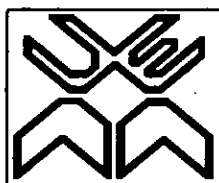


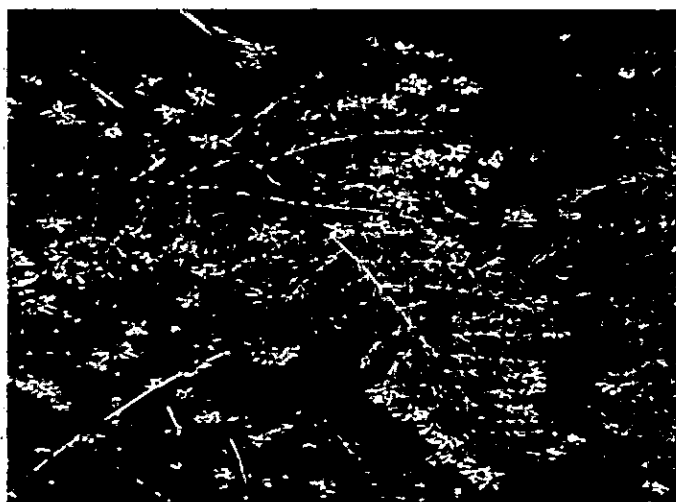
Q.000.14



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TRABALHO DE LICENCIATURA

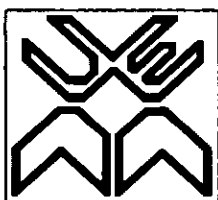
ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS SAPONINAS ESTEROIDAIS NAS
RAÍZES DA PLANTA ASPARAGUS PLUMOSUS BAKER (LILIACEAE)



Asparagus plumosus Baker

AUTOR: Almirante Carlos Dima

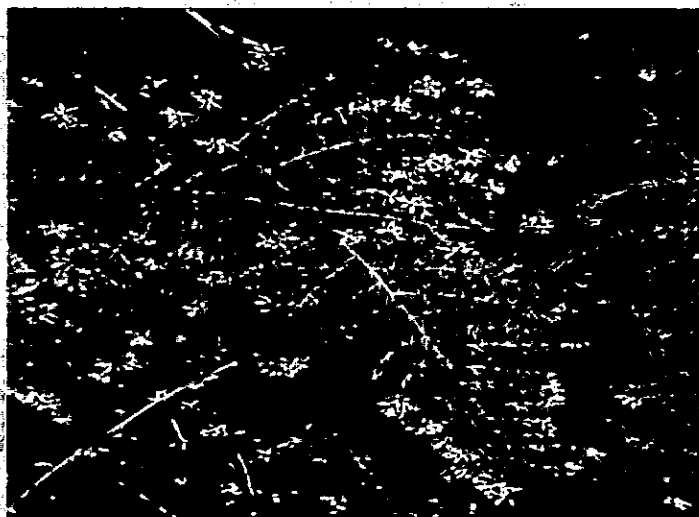
Maputo, Julho de 2006



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TRABALHO DE LICENCIATURA

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS SAPONINAS ESTEROIDAIS
NAS RAÍZES DA PLANTA ASPARAGUS PLUMOSUS BAKER
(LILIACEAE)



Asparagus plumosus Baker

AUTOR: Almirante Carlos Dima

SUPERVISOR: Prof. Doutor François Munyemana

U.E.M. DEPARTAMENTO DE QUÍMICA	
BIBLIOTECA	
R. E.	87 T.L
DATA	08/04/2008
AQUIÇÃO	Oferta
COTA	

Maputo, Julho de 2006

DEDICATÓRIA

Dedico especialmente este trabalho de licenciatura à minha mãe Raquelina Marcos Muthewuye com todo o amor que um coração de mãe pode albergar e aos meus irmãos Osvaldo C. Dima, Mariana C. Dima, Ângela E. C. Dima, Marcos J. Dima e ao meu sobrinho Carlinho pela coragem, educação, instrução, paciência, delicadeza e inspiração dadas mesmo nos momentos de grandes dificuldades.

À minha namorada Maria de Fátima A. J. M. Reich

Dizem que todo o homem somente se realiza plenamente quando faz um filho, planta uma árvore e escreve um livro. E tudo isso ainda não se foi no tempo e no espaço. Assim, acho que hoje — tenho condições para avaliar serenamente aquilo que realmente pode realizar um homem. Não é bem um filho, uma árvore ou um livro tão-somente, mas, sobretudo, o amor, paciência, carinho e encorajamento de uma mulher. E muito mais do que isso é o seu amor que realmente me realiza como homem e criatura humana.

A você — minha plena realização — dedico este trabalho com todo o amor.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar desejo expressar os meus sinceros agradecimentos ao meu supervisor Prof. Doutor François Munyemana, pela sábia orientação, ensinamentos transmitidos e apoio prestado ao longo de todas as fases da realização do presente trabalho.

Ao Prof. Doutor Felisberto Pagula pela disponibilidade por ele prestada durante a realização deste trabalho.

À Sra. Amélia Furvela, pela ajuda prestada durante a realização do trabalho experimental.

À Sra. Eva V. Cassamo pelo valioso apoio prestado e, sobretudo, pelos ensinamentos e conselhos que me transmitiu.

Não posso deixar de endereçar também os meus agradecimentos à minha família, em especial aos meus tios e primos que sempre se empenharam para que nada faltasse durante os estudos e também ao meu amigo Coimbra S. Sambo com quem muito aprendi durante a minha formação.

Os meus agradecimentos são extensivos ao corpo docente, CTA e aos estudantes do departamento de Química na Faculdade de Ciências da UEM pelos momentos de simpatia com quem passei durante a fase académica e com quem trabalhei ao longo dos anos da minha formação.

Aos meus colegas Maússe, Chuquela, Banze, Hélder e Ayuba vão também os meus agradecimentos pelo espírito de companheirismo.

A todos aqueles que directa ou indirectamente contribuíram para a realização deste trabalho vai o meu muito obrigado.

DECLARAÇÃO SOB COMPROMISSO 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

Almirante Carlos Dima
(Almirante Carlos Dima)

ÍNDICE

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Declaração sob compromisso de honra.....	iii
Índice geral.....	iv
Lista de figuras.....	vii
Lista de tabelas.....	viii
Abreviaturas.....	ix
Resumo.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJECTIVOS DO TRABALHO.....	3
2.1. Objectivo Geral.....	3
2.2. Objectivos Específicos.....	3
3. METODOLOGIA.....	3
4. SAPONINAS.....	4
4.1. Classificação das Saponinas.....	5
4.1.1. Classificação das saponinas segundo o núcleo fundamental aglicona.....	5
4.1.2. Classificação segundo o número de cadeias de açúcares.....	9
4.2. Ocorrência, distribuição e nomenclatura das saponinas.....	10
4.3. Biogénese das Saponinas.....	11
4.4. Métodos de detecção e identificação das saponinas.....	12
4.4.1. Ensaio de reconhecimento das saponinas esteroidais.....	13
4.5. Actividade biológica das saponinas e outros usos.....	14
4.5.1. Actividade antifúngica.....	14
4.5.2. Actividade antibacteriana.....	15
4.5.3. Actividade espermicida.....	15
4.5.4. Actividade antiinflamatória.....	16
4.5.5. Actividade insecticida.....	17

4.5.6. Actividade citostática.....	17
4.5.7. Actividade moluscicida.....	17
4.5.8. Actividade antiprotozoária.....	18
4.5.9. Outros usos das saponinas.....	19
4.6. Relação estrutura-actividade antifúngica e hemolítica da Dioscina e Dioscinina..	20
4.7. Saponinas isoladas das plantas da família Liliaceae com actividade biológica	23
4.8. Caracterização e descrição da planta em estudo	25
4.9. Descrição botânica da planta Asparagus plumosus baker	26
5. MÉTODOS DE EXTRACÇÃO, PURIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DAS SAPONINAS ..	26
5.1. Extracção.....	27
5.1.1. Maceração	28
5.1.2. Soxhlet	28
5.2. Métodos de análise usados	28
5.2.1. Métodos Cromatográficos	28
5.2.2. Cromatografia em Papel (PC).....	29
5.2.3. Cromatografia em Camada Fina (TLC).....	30
5.2.4. Cromatografia Líquida de Média Pressão (MPLC).....	32
6. PARTE EXPERIMENTAL	32
6.1. Colheita das amostras	33
6.2. Secagem e Moagem das amostras	33
6.3. Extracção.....	33
6.3.1. Extracção por Maceração	34
6.3.2. Extracção por Soxhlet	34
6.4. Cromatografia em camada fina (TLC).....	35
6.4.1. Aplicação da amostra e sistema de detecção	36
6.4.2. Cromatograma dos extractos brutos	37
6.5. Ensaio qualitativos (testes preliminares).....	38
6.5.1. Teste de Liebermann-Burchard para esteróides e triterpenóides	38
6.5.2. Teste de espuma.....	38
6.5.3. Teste para confirmação da presença de saponinas.....	38

