

Q. 026-43



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE



FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TRABALHO DE LICENCIATURA



**Isolamento e Caracterização dos diterpenos nas
raízes da planta *Spirostachys Africana*.**

Autora: Elsa Elpídia Chuquela

Maputo, Abril de 2006



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE



FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TRABALHO DE LICENCIATURA



**Isolamento e Caracterização dos diterpenos nas
raízes da planta *Spirostachys Africana*.**

Autora: Elsa Elpídia Chuquela

Supervisor: Prof. Doutor François Munyemana

U. E. M. DEPARTAMENTO DE QUÍMICA	
BIBLIOTECA	
R. E.....	2.1.10.T.L.
DATA.....	12.1.27.06
AQUISIÇÃO.....	Elsa
COTA.....	

Maputo, Abril de 2006

Dedicatória

Ao meu filho Luís Xavier Chuquela Júnior, aos meus pais Obed Samussone Chuquela e Virgínia Joaquim Chelene e à memória da minha inesquecível tia Lisefa Samussone Chuquela.

Agradecimentos

Agradeço primeiro a Deus pela vida e pela saúde.

Gostaria também de expressar a minha mais profunda gratidão e reconhecimento ao Prof. Doutor François Munyemana, supervisor deste trabalho, pela sábia orientação e apoio prestado em todas as fases deste trabalho.

Gostaria também de agradecer ao Prof. Doutor Felisberto Pagula pela sua disposição e colaboração durante o trabalho laboratorial para o presente trabalho.

Aos funcionários da Biblioteca e da sala de informática que sempre souberam compreender as nossas necessidades, colocando sempre ao dispor os seus recursos.

Os meus agradecimentos são extensivos ao corpo docente e a todos os estudantes do Departamento de Química da Faculdade de Ciências da UEM com os quais aprendi muito durante a minha formação.

Uma palavra de apreço vai à Sra. Amélia Furvela, pela atenção prestada durante a realização dos ensaios laboratoriais.

Não posso deixar de endereçar também os meus agradecimentos à minha família, em especial aos meus pais e irmãos que sempre se empenharam para que nada me faltasse durante os estudos, e também ao meu noivo Luís Xavier Chuquela que sempre me incentivou para a continuação dos estudos.

Aos meus colegas Bonifácio e Almirante vão também os meus agradecimentos pelo bom espírito de companheirismo.

A todos vão os meus sinceros agradecimentos.

Declaração sob palavra de Honra

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

A autora,

Elsa Elpídia Chuquela

Elsa Elpídia Chuquela

ABREVIATURAS

P. Falciparum – Plasmodium Falciparum

Acetil CoA – Acetil Coenzima A

VSV – Vascular Stomatitis Virus

TLC – Cromatografia em Camada Fina

GLC – Cromatografia Gás – Líquido

GSC – Cromatografia Gás – Sólido

MPLC – Cromatografia Líquida de Média Pressão

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Resolução

EtOAc – Acetato de Etilo

n- Hex – n- Hexano

EP – Éter de Petróleo

MeOH – Metanol

S.A. – Spirostachys Africana

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJECTIVOS DO TRABALHO.....	2
2.1. Objectivo geral.....	2
2.2. Objectivos específicos.....	3
3. METODOLOGIA.....	3
4. ESTRUTURA, BIOSÍNTESE E ACTIVIDADE BIOLÓGICA DOS DITERPENOS.....	3
4.1 Definição e classificação dos Diterpenos.....	3
4.2 Biossíntese dos Diterpenos.....	6
4.3 Actividade biológica dos Diterpenos.....	11
4.3.1 Diterpenos com actividade antimicrobiana.....	13
4.3.2 Diterpenos com actividade antiviral.....	14
4.3.3 Diterpenos com actividade insecticida.....	15
4.3.4 Diterpenos com outras actividades.....	16
4.4 Relação entre estrutura e actividade antimicrobiana dos Diterpenos.....	17
4.5 Diterpenos e Difenóis isolados da planta <i>Spirostachys Africana</i>	20
5. CARACTERIZAÇÃO E DESCRIÇÃO DA PLANTA EM ESTUDO- SPIROSTACHYSAFRICANA (EUPHORBIACEAE).....	23
5.1 Informação medicinal.....	23
5.2 Aplicação da <i>Spirostachys Africana</i> no tratamento da malária em Moçambique.....	24
6. TÉCNICAS E MÉTODOS DE ANÁLISE DE PLANTAS.....	24
6.1 Extracção	24
6.1.1 Métodos de extracção usados.....	25
6.1.1.1 Maceração	25
6.1.1.2 Soxhlet.	25
7. MÉTODOS DE ANÁLISE USADOS.....	26
7.1 Métodos Cromatográficos	26
7.1.1 Cromatografia Líquida de Média Pressão (MPLC)	27
7.1.2 Cromatografia em Camada Fina (TLC)	28

7.1.3 Cromatografia em Camada Fina Preparativa.....	32
8. PARTE EXPERIMENTAL.....	34
8.1 Extracção.....	35
8.1.1 Extracção das raízes da Spirostachys Africana por maceração.....	35
8.1.2 Extracção das raízes da Spirostachys Africana por Soxhlet.....	36
8.2 Cromatografia em Camada Fina.....	37
8.3 Fraccionamento por Cromatografia Líquida de Média Pressão.....	38
8.3.1 Fraccionamento do extracto metanólico das raízes da Spirostachys Africana obtido por Soxhlet.....	39
9. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	43
10. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	46
10.1 Conclusões.....	46
10.2 Recomendações.....	47
BIBLIOGRAFIA.....	48
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABELAS

Tab. 1 Diterpenos naturais com actividade antimicrobiana.....	13
Tab. 2 Diterpenos naturais com diversas actividades.....	16

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Extractor Soxhlet usado para extracção de amostras brutas de plantas.....	26
Fig. 2 Esquema do MPLC.....	28
Fig. 3 Pulverizador.....	31
Fig. 4 Esquema Geral do trabalho.....	34
Fig. 5 Cromatograma dos compostos obtidos por Cromatografia em Camada Fina Preparativa.....	42

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Cromatograma dos extractos brutos do Éter de Petróleo, Metanol e da mistura n-Hex / EtOAc obtidos por Maceração e Soxhlet (TLC1).....	I
Anexo 2 Cromatogramas das fracções do extracto metanólico obtidas no ensaio preliminar (TLC2).....	II
Anexo 3. Cromatograma das fracções do extracto metanólico obtidas no segundo fraccionamento usando a MPLC (TLC3).....	III
Anexo 4. Cromatograma das fracções agrupadas do segundo fraccionamento (TLC4).....	IV
Anexo 4 Cromatograma das fracções obtidas do último fraccionamento usando a MPLC (TLC5).....	IV

Resumo

As plantas são fontes de compostos com actividade biológica diversificada, a partir delas têm sido isolados vários diterpenos biologicamente activos.

A *Spirostachys Africana* é uma planta da família *Euphorbiaceae* que é frequentemente usada em Moçambique para o tratamento de várias doenças. Nos últimos tempos ela tem sido investigada quanto à actividade antimalárica. Outras investigações mostraram que alguns diterpenos foram isolados desta planta [23].

No âmbito do estudo da relação estrutura – actividade antimicrobiana dos diterpenos, a comparação das estruturas dos diterpenos isolados de outras plantas com comprovada actividade antimicrobiana com os diterpenos já isolados da *Spirostachys Africana*, deixa transparecer que estes últimos podem também possuir alguma actividade antimicrobiana.

No presente trabalho, efectuou-se o estudo fitoquímico das raízes da *Spirostachys Africana*. A extracção destas foi feita seguindo duas formas: Maceração e Soxhlet, usando a seguinte sequência de solventes: Éter de petróleo, Metanol e Água.

Como forma de comparar a composição dos extractos foi realizada também uma extracção das raízes em Soxhlet usando a mistura n-Hexano /EtOAc (1:1). Todos os extractos brutos foram analisados por Cromatografia em Camada Fina (TLC). A partir dos resultados cromatográficos, por comparação de dados da literatura, notou-se uma forte probabilidade da existência de diterpenos nas raízes da *Spirostachys Africana*, o que só pode ser confirmado por análises espectroscópicas.

Apenas o extracto metanólico obtido por extracção em Soxhlet foi conduzido ao fraccionamento por Cromatografia Líquida de Média Pressão (MPLC) e Cromatografia em Camada Fina Preparativa de onde após vários fraccionamentos foram isolados dois compostos.

1. INTRODUÇÃO

A relação entre as plantas medicinais vulgarmente encontradas e os principais problemas de saúde em África, especialmente em Moçambique constitui ainda um grande dilema.

O uso de plantas medicinais para o tratamento de várias doenças tem sido evidenciado em grande escala na nossa Sociedade, embora muitas vezes sem o conhecimento real dos princípios activos que estão por detrás desse poder quimioterapêutico. Assim, a busca de fármacos mais ideais com vista a substituir aqueles aos quais os micróbios têm oferecido resistência deve ser muito mais intensificada.

A *Spirostachys Africana* é uma dessas plantas. A sua aplicação na medicina até agora não foi perfeitamente explorada, embora existam grandes especulações de que ela constitua um grande potencial terapêutico de entre as várias até aqui já bem conhecidas. Estudos realizados por alguns investigadores mostraram que a seiva desta planta contém diterpenos [23], compostos com actividade biológica variada. Deste modo, no presente trabalho, uma das questões fundamentais é saber se estes compostos estão ou não presentes nas raízes e se possuem alguma influência na actividade antimicrobiana, por análise das suas estruturas.

Vários compostos químicos estão presentes (mesmo que em pequenas quantidades) nas plantas, mas actualmente, as suas actividades biológicas têm sido determinadas e estes compostos têm sido sintetizados de modo a controlar os diferentes organismos patogénicos.

A malária é uma das doenças mais perigosas que tem causado mortes em grande escala, especialmente em zonas tropicais. Das quatro espécies do *Plasmodium* mais comuns, o *P. Falciparum* causa cerca de 80% de todos os casos da doença, em particular na África tropical. Uma vez que o parasita tem mostrado resistência face às várias drogas antimaláricas, actualmente têm sido desenvolvidos esforços de modo a se obter drogas com diferentes

Autor

Chiquela, Elsa Elpidia

Obra

Trabalho de Licenciatura

Cota

DATA	RÚBRICA	N.º CARTÃO
14/08/06	Tecendo sacros	
18/08/06	Tecendo sacros	
24/10/06	Candida Flávia	
30/10/06	Tecendo sacros	
30/11/06	Tecendo sacros	
28/11/06	Benedito Faia	
05/12/06	Benedito Faia	
13/12/06	Tecendo sacros	
14/12/06	Tecendo sacros	
15/01/07	Benedito Faia	
31/01/07	Benedito Faia	
14/02/07	Benedito Faia	
19/02/07	Benedito Faia	
02/02/07	Benedito Faia	
28/03/07	Benedito Faia	
01/04/07	Benedito Faia	
09/04/07	Benedito Faia	
8/6/07	Pan Guan	
26/07/07	CHOTI	
28/09/07	Chicala	
22/10/07	Funla Amélia	
1/1/		
1/1/		
1/1/		
1/1/		

características estruturais, sejam elas sintéticas ou originadas directamente das plantas [16].

A *Spirostachys Africana* é uma planta medicinal que até agora não foi estudada profundamente de forma individual e completa. Alguns estudos fitoquímicos a ela relacionados resultaram no isolamento e caracterização de alguns diterpenos. Estes compostos têm demonstrado um grande potencial terapêutico em especial para uma possível cura do SIDA, doença que tem causado milhares de mortes no mundo inteiro [8].

O uso da *Spirostachys Africana* na medicina tradicional em Moçambique é muitas vezes acompanhado por outras plantas. Além disso, precisa-se ainda de muito trabalho científico para comprovar a existência de actividade biológica nos compostos químicos a ela referentes. Assim, torna-se pertinente fundamentar os seguintes aspectos:

- Uma vez que os diterpenos são responsáveis pela actividade anti-microbiana de várias plantas, é necessário investigar se estes compostos (já isolados e identificados de acordo com os artigos publicados) são responsáveis pela inibição no crescimento dos parasitas na fracção etanólica das raízes da *Spirostachys Africana* de acordo com a publicação de Jurg, A. et al [10].
- A partir dos estudos desenvolvidos que comprovam a existência de diterpenos no cerne da *Spirostachys Africana* torna-se necessário verificar experimentalmente se estes diterpenos também estão presentes em outras partes da planta, como é o caso das raízes.

2. OBJECTIVOS DO TRABALHO

2.1. Objectivo geral

Estudo fitoquímico das raízes da planta *Spirostachys Africana*.

2.2. Objectivos específicos

- Isolar e caracterizar os diterpenos nas raízes da planta *Spirostachys Africana*.
- Estabelecer uma comparação entre os compostos isolados das raízes e aqueles encontrados na literatura.
- Desenvolver os métodos de extracção e fraccionamento dos diterpenos nas raízes da *Spirostachys Africana*.
- Estabelecer uma relação estrutura / actividade antimicrobiana dos diterpenos.

3. METODOLOGIA

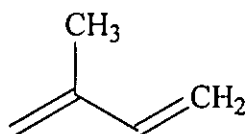
O trabalho em causa consistiu na seguinte sequência:

- Pesquisa bibliográfica
- Trabalho experimental cujos passos fundamentais foram:
 - Extracção e fraccionamento
- Análise e discussão dos resultados.
- Elaboração do Relatório final.

