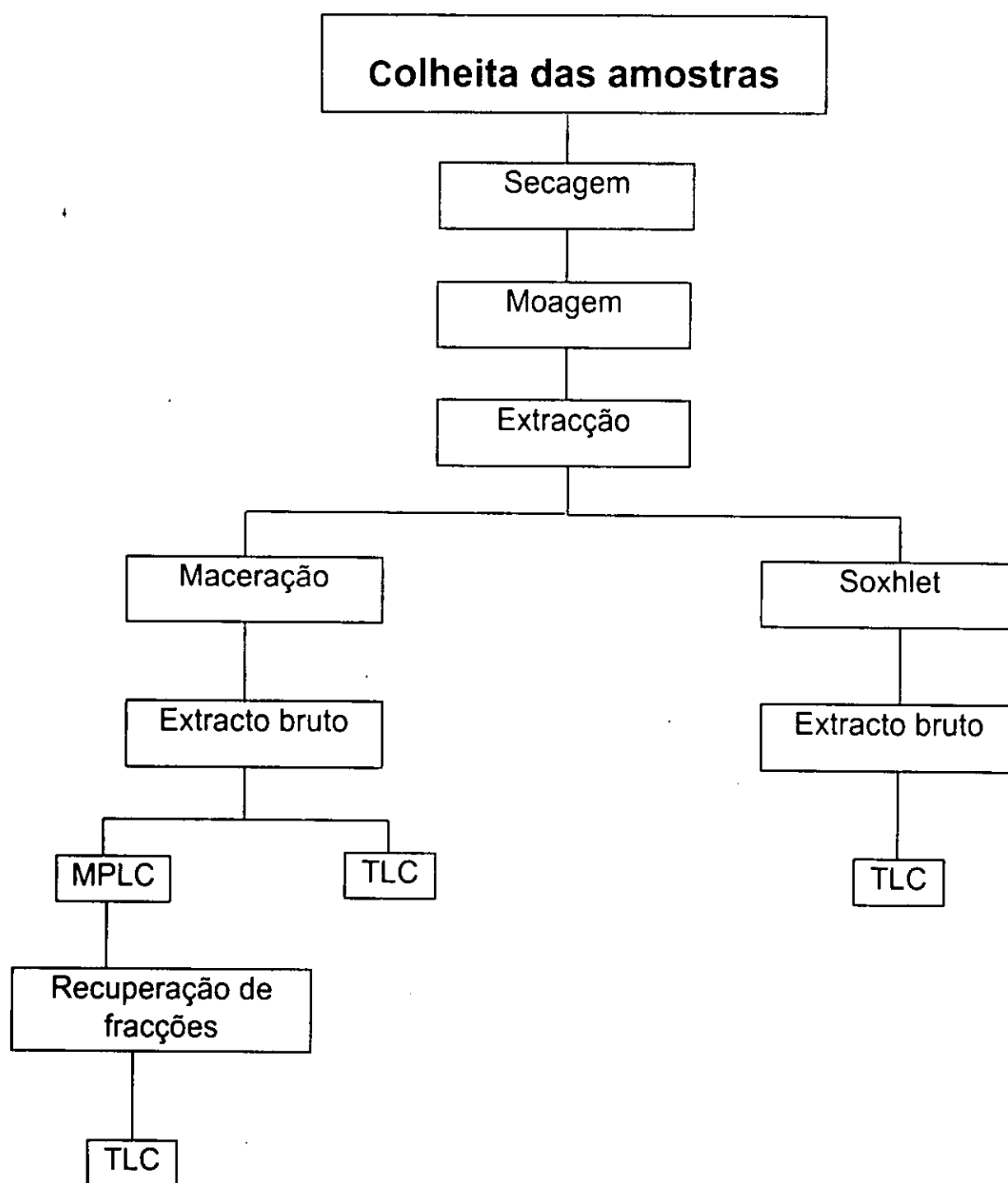
1- Bomba; 2- coluna; 3- adaptador de ligações; 4- câmara de mistura; 5- reservatório; 6- colector de fracções; 7- detector (UV); 8- registador (papel); 9- gradiente de solvente.

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 camara e o volume de cada solvente.

7. PARTE EXPERIMENTAL

Nesta parte é apresentado o procedimento do trabalho desde a colheita das amostras até a realização dos ensaios laboratoriais de acordo com as técnicas recomendadas.

Na figura 4 apresenta-se o esquema geral do trabalho realizado:



16-T.L

Autor

FAIFE, Diogo António

Obra

Trabalho de licenciatura

Cota

DATA	RÚBRICA	N.º CARTÃO
16/04/04	Adm. Col. de Mariana	
19/7/04	Bonifácio Sousa	
04/08/04	Olga Carlos Mendes	
23/09/04	Elz Chyrela	
28/9/05	Almirante C. Lima	
01/11/05	Bonifácio Sousa	
14/11/05	Teodoro S. Aires	
18/11/05	Elz Chyrela	
18/11/05	Bonifácio Sousa	
24/11/05	Almirante C. Lima	
6/12/05	Bonifácio Sousa	
15/2/06	Bonifácio Sousa	
23/2/06	Elz Chyrela	
28/2/06	Elz Chyrela	
06/3/06	Elz Chyrela	
09/03/06	Almirante C. Lima	
03/04/06	Vieira, Nuno	
11/04/06	Faída, Benedito	
12/04/06	Almirante C. Lima	
21/08/06	Flávia, Cândida	
19/10/06	Almirante C. Lima	
10/10/06	Faída	
14/10/07	Benedito Faída	
09/04/07	Benedito Faída	
23/04/07	Benedito Faída	