6.6.	Hidrólise ácida do extracto <i>n</i> -butanólico	39
6.7.	Fraccionamento por Cromatografia líquida de Média Pressão	40
6.7.1.	Enchimento e montagem da coluna MPLC	40
6.7.2.	Fraccionamento do extracto <i>n</i> -butanólico	41
6.8.	Análise das fracções isoladas por espectroscopia na região de UV-Vis.....	48
7.	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	49
8.	CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	52
8.1.	Conclusões	52
8.2.	Recomendações	53
	BIBLIOGRAFIA	55
	ANEXOS	59

LISTA DE FIGURAS

Figura-1: Esqueletos básicos de agliconas esteroidais.....	8
Figura-2: Esqueletos básicos de agliconas triterpénicas	9
Figura-3: Exemplo de saponina monodesmosídica	10
Figura-4: Exemplos de saponinas bidesmosídicas	10
Figura-5: Origem biogenética de Sapogeninas e Saponinas esteroidais.....	12
Figura-6: Esquema geral das análises realizadas por Cromatografia em Papel de modo ascendente (unidimensional).	30
Figura-7: Esquema geral das etapas do procedimento seguido no presente trabalho	32
Figura-8: Cromatograma dos extractos brutos <i>n</i> -butanólicos	37
Figura-9: Cromatograma referente à identificação dos açúcares.....	40
Figura-10: Fotografia da montagem de Coluna de MPLC.....	41
Figura-11: Cromatograma das 33 fracções da MPLC-1 (TLC-2)	43
Figura-12: Cromatograma das 5 fracções agrupadas (TLC-3).....	43
Figura-13: Cromatograma das 19 fracções da MPLC-2 (TLC-4)	44
Figura-14: Cromatograma das misturas de fracções 6-7; 10-15 e o extracto bruto (TLC-5)	45
Figura-15: Cromatograma das 27 fracções da MPLC-3 (TLC-6)	46
Figura-16: Cromatograma final dos compostos isolados (TLC-7)	47
Figura-17: Cromatogramas das fracções 23-33 (amostra P4; MPLC-1) e das fracções.....	47
18-23 (amostra P3; MPLC-3) (TLC-8).	47
Figura-18: Cromatogramas dos extractos brutos <i>n</i> -butanólicos das raízes e folhas.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela-01: Valores correspondentes `as actividades hemolítica (HD ₅₀) e antifúngica (GID ₅₀) da Dioscina (1-5) e Dioscinina (6-12) [25].	23
--	----

ABREVIATURAS

TLC – Cromatografia em Camada Fina
MPLC – Cromatografia Líquida de Média Pressão
PC – Cromatografia em Papel
CG – Cromatografia Gasosa
UV – Ultravioleta
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
MS – Espectroscopia de Massa
IV – Infravermelho
HDL—Lipoproteína de Alta Densidade
EUA — Estados Unidos da América
T. *cruzi* – Tripanossoma cruzi
L. *donovani* – Leishmania donovani
P. *falciparum* – Plasmodium falciparum
R_f – Factor de Retenção
OUA — Organização da Unidade Africana
OMS — Organização Mundial da Saúde
INIA — Instituto Nacional de Investigação Agronômica
ATP — Adenosina Trifosfato
AcOEt — Acetato de Etilo
n-BuOH — *n*-Butanol
AcOH — Ácido acético
MeOH — Metanol
EtOH — Etanol

RESUMO

As plantas da família das liliaceae e em particular a do género *Asparagus* são utilizadas em Moçambique na medicina tradicional para o tratamento de várias doenças de origem microbiana.

A sua acção medicinal pode estar relacionada com a presença de substâncias activas na sua composição fitoquímica de compostos conhecidos por saponinas. As saponinas têm despertado um grande interesse na família das liliaceae não somente pelo interesse químico mas também porque apresentam actividades biológicas variadas.

No presente trabalho, fez-se um estudo fitoquímico das raízes da planta *Asparagus plumosus* Baker, especificamente tentou-se isolar as saponinas no extracto metanólico.

Foram usados para o estudo desta planta dois métodos de extracção: extracção por Maceração e extracção com Soxhlet usando os solventes Éter de petróleo, Diclorometano, Metanol e n-Butanol. As fracções n-butanólicas foram escolhidas para o fraccionamento por Cromatografia Líquida de Média Pressão (MPLC) no âmbito de isolar as saponinas presentes nesta planta e as diferentes fracções foram analisadas por Cromatografia em Camada Fina (TLC).

Foram isolados 3 compostos que apresentam na Cromatografia em Camada Fina (TLC) as características de saponinas.

Fez-se a hidrólise ácida da fracção total das saponinas (fracção n-butanólica) com o objectivo de identificar os açúcares presentes e as análises foram feitas por Cromatografia em Papel (PC) onde foram identificados os açúcares Glucose e Ramanose.

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais para aliviar doenças e prevenir enfermidades, é uma prática que é usada desde a antiguidade. Há cerca de 5 mil anos a humanidade socorria-se de produtos naturais como sendo uma fonte primária de medicamentos. A origem do conhecimento do Homem sobre as virtudes das plantas é numerosa e muitas foram as fontes que abriram esse caminho: o sexto sentido, a inspiração, o instinto, o exemplo dos animais, a casualidade, a observação, o ensinamento indígena, as religiões, a pesquisa, etc. Verificou-se durante muito tempo que os remédios naturais baseados nas plantas eram os principais recursos de que os médicos dispunham. Houve pequenas mudanças durante este período de tempo; contudo, estes dois últimos séculos trouxeram uma explosão na compreensão de como os produtos naturais são produzidos e como interagem com outros organismos.

É importante realçar que antigamente, quando a indústria químico-farmacêutica nem pensava em nascer, as plantas eram amplamente utilizadas não só na medicina mas também na alimentação, na religião, magia e rituais, para fins aromáticos (incensos, perfumes, defumações), produtos de beleza, ornamentos ou simplesmente para espantar insectos (mosquitos e traças) [30].

Hoje a humanidade volta-se para a natureza e a saúde do corpo passa a estar directamente vinculada a uma alta qualidade de vida, vida esta que para se ter é necessário manter o contacto directo com a natureza.

As plantas têm um grande valor medicinal devido à presença de substâncias químicas activas. Muitos dos princípios activos são complexos e a sua natureza química exacta ainda não é conhecida.

A qualidade da droga é creditada directamente aos seus componentes activos, substâncias inertes ou pouco activas farmacologicamente. A natureza química destas substâncias deve-se aos seguintes grupos principais: *taninos, alcalóides, glicósidos, glucoquininas, saponinas, mucilagens vegetais, princípios amargos, óleos gordos, óleos essenciais, hormonas e anti-sépticos vegetais* [8][29].

A nossa flora moçambicana é rica em recursos de origem vegetal, recursos estes que podem ser aproveitados para o estudo e a investigação sobre as plantas medicinais. A

população moçambicana no geral, e principalmente a residente nas zonas rurais baseia-se no uso de plantas medicinais para o tratamento de certas doenças assim como também para a prevenção pois já provaram ou tentaram provar a sua eficácia. Neste sentido torna-se pertinente o estudo das plantas medicinais moçambicanas, pois poucos estudos foram realizados até hoje.

Portanto nestes últimos anos, um interesse particular sobre as plantas medicinais e a medicina tradicional foi manifestada nos países africanos sob a recomendação e o apoio da OMS e OUA. É assim que estudos etnobotânicos e fitoquímicos foram realizados na maioria dos países africanos. Em Moçambique estudos semelhantes foram realizados em alguns Centros de Investigação, Institutos de pesquisas, Ministério da Saúde e Universidades.