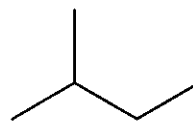
4. ESTRUTURA, BIOSÍNTESE E ACTIVIDADE BIOLÓGICA DOS DITERPENOS

4.1 Definição e classificação dos Diterpenos

Os diterpenos correspondem ao grupo de terpenos, cujo esqueleto carbónico é constituído por quatro unidades isoprénicas.



Isopreno



Unidade estrutural isoprénica

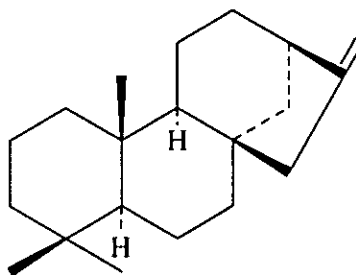
Eles podem distinguir-se nas seguintes classes: diterpenos resínicos, diterpenos tóxicos e giberilinas. [5]

- **Diterpenos resínicos:** Incluem compostos como o ácido abiético e agático encontrados em resinas de plantas correntes ou de fósseis. Estes compostos das resinas possuem uma função protectora na natureza, e são retirados do caule das árvores ou do cerne.
- **Diterpenos tóxicos:** constituem as graianotoxinas que ocorrem em folhas de várias espécies *Rhododendrom* e *Kalmia*. Eles são responsáveis pela natureza venenosa da folhagem destas plantas.
- **Giberilinas:** constituem um grupo de hormonas que normalmente estimulam o crescimento, sendo muito divulgadas nas plantas.

Os constituintes químicos das plantas podem ser classificados de diversas formas. Essa classificação pode basear-se na origem biossintética, nas propriedades de solubilização e na presença de certos grupos funcionais de maior interesse.

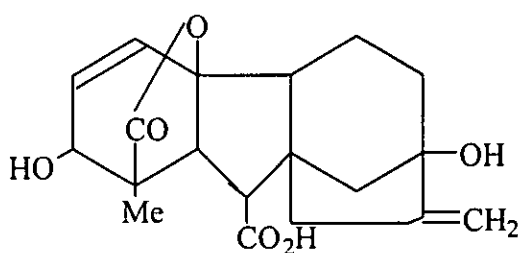
Para este caso, apresentam-se as subclasses principais dos diterpenos tetracíclicos [4] que, como se verá posteriormente, constituem o grupo de maior destaque.

- **Classe do kaurene-Phyllocladene** -os membros desta classe são os mais conhecidos de entre os diterpenos tetracíclicos, embora o Phyllocladene (I) tenha sido o primeiro diterpeno tetracíclico a ser isolado.



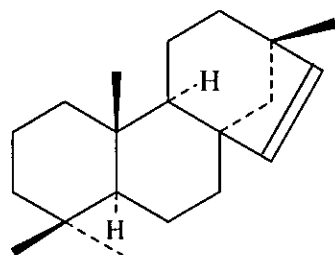
(I) Phylloladene

-**Giberilinas** — já foram descritas anteriormente. Um dos exemplos é o ácido giberílico (II):

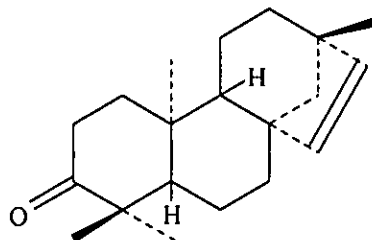


(II) Ácido Giberílico

- **Classe do Stachene** - O Hidrocarboneto parental deste grupo apresenta duas formas enantioméricas. A primeira é o Hibaeno (III), isolado da planta *Thujopsis dolabrata* e a outra Stachene, isolado da *Erythroxylon monogynum*. A partir do Stachene foi sintetizado o composto Stachenone (IV).



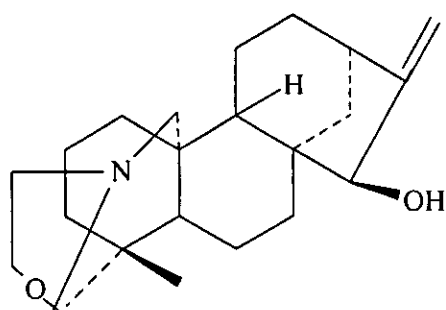
(III) Hibaeno



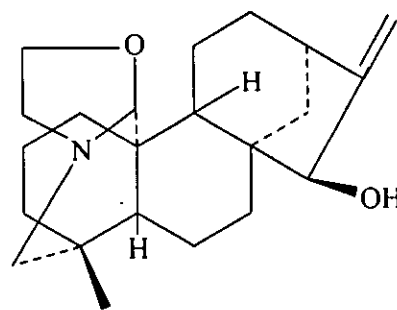
(IV) Stachenone

É de salientar que um número considerável de Diterpenos da série do stachene foi isolado do cerne da planta *Spirostachys Africana*.

- **Diterpenos alcalóides tetracíclicos-** Neste grupo podem-se salientar alguns compostos tais como Garryine (V), isolado da planta *Garrya racemosa* e Veatchine (VI), isolado da planta *G. Veatchii*.



(V) Garryine

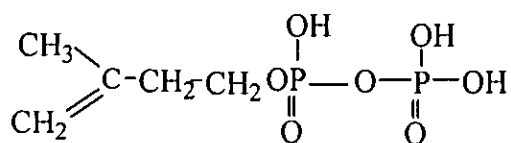


(VI) Veatchine

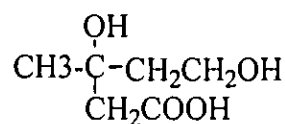
4.2 Biossíntese dos Diterpenos. [18]

Conforme se referiu anteriormente, os diterpenos constituem uma classe dos Terpenos. Sendo assim, é bastante relevante analisar a biossíntese destes.

Embora os Terpenos sejam biologicamente derivados da molécula do Isopreno, este não actua como precursor *in vivo*. O composto que actua como tal é o pirofosfato de 3-isopentenilo (VII), formado a partir do acetato por via do ácido mevalónico (VIII). O pirofosfato de 3-isopentenilo ocorre em células vivas em equilíbrio com o isómero pirofosfato de dimetilalilo.



VII

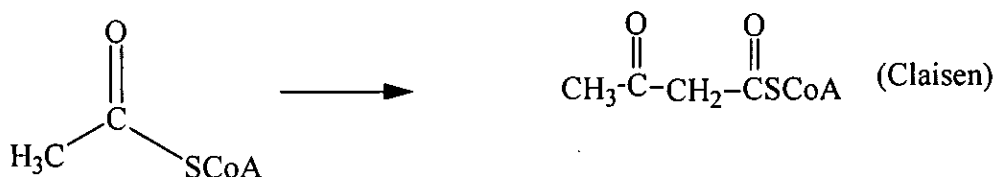


VIII

A biossíntese dos Terpenos pode ser dividida em três etapas:

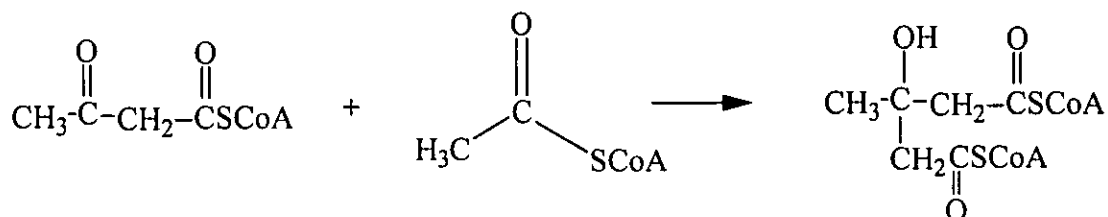
- Formação de uma unidade biológica a partir do acetato
- Condensação desta unidade para formar terpenóides acíclicos
- Conversão de terpenóides acíclicos em cíclicos.

O grupo acetato é a unidade precursora da biossíntese dos Terpenos, pois a partir dele se forma o pirofosfato de 3-isopentenilo, reacção catalisada e controlada por enzimas específicas. Para tal, duas moléculas do acetato, na forma de tioéster da Coenzima A combinam-se para formar Acetoacetil CoA, pela reacção do tipo Claisen.



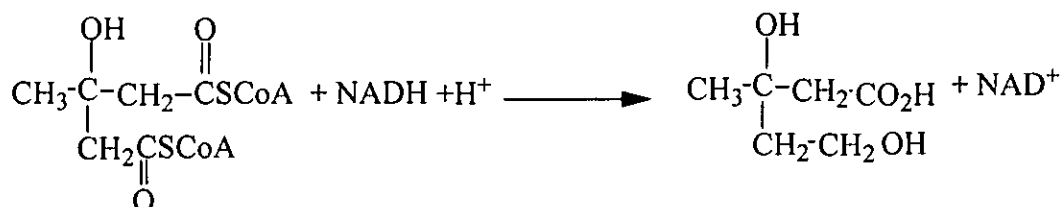
Acetoacetil CoA

Uma outra molécula do acetil CoA une-se a Acetoacetil CoA, seguindo a reacção do tipo aldol, formando β-hidroxil-β-metilglutaril CoA, estrutura com seis átomos de Carbono.

 β -hidroxil- β -metilglutaril CoA

O ácido mevalônico é formado por redução de um grupo carboxílico pela Dihidronicotinamida Adenina Dinucleotido (NADH) e posterior hidrólise de outro grupo tioéster.

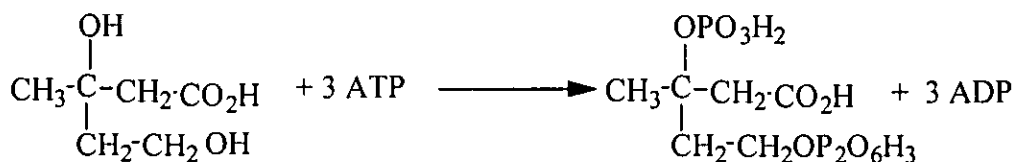
Redução e Hidrólise



Ácido Mevalônico

O ácido mevalônico é então fosforilado pela Adenosina Trifosfato (ATP) e posteriormente descarboxilado para formar o pirofosfato de 3- isopentenilo.

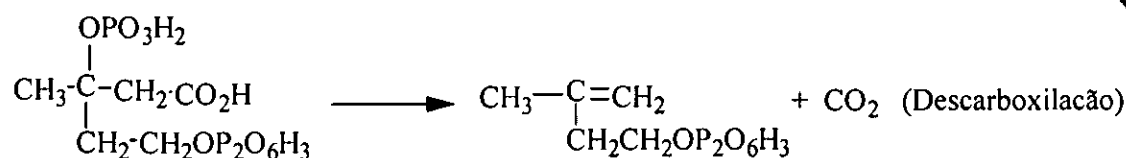
Fosforilação



Ácido 3-fosfo-5-piomevalônico



Descarboxilação



Pirofosfato de 3-isopentenilo

A formação de monoterpenos é feita a partir da dimerização, que começa pela isomerização da dupla ligação nas moléculas do pirofosfato de 3-isopentenilo, da posição 3 para 2, formando o pirofosfato de dimetilalilo, que é mais reactivo.

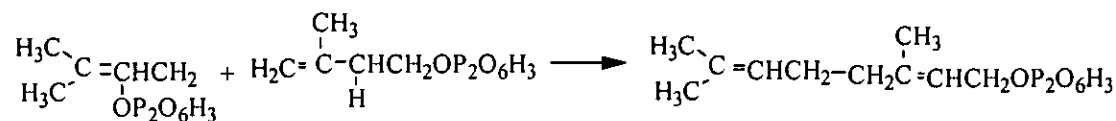
Isomerização



Pirofosfato de 3-isopentenilo

Pirofosfato de dimetilalilo

Uma molécula do pirofosfato de 3-isopentenilo e uma de pirofosfato de dimetilalilo unem-se para formar o pirofosfato de geranilo (C₁₀), o principal intermediário para a formação dos monoterpenos.

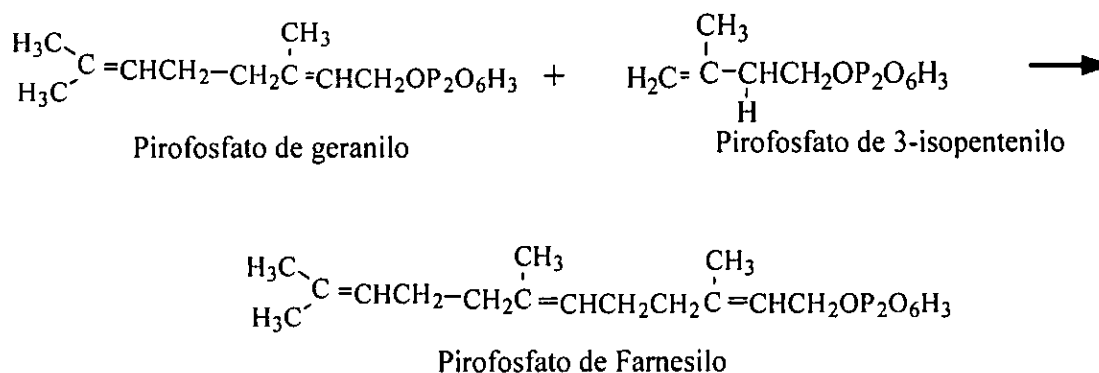


Pirofosf. de dimetilalilo

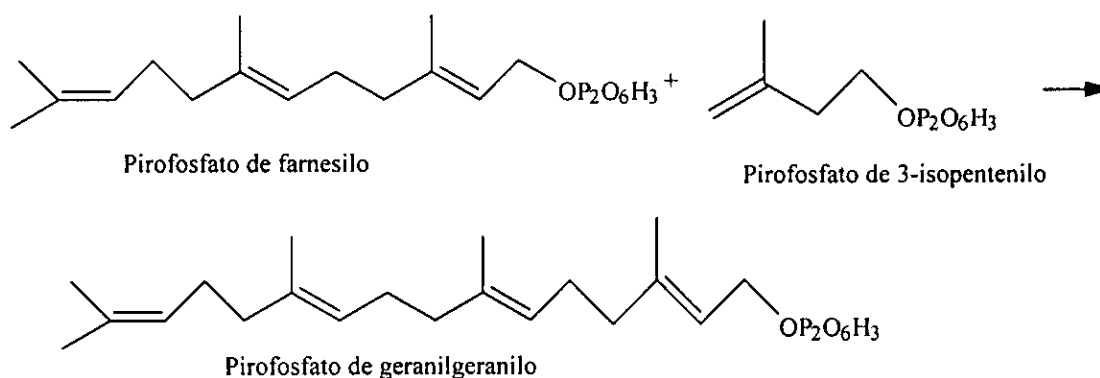
Pirofosf. De 3-isopentenilo

Pirofosfato de geranilo

Os pirofosfato de geranilo e o de 3-isopentenilo unem-se por sua vez para formar o pirofosfato de farnesilo (C₁₅), o precursor para a síntese dos sesquiterpenos.