7.1. Colheita, Secagem e Moagem das Amostras

As amostras da *Asparagus Plumosus Baker* e da *Asparagus Africanus* foram colhidas no Distrito de Marracuene, Localidade de Michafutene, Bairro de Mumemo na manhã do dia 20 de fevereiro de 2003, e foram transportadas para o herbário do departamento de Ciências Biológicas da universidade Eduardo Mondlane. Vinte e quatro horas depois foram transferidas para o laboratório de produtos naturais do Departamento de Química da Universidade Eduardo Mondlane.

A secagem das raízes foi feita numa estufa eléctrica a uma temperatura compreendida entre 40 – 50°C durante quinze(15) dias e as folhas foram deixadas secar à temperatura ambiente, à sombra do laboratório acima referido durante cerca de 45 dias.

Em seguida foram transportadas para o Instituto Nacional de investigação agronómica (INIA), onde foram moídas.

7.1.1. Extração e fraccionamento

Dois tipos de extração foram utilizados no presente trabalho: Maceração e extracção com soxhlet.

Os extractos brutos foram fraccionados usando a cromatografia líquida de média pressão (MPLC)

Enchimento e montagem da coluna MPLC

Para o enchimento da coluna foi usado o seguinte material:

- Uma coluna cromatográfica e os respectivos acessórios;
- Dois suportes com as respectivas garras;
- Um agitador magnético;
- Uma bomba de média pressão;
- Dois funís;
- Tubos de ensaio dispostos um a seguir ao outro

As diferentes fracções foram analisadas por Cromatografia em Camada Fina (TLC).

Na Cromatografia em Camada Fina foram usadas:

- Placas comerciais de Alumínio 20 x 20 cm e 5 x 20 cm com camada adsorvente Sílica-gel 60 F254 (MERCK),
- Tinas cromatográficas para o desenvolvimento das placas;
- Tubos capilares;
- Frasco de spray;

Aplicação da amostra

As amostras foram aplicadas nas placas de TLC usando tubos capilares de 2 µl quantas vezes fosse necessário para concentrar, na linha de origem à 10 mm da extremidade inferior, mantendo uma separação mínima de 5 mm entre os pontos de aplicação.

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.

Sistema de Detecção

Para a visualização das manchas foi usada a lâmpada UV (254 e 366nm) e para a revelação das placas desenvolvidas foi usado o reagente vanilina-ácido fosfórico, que se aplica com ajuda do frasco spray. Depois de aplicar o revelador a placa cromatográfica é aquecida sobre uma placa eléctrica apropriada durante 10 minutos à uma temperatura de 100°C.

7.1.1.1. Ensaio preliminar

Para um estudo preliminar, foram submetidas a maceração 25g de pó das raízes da *Asparagus Africanus*, com 150ml de éter de petróleo durante 48 horas; filtrou-se e o filtrado foi concentrado no rotavapor até quase a secura para obtenção do extracto bruto, o resíduo do filtrado foi posto a secar para depois ser usado para as extracções sucessivas com os solventes: Diclorometano, Acetato de etilo e Metanol.

Fez-se a Cromatografia em Camada Fina (TLC) dos extractos brutos usando vários sistemas de solventes e verificou-se uma complexidade de manchas (TLC1p). Na tentativa de isolar os dois produtos principais, que

correspondem às duas manchas importantes das fracções de Diclorometano e Acetato de etilo, fez-se o seu fraccionamento.

O fraccionamento do extracto de Diclorometano usando a Cromatografia Líquida de Média Pressão (MPLC) no sistema de solvente: Diclorometano/Acetato de Etilo nas proporções (v/v): (25/25; 30/20; 35/15; 40/10; 45/5) que resultou em 47 fracções; fez-se a Cromatografia em Camada Fina no sistema de solventes Diclorometano: Acetato de etilo (9:1) e verificou-se que existiam fracções semelhantes com manchas de mesmo Rf e que foram agrupadas em 5 fracções (TLC2p). Estas fracções foram analisadas por Cromatografia em Camada Fina no mesmo sistema de solventes e destacaram-se duas manchas principais que são de cor púrpura (UV 254nm), que se tornam púrpura carregada e castanho clara (revelador vanilina-ácido fosfórico) e cujos Rf são 0,67 e 0,45 respectivamente.

Do mesmo modo foi feito o fraccionamento do extracto de Acetato de Etilo tendo-se recolhido 47 fracções. Fez-se a Cromatografia em Camada Fina usando o sistema de solventes Diclorometano:Acetato de etilo (9:1) e verificou-se que existiam fracções com manchas semelhantes e mesmo Rf e foram agrupadas em 5 fracções (TLC3p). Desta TLC verificou-se a existência de dois produtos principais que são visíveis a 254nm que são de cor rocho escuro e rocho claro e depois da aplicação do revelador (vanilina-ácido fosfórico) as cores mudaram para castanho escuro e castanho claro com os Rf 0,67 e 0,45 respectivamente. Verificou-se também a existência de um terceiro produto que só é visível a 366nm, é de cor azul escuro e o seu Rf é 0,49.