A malária é um dos grandes problemas de saúde pública. É uma doença endémica em algumas partes de África, Ásia e América Latina e é responsável pela morte de mais de um milhão de crianças por dia em África. A resistência do parasita da malária *Plasmodium falciparum* às drogas antimaláricas comumente usadas 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 [21].

Estudos recentes realizados por Oketch-Rabah et al sobre as raízes da planta *Asparagus africanus* mostraram que foi isolada uma sapogenina denominada de *Muzanzagenina* que se revelou possuir uma actividade antiprotozoária (antileishmaniótica e antimalárica) moderada contra a *Leishmania major* e o *Plasmodium falciparum*. Na mesma planta foram isoladas também saponinas esteroidais (Spirostanósidos e oligofuranósidos) no extracto metanólico das raízes. Numa outra planta do género *asparagus*: *Asparagus dumosus* foram isoladas saponinas esteroidais do extracto butanólico.

É neste âmbito que no presente trabalho se propõe realizar um estudo fitoquímico da planta medicinal *Asparagus plumosus* Baker (família das Liliaceae) e especificamente, isolar e caracterizar as saponinas esteroidais nas raízes desta planta.

2. OBJECTIVOS DO TRABALHO

2.1. Objectivo Geral

- ✓ Este trabalho tem como objectivo realizar o estudo fitoquímico duma planta com actividade antiprotozoária: *Asparagus plumosus* Baker (família das Liliaceae).

2.2. Objectivos Específicos

- ✓ Extrair, separar e identificar as saponinas na fracção metanólica das raízes da planta *Asparagus plumosus* Baker;
- ✓ Comparar por Cromatografia em Camada Fina a composição química dos extractos brutos de metanol obtidos por Maceração e Soxhlet das raízes da planta *Asparagus plumosus* Baker;
- ✓ Hidrolisar os extractos metanólicos e identificar por Cromatografia em Camada Fina (TLC) e Cromatografia em Papel (PC) em comparação com os dados da literatura os carboidratos presentes.

3. METODOLOGIA

O presente trabalho obedeceu a seguinte sequência:

Pesquisa bibliográfica;

Recolha da amostra no campo;

Trabalho experimental que teve as seguintes etapas:

- ✓ Preparação das amostras (secagem e moagem);
- ✓ Extracção e fraccionamento;
- ✓ Análise e discussão dos resultados.

Elaboração do relatório final.

4. SAPONINAS

As saponinas também chamadas saponósidos (o seu nome deriva do Latim "Sapo, Saponis", que significa sabão) possuem propriedades tensoactivas. Elas formam uma espuma persistente quando agitadas na água à semelhança do sabão. Esta actividade superficial das saponinas fez com que durante centenas de anos fossem usadas como detergentes naturais. Essas propriedades são também referenciadas em algumas plantas usadas como detergentes, ex. erva do sabão (*Saponaria officinalis*), árvore do sabão (*Quillaja saponaria*) ou amêndoa do sabão (*Sapindlus mukurossi*). A maioria das saponinas tem ademais propriedades hemolíticas devido à capacidade de alterar a permeabilidade das membranas biológicas, sendo tóxicas para animais de sangue frio [1].

As saponinas encontram-se em cerca de 75% de todos os tipos de plantas e com um teor de 0.1 a 30% de massa seca; pertencem às substâncias secundárias mais abundantes nas plantas [24].

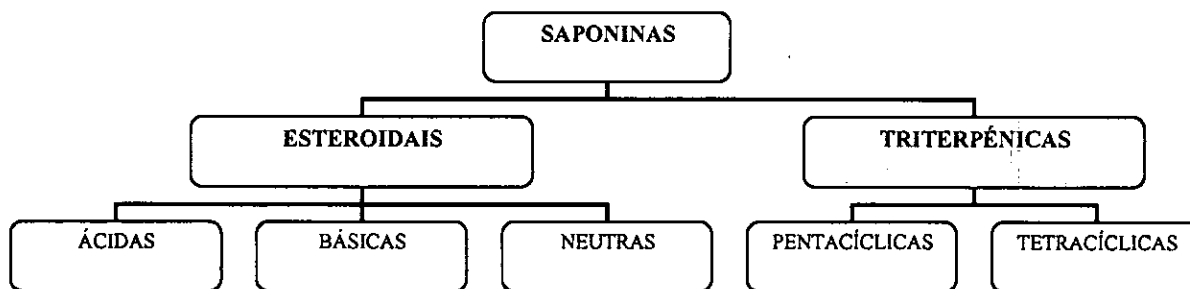
Em geral, as saponinas formam um grupo particular de heterósidos derivados dos triterpenos tetracíclicos ou seja, são glicósidos de esteróides ou terpenos policíclicos. Esse tipo de estrutura, que possui uma parte com característica lipofílica (triterpeno ou esteróide) e outra parte hidrofílica (açúcares), determina a propriedade de redução da tensão superficial da água e suas acções detergente e emulsificante. Portanto, estes compostos são difíceis de serem isolados e elucidados estruturalmente mas, apesar destas dificuldades, desde a antiguidade esse grupo de substâncias tem um interesse farmacêutico, seja como adjuvante em formulações, componentes activos em drogas vegetais (devido à sua actividade farmacológica), elas podem ser de aplicação directa a terapêutica e, por outro lado, também podem ser utilizados indirectamente como precursores para a obtenção de fármacos por semissínteses químicas (obtenção de anticonceptivos orais, diuréticos, hormonas sexuais, corticoides) e podem ser empregues como ferramentas farmacotécnicas devido às suas propriedades físicas (tensoactivas) [1].

As saponinas apresentam um número variável de açúcares ligados entre si quer em cadeia linear ou ramificada e os mais comuns são: *D-glicose*, *D-galactose*, *L-ranose*, *L-arabinose*, *D-xilose*, *D-fucose*, os ácidos *D-glucurónicos*, *D-galacturónico* e o *6-desoxiglucose*. A *D-apiose*, *D-ribose*, *D-quivonose* e *D-alose* são também reportadas mas são pouco comuns. Em alguns organismos marinhos também foi encontrado o *D-Chivonose*. Os açúcares da série *D*- têm maioritariamente uma ligação α -glicosídica e os açúcares da série *L*- têm a ligação β -glicosídica [3][24].

4.1. Classificação das Saponinas

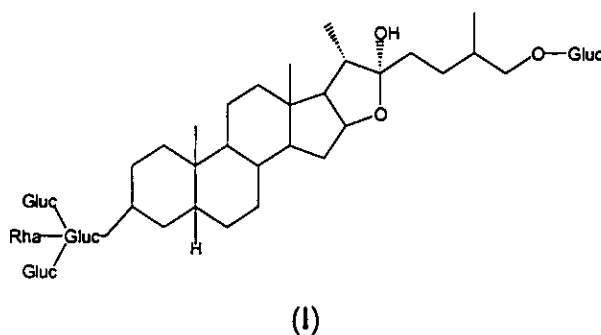
4.1.1. Classificação das saponinas segundo o núcleo fundamental aglicona

As saponinas são geralmente classificadas de acordo com o núcleo fundamental aglicona: Assim podem ser denominadas de saponinas esteroidais ou saponinas triterpénicas.

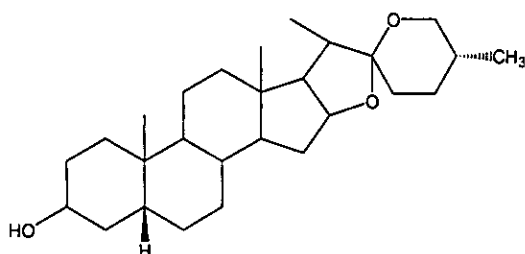


As saponinas esteroidais podem ser classificadas de acordo com o seu carácter de ácida, básica ou neutra.