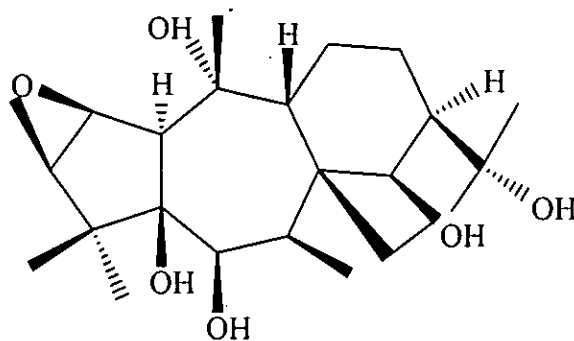
Os diterpenos são formados por união de uma molécula do pirofosfato de farnesilo com uma unidade pirofosfato de 3-isopentenilo, conforme ilustra o esquema:



O pirofosfato de geranilgeranilo (C₂₀) é o precursor dos Diterpenos.

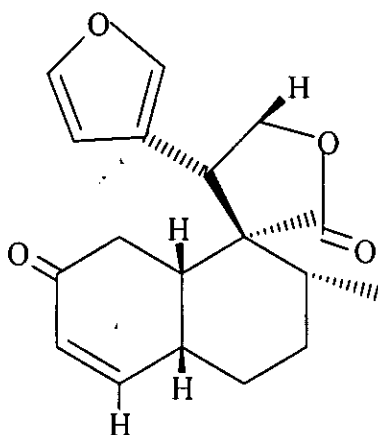
4.3 Actividade biológica dos diterpenos

Os diterpenos possuem actividade biológica variada. Eles apresentam diversas funções tanto nos vegetais bem como nos animais. Por exemplo, a rodojaponina III (IX), um diterpeno isolado das flores da *Rhododendron molle*, mostrou forte actividade contra os besouros, especialmente contra as larvas de *Leptinotarsa decemlineata* [9].



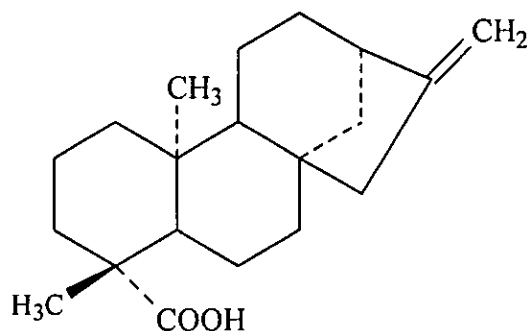
IX

Os diterpenos isolados da família Euphorbiaceae são notoriamente carcinogénicos ao Homem, entretanto apresentam actividade supressora do apetite. O cis-desidrocatonina (X), obtido da *Croton Cajucara*, é um inibidor do crescimento da *Heliothis virescens* [9].



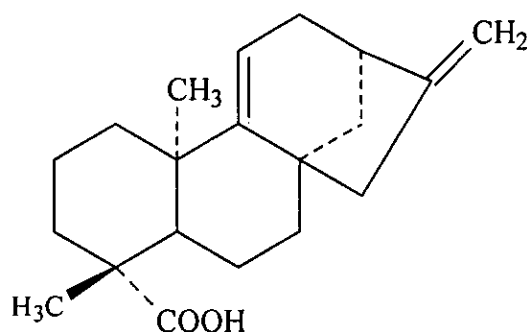
X

O diterpeno ácido ent- Kaur-16-en-19-oico (XI), foi isolado do extracto etanólico das partes aéreas da planta *Mikania obtusata* [1] e possui actividade contra o agente causador da doença de Chagas (American trypanosomiasis), o protozoário *Trypanosoma cruzi*.



XI

No entanto, o mesmo diterpeno (XI) e o ácido 9 (11), 16-Kauradien-19-oico (XII), foram isolados do extracto do diclorometano das raízes da *Melantheria albinervia* e descobriu-se que estes possuíam actividade contra o mosquito causador da febre amarela, *Aedes aegypti* [19].



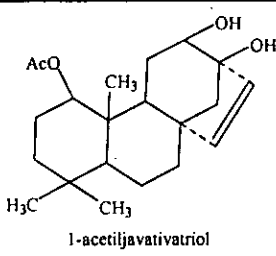
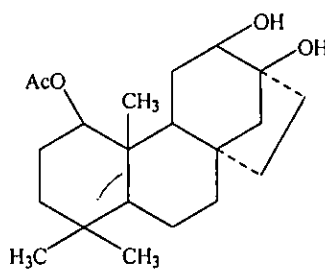
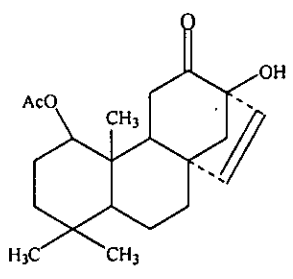
XII

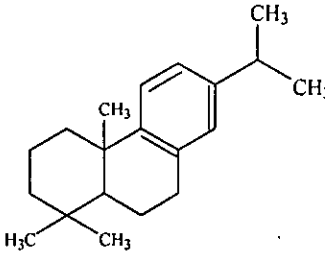
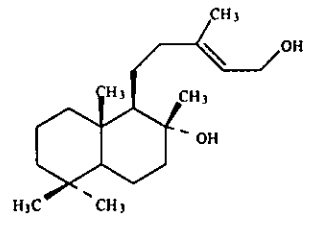
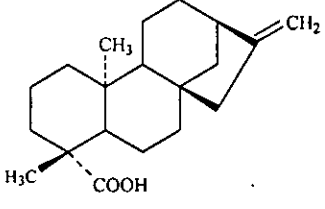
4.3.1 Diterpenos com actividade antimicrobiana

Os agentes antimicrobianos são drogas usadas para o tratamento de infecções causadas por micróbios.

A tabela a seguir mostra alguns diterpenos naturais (de diferentes famílias) com essa actividade.

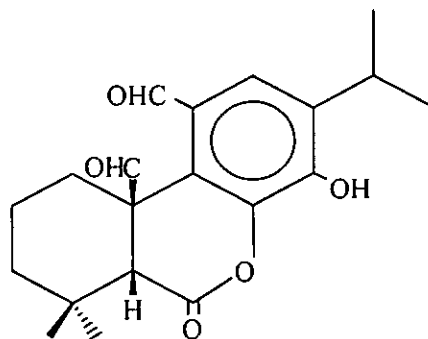
Tab. 1 Diterpenos naturais com actividade antimicrobiana. [3, 2, 19]

Planta	Estrutura	Actividade	Parte da planta
Sideritis	 <p>1-acetiljavatatriol</p>	Antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (S. Aureus, B.subtilis e M. phlei) e contra a levedura (C.Albicans)	Partes aéreas
Sideritis		Antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (S. Aureus, B.subtilis e M. phlei)	Partes aéreas
Sideritis		Antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (S. Aureus, B.subtilis e M. phlei) e contra a levedura (C.Albicans)	Partes aéreas

Prumnopitys andiana (Podocarpaceae)		Antimicrobiana contra Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Escherichia coli e Pseudomonas sp.	casca
Cistus incanus (Cistaceae)		Antimicrobiana contra Staphylococcus aureus, Staphylococcus epideridis, Pseudomonas aeruginosae, Escherichia coli, etc	folhas
Melantheria albinervia (Asteraceae)		Anti bacteriana contra Bacillus subtilis	Raízes

4.3.2 Diterpenos com actividade antiviral

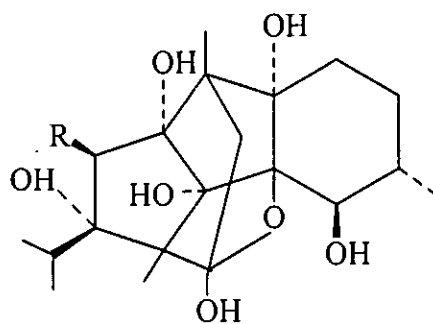
As plantas podem também ser fontes de diterpenos com actividade antiviral. Como exemplo, destaca-se o isolamento do diterpeno *Safficinolide* (XIII), com potente actividade contra o vírus VSV (*Vascular stomatitis Virus*), isolado da planta *Salvia Officinalis* [21].



XIII

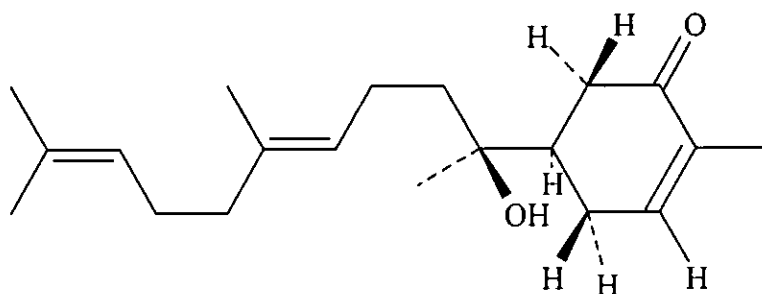
4.3.3 Diterpenos com actividade insecticida

Alguns diterpenos com actividade insecticida foram já isolados. Podem-se salientar os casos de *Ryanadol* (**XIV_a**), *Cinnceylanol* (**XIV_b**), ambos isolados da planta *Persea indica* e o diterpeno (**XV**) isolado da planta *Croton linearis*.



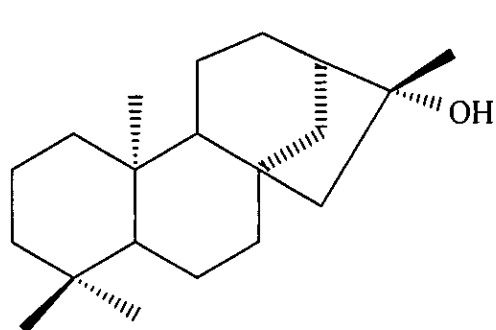
XIV_a- R= OH

XIV_b- R= H

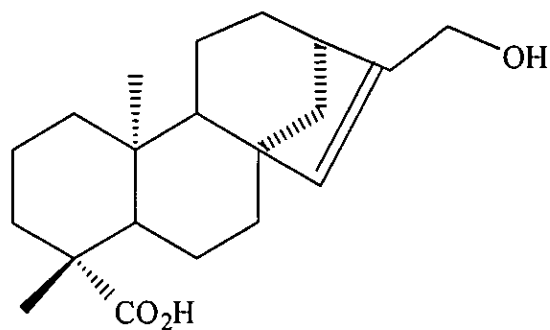


XV

Foram também isolados diterpenos com actividade insecticida a partir de plantas da espécie *Solidago*, nomeadamente *S. Nemoralis* e *S. Altissima*. Alguns desses compostos são o ent- kauran-16 α -ol (**XVI**) e o ácido 17-hidroxi-ent-kaur-15-en-19-oico (**XVII**) [13].



XVI



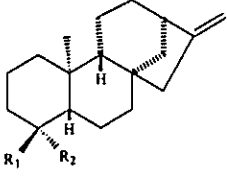
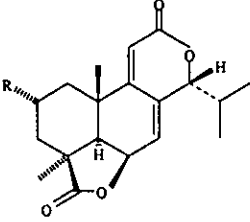
XVII

4.3.4 Diterpenos com outras actividades

A tabela a seguir mostra alguns diterpenos naturais com outras actividades biológicas, para além das referidas anteriormente.

Tab. 2 Diterpenos naturais com diversas actividades [19, 6, 13]

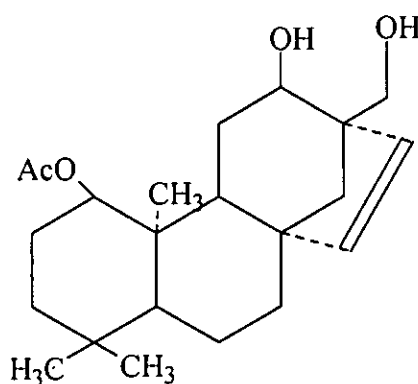
Planta	Família	Estrutura	Actividade	Parte da planta
Euphorbia Calyptrata	Euphorbiaceae		Antidepressante no CNS*	Raízes
Euphorbia Calyptrata	Euphorbiaceae		Antidepressante no CNS	Raízes
Croton Cajucara	Euphorbiaceae		Antiinflamatória	Caule

Mikania Banisteriae	Asteraceae	 <p>1 R1 = COOH, R2 = CH3 2 R1 = CH2OH, R2 = CH3 3 R1 = =CH2Ac, R2 = CH2OAc</p>	Antinflamatória e insecticida	Partes aéreas
Podocarpus nagi	Podocarpaceae	 <p>1 R = OH 2 R = H</p>	Antifúngica	raízes

* Sistema Nervoso Central

4.4 Relação entre estrutura e actividade antimicrobiana dos diterpenos.

Estudos feitos sobre agentes antimicrobianos das espécies *Sideritis* da Espanha [3] mostraram que alguns diterpenóides naturais e sintéticos eram activos contra as bactérias gram-positivas. Refere-se que os grupos hidroxilo das posições 12 e 17 são responsáveis por esta actividade.