O mesmo estudo foi feito com as raízes da planta *Asparagus Plumosus Baker*, tendo-se submetido a maceração 40g do pó das raízes desta planta com 200ml de éter de petróleo durante 48 horas. Seguiu-se o mesmo procedimento que o anterior usando as extracções sucessivas do resíduo seco com os solventes Diclorometano, Acetato de etilo, Metanol; e obteve-se os extractos brutos. Fez-se a Cromatografia em Camada Fina (TLC) desses extractos brutos e verificou-se uma complexidade de manchas.

Como no caso de *Asparagus Africanus*, só os extractos de Diclorometano e Acetato de etilo foram submetidos ao fraccionamento.

O extracto bruto de Diclorometano foi submetido ao fraccionamento por Cromatografia Líquida de Média pressão (MPLC) de onde foram obtidas 23 fracções que foram analisadas por Cromatografia em Camada Fina (TLC) usando o sistema de solvente Diclorometano: Acetato de etilo (9:1) e verificou-se que existiam manchas semelhantes e que foram agrupadas em 4 fracções (TLC4p). Desta TLC verificou-se novamente uma complexidade de manchas de onde se pode ver portanto a existência de três manchas principais com os Rf seguintes: 0,75; 0,56 e 0,51.

De igual modo foi fraccionado o extracto bruto de Acetato de etilo de onde foram obtidas 55 fracções. Fez-se a Cromatografia em Camada Fina (TLC) no sistema de solvente Diclorometano:Acetato de etilo (9:1) e verificou-se a existência de fracções semelhantes e foram agrupadas em 5 fracções (TLC5p).

As quantidades nas diferentes fracções eram tão poucas que não se podia submeter a um fraccionamento posterior.

A Cromatografia em Camada Fina dos extractos brutos das fracções de Diclorometano e de Acetato de etilo das raízes de *Asparagus Plumosus Baker*, mostram que as duas fracções são quase semelhantes.

7.1.1.2. Extracção e fraccionamento das raízes de *Asparagus Plumosus Baker*

200g do pó das raízes da *Asparagus Plumosus Baker* foram submetidas à maceração com 1200 ml de éter de petróleo durante 48 horas; estas quantidades foram divididas em 4 erlenmeyers com capacidade de 500 ml; isto para facilitar a agitação. Filtrou-se e o filtrado foi concentrado no rotavapor até quase à secura para obtenção do extracto bruto, o resíduo do filtrado foi posto a secar para depois ser submetido à extracções sucessivas com os solventes: Diclorometano/Acetato de Etilo e Metanol.

Dos extractos brutos obtidos temos as seguintes quantidades:

Extracto bruto de Eter de Petróleo = 300mg (0,15%)

Extracto bruto de Diclorometano/Acetato de Etilo = 3110mg (1,56%)

Extracto bruto de Metanol = 3020mg (1,51%)

Tendo em conta os procedimentos efectuados no estudo preliminar foi feita primeiramente uma TLC com os extractos brutos de éter de petróleo e Diclorometano/Acetato de etilo (TLC1) de onde se verificou uma

complexidade de manchas. Deste modo foi submetido a Cromatografia Líquida de Média Pressão (MPLC) o extracto bruto de Diclorometano/Acetato de Etilo que é o de interesse para o presente trabalho; fraccionamento este que resultou em 39 fracções e em seguida fez-se uma TLC das 39 fracções que depois foram agrupadas em 7 fracções (TLC2).

Mesmo assim, a mistura permaneceu complexa e não foram determinados os Rf das manchas nas 7 fracções.

Na tentativa de isolar produtos foi feito um novo fraccionamento para as fracções 2,3,4,5 e 6.

Para as fracções 3 e 4 foi usado o sistema de solvente: Diclorometano/Ciclohexano/Metanol nas proporções seguintes (v/v/v): (25/25; 35/15; 40/10; 40/7,5/2,5; 40/5/5) e para as fracções 2,5 e 6 usou-se o sistema de solvente CHCl_3 /Éter de petróleo nas proporções (v/v/v): (25/25; 30/20; 35/15; 40/10; 45/5).

Da fracção 3 obteve-se 12 fracções que foram analisadas por Cromatografia em Camada Fina (TLC) no sistema de solvente Diclorometano:Acetato de etilo (9:1) e foram agrupadas em 3 fracções (TLC3) que resultou em manchas com as cores seguintes: (1) lilás, amarela e castanha (UV 254nm) que depois do uso do revelador (vanilina-ácido fosfórico) tornaram-se de cor púrpura, amarela e castanha escura e os seus Rf são 0,27; 0,37 e 0,46 respectivamente; os compostos existentes em (2) tem as cores castanha, azul, castanha e amarelo e castanha (UV 254nm) que depois de usar o revelador tomam as seguintes cores: castanha escura, púrpura, castanha escura, amarelo e castanha escura com os Rf respectivos, 0,04; 0,13; 0,23; 0,26 e 0,41.