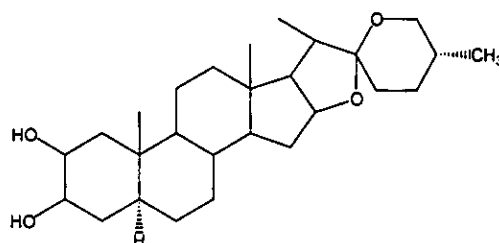
O carácter ácido pode ser devido à presença de um grupo carboxilo na parte aglicona ou na cadeia de açúcares ou ambos. É o caso por exemplo do *Sarsaparilósido (I)* que contém o ácido glucurónico na sua estrutura.



O carácter neutro pode ser devido à presença de *oxigénio* na molécula no anel F e as saponinas esteroidais neutras são derivadas do Spirostano (exemplos: *Smilagenina (II)* e *Digitogenina (III)*).



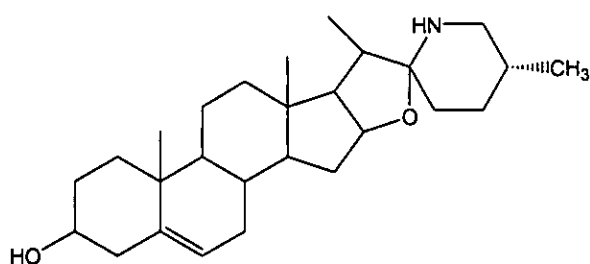
(II)



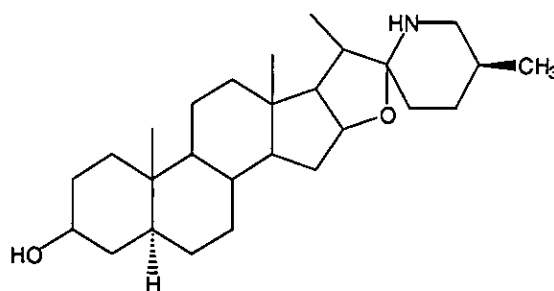
(III)

O carácter básico deve-se à presença do *nitrogénio* na molécula, em geral sob a forma de uma amina secundária ou terciária. Estas saponinas podem ser divididas em duas classes seguintes:

A primeira classe consiste em análogos nitrogenados de saponinas contendo nitrogénio secundário, é o caso de *Solasodina (IV)* e *Tomatidina (V)*;

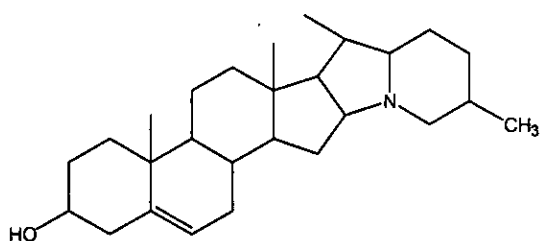


(IV)

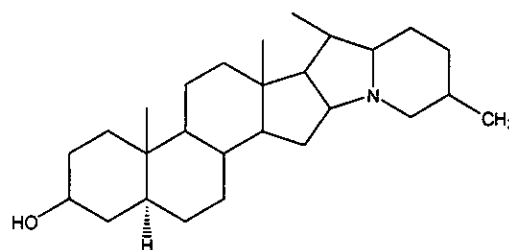


(V)

A segunda classe consiste nos análogos nitrogenados de saponinas contendo um sistema de anel condensado e nitrogénio terciário, é o caso da *Solanidina (VI)* e *Demissidina (VII)*.



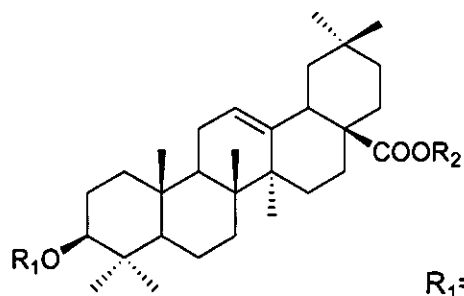
(VI)



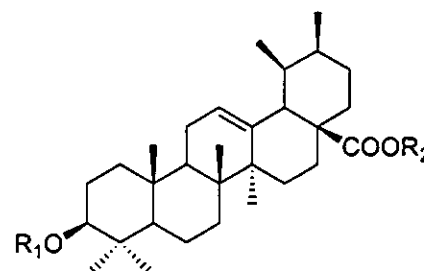
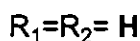
(VII)

As saponinas triterpênicas podem ser classificadas de acordo com o número de anéis cíclicos presentes de pentacíclicas ou tetracíclicas.

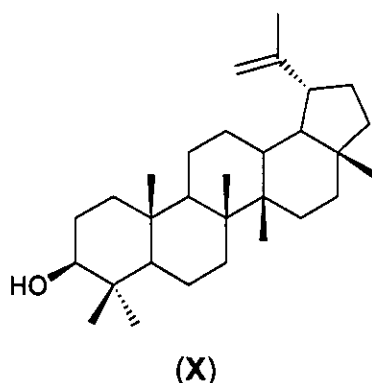
As Saponinas Triterpênicas Pentacíclicas apresentam os esqueletos do tipo β -amirina conhecidos como *oleonanos* com dois grupos CH_3 no C_{20} (exemplo: **Ácido Oleanóico (VIII)**); α -amirina conhecidos como *ursanos* com o grupo CH_3 α em C_{20} e outro CH_3 α em C_{19} (exemplo: **Ácido Ursólico (IX)**) e o esqueleto de *lupeol* (X).



Estrutura do tipo β -amirina
(VIII)

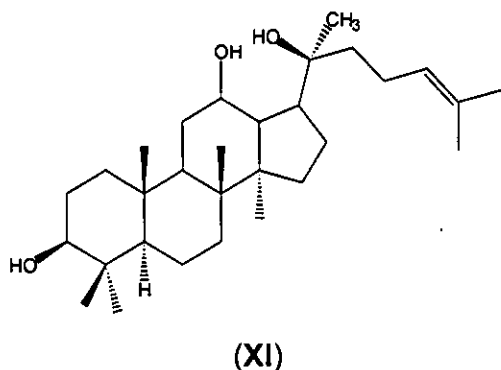


Estrutura do tipo α -amirina
(IX)

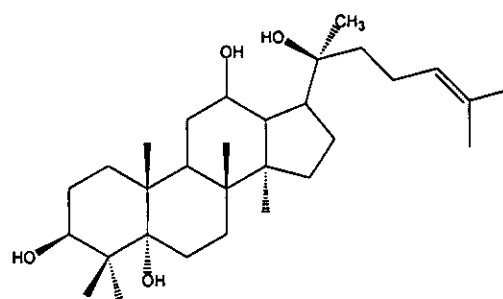


(X)

A maioria das saponinas triterpênicas tetracíclicas pertence ao núcleo de *Dammarano*: É o caso de 20S Protopanaxadiol (XI) e 20S Protopanaxatriol (XII).



(XI)



(XII)

Existem 3 agliconas esteroidais básicas: *Spirostanol* (XIII), *Furostanol* (XIV), esteróide alcalóide (XV) (fig-1) e 4 agliconas triterpênicas básicas: *Oleanano* (XVI), *Ursano* (XVII), *Hopano* (XVIII) e *Dammarano* (XIX) (fig-2).

Assim as saponinas esteroidais dividem-se em dois grupos maiores: os glicósidos do *Spirostanol* (XIII) e os glicósidos do *Furostanol* (XIV); e um terceiro grupo menor, o dos glicósidos nitrogenados esteroidais que são tratados como alcalóides (XV) de acordo com a sua frequência [11].