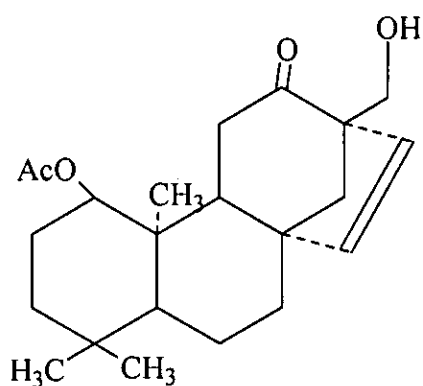


XVIII- 1-acetiljativatriol

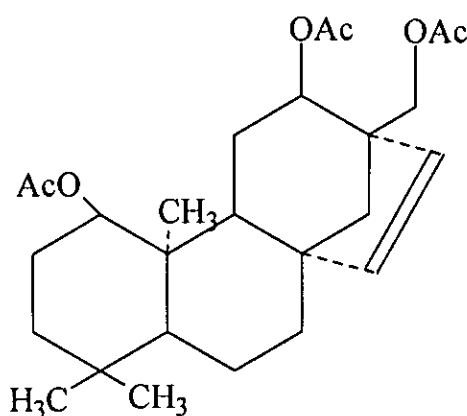
A investigação mostra ainda que o 1-acetiljativatriol (composto **XVIII**) foi o primeiro diterpenóide natural ent-beyerénico para o qual foi provada a existência de actividade antimicrobiana.

No referido trabalho concluiu-se que:

- A principal causa da actividade antimicrobiana é a existência do grupo 12,17-dihidroxílico, mas este deve estar acompanhado por uma função não polar tal como o grupo acetoxi no composto **XVIII**.
- A ligação dupla entre os C₁₅ e C₁₆ não é essencial para a actividade antimicrobiana.
- Se o grupo hidroxilo estiver em C₁, não se verifica actividade antimicrobiana.
- Se a estrutura 12,17-dihidroxilo for bloqueada por tratamento com acetona, não se verifica actividade antimicrobiana.
- O produto obtido após oxidação em C₁₂ (composto **XIX**) também foi activo.
- O composto **XX** também demonstrou possuir actividade antimicrobiana.



XIX



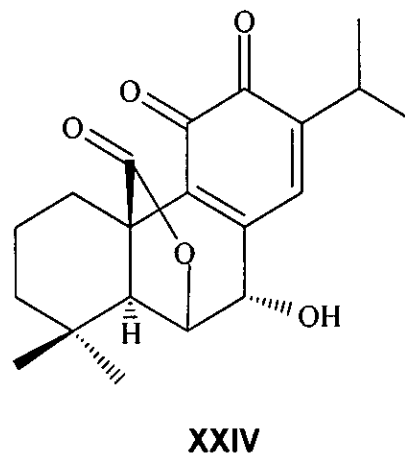
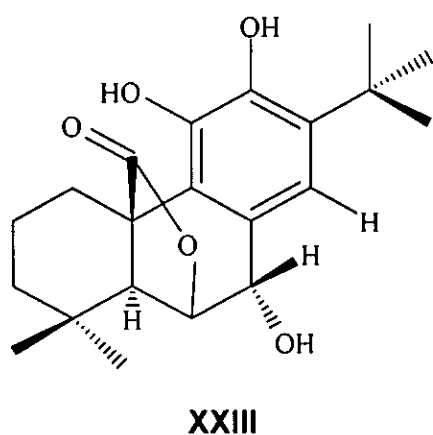
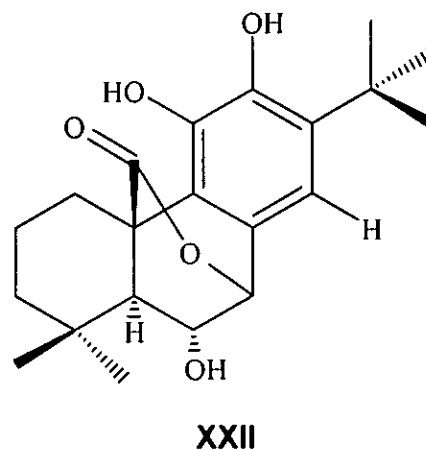
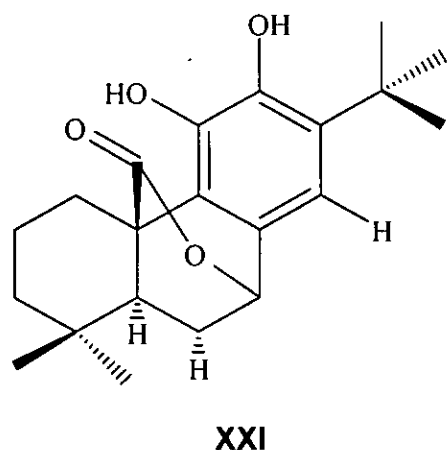
XX

Um outro estudo efectuado que elucida a relação entre a estrutura e a actividade antimicrobiana dos diterpenos foi feito em relação às plantas da espécie *Salvia*, de onde foram isolados diterpenos cuja actividade contra bactérias gram-positivas foi avaliada [14].

O estudo mostra que os grupos hidroxilo das posições 11 e 12 (Catechol livre, são essenciais para a existência de actividade antimicrobiana.

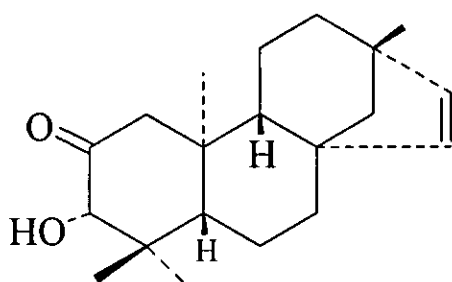
Dos vários diterpenos isolados notou-se que:

- Um composto bastante activo (composto **XXI**) continha dois grupos hidroxilo nos Carbonos vizinhos C₁₁ e C₁₂. No entanto, mais um grupo hidroxilo adicional causou um decréscimo na actividade (Composto **XXII** e **XXIII** com mais um grupo hidroxilo em C₆ e C₇, respectivamente). Por outro lado, mesmo na presença deste grupo hidroxilo adicional, a actividade aumentava se os grupos hidroxilo em C₁₁ e C₁₂ fossem oxidados a compostos ceto, como mostra a estrutura do composto **XXIV**.



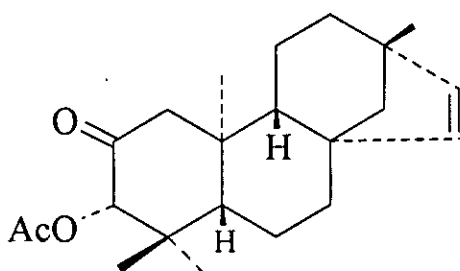
4.5 Diterpenos e Difenóis isolados da planta *Spirostachys Africana*.

Estudos fitoquímicos efectuados sobre a planta *Spirostachys Africana* resultaram no isolamento de novos diterpenos [23]. O primeiro foi o ent-3 β -hidroxi-beyer-15-ene-2-ona (**XXV**) seguinte estrutura:



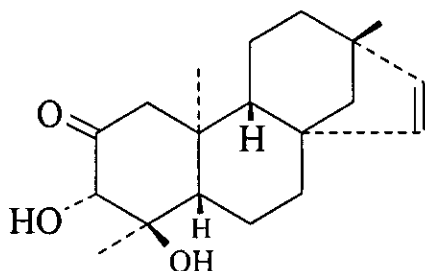
XXV

Preparou-se o derivado do composto acima referido por acetilação, resultando no composto **XXVI**.



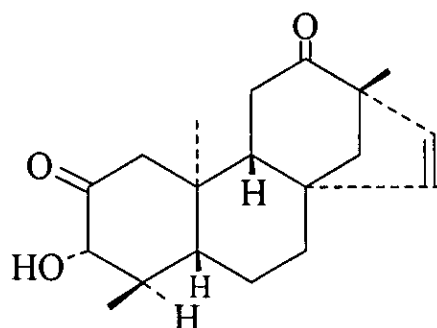
XXVI

O segundo composto isolado foi o ent-3 β ,18-dihidroxi-beyer-15-ene-2-ona **XXVII**.

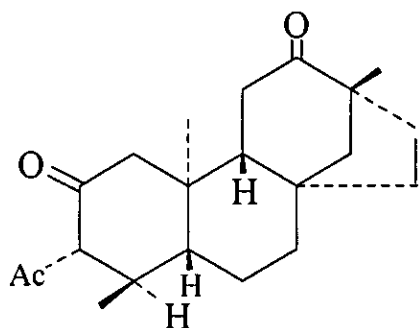


XXVII

Por fim foi isolado o composto ent-3 β -hidroxi-19-nor-beyer-15-ene-2,12-diona (XXVIII), cuja acetilação produziu o composto XXIX.



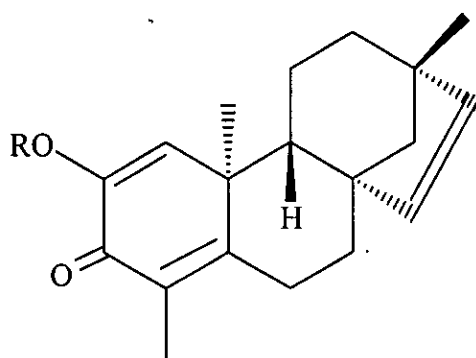
XXVIII



XXIX

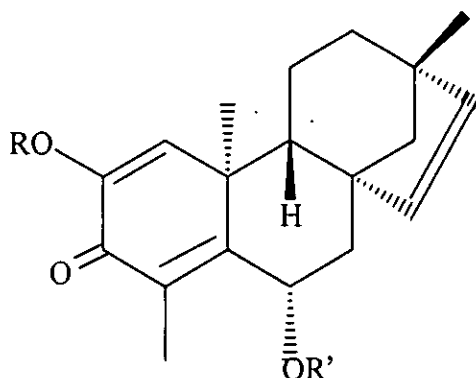
No entanto, foram também isolados do látex do cerne da *Spirostachys Africana*, difenóis da classe do stachene [15].

O primeiro a ser isolado foi o ent-2-hidroxi-norbeyer-1,4,15-trien-3-ona (XXX_a) cujo derivado por acetilação foi preparado, tendo-se obtido o ent-2-Acetil-norbeyer-1,4,15-trien-3-ona (XXX_b).

XXX_a- R = HXXX_b- R = Ac

O segundo difenol a ser isolado foi o ent-2,6 β -dihidroxi-norbeyer-1,4,15-trien-3-ona (XXXI_a). A acetilação deste resultou no difenol diacetato XXXI_b (ent-2,6 β -

diacetil-norbeyer-1,4,15-trien-3-ona) e no monoacetato ent-2-acetil-6 β -hidroxi norbeyer-1,4,15-trien-3-ona **XXXI_c**.

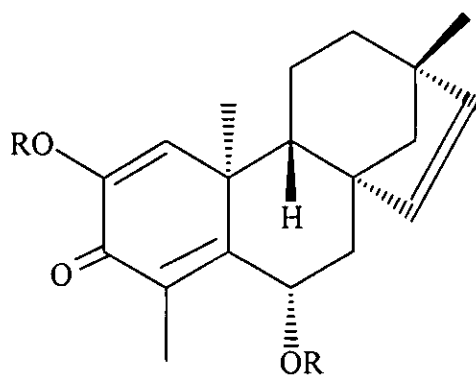


XXXI_a- R = R' = H

XXXI_b - R = R' = Ac

XXXI_c - R = Ac, R' = H

Por fim foi isolado o difenol ent-2,6 α -dihidroxi-norbeyer-1,4,15-trien-3-ona (**XXXII_a**). O diacetato correspondente é o **XXXII_b**.



XXXII_a- R = H

XXXII_b- R = Ac

5. CARACTERIZAÇÃO E DESCRIÇÃO DA PLANTA EM ESTUDO— SPIROSTACHYS AFRICANA (EUPHORBIACEAE).

A planta *Spirostachys Africana*, vulgarmente chamada *Mubandua* (em Moçambique) possui uma madeira extremamente dura que se caracteriza pela sua cor negra e perfume agradável. É usada apenas para o fabrico de objectos de luxo por ser rara e simples de trabalhar. Possui uma altura de 10 a 15 metros com folhas de forma oval ou elíptica.

Esta planta ocorre com frequência na região sul de África, em especial em Moçambique, Zimbabwe, Botswana e África do Sul. [17]

5.1 Informação medicinal

A planta *Spirostachys Africana* tem sido usada para os seguintes propósitos na medicina tradicional:

- Inchaço abdominal

Para aliviar este problema, usam-se raízes da planta *Adenga Multiflorum*, o bolbo da *Uriginea altissima* e as raízes da *Spirostachys Africana* [7].