Por outro lado, da fracção 4 obteve-se 19 fracções que foram analisadas por Cromatografia em Camada Fina (TLC) no sistema de solvente Diclorometano:Acetato de etilo (9:1) e foram agrupadas em 3 fracções e foram de novo analisadas por Cromatografia em Camada Fina (TLC4) que resultou em manchas com as cores seguintes: (1) púrpura (UV 254nm) que depois do uso do revelador (vanilina-ácido fosfórico) tornaram-se de cor castanha, amarela, lilás, castanha escura, amarela, e os seus Rf são 0,29; 0,40; 0,56; 0,65 e 0,73 respectivamente; os compostos existentes em (2) tem cor púrpura (UV 254nm) que depois de usar o revelador tomam as seguintes cores: castanha, amarela, lilás, castanha escura, amarela, e os seus Rf são 0,29; 0,40; 0,53; 0,62 e 0,68 respectivamente.

De seguida foi feito o fraccionamento da fracção 2 que resultou em 12 fracções que foram analisadas por Cromatografia em Camada Fina (TLC) no sistema de solvente Diclorometano:Acetato de etilo (9:1) e foram agrupadas em 3 fracções (TLC5) que resultou em manchas com as cores seguintes: amarela, lilás, (UV 254nm) que depois do uso do revelador (vanilina-ácido fosfórico) tornaram-se de cor, amarela carregada, castanha clara e os seus Rf são 0,55; 0,69 respectivamente.

Da fracção 5 obteve-se 12 fracções que foram analisadas por Cromatografia em Camada Fina (TLC) no sistema de solvente Diclorometano:Acetato de etilo (9:1) e foram agrupadas em 5 fracções (TLC6) que resultou em manchas com as cores seguintes: lilás e púrpura (UV 254nm) que depois do uso do revelador (vanilina-ácido fosfórico) tornaram-se de cor púrpura, e castanha clara e os seus Rf são 0,65 e 0,57 respectivamente.

Da fracção 6 obteve-se 12 fracções que foram analisadas por Cromatografia em Camada Fina (TLC) no sistema de solvente Diclorometano:Acetato de etilo (9:1) e foram agrupadas em 6 fracções (TLC7) que resultou em manchas com as cores púrpura (UV 254nm) que depois do uso do revelador (vanilina-ácido fosfórico) tornaram-se de cor castanha clara. As fracções 2, 3, 4 e 5 apresentam manchas principais comuns de R_f : 0,27; 0,49 e 0,78 respectivamente.

7.1.1.3. Extracção com soxhlet das raízes e folhas de *Asparagus plumosus Baker* e *Asparagus africanus*

Foram submetidas a extracção com soxhlet 5g do pó das raízes e das folhas de cada uma das duas plantas, usando para tal os solventes: Éter de Petróleo, Diclorometano e Acetato de Etilo segundo a ordem crescente de polaridade, tendo-se obtido as seguintes quantidades de extracto bruto:

Tabela 3. Percentagem dos extractos brutos de *Asparagus Africanus* e de *Asparagus Plumosus Baker* obtidos por extracção com soxhlet

	Asparagus Africanus		Asparagus Plumosus Baker	
	Raízes	Folhas	Raízes	Folhas
Extracto bruto de Eter de Petróleo	0,065g(1,3%)	0,105g(2,1%)	0,038g(0,76%)	0,056g(1,12%)
Extracto bruto de Diclorometano	0,092g(1,84%)	0,116g(2,32%)	0,069g(1,38%)	0,063g(1,26%)
Extracto bruto de Acetato de Etilo	0,051g(1,02%)	0,082g(1,64%)	0,071g(1,42%)	0,094g(1,88%)

Os diferentes extractos brutos foram analisados por Cromatografia em Camada fina (TLC) no sistema de solvente Diclorometano/Acetato de Etilo (9:1). Como nos casos anteriores os cromatogramas são visualizados usando a lâmpada UV (254 e 366nm) e depois revelados com o reagente vanilina ácido fosfórico.

Do cromatograma das raízes evidencia-se a existência de duas manchas principais nas fracções de Diclorometano e acetato de etilo, com R_fs semelhantes aos das manchas obtidas nos cromatogramas dos extractos das raízes da extracção por maceração.

Por outro lado, do cromatograma das folhas a complexidade é menor em relação as raízes e pode-se ver mais manchas no extracto de éter de petróleo que é o contrário do que se verifica nas raízes.

A fracção de Acetato de etilo das raízes da *Asparagus Plumosus Baker* foi submetida a uma Cromatografia em Camada Fina preparativa. De foram evidenciadas 9 fracções das quais 5 apresentam uma única mancha em Cromatografia em camada Fina, cujos Rfs são: 0,20; 0,25; 0,32; 0,61 e 0,77; e as cores violeta e azul (254nm e 366nm respectivamente), púrpura (254nm), púrpura (254nm), púrpura (254nm) e amarela (254nm) respectivamente.

As manchas de Rf 0,20 e de Rf 0,77 são as únicas que apresentam uma coloração depois do uso do revelador vanilina-ácido fosfórico; e as cores são azul e amarela respectivamente. As restantes manchas não apresentam coloração.

No extracto de éter de petróleo (das folhas) evidenciam-se quatro manchas principais que são as mesmas para as duas plantas.

Para o extrato de Diclorometano (folhas de *Asparagus Africanus*) evidenciam-se duas manchas principais que estão patentes na fracção de Acetato de etilo para as folhas da mesma planta.

Do mesmo modo acontece com as fracções de Diclorometano Acetato de etilo (folhas de *Asparagus Plumosus Baker*), onde se evidenciam quatro manchas principais.

8. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

O estudo preliminar realizado sobre pequenas quantidades de pó de raízes de *Asparagus Africanus* permitiu evidenciar depois do fraccionamento por Cromatografia Líquida de Média Pressã (MPLC) do extracto de Acetato de etilo dois produtos principais que apresentam na Cromatografia em Camada Fina (TLC) no sistema de solvente Diclorometano/Acetato de etilo (9:1) as manchas de Rf igual a 0,67 e 0,45. Quando visualizados na lâmpada UV apresentam a cor rocho escuro e claro, e por revelação com o reagente Vanilina-ácido fosfórico, mudam para castanho e claro.

A comparação com dados da literatura [3] mostra que os dois produtos são diferentes do Nyasol e Muzanzagenina, isolados da fracção de Acetato de etilo das raízes de *Asparagus Africanus* e também do Nyasol isolado da fracção de Diclorometano das raízes de *Asparagus Conchichinensis*.

As mesmas manchas foram observadas nos extractos de Diclorometano e de Acetato de etilo das raízes de *Asparagus Plumosus Baker*.

O fraccionamento do extracto de Diclorometano/Acetato de etilo obtido por maceração de 200g do pó das raízes de *Asparagus Plumosus Baker* permitiu evidenciar muitas manchas na Cromatografia em Camada Fina, visualizados por UV 254nm/ 366nm e revelados usando o reagente vanilina-ácido fosfórico, específico para detecção de lignanes, terpenóides e curcubitacinas.

Não foi possível usar o revelador a base de anisaldeído (Anisaldeído-ácido sulfúrico) usado na literatura para detecção do Nyasol (uma lignane) por não existir esse reagente. Este revelador (Anisaldeído-ácido sulfúrico) era o mais indicado neste trabalho para a detecção dos terpenóides, propil-propanóides, princípios amargos e saponinas; e permitiria comparar as cores das manchas obtidas neste trabalho e as reportadas na literatura.

Muitos fraccionamentos por Cromatografia Líquida de Média Pressão foram feitos na tentativa de isolar os produtos. Em algumas fracções, na Cromatografia em Camada Fina evidenciou-se uma única mancha principal mas devido as pequenas quantidades obtidas não foi possível purificar os produtos. Seria necessário trabalhar com grande quantidade de amostra (pó) para poder isolar quantidades razoáveis de produtos que facilitariam as análises cromatográficas e espectroscópicas.

Da extração com soxhlet do pó das raízes de *Asparagus Plumosus Baker*, pode-se evidenciar a existência de um produto com Rf 0,20 que é próximo do Rf do Nyasol (0,21) apresentado na literatura, mas que não se pode confirmar por falta de análises espectroscópicas.

9. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

9.1. CONCLUSÕES

- Os dados da literatura mostram que das plantas do género *Asparagus* (família das Liliaceae) foram isolados lignanes e

saponinas esteroídicas que apresentam uma interessante actividade antiprotozoária.

- Neste trabalho preliminar sobre o estudo da planta *Asparagus Plumosus Baker*, deduz-se com base na Cromatografia em Camada Fina que existem muitos produtos comuns nos extractos das raízes da planta *Asparagus Africanus* e *Asparagus Plumosus Baker* embora esta última seja mais complexa.
- As lignanes e saponinas esteroídicas isoladas de *Asparagus Africanus* e *Asparagus conchichinensis* podem estar presentes também na planta *Asparagus Plumosus Baker*.
- Um estudo aprofundado usando diferentes métodos cromatográficos e espectroscópicos para os posteriores ensaios biológicos, poderá permitir o isolamento e identificação completa destes produtos.

9.2. RECOMENDAÇÕES

- Recomenda-se que se melhorem as condições para facilitar o estudo de plantas medicinais no Departamento de Química, sobretudo para a purificação e identificação dos princípios activos.

- Que se prossiga com o estudo da planta *Asparagus Africanus*, e *Asparagus Plumosus Baker* para a purificação e identificação dos compostos isolados.
- Que haja uma colaboração directa entre o químico e os Praticantes da Medicina Tradicional para o melhor conhecimento das plantas sobretudo o seu uso na medicina tradicional e consequentemente o seu estudo.
- Sugiro que se faça o estudo da fracção metanólica, cujo fraccionamento não foi contemplado neste trabalho; que de acordo com os outros estudos realizados sobre outras plantas do género *asparagus* pode conter saponinas e glicosídeos que tem um interessante efeito antiprotozoário.

9. BIBLIOGRAFIA

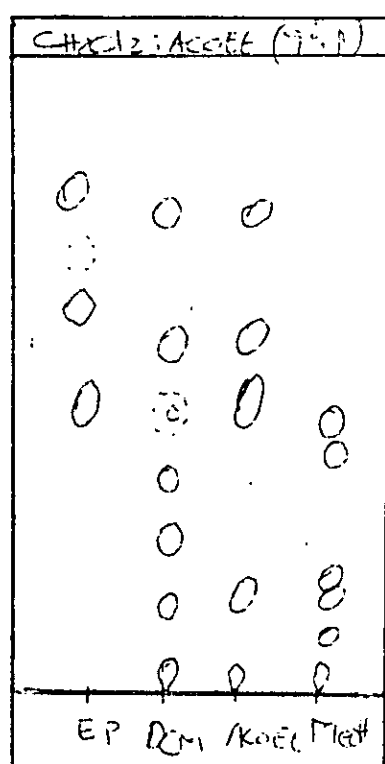
- [1]. Elena R. Mongelli y Alicia B. Pomilio (2002), Medicamentos y etnomedicina Del uso popular a la industria farmaceutica (<http://www.ciencia.hoy.retina.ar/hoy68/medicamentos.htm>)
- [2]. Addae-Mensah, I. (1988). The Impact and Implication of Traditional Africa Medicine on Health Care Delivery. Pp 1 -7. Legon, Chemistry Department.
- [3]. Artur Neumann. (2002), Substâncias activas das ervas medicinais (<http://www.canalvip.com.br/neumart/pm/substveg.htm>)