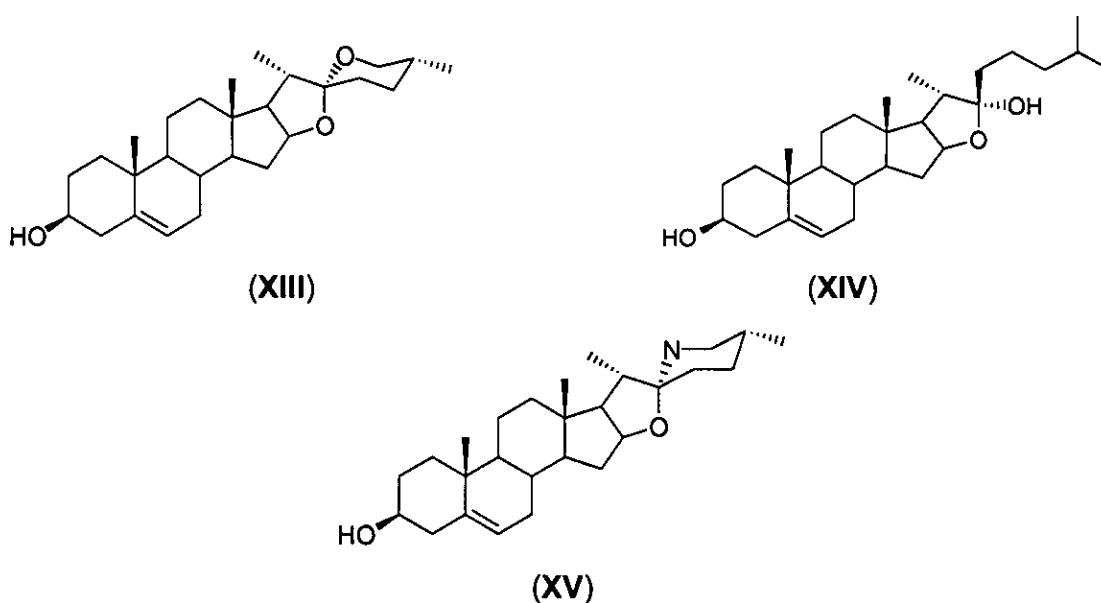
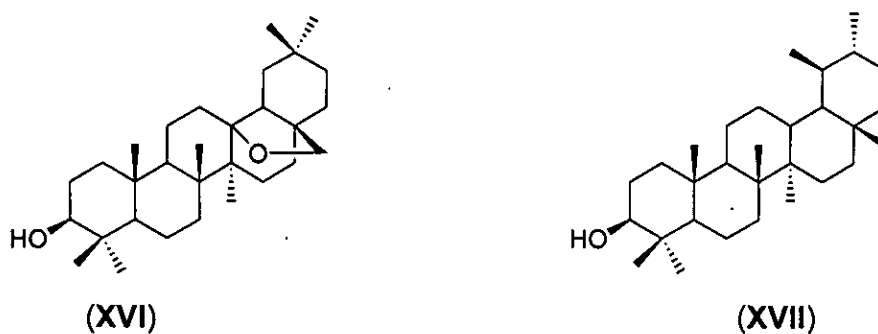


Figura-1: Esqueletos básicos de agliconas esteroidais



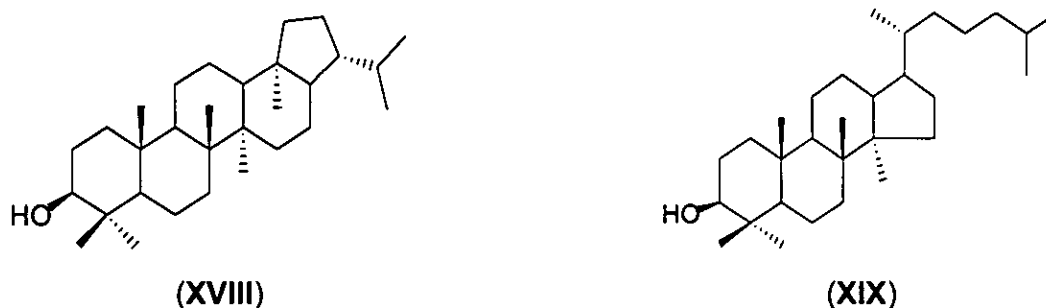
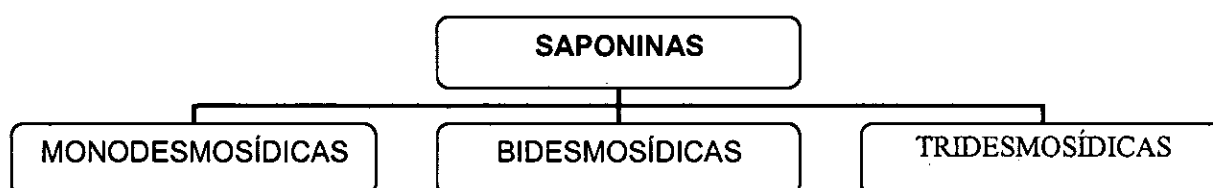


Figura-2: Esqueletos básicos de agliconas triterpênicas

4.1.2. Classificação segundo o número de cadeias de açúcares

Esta classificação das saponinas refere-se ao número de cadeias de açúcares ligados na aglicona. Elas podem ser chamadas de saponinas monodesmosídicas, bidesmosídicas e tridesmosídicas.



As saponinas *monodesmosídicas* possuem uma cadeia de açúcares e a união dos açúcares realiza-se no hidroxilo de C_3 (exemplo: *Digitalina* (XX)) (fig-3).

Nas saponinas *bidesmosídicas*, estabelece-se uma esterificação adicional com outras moléculas glicosídicas através do grupo ácido situado sobre o C_{22} ou C_{26} (a maioria com ligação éter em C_3 e outra com ligação éster em C_{22} ou C_{26}): caso de *Ginsengósido Rb₂* (XXI) e *Furostanol-Typ ACS 2* (XXII) (fig-4).

As saponinas tridesmosídicas (as que contêm três restos de carboidratos) raramente foram encontradas [1][3].

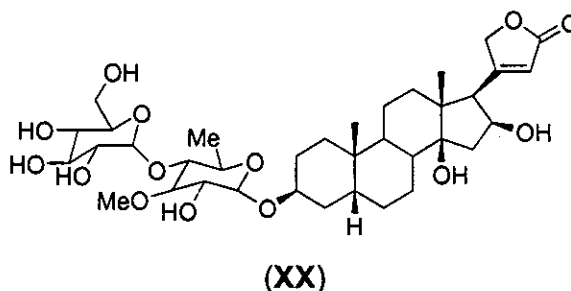


Figura-3: Exemplo de saponina monodesmosídica

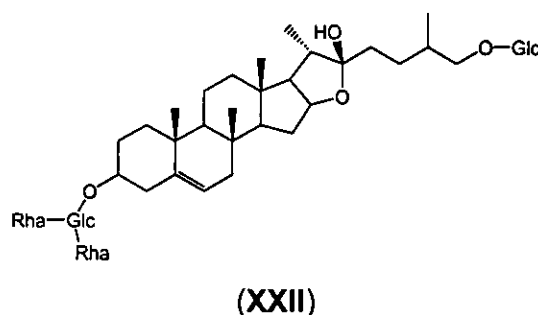
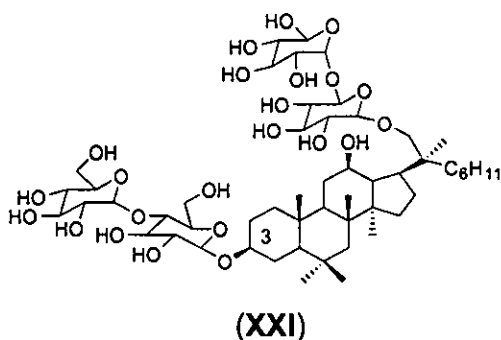


Figura-4: Exemplos de saponinas bidesmosídicas

4.2. Ocorrência, distribuição e nomenclatura das saponinas

As saponinas esteroidais e triterpênicas apresentam uma distribuição diferenciada no reino vegetal. As saponinas esteroidais neutras são encontradas quase que exclusivamente em *monocotiledóneas*, principalmente nas famílias Liliaceae, Discoraceae e Agavaceae. Os gêneros Smilax, Discorea, Agave e Yuca são especialmente ricos em saponinas esteroidais. Estas saponinas encontram-se também em *dicotiledóneas* com exceção na família Scrophulariaceae no gênero Digitalis. Importa dizer que, no reino animal as estrelas do mar constituem um único exemplo de animais com saponinas esteroidais [11][29].

As saponinas esteroidais básicas ou alcalóides encontram-se principalmente na família Solanaceae concretamente no gênero Solanum. Por outro lado, as saponinas triterpênicas são encontradas em *dicotiledóneas*, *pteridófitas* e *alguns animais de sangue frio*. Em *dicotiledóneas* encontram-se principalmente nas famílias da Araliaceae, Sapindaceae, Hippocastanaceae, Sapotaceae, Polygalaceae, Caryophyllaceae e Primulaceae [1].