- Tuberculose

Usam-se as raízes da *Cissus rotundifolia*, *Fagara humulis*, *Spirostachys Africana* e *Sarcostema Viminale* para o tratamento desta doença.[7]

O artigo publicado por Zvitendo et al [23] afirma que pedaços da madeira desta planta podem ser colocados na roupa como repelentes de insectos e para proteger sementes armazenadas. Afirma ainda que o seu látex pode ser usado como purgativo e como emético, que possui propriedades irritantes e é acre.

No entanto segundo Pelgarve [17], o látex é tóxico e pode causar profundas irritações da pele. A serradura pode causar cegueira. A inalação de fumos da lenha pode causar dores de cabeça e náuseas, daí que não se recomenda o seu

uso como combustível. A comida directamente exposta a esses fumos pode tornar-se venenosa.

5.2 Aplicação da *Spirostachys Africana* no tratamento da malária em Moçambique

Estudos da planta *Spirostachys Africana* feitos por Jurg, A. et al [10] indicam que os extractos aquoso, etanólico e do éter de petróleo foram testados para actividade antimalárica. Notou-se que após 48 horas de incubação ocorreu uma redução considerável de esquizontes; isto é, houve redução considerável de parasitas para o caso dos pacientes tratados. Assim, isto revela que estas plantas mostraram resultados promissores no combate à malária.

Conseguiu-se inibir a proliferação do *P. Falciparum* em proporções que dependiam da concentração do extracto da planta, à excepção dos extractos brutos de éter de petróleo das folhas da *Spirostachys Africana*.

Uma apreciação de interesse neste trabalho vai para as raízes da *Spirostachys Africana* cujo extracto etanólico causou cerca de 38.6% de inibição no crescimento dos parasitas, para uma concentração de 0.05 µg/ml. Deve-se salientar que todos os extractos brutos mostraram mais que 50% de inibição à concentração de 500 µg/ml, mas esta não é recomendável devido à dosagem aconselhável aos doentes.

6. TÉCNICAS E MÉTODOS DE ANÁLISE DE PLANTAS

6.1 Extracção

A extracção é uma técnica usada para separar um componente de uma mistura por meio de um solvente.

Esta técnica é bastante usada para separar substâncias de soluções ou suspensões líquidas (extracção líquido-líquido); ou para separar uma substância de um sólido por meio de um solvente (extracção sólido-líquido).

A extracção líquido-líquido consiste na agitação de duas soluções imiscíveis, num funil de separação, deixando em repouso durante algum tempo até separação nítida das duas camadas. Os diferentes solutos presentes distribuem-se entre as fases de acordo com as suas solubilidades relativas.

6.1.1 Métodos de extracção usados

Para o presente trabalho, foi usada a extracção sólido-líquido, que por sua vez engloba os seguintes métodos usados:

- Maceração
- Soxhlet

6.1.1.1 Maceração

A Maceração consiste em submeter um material sólido previamente moído à acção de um solvente à temperatura ambiente. Algumas substâncias do sólido solubilizam-se no solvente de acordo com a sua polaridade.

6.1.1.2 Soxhlet

A extracção em Soxhlet consiste num processo de extracção exaustiva de um sólido por meio de um líquido, onde se efectua um refluxo durante um certo tempo até descoloração do material em extracção contido no interior de um cartucho de material poroso.

O extractor Soxhlet está ilustrado na Figura 1.

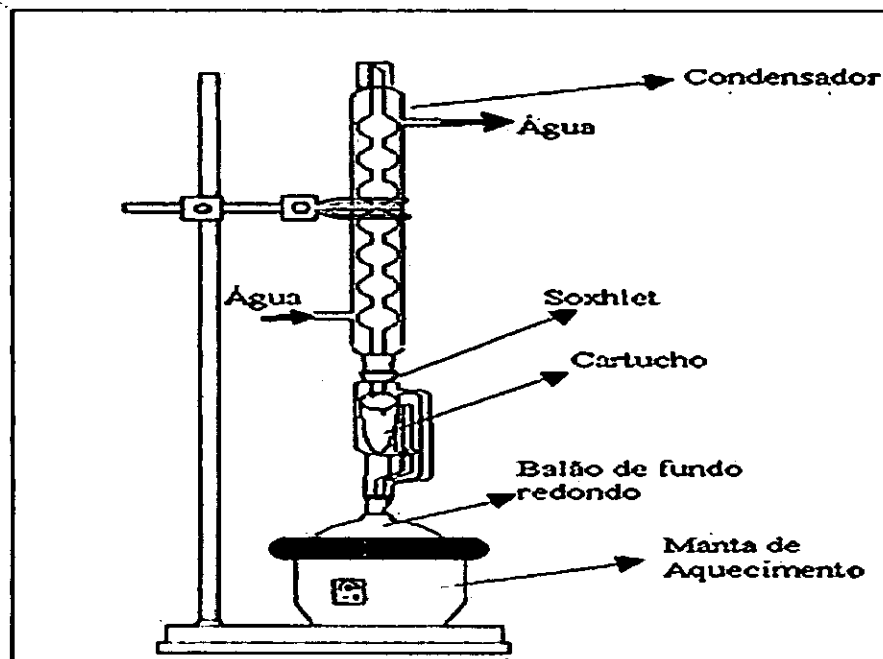


Figura 1. Extractor Soxhlet usado para extracção de amostras brutas de plantas

7. MÉTODOS DE ANÁLISE USADOS

7.1 Métodos Cromatográficos

A Cromatografia pode ser definida como uma técnica usada para separar e identificar os componentes de uma mistura e baseia-se nas diferentes velocidades de arrastamento dos solutos por um determinado solvente, num meio apropriado.

A cromatografia, por si ou associada a outra técnica, constitui uma das técnicas mais importantes da actualidade, pois para além de ser aplicada na área de separação dos componentes de uma mistura, serve também para a purificação e identificação desses componentes.

Existem diferentes técnicas Cromatográficas:

- Cromatografia em Papel;
- Cromatografia em Camada Fina (TLC);
- Cromatografia Gás - Líquido (GLC);
- Cromatografia Gás - Sólido (GSC);
- Cromatografia Líquida de Média Pressão (MPLC);
- Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC); etc.

As técnicas Cromatográficas usadas no presente trabalho são: Cromatografia Líquida de Média Pressão, Cromatografia em Camada Fina e Cromatografia em Camada Fina Preparativa.

7.1.1 Cromatografia Líquida de Média Pressão (MPLC)

É uma técnica usada para separação de misturas. Nesta, a adsorção ocorre no interior de um tubo contendo o adsorvente empacotado e uma mistura a separar. No fracionamento dos componentes da mistura, estes são separados de acordo com as suas polaridades.

A Cromatografia Líquida de Média Pressão pode também ser usada como uma técnica de pré-purificação.

O esquema da MPLC está representado na Figura 2.

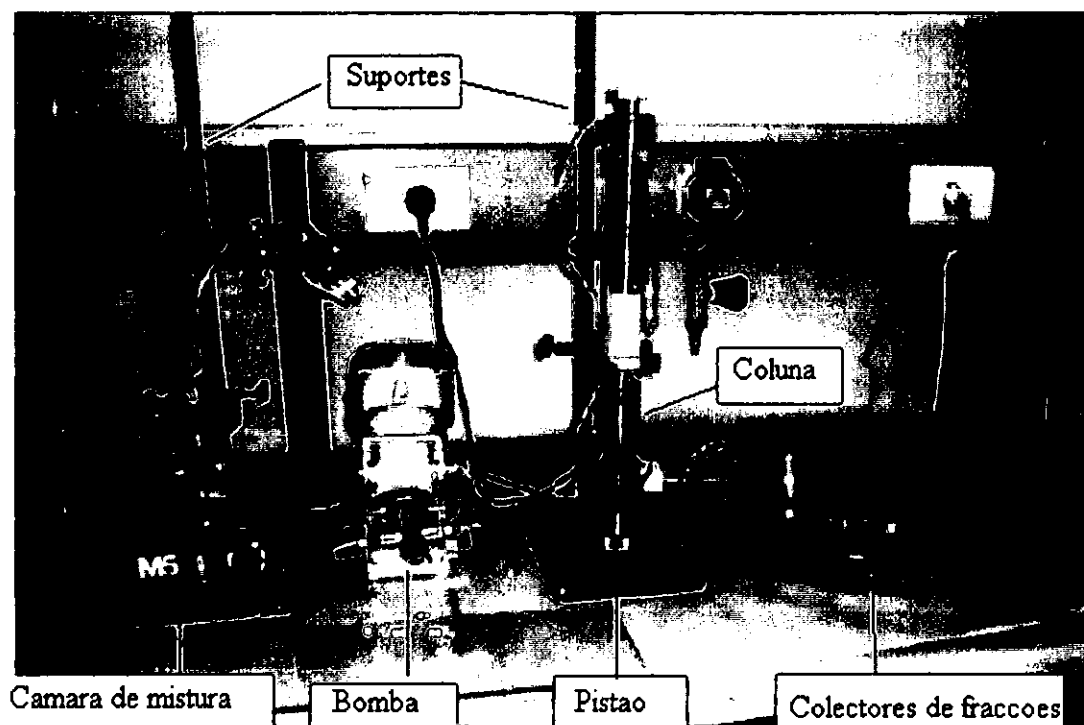


Figura 2. Esquema do MPLC

7.1.2 Cromatografia em Camada Fina (TLC) [22]

A Cromatografia em Camada Fina é um tipo de Cromatografia de adsorção, na qual os componentes de uma mistura são adsorvidos à superfície do sólido (por interacção dipolo-dipolo), a diferentes velocidades, à medida que a fase móvel se desloca ao longo da fase estacionária. O factor que condiciona a separação é a diferença de afinidades que as substâncias a separar têm, entre a fase estacionária e a móvel (eluente), requerendo neste caso que os compostos da mistura sejam polares.

A Cromatografia em Camada Fina apresenta várias vantagens em relação às outras técnicas cromatográficas, algumas das quais são:

- Uso de pequenas quantidades de solvente;
- A polaridade do solvente ou o tipo de mistura de solvente pode ser alterado em pouco tempo;

- Permite que se analisem na mesma placa várias amostras ao mesmo tempo. Numa placa 20 x20 cm podem-se analisar simultaneamente cerca de vinte amostras.
- É uma técnica de baixo custo.

A maior desvantagem da TLC consiste na dificuldade de pulverização uniforme da amostra contida na camada adsorvente nas placas de suporte; isto é, para a revelação usando reagentes apropriados, torna-se difícil pulverizar uniformemente a amostra na placa de modo que as manchas apareçam a um mesmo nível de visualização.

Aplicação da amostra

A amostra a analisar é geralmente aplicada na forma de um pequeno ponto (um a dois centímetros de diâmetro), colocado a cerca de um a dois centímetros da extremidade inferior da placa.

A aplicação pode ser feita com uma microseringa ou com um capilar de vidro. Deve aplicar-se amostras tão pequenas quanto possível, de modo a minimizar a largura dos rastros e a sobreposição das manchas.

Se a solução da amostra a aplicar for muito diluída, deve-se fazer várias aplicações no mesmo ponto, deixando o solvente evaporar entre cada aplicação, de forma a não deixar alastrar a mancha.

Deve-se também ter o cuidado de não perfurar o adsorvente, caso contrário o eluente pode percorrer a placa de forma desigual.

É necessário indicar a altura a que se faz a aplicação da amostra com um pequeno traço num dos bordos da placa.

Fase móvel

O sucesso da TLC depende em grande parte da escolha adequada da fase móvel que permitirá a separação dos componentes.

Os solventes a serem usados para a fase móvel devem ser puros. Alguns são higroscópicos e podem ser afectados pela humidade, diminuindo a reprodutibilidade.

Deve-se também ter em conta as condições e o tempo de armazenamento destes solventes.

Quando se usa uma mistura de solventes, esta não deve ser usada repetidamente, pois a mistura pode sofrer alteração da composição devido a humidade, ou componente mais volátil pode evaporar-se quando se abre a tina. Para se alcançar resultados mais reprodutíveis, a tina cromatográfica deve estar saturada de vapor do eluente, o que pressupõe uma preparação antecipada.

Fase estacionária

A fase estacionária (adsorvente) pode ser a Sílica-Gel, Alumina (Al_2O_3) ou um determinado tipo de celulose.

Pode-se incorporar à Sílica-Gel indicadores Ultra-Violeta de modo a facilitar a localização dos componentes separados através da absorção da luz U.V. aos comprimentos de onda de 254 e 366 nm.

Desenvolvimento das placas

Desenvolvimento em Cromatografia em Camada Fina (TLC) é o processo no qual a fase móvel percorre a camada adsorvente de modo a separar os diferentes componentes da amostra.

A forma mais comum para o desenvolvimento das placas em TLC é a subida do solvente no sentido ascendente da placa, embora sejam também conhecidas outras tais como desenvolvimento descendente e horizontal.

Métodos de visualização

Para que a técnica de visualização seja considerada ideal em TLC deve corresponder aos seguintes requisitos:

- ✓ Permitir a visualização quantitativa dos componentes, na ordem de μg ;
- ✓ Oferecer uma área visualizada que seja suficientemente estável na sua aparência.
- ✓ Distinguir satisfatoriamente a área visualizada do fundo;
- ✓ Dar uma área suficientemente estável e adequada a medidas quantitativas, se necessário.

Existem dois métodos de visualização principais:

- Métodos físicos — exemplo: uso da luz Ultra Violeta;
- Métodos químicos — exemplo: reacção da solução vanilina- ácido sulfúrico para produzir uma mancha com determinada cor.