- [4]. Carlos Magno Greghi (1999), protozoários([www.terravista.pt/5542/biologia/celula/protozoa23.htm-9k](http://www.terraviva.pt/5542/biologia/celula/protozoa23.htm-9k))
- [5]. Oketch-Rabah H. A, Dossaji S. F, Christensen S. Brogger, Frydenvang. Karla, Lemmich Else, Cornett Claus, Olsen Carl E, Chen Ming, Kharazmi Arsalan, Theander Thor, (1997). Antiprotozoal Compounds from *Asparagus Africanus*, Journal of Natural Products, 60, 1017-1022.
- [6]. [BIOMANIA.com.br]. (2002), protista Doenças (<http://www.biomania.com.br/protista/protozoario.php>)
- [7]. Phillipson J. David, Wright Colin W. (1991). Antiprotozoal Agents from Plant Sources, Planta Médica, 57, S53-S59.
- [8]. Watt e Breyer (1962). Cadernos de saúde, Medicina Tradicional, 1ª série nº 1, Brandwijk.
- [9]. Harborne. J. B, (1998). Phytochemical Methods, a Guide To Modern techniques Of Plant Analysis, 3rd edition, pp5-6, London.
- [10]. Mayo, Dana W.; Pike, Ronald M.; Butcher, Samuel S.; e Trumper, Peter K. (1991). Techniques for the Organic Laboratory, 104pp, USA.
- [11]. Wagner. H, Bladts. S, (1996). Plant Drug Analysis, A Thin Layer Chromatography Atlas, 2nd edition, pp 263- 305, New York.

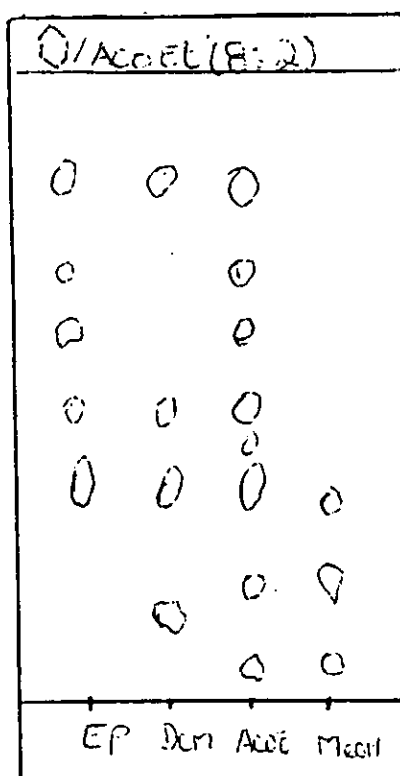
- [12]. Jirón, Z. (1996). Approaching Optimal conditions for Running Liquid Adsorption Column Chromatography Using Simple Computational Models. Tese de Mestrado. Pp 26-29. Stockholm, Department of Chemistry, Organic Chemistry, Royal Institute of Technology.
- [13]. Fonseca, Estrela Tayob Lagrosse (2000). Plantas Medicinais Utilizadas No Tratamento De Parasitoses Intestinais Pela Comunidade E Praticantes De Medicina Tradicional No Distrito Da Manhica. Tese de Licenciatura. pp 1-4, Maputo Universidade Pedagógica,
- [14]. Touchstone, J. C. e M. Dobbins, F. (1983). Practice of Thin Layer Chromatography, 2nd edition, 405pp. New York, John Willey and Sons, Inc.
- [15]. Ahmad Vigar Uddin, Khaliq-uz-Zaman Syed Muhammad, Shameel Simin, Perveen Shaista, Ali Zulfiqar, (1998). Steroidal Saponins from *Asparagus dumosus*, Phytochemistry, 50, 481-484.
- [16]. Asfaw Debella, Ernst Haslinger, Olaf Kunert, Gunter Michl, Dawit Abebe, (1999). Steroidal Saponins from *Asparagus africanus*, Phytochemistry, 51, 1069-1075.