No que diz respeito à nomenclatura das saponinas até agora ainda não existe uma nomenclatura uniforme para este grupo de substâncias. Frequentemente é acrescentada a terminação **-ina** ao nome da planta, onde a saponina foi isolada pela primeira vez (ex. Asparasaponina, Dioscina), enquanto que as Furostanolsaponinas recebem a terminação **-ósidos** (ex. Asparagósidos, Ginsengósidos). Alguns autores usam para as Furostanolsaponinas o prefixo **proto-** (ex. Protodioscina, Protoglacillina) [24].

Saponinas com estrutura idêntica recebendo nomes de acordo com a sua origem torna a sistematização geral difícil (ex. a Protodioscina da planta *Discorea collettii* é idêntica a ACS-2 da planta *Asparagus officinalis*). Para diferenciar saponinas semelhantes da mesma planta são usadas letras e/ou números (ex. Sojasaponina A₁, Sojasaponina A₂, Ginsengósido Rb₁, Ginsengósido Rb₂).

4.3. Biogênese das Saponinas

A porção esteróidica das saponinas esteroidais (denominada sapogenina) origina-se a partir do acetilCoenzima-A via ácido mevalônico e escualeno. Uma vez formado o precursor esteróidico com 27 átomos de carbono (por ex. *Cicloartenol*), este é desidrogenado para originar 3-colestanona. A colestanona é oxidada nos C₁₆ e C₂₂. Este intermediário altamente oxidado na cadeia lateral pode sofrer uma desidratação entre os hidroxilos dos C₁₆ e C₂₂, o que origina 3-furostanona; este por sua vez pode sofrer primeiro uma oxidação e depois sofrer outra desidratação entre os hidroxilos dos C₂₂ e C₂₇ restantes, o que dá lugar a um composto propriamente dito Spirostano. A 3-Spirostanona pode ser reduzida a 3-Spirostanol e que pode sofrer processos enzimáticos de glicosilação para originar saponinas esteróidicas (fig-5).

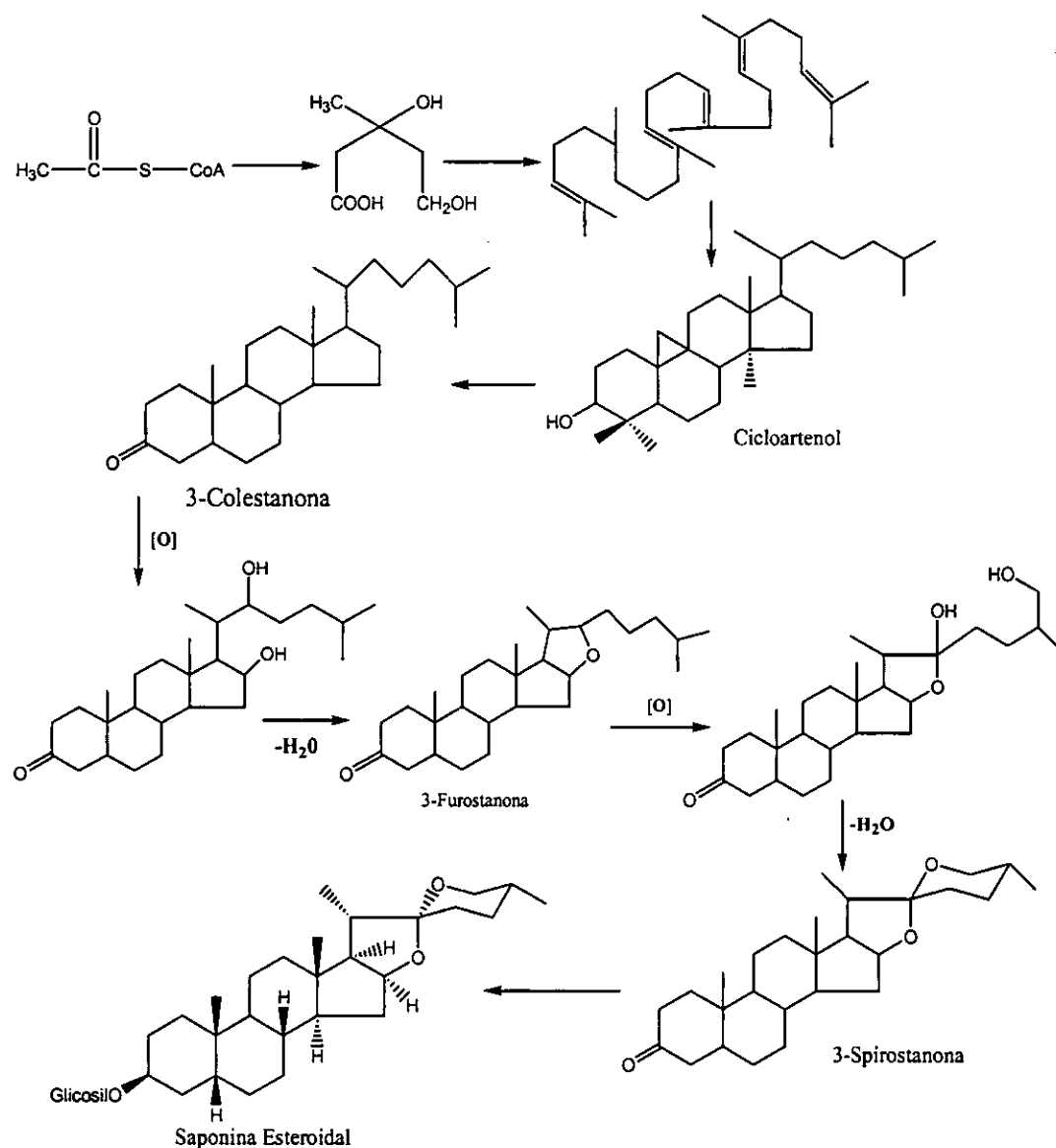


Figura-5: Origem biogénica de Sapogeninas e Saponinas esteroidais.

4.4. Métodos de detecção e identificação das saponinas

A detecção e identificação das saponinas no vegetal são realizadas a partir das suas propriedades físico-químicas, propriedades estas que estão relacionadas com o teste de espuma que pode ser denominado por teste de acção superficial, que é realizado com o extracto aquoso obtido a partir do decocto vegetal, e o teste de acção hemolítica que pode ser determinado tanto em um tubo de ensaio contendo uma solução tamponizada de células sanguíneas, como em placas cromatográficas, após a migração dos diferentes

extractos vegetais em teste. Importa também salientar que, as medições de espuma, da actividade hemolítica ou da toxicidade em peixes que foram usadas antigamente para informações quantitativas, já não são usadas actualmente pois verificou-se que estas propriedades não se manifestam igualmente em todas as saponinas [24].

Para a identificação das saponinas usam-se os métodos cromatográficos e espectroscópicos tais como: Cromatografia de camada fina (TLC), Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Ultravioleta (UV), Infravermelho (IV), Espectroscopia de Massa (MS), etc.

4.4.1. Ensaio de reconhecimento das saponinas esteroidais

As saponinas esteroidais podem ser reconhecidas usando os testes fitoquímicos preliminares seguintes: ensaios (teste) de espuma, hemólises dos glóbulos vermelhos, teste de Liebermann-Burchard e ensaios para os carboidratos [29].

4.4.1.1. Ensaio de espuma

Ao agitar uma solução aquosa duma amostra que contém saponinas, forma-se uma espuma estável como quando se agita uma solução aquosa de sabão. Visto que podem existir também outras substâncias que podem formar espuma, deve-se assumir este ensaio como uma presumível prova de existência das saponinas esteroidais.

4.4.1.2. Ensaio de hemólise

Este ensaio é muito mais confiável do que o teste de espuma. A uma suspensão de glóbulos vermelhos em uma solução alcalina diluída, adiciona-se uma solução amostra que se presume conter saponinas. Se os glóbulos vermelhos se rompem (hemolisam), assume-se que esta prova é positiva. Este ensaio pode ser em um tubo de ensaio 49, em caixas de *Petri* com agar-sangue ou em caixas de *Petri* com gelatina-sangue 51. É pertinente salientar que quando a amostra contém taninos, estes devem ser eliminados muito antes de se realizar a prova pois eles interferem. Este facto logra-se positivo por

meio de um tratamento repetido da amostra com óxido de magnésio (MgO) o qual se complexa com os taninos da solução eliminando-os.