Os métodos de visualização podem também ser destrutivos (aplicação da mistura ácido sulfúrico/vanilina para revelação) ou não destrutivos (uso da luz U.V. ou dos vapores de iodo, sendo este último um método químico não destrutivo).

O reagente de revelação é aplicado usando um pulverizador (Figura 3)



Fig. 3 Pulverizador

Determinação do R_f

O R_f é uma grandeza que exprime a razão entre a distância percorrida pela substância ao longo da placa e a distância percorrida pelo eluente.

A fórmula para a determinação do R_f é dada por:

$$R_f = a / x$$

Onde:

a – distância desde o ponto de aplicação das amostras até ao centro da mancha.

X – distância desde o ponto de aplicação (linha de base) até à linha de frente do solvente.

Pode-se dizer que o valor do R_f é um valor constante para cada substância se forem usadas as mesmas condições operacionais.

Sendo o R_f função de vários parâmetros, torna-se evidente a dificuldade de identificar uma substância exclusivamente a partir do seu valor, pois as condições teriam que ser minuciosamente controladas para se poder obter resultados reprodutíveis e conclusivos.

Assim, o R_f é um valor indicativo mas não conclusivo pois apenas pode fornecer uma indicação da possível identidade da substância, sem no entanto dar uma conclusão segura.

7.1.3 Cromatografia em Camada Fina Preparativa [22]

É uma Cromatografia em Camada Fina na qual a amostra é aplicada na forma de banda, geralmente numa placa de dimensões 20x20 cm e envolve quantidades relativamente maiores que a TLC simples.

Esta Cromatografia é usada para o isolamento de substâncias cujos R_f difiram significativamente em TLC simples.

As placas usadas nesta técnica possuem uma camada adsorvente maior que as da TLC simples.

Uma das grandes vantagens desta técnica é a fácil remoção das zonas separadas da placa, que podem posteriormente ser extraídas e filtradas.

As condições necessárias para o desenvolvimento das placas em Cromatografia em Camada Fina Preparativa podem ser experimentalmente determinadas com antecedência e rapidez usando a TLC simples.

8. PARTE EXPERIMENTAL

A parte experimental consiste no trabalho elaborado de acordo com os objectivos já referidos, tendo em conta as condições técnicas e materiais disponíveis.

Uma vez que as amostras usadas tinham já sido recolhidas, esta parte do trabalho começou apenas com a preparação das amostras, seguindo o esquema geral da Figura 4.

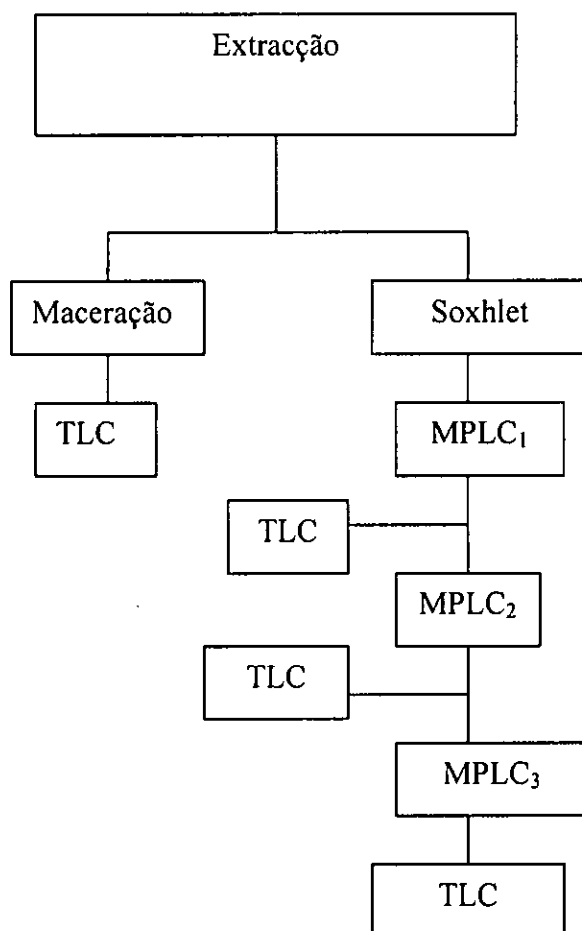


Figura 4 Esquema geral do trabalho.

8.1 Extracção

Para a realização do presente trabalho foram seguidos dois procedimentos usados em trabalhos já publicados para o caso do cerne [23], raízes e folhas [10]. O primeiro consiste na maceração das raízes secas em pó durante vinte e quatro horas no solvente apropriado. O outro consiste na extracção por Soxhlet durante o mesmo período num determinado solvente.

8.1.1 Extracção das raízes da *Spirostachys Africana* por maceração

150 g de raízes secas em pó foram submetidas a extracções sucessivas por maceração durante 24 horas com agitação, em éter de petróleo (1.2 l), álcool metílico (1.0 l) e água (1.0 l). Depois da filtração, cada filtrado foi evaporado no rotavapor, deixando o respectivo resíduo em repouso à temperatura ambiente para evaporação completa do solvente, seguindo-se assim a extracção subsequente com o outro solvente.

A extracção em éter de petróleo resultou na formação de um extracto castanho claro, após concentração no rotavapor.

A extracção por maceração em metanol e em água resultou em extractos de cor castanho escuro.

As quantidades obtidas foram as seguintes:

- ✓ Extracto bruto do Éter de Petróleo = 160 mg
- ✓ Extracto bruto do Metanol = 510 mg
- ✓ Extracto bruto da Água = 860 mg

Os extractos obtidos de cada solvente foram submetidos a análises por TLC, tendo-se verificado uma complexidade de manchas, conforme mostra o cromatograma TLC₁ no Anexo1.

8.1.2 Extracção das raízes da *Spirostachys Africana* por Soxhlet

Para esta técnica usaram-se dois procedimentos de extracção diferentes.

- i) 200 g de raízes secas em pó foram submetidas à extracção por Soxhlet durante 24 horas, seguindo a mesma sequência de solventes que a usada em extracção por maceração. Foram efectuadas diferentes operações, introduzindo em cada cartucho as raízes secas em pó em quantidades que dependiam da capacidade do mesmo. Isto levou com que o volume de solvente usado nesta extracção fosse mais elevado que em maceração, a mencionar: 1.6 l de éter de petróleo; 1.8 l de álcool metílico e 1.8 l de água.

O extracto obtido da extracção com éter de petróleo por Soxhlet apresentou cor castanho claro, enquanto que o obtido pela extracção pela mesma técnica usando os solventes metanol e água eram de cor castanho escuro.

As quantidades obtidas foram as seguintes:

- ✓ Extracto bruto do Éter de Petróleo = 1360 mg
- ✓ Extracto bruto do Metanol = 3480 mg
- ✓ Extracto bruto da Água = 3220 mg

- ii) 10 g de raízes secas em pó foram submetidos a extracção em Soxhlet em 200 ml de uma mistura n- Hex /EtOAc (1:1) durante 24 horas [3] . Lavou-se o extracto com Na_2CO_3 , secou-se com MgSO_4 anidro e evaporou-se à secura.

Obteve-se 200mg de um extracto castanho claro.

Os cromatogramas referentes a estas extracções mostraram uma complexidade de manchas, como mostra a TLC1 no Anexo 1.

8.2 Cromatografia em Camada Fina (TLC)

Os extractos brutos e as diferentes fracções obtidas após fraccionamento por MPLC foram submetidos à análise por TLC, usando as seguintes condições cromatográficas:

- **Fase estacionária**

Sílica-gel 60 F₂₅₄ (MERCK) sobre placas de Alumínio 5 x 20 cm e de vidro 20 x 20 cm.

- **Fase móvel**

Mistura n-Hexano : EtOAc (8:2).

- Tinas cromatográficas para o desenvolvimento das placas.
- Tubos Capilares
- Pulverizador

Aplicação da amostra

O extracto bruto metanólico das raízes foi dissolvido em diclorometano e aplicado em placas cromatográficas, a uma distância de 1 cm da extremidade inferior usando capilares de 2µl, mantendo uma separação mínima de 1 cm entre os pontos de aplicação.

Desenvolvimento das placas

As placas foram introduzidas em tinas cromatográficas previamente saturadas, tendo o cuidado de o nível do solvente de eluição não atingir os pontos de aplicação da amostra durante a imersão.

A eluição foi feita de modo que fase móvel migrasse no sentido ascendente da placa.

Sistema de detecção

As manchas foram visualizadas usando uma lâmpada U.V. a 254 e 366 nm. Após eluição, usou-se para a revelação o reagente Vanilina - ácido fosfórico, preparado dissolvendo 1 grama de vanilina em 50 ml de Ácido Fosfórico e 50 ml de Etanol. Esta mistura reveladora foi aplicada usando um frasco spray (pulverizador). As placas foram seguidamente levadas à placa eléctrica de aquecimento durante cerca de 3 minutos à temperatura de 100 °C.

8.3 Fraccionamento por Cromatografia Líquida de Média Pressão

Enchimento e montagem da coluna MPLC

Material usado:

- Coluna cromatográfica com respectivos acessórios
- Dois suportes com respectivas garras
- Agitador magnético
- Bomba de Média Pressão
- Funis
- Tubos de ensaio dispostos num *carrossel*.

Fixa-se o pistão numa das extremidades da coluna introduzindo-se depois 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 5 cm. Esta introdução deve ser feita de forma contínua, comprimindo-se muito bem com ajuda de um ponteiro de modo que o eluente percorra uniformemente a coluna. Procede-se da mesma maneira para a introdução da

amostra na coluna, separando-a da sílica-gel por meio de um filtro. Compacta-se a amostra sobre a sílica-gel e coloca-se um filtro na extremidade superior. Introduce-se então o outro pistão, fixando-o cuidadosamente. Monta-se finalmente a coluna para a eluição.

8.3.1 Fraccionamento do extracto metanólico das raízes da *Spirostachys Africana* obtido por Soxhlet.

Apenas o extracto bruto do Metanol foi submetido à Cromatografia Líquida de Média Pressão (MPLC), isto na tentativa de isolar os produtos cujas manchas correspondiam aos produtos principais que possuíam a cor violeta.

O sistema de solventes usado foi n-Hex / EtOAc (V/V) nas proporções 95/5; 90/10; 15/85; 20/80; 25/75; 30/70; 35/65; 40/60; 50/50; e 100% de EtOAc.

Para um ensaio preliminar pesou-se 0.25 g do extracto metanólico. O fraccionamento na MPLC resultou em 23 fracções das quais após uma TLC (TLC2 no Anexo 2) usando o sistema de solventes n-Hex / EtOAc verificou-se que:

- As fracções 1-3 não apresentaram nenhuma mancha;
- A fracção 4 apresentou duas manchas visíveis apenas quando reveladas pelo revelador vanilina – ácido fosfórico. (R_f 0.64 e 0.75)
- As fracções 5,6,7 foram agrupadas pois apresentaram manchas semelhantes. Nesta TLC, verificou-se que as manchas dos compostos principais com R_f 0.54; 0.64 e 0.78 eram visíveis a 254 nm e quando revelados com o revelador Vanilina - ácido fosfórico apresentavam cor violeta, mudando depois para castanho claro.
- As fracções 8, 9 e 10 foram também agrupadas por apresentarem manchas com as mesmas características, embora representando uma mistura complexa. Apesar disso, estas fracções mostraram uma forte presença do composto principal devido à existência de uma mancha bem nítida aos 254 nm, e de cor violeta intenso após

revelação com Vanilina - ácido fosfórico, embora esta se tenha tornado amarela após algum tempo.

- As fracções 10-23 mostraram na TLC uma complexidade de manchas.

Após concentração das fracções misturadas, notou-se que realmente não tinha havido uma separação clara ou isolamento de algum composto.

Efectuou-se um segundo fraccionamento em MPLC, usando desta vez 1.0 g de extracto bruto, nas mesmas condições que na coluna anterior. Desta, resultaram 33 fracções para as quais realizou-se uma TLC (TLC3 no Anexo 3) onde se verificou que:

- As fracções 1-7 não apresentaram nenhuma mancha.
- As fracções 8, 9, 10 foram agrupadas por apresentarem manchas semelhantes, bem nítidas a 254 nm.
- As fracções 11-16 foram agrupadas por apresentarem manchas semelhantes visíveis a 254 nm e quando reveladas com vanilina-ácido fosfórico (cor violeta que desapareceu com o tempo).
- As fracções 17-23 foram agrupadas por apresentarem manchas semelhantes embora com alguma complexidade, visíveis a 254 nm e quando reveladas com vanilina-ácido fosfórico (cor violeta).
- As fracções 24-29 foram agrupadas por apresentarem manchas semelhantes muito pouco distantes do ponto de aplicação, com R_f 0.03, visíveis apenas quando reveladas com vanilina-ácido fosfórico (cor castanha).
- As fracções 30-33 foram agrupadas por apresentarem manchas semelhantes que não saíam do ponto de aplicação.

Efectuou-se a concentração de todas as fracções misturadas, tendo-se realizado a TLC (TLC4 no Anexo 4) das mesmas. Notou-se que:

- A mistura das fracções 8, 9, 10 apresentou desta vez três manchas separadas, com valores de R_f 0.28 (azul violeta após revelação com o reagente em uso); 0.52; 0.75 (cor violeta após revelação com vanilina - ácido fosfórico).
- A mistura das fracções 11-16 apresentou uma complexidade de manchas.
- As misturas das restantes fracções continuaram complexas.