ANEXOS
Cromatogramas

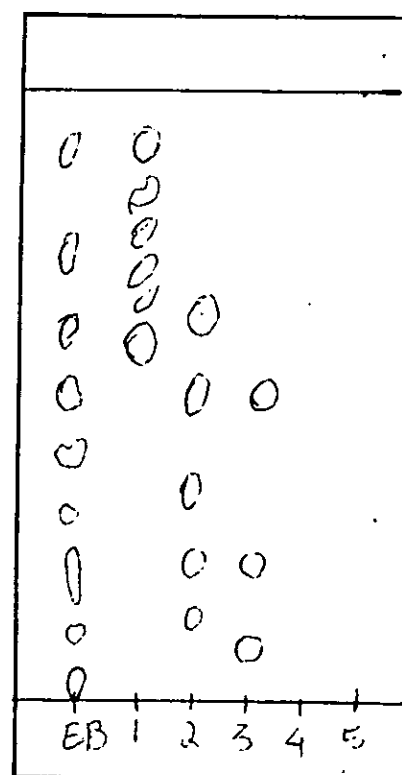
TLC1p



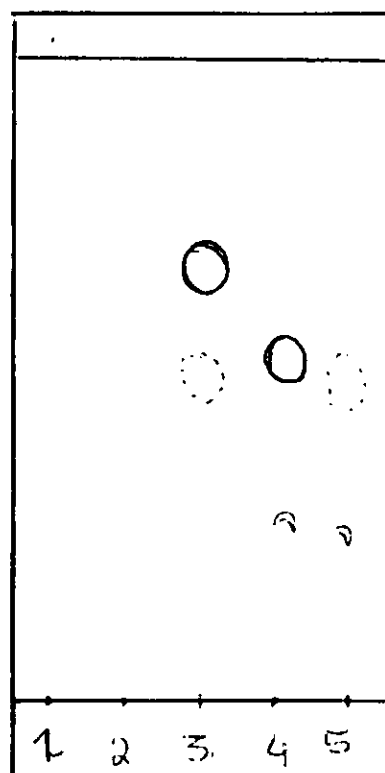
TLC1p



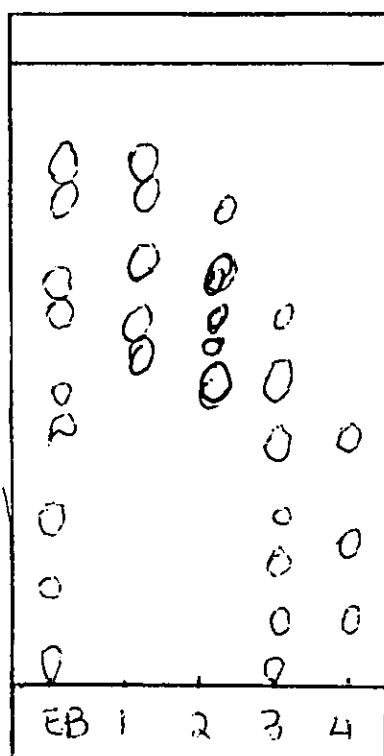
TLC2p



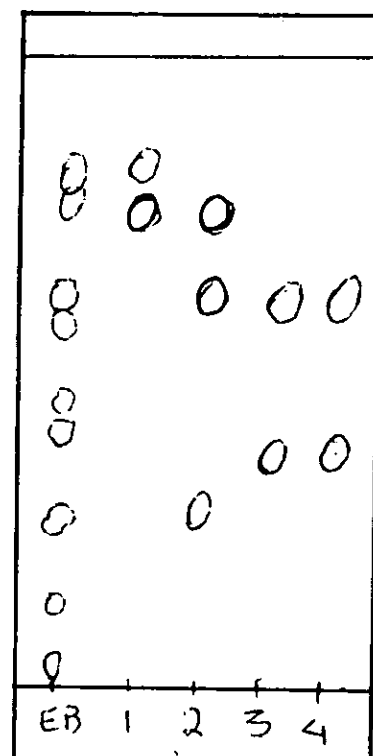
TLC3p



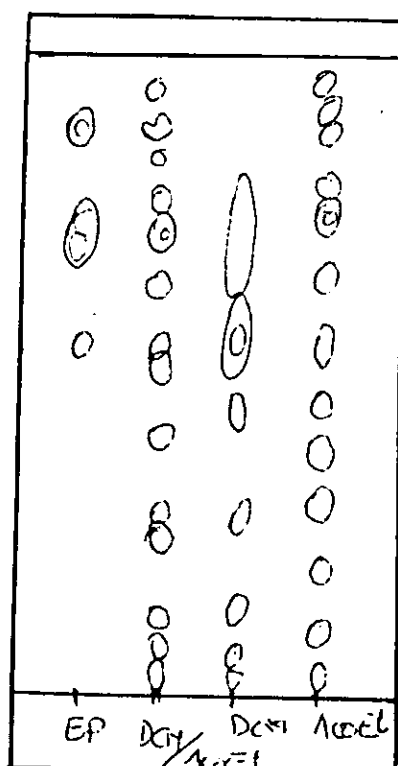
TLC4p



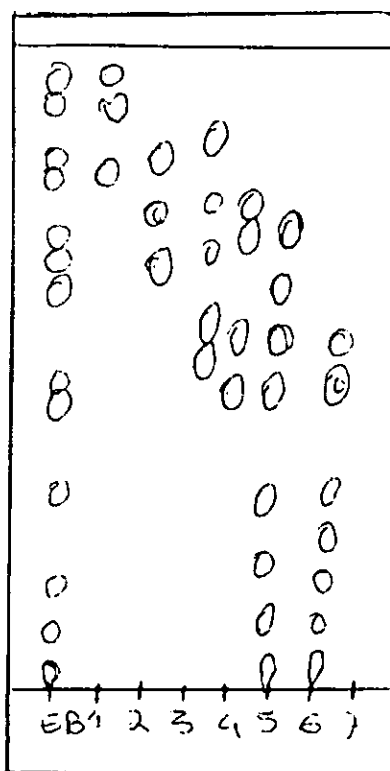