4.4.1.3. Teste de Liebermann-Burchard

Para este ensaio, extrai-se o resíduo seco contido em pequenos copos três vezes com 2 ml de clorofórmio. Filtra-se a solução clorofórmica para um tubo de ensaio seco. Junta-se 1 ml de anidrido acético e agita-se suavemente. Junta-se três gotas de ácido sulfúrico concentrado e agita-se suavemente. Quando o teste é positivo verifica-se a formação de uma coloração vermelha no caso em que temos saponinas não livres e no caso contrário observa-se a formação de uma coloração verde-azulada.

4.4.1.4. Ensaio para carboidratos

A presença de carboidratos ligados pode ser reconhecido facilmente mediante os ensaios de *Molisch*, *da Antrona*, *Seliwanoff*, etc; estes ensaios (testes) baseiam-se na aplicação de reagentes específicos na qual se observa a formação duma coloração que serve como indicador da presença de carboidratos.

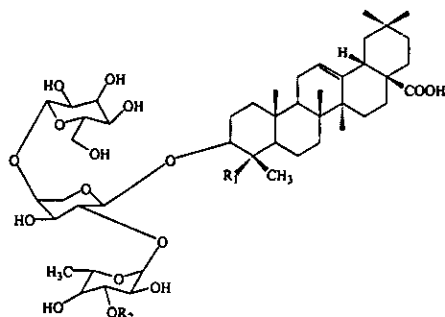
4.5. Actividade biológica das saponinas e outros usos

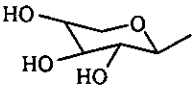
Algumas saponinas esteroidais têm mostrado diversas actividades biológicas: antimicrobiana, antiparasitária, antiprotozoária, antitumoral, ictiotóxica, antiinflamatória, antiúlcera, antihepatotóxica, antifertilidade, moluscicida; citotóxica, insecticida; espermicida, analgésica, antipirética, sedativa, etc.

4.5.1. Actividade antifúngica

As saponinas esteroidais são fungicidas muito potentes comparadas com as saponinas triterpénicas, mas o seu espectro de actividade é muito restrito contra outros organismos. Da planta *Serjania salzamanniana* foram isoladas 4 saponinas (XXIIIa-XXIIIId) que apresentam actividade antifúngica contra o *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* e

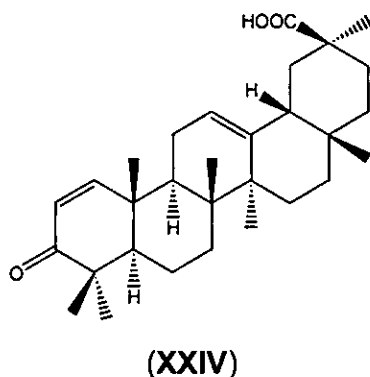
Aspergillus fumigatus e também mostraram actividade moluscicida contra a *Biomphalaria alexandrina* que é o vector causador da *Schistosoma mansoni* [6].



	R ₁	R ₂
XXIIIa	CH ₂ OH	H
XXIIIb	CH ₃	H
XXIIIc	CHO	H
XXIIId	CH ₂ OH	

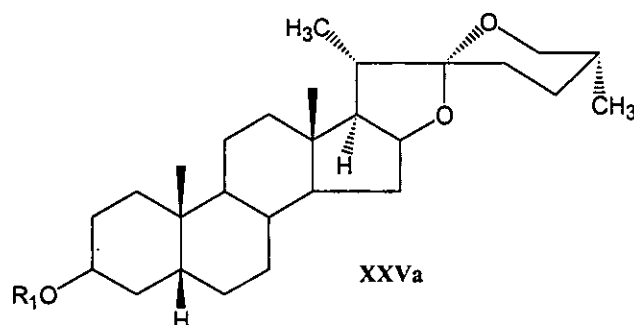
4.5.2. Actividade antibacteriana

As saponinas apresentam uma actividade antibacteriana ampla contra algumas bactérias. Das folhas das plantas *Dillenia papuana* foi isolada uma saponina denominada de ácido 3-oxoolean-1,12-dieno-30-oico (XXIV) com actividade antibacteriana contra as bactérias *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Micrococcus luteus*. Ela actua também como agente defensor patogénico contra microorganismos das plantas [13].



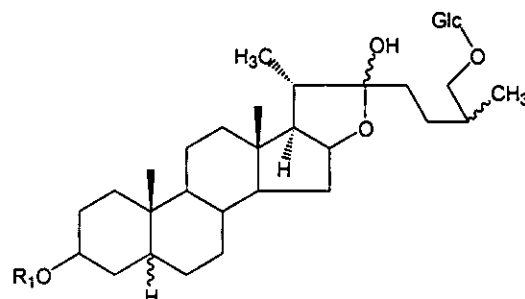
4.5.3. Actividade espermicida

As saponinas são usadas em regiões muito pobres como espermicidas (XXVa – XXVc). Presume-se que o seu mecanismo de acção se deve a desruptura do esperma do plasma na membrana celular, como é o caso de muitas espermicidas comerciais [3][28].



XXVa

XXVa Aspfiliósido-A R_1
—Glu⁴—Xyl



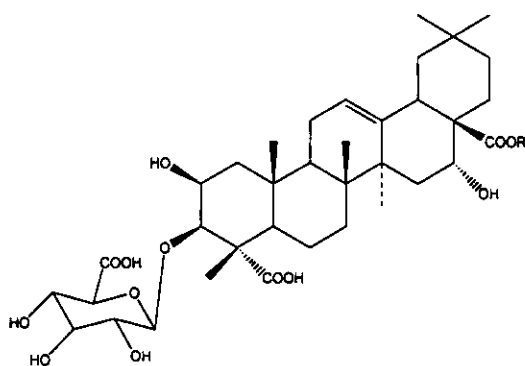
XXVb Aspfiliósido-B

XXVc Aspfiliósido-C

R_1
—Glu⁴—Xyl
|
6Ara
—Glu⁴—Xyl
|
6Ara

4.5.4. Actividade antiinflamatória

As saponinas também apresentam uma actividade antiinflamatória. Das raízes das plantas *Zanha africana* que é usada na medicina tradicional na África do Sul para o tratamento da disenteria, foram isoladas duas saponinas Zanhasaponina A (XXVIa) e B (XXVIb) que apresentam uma actividade antiinflamatória (inibem a *Naja naja* fosfolipase A₂, uma enzima que joga um papel importante na patogénese de vários processos de inflamação da pele) por serem activas contra o edema acútico do ácido araquidónico nos ratos [7].



(XXVIa) Zanhasaponina A

$\text{R} = \alpha\text{-L-Rhap}-(1\rightarrow 2)-\alpha\text{-L-Rhap}$

(XXVIb) Zanhasaponina B

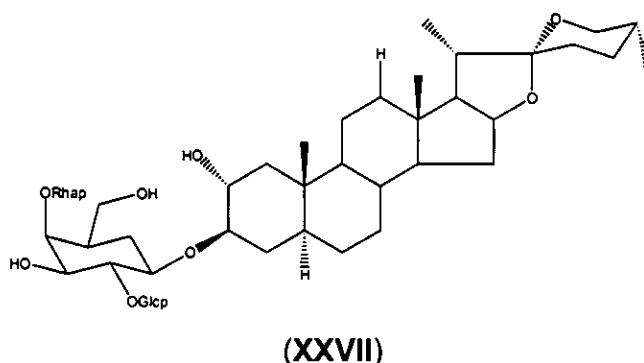
$\text{R} = \beta\text{-D-Xylp}-(1\rightarrow 2)-\alpha\text{-L-Rhap}-(1\rightarrow 2)-\alpha\text{-L-Rhap}$

4.5.5. Actividade insecticida

As saponinas apresentam uma actividade insecticida ampla contra insectos. Esta actividade insecticida foi também proposta por muitos investigadores por ser a maior razão da biossíntese das saponinas em muitas plantas [3].