Na tentativa de isolar o composto correspondente à mancha principal obtida da mistura das fracções 8 ,9 e 10, efectuou-se o fraccionamento desta por MPLC. Nesta, encontraram-se 32 fracções das quais após uma TLC (TLC5 no Anexo 4) verificou-se que:

- As fracções 1-20 não apresentaram nenhuma mancha.
- A fracção 21 apresentou uma mancha de cor violeta quando revelada com vanilina-ácido fosfórico, apresentando R_f 0.75.
- As fracções 22-27 foram misturadas por apresentarem algumas manchas bem separadas e nítidas.

A mistura das fracções 22-27 foi submetida à Cromatografia em Camada Fina Preparativa, usando como sistema de eluição a mistura n-Hexano/ EtOAc (8:2). Depois de demarcar as zonas separadas, estas foram raspadas, extraídas com diclorometano, filtradas e concentradas. Assim, duas fracções apresentaram uma mancha única em TLC, cujos R_f são: 0.75 (cor violeta quando revelada usando vanilina – ácido fosfórico) e 0.64 (cor amarela), respectivamente. Para

verificar a sua pureza, foram submetidas à Cromatografia em Camada Fina (TLC6, Figura 5), nas mesmas condições que a TLC anterior.

As restantes fracções apresentaram cada uma, duas manchas bem separadas, todas contendo a mancha azul violeta, com Rf 0.28.

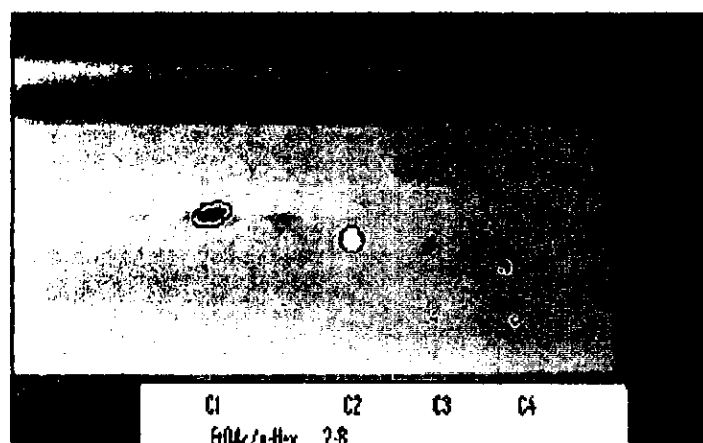


Fig. 5 Cromatograma dos compostos obtidos por Cromatografia em Camada Fina Preparativa (TLC6)

Como forma de aumentar a quantidade dos produtos de interesse, e devido ao défice do solvente Acetato de Etilo, efectuou-se o fraccionamento de 1 g do extracto metanólico na MPLC, usando desta vez o sistema de solventes n-Hexano / Metanol. Notou-se que este sistema não se mostrou eficaz para as diferentes proporções usadas pois os respectivos cromatogramas não mostraram separação suficiente nem isolamento de algum composto.

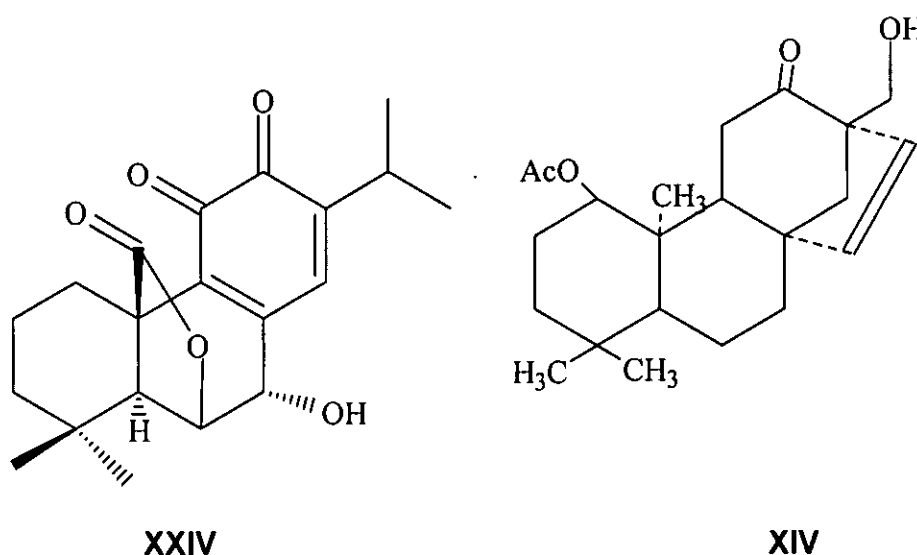
9. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Da análise por TLC os extractos obtidos a partir das duas técnicas de extracção (maceração e Soxhlet), notou-se que:

- i) A composição química dos extractos obtidos por maceração e por Soxhlet é a mesma, qualquer que seja o solvente usado, (Éter de Petróleo e Metanol).
- ii) O extracto do éter de petróleo apresentou praticamente a mesma composição que o obtido por extracção usando a mistura n-Hex /EtOAc. Os respectivos cromatogramas mostraram uma mancha de cor castanha (quando revelada usando o reagente Vanilina - ácido fosfórico) correspondente a um composto muito apolar cujo R_f é 0.92. No entanto, o extracto de metanol não apresentou a referida mancha.
- iii) O extracto do metanol apresentou na revelação a 366 nm, uma mancha azul fluorescente muito próxima do ponto de aplicação com R_f 0.05, e uma amarela encoberta por uma violeta com R_f 0.64. A mancha amarela não apareceu nos extractos brutos do éter de petróleo e da mistura n-Hex /EtOAc (1:1).
- iv) Os resultados experimentais mostram uma forte possibilidade da existência de diterpenos nas raízes da planta em estudo, principalmente para as manchas de cor violeta cujos R_f estão entre 0.5-0.9. Referências bibliográficas [24] mostram que foram detectados numa planta medicinal, diterpenos para os quais após revelação com o reagente Vanilina - ácido sulfúrico, (que tem o mesmo efeito que o revelador Vanilina - ácido fosfórico) houve aparecimento de manchas com cor violeta, com valores de R_f a variar no intervalo acima referido.
- v) Da relação estrutura / actividade antimicrobiana feita para as plantas das espécies *Sideritis* e *Salvia* [3 e 14], pode-se notar que em ambos os casos a existência de elevada actividade antimicrobiana é condicionada pela existência de dois grupos hidroxilo livres, ligados

cada um a dois Carbonos vizinhos. De igual forma, nota-se que para o estudo feito em ambas as espécies, a presença de mais um grupo hidroxilo próximo dos dois primeiros, baixa ou anula a actividade.

- vi) A oxidação de um ou de ambos os grupos hidroxilo das posições principais (C_{11} e C_{12} nos diterpenos da *Salvia*; C_{12} e C_{17} nos diterpenos da *Sideritis*) aumenta significativamente a actividade antimicrobiana. Isto pode notar-se nos compostos **XXIV** dos diterpenos da *Salvia*, nos quais os dois grupos OH de C_{11} e C_{12} foram oxidados à função ceto, e no composto **XIV** da *Sideritis* no qual apenas um grupo OH do C_{12} foi oxidado.

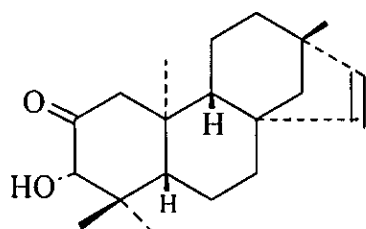


Avaliando a existência ou não de actividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas nos diterpenos das plantas das espécies *Salvia* e *Sideritis*, pode-se prever a existência dessa actividade nos diterpenos da *Spirostachys Africana*, por comparação das suas estruturas.

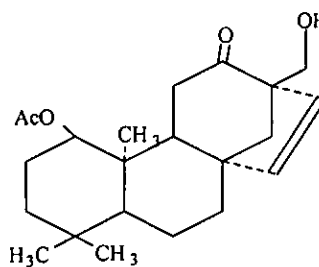
Assim:

Pode-se presumir que os diterpenos **XXV** e **XXVIII** da *Spirostachys Africana* possuam alguma actividade antimicrobiana, já que o primeiro possui um grupo ceto e outro hidroxilo ligados cada um a dois Carbonos vizinhos. A sua estrutura pode ser comparada à do diterpeno **XXIX** das espécies *Sideritis*, no qual um dos

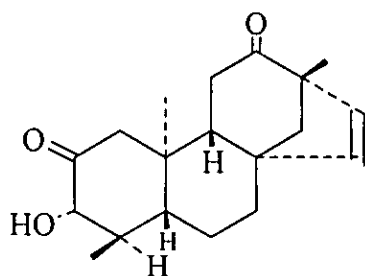
grupos hidroxilo das posições principais foi substituído por um grupo ceto. O diterpeno **XXVIII** da S.A. possui os dois grupos hidroxilo substituídos por dois grupos ceto, o que pode ser comparado à estrutura do diterpeno **XXIV** das espécies *Salvia*.



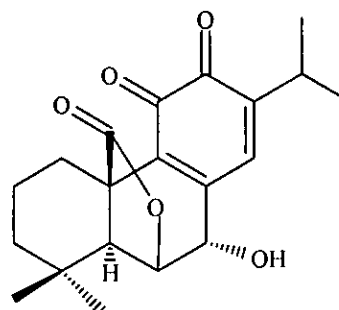
XXV



XXIX



XXVIII



XXIV

10. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

10.1 Conclusões

De acordo com os resultados experimentais pode-se concluir que:

- i) A técnica de extracção em Soxhlet origina maiores quantidades de extracto bruto em relação à maceração, daí que este último não foi submetido ao fraccionamento por MPLC.
- ii) A extracção das raízes da *Spirostachys Africana* usando os solventes éter de petróleo ou a mistura n-Hexano / EtOAc (1:1) leva à obtenção de extractos com a mesma composição. A mancha castanha com R_f 0.92 que aparece foi eliminada pelo éter de petróleo, daí que ela não aparece no extracto metanólico. Desta maneira, pode-se presumir que as duas fracções contenham diterpenos, já que o éter de petróleo é um solvente que extrai lípidos e terpenóides [5] e a extracção com a mistura n-Hex / EtOAc foi feita directamente nas raízes secas.
- iii) Existe uma forte probabilidade da presença de diterpenos nas raízes da *Spirostachys africana*, o que pode ser sustentado pelas características cromatográficas dos compostos observados (cor violeta e R_f no intervalo de 0.5-0.9), em particular do composto isolado com R_f 0.75, embora a sua identificação só possa ser comprovada usando outras técnicas de análise tais como a Espectroscopia.
- iv) A comprovação da existência de princípios activos nas raízes da *S.* A seria bastante relevante, dado que estas podem ser colhidas praticamente isentas de látex que, como se referiu anteriormente, é tóxico e irritante. Isto diminuiria de certa maneira a possibilidade de ocorrência de efeitos colaterais durante o tratamento dos pacientes.
- v) No que concerne à relação estrutura / actividade antimicrobiana, a existência desta actividade na planta *Spirostachys Africana* pode ser associada à presença dos diterpenos na sua composição fitoquímica.

10.2 Recomendações

Como forma de melhorar o estudo fitoquímico de plantas medicinais que, como se sabe constituem um grande potencial terapêutico em Moçambique, recomenda-se que se melhorem as condições de trabalho no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da UEM e que se envidem esforços no sentido de se englobar ensaios biológicos nestas pesquisas, de modo a confirmar a existência ou não de princípios activos.

Recomenda-se também que se encontrem formas de reparação dos aparelhos para separação e identificação espectroscópica de compostos tais como RMN e HPLC, de forma a dar mais credibilidade aos trabalhos de elevado valor científico, tal como é o caso dos Trabalhos de Licenciatura.