TLC5p



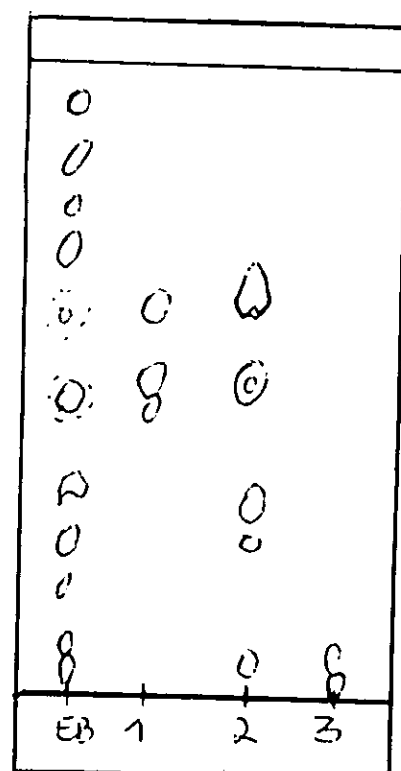
TLC1



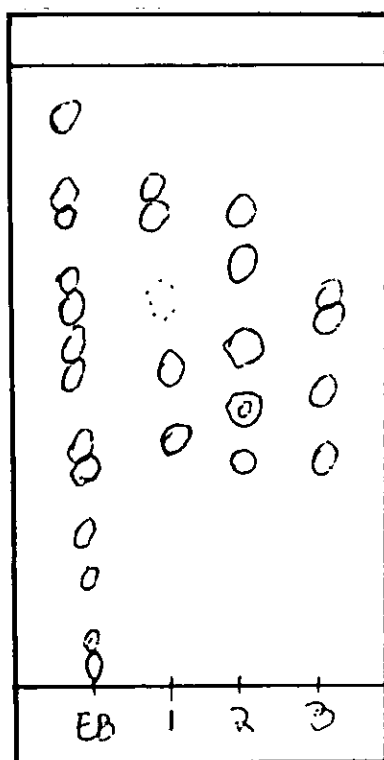
TLC2



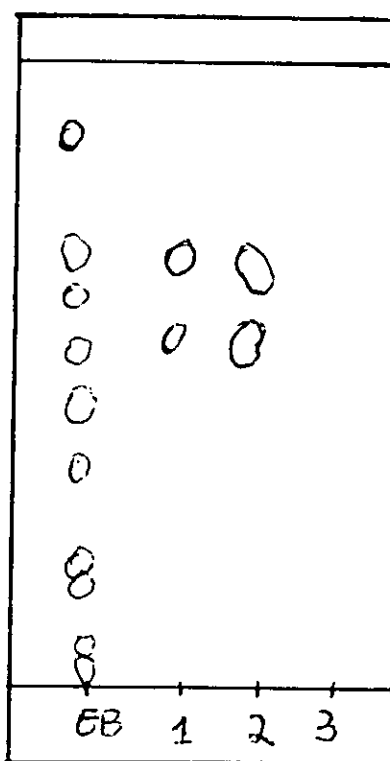
TLC3



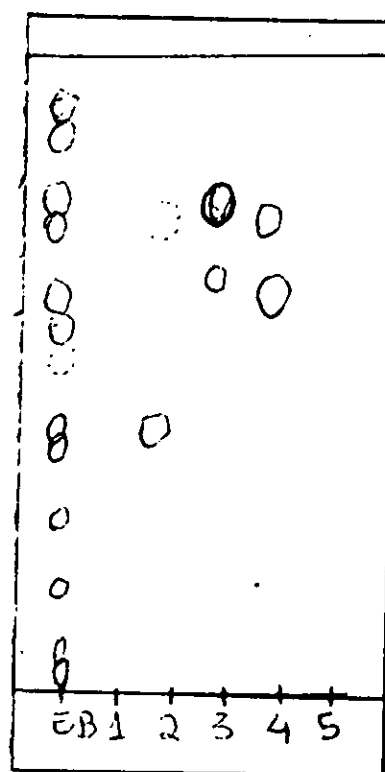
TLC4



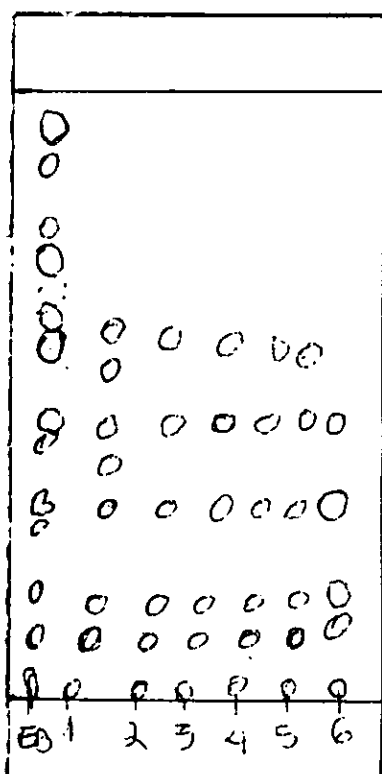
TLC5



TLC6



TLC7



TLC8