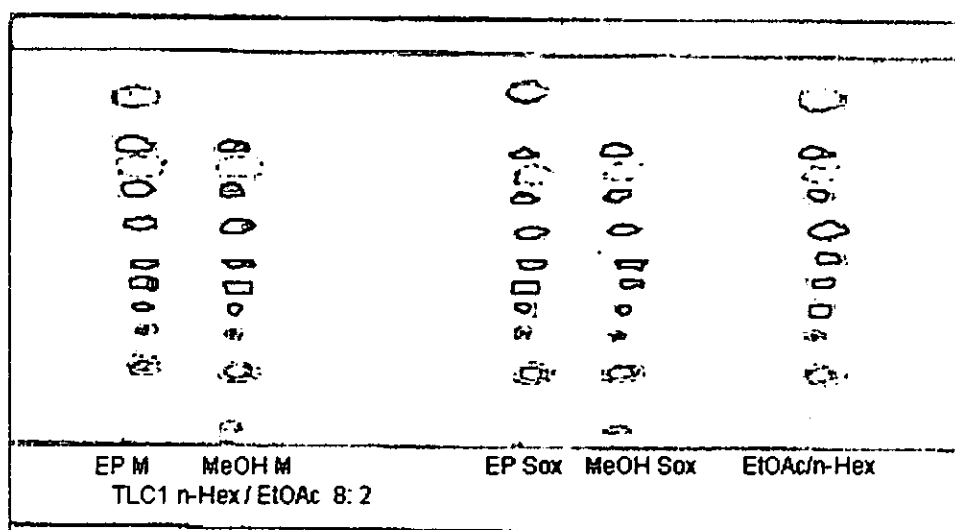
BIBLIOGRAFIA

1. Alves, T. M. et al. (1995). A diterpene from *Mikania obtusata* active on *Trypanosoma cruzi*. *Planta Medica*, **61**: 85- 86.
2. Chinou, I. et al. (1994). Cytotoxic and Antibacterial Labdane-Type Diterpenes from the Aerial parts of *Cistus incanus* subsp. *Creticus*. *Planta Medica*, **60**: 34-35.
3. Díaz, R. M. et al. (1988). Studies on the Relationship of Structure to antimicrobial Proprieties of Some Diterpenoid Compounds from *Sideritis*. *Planta Medica*, **54**: 301-304.
4. Hanson, J. R. (1968). The tetracyclic Diterpenes, 132 pp. Pergamon Press Ltd. London.
5. Harbone, J. B. (1998). Phytochemical Methods - A guide to modern Techniques of Plant Analysis, 3rd edition, 290 pp. Chapman and Hall Publishers, London.
6. Ichihara, Y. et al. (1992). Cajucarinolide and isocajucarinolide: Anti-inflammatory Diterpenes from *Croton Cajucara*, **58**: 549 – 551.
7. Janson, P. C. M. e Mendes, O. (1984). Plantas Medicinais - Seu uso tradicional em Moçambique. Tomo 1-4, INLD, Maputo.
8. Jornal Notícias, 2005. Biólogos pesquisam algas capazes de inibir vírus da SIDA, publicado aos 30 de Setembro de 2005, Maputo.
9. Júnior, C. V. (Data não disponibilizada) *Terpenos com actividade insecticida: uma alternativa para o controlo químico de insectos*. Disponível: [http:// www.scielo.br/scielo.php](http://www.scielo.br/scielo.php). (12. 01. 2005).
10. Jurg, A., Tajú, T. and Pividal, J. (1991). Antimalarial activity of some plant remedies in use in Marracuene, southern Mozambique. *Journal of Ethnopharmacology*, **33**: 79-83.
11. Korolkovas, A. and Burckhalter, J. H. (1988). Química Farmacêutica. Editora Guanabara KOOGAN, 783 pp, S.A. Rio de Janeiro.
12. Kurata, K. and Taniguchi, K. (1998). Diterpenoid feeding-deterrents from *Laurencia Saitoi*. *Phytochemistry*, **47** (3): 363-369.

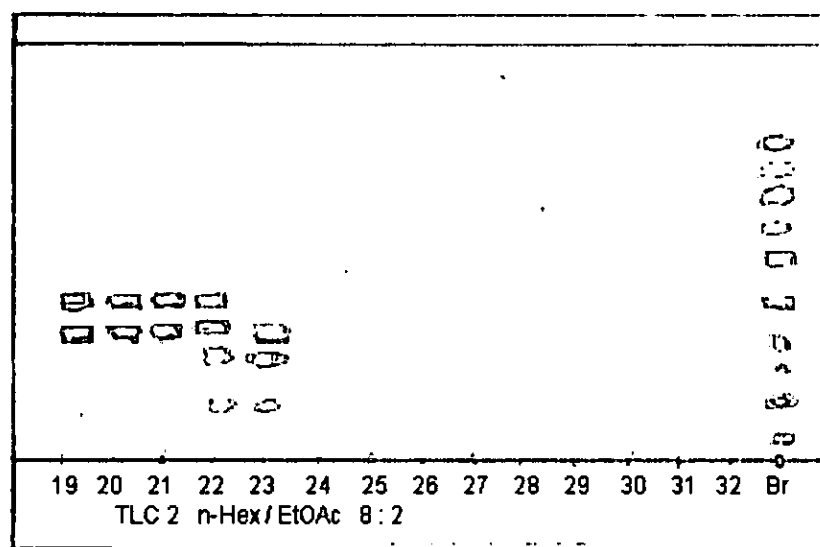
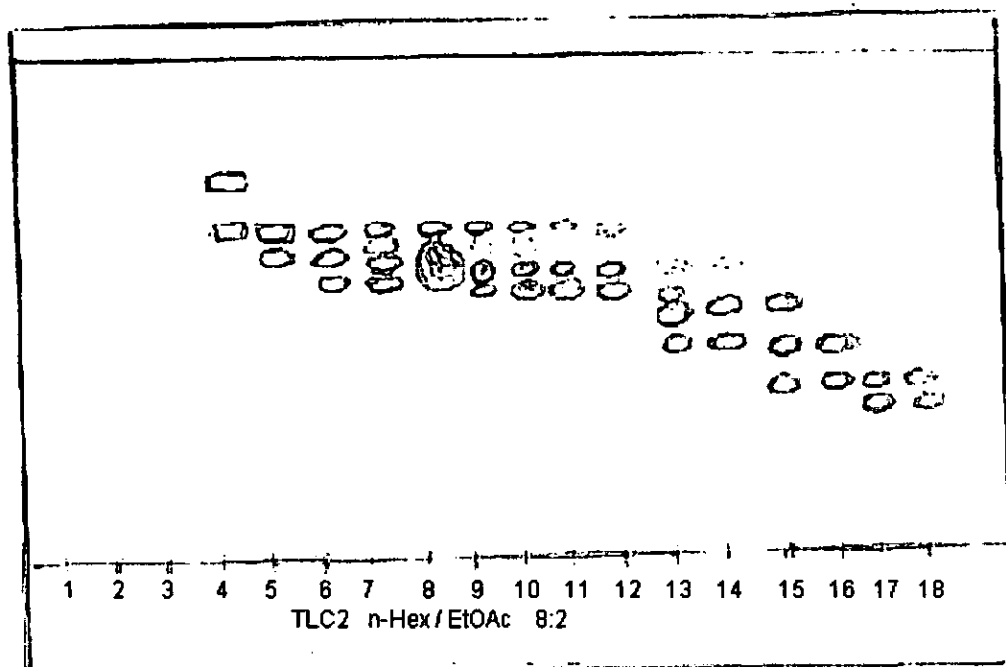
13. Le Quesne, P. W., Cooper-Driver G. and Villane, M. (1986). Biologically Active Diterpenoids from *Solidago* species- Plant-Insect Interactions in Atta-Ur-Rahman and Le Quesne, P. W., New Trends in Natural Products Chemistry 1986; Elsevier Science Publishing Company, Inc. 271-280 pp.
14. Moujir, L. et al. (1993). *Structure-Antimicrobial Activity relationships of Abietane Diterpenes from Salvia species*. Phytochemistry, **34** (6): 1493-1495.
15. Munkombwe, N. M. et al. (1997). *Diosphenols from Spirostachys Africana*. Phytochemistry, **45** (6): 1217-1220.
16. Nkunya, M. H. H. et al, (1991). *Antimalarial Activity of Tanzanian Plants and their Active Constituents: The Genus Uvaria*. Planta Medica, **57**: 341-343.
17. Pelgarve, K. C. (1983). Trees of Southern Africa, 2nd edition, 959 pp, Struik Publishers, (PTY) Ltd, Cape Town.
18. Pine, H. S. (1987). Organic Chemistry, Fifth edition, 1187 pp, McGRAW-Hill International Editions, Singapore.
19. Slimestad, R., Marton, A. and Hostettman, K. (1995). *Larvicidal Constituents of Melantheria albinervia*. Planta Medica, **61**:562-563.
20. Speroni, E. et al. (1991). *Activity on the CNS of Crude extracts and of some Diterpenoids Isolated from Euphorbia Calyptrata Suspended Cultures*. Planta Medica, **57**:531-535.
21. Tada, M., et al. (1994). *Antiviral Diterpenes from Salvia officinalis*. Phytochemistry, **35** (2): 539-541.
22. Touchstone, J. C. e M. Dobbins F. (1983). Practice of Thin Layer Chromatography, 2nd edition, 405 pp. John Willey and Sons, Inc. New York.
23. Zvitendo, J. D. et al. (1992). *Diterpenoids from Spirostachys Africana*. Phytochemistry, **31** (2): 699-702.
24. Wagner, H. and Bladt, S. (1996). Plant drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. 2nd edition, pp 77-93, Germany.

ANEXOS

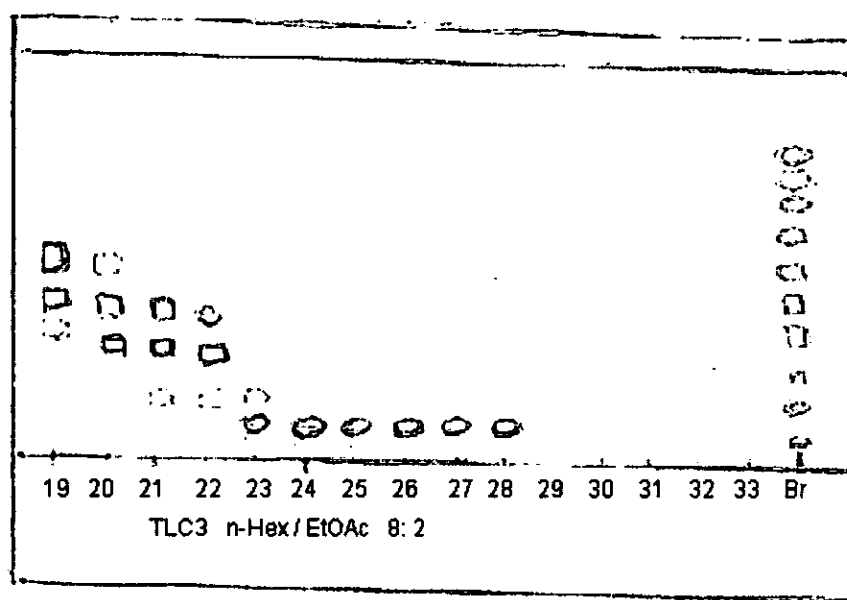
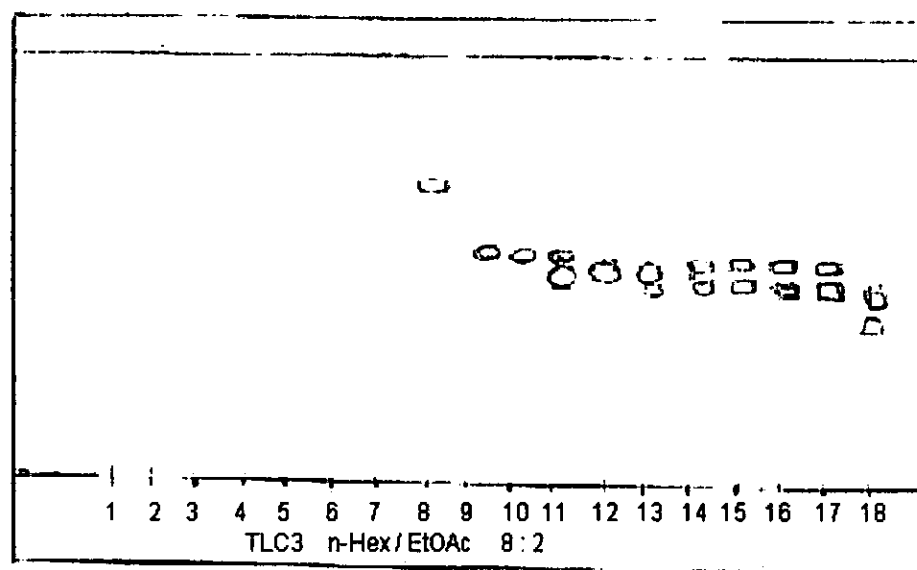
Anexo 1. Cromatograma dos extractos brutos do Éter de Petróleo, Metanol e da mistura n-Hex / EtOAc obtidos por Maceração e Soxhlet (TLC1)



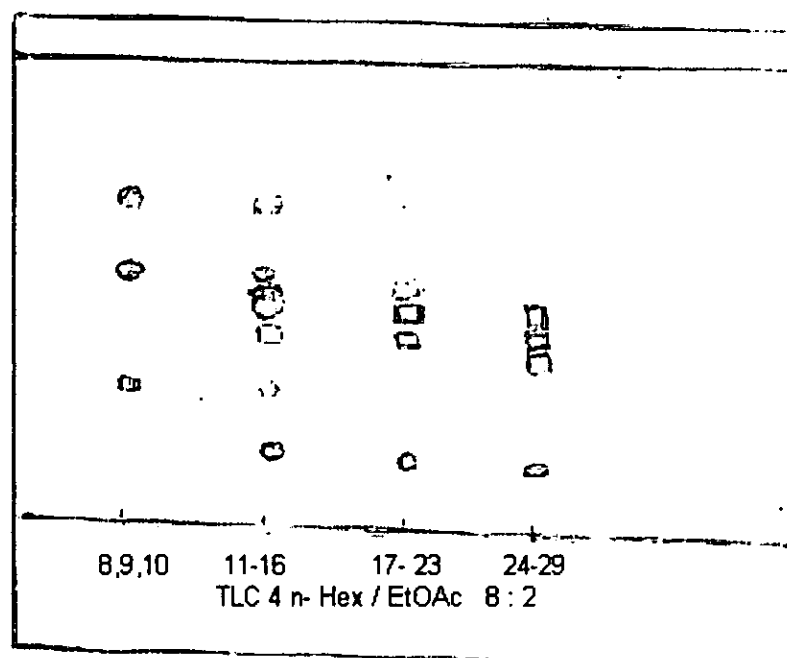
Anexo 2 Cromatogramas das fracções do extracto metanólico obtidas no ensaio preliminar (TLC2)



Anexo 3. Cromatograma das fracções do extracto metanólico obtidas no segundo fraccionamento usando a MPLC (TLC3)



Anexo 4. Cromatograma das fracções agrupadas do segundo fraccionamento (TLC4).



Anexo 4 Cromatograma das fracções obtidas do último fraccionamento usando a MPLC (TLC5)