4.5.6. Actividade citostática

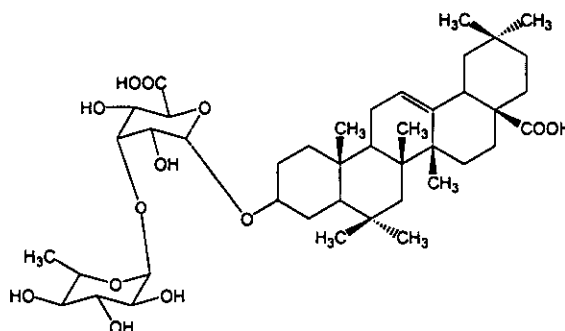
Das raízes da planta *Hosta sieboldii* que é usada na medicina tradicional na Ásia para o tratamento da leucemia foi isolada uma saponina esteroideal denominada de (25R) - 5 α -Spirostano-2 α , 3 β -diol (gitogenina)-3-O-{O- α -L-ramanopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O-[β -D-glucuronopiranosil-(1 \rightarrow 4)]- β -D-galactopiranósido} (XXVII) que apresenta uma actividade citostática contra as células HL-60 da leucemia [20].



4.5.7. Actividade moluscicida

Uma das áreas promissoras é a da investigação sobre a actividade moluscicida das saponinas. Foi instituído há cerca de 5 anos um programa de controlo e em regiões tropicais (possuem plantas ricas em saponinas) de doenças causadas pelas águas infectadas por caracóis e outros parasitas usando extractos de baga (*Phytolacca dodecandra* conhecido por "endod"). Este extracto (previamente usado como sabão, contendo 25% de saponinas), reduziu drasticamente a média de infecções de *Schistosoma mansoni*. Da planta *Sesbania sesban* foi isolada uma saponina denominada de ácido 3-O-[α -L-ramanopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopiranosil]-oleanóico (XXVIII) que apresentou

uma actividade moluscicida contra a *Biomphalaria glabarta* que é um vector causador da Schistosomíase e apresentou também actividade espermicida e hemolítica [3][5].



(XXVIII)

4.5.8. Actividade antiprotozoária

Os protozoários são animais unicelulares, coloniais ou isolados de grande primitivismo; eles adaptaram-se nos mais variados ambientes, ocupando uma grande gama de nichos ecológicos. Alguns são parasitas, outros de vida livre e outros fazem mutualismo mas eles são responsáveis por um elevado número de doenças tropicais incluindo a malária, leishmaníase, amebíase, trichomaníase (trichomonas vaginalis), tripanossomíase e outras infecções protozoárias veterinárias [15].

São muitas as espécies de protozoários que infectam o homem ou animais de interesse do homem.

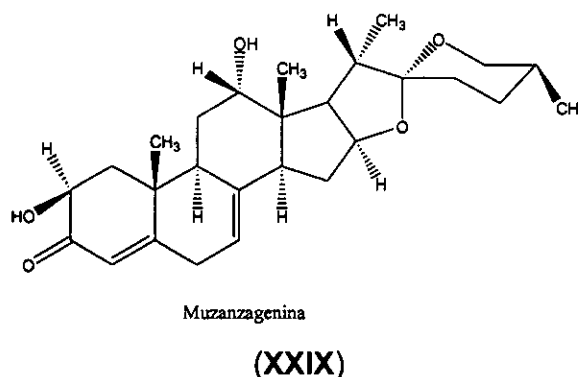
Estas espécies pertencem a três subfilos diferentes do filo *Protozoa*, como segue:

- I. Subfilo *Sarcomastigophora* que compreende as superclasses:
 - (a) *Mastigophora*;
 - (b) *Sarcodina*
- II. Subfilo *Sporozoa*;
- III. Subfilo *Ciliophora*.

Agentes antiprotozoários

Os agentes antiprotozoários são fármacos mais usados na profilaxia ou tratamento de doenças parasitárias causadas por protozoários e são divididos nos seguintes grupos: agentes antimaláricos, agentes antiamebianos, agentes tripanomicidas, agentes trichomonicidas, drogas antileishmanióticas e drogas usadas em infecções protozoárias veterinárias.

Na literatura, poucos estudos foram realizados sobre as saponinas que apresentam esta actividade. Segundo o trabalho realizado por Oketch-Rabah et al sobre a planta *Asparagus africanus* foi isolada a *Muzanzagenina* (XXIX) que é uma sapogenina esteroideal que possui uma actividade moderada contra a leishmania e a malária [4][19].



4.5.9. Outros usos das saponinas

As saponinas são comumente usadas para envenenamento dos peixes (por ex: A Digitalina (XX) cardiotônica da *Digitalis purpurea*) e como suplementos nas dietas (ginsengósido Rb₂ (XXI) proveniente de várias espécies *Panax* (*Ginseng*)). A técnica de envenenamento das águas como forma de capturar os peixes tem sido usada como tradição em muitas culturas de pescadores tais como pescadores brasileiros, indianos, japoneses e nigerianos que até hoje praticam esta técnica usando espécies de saponinas ricas em *Serjania* e *Schimia* [3].

Foram investigados outros usos das saponinas, particularmente o efeito das saponinas no sistema cardiovascular. Muitas tentativas no sentido de relacionar várias actividades biológicas com a actividade hemolítica das saponinas dão resultados inconclusivos. Vários mecanismos de acção das saponinas ainda são desconhecidos. A maior parte das saponinas triterpénicas conhecidas são saponinas bidesmosídicas e usualmente não apresentam a actividade antifúngica ou moluscicida. As saponinas bidesmosídicas podem actuar como prodrogas desde que elas tenham propriedades superiores de transporte (muito solúveis em água) comparadas com as saponinas monodesmosídicas. Em algumas plantas, as saponinas bidesmosídicas são formadas nas raízes e transportadas ao local de infecção onde são quebradas enzimaticamente para formarem saponinas fungicidas monodesmosídicas [3].

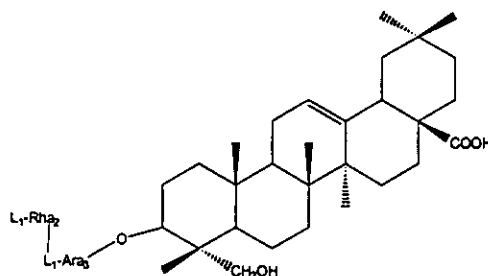
Suplementos diários e géneros alimentícios são também fontes de uso de saponinas contidas nas plantas. Uma das vantagens do uso destes suplementos (nos EUA) é a capacidade potencial das saponinas de reduzirem o colesterol. Saponinas do feijão-soja mostraram-se capazes de reduzir o colesterol quando administradas no intestino dos ratos. O extracto de *Ginseng* pode reduzir o colesterol total e a concentração do triglicérido mas não afecta o HDL-colesterol [3].

4.6. Relação estrutura-actividade antifúngica e hemolítica da Dioscina e Dioscinina

Os compostos *Dioscina* (XXX) e *Dioscinina* (XXXI) são furostanolsaponinas isoladas das plantas tais como *Polygonatum zanlanscianense* pump, *Dioscorea villosa* e *Dioscorea polystachya* que pertencem à família Dioscoreaceae. Estas plantas são usadas na medicina tradicional chinesa e mexicana para o tratamento da leucemia, palpitações, doenças pulmonares, problemas estomacais, diabetes, reumatismo e mais.

O composto *Dioscina* e seus derivados apresentam uma actividade antifúngica contra *Piricularia oryzae* e *Hansemula anomala*, mas apresentam também uma actividade hemolítica. Para a actividade hemolítica a relação estrutura-actividade ainda não foi estudada [25].

A actividade hemolítica e antifúngica destes compostos estão representadas na tabela-1. A comparação das estruturas e actividade dos derivados da Dioscina (XXXa – XXXd) e da própria Dioscina revela que as actividades são proporcionais ao número de resíduos de açúcares. A actividade hemolítica do composto XXXc é inferior à do composto XXXd que por sua vez é inferior à do composto XXXb, mas a sua actividade antifúngica é maior e varia no mesmo sentido ($XXXc < XXXd < XXXb$). Nota-se que a glucose do composto XXXc deve ser muito importante para a sua actividade antifúngica mas não para a actividade hemolítica. A ramanose do composto XXXb é responsável pela sua actividade hemolítica mas não se pode generalizar porque por exemplo a ramanose do composto *α -hederina* (XXXII) mostrou-se contribuir mais para actividade antifúngica do que para a hemolítica [25].



(XXXII)

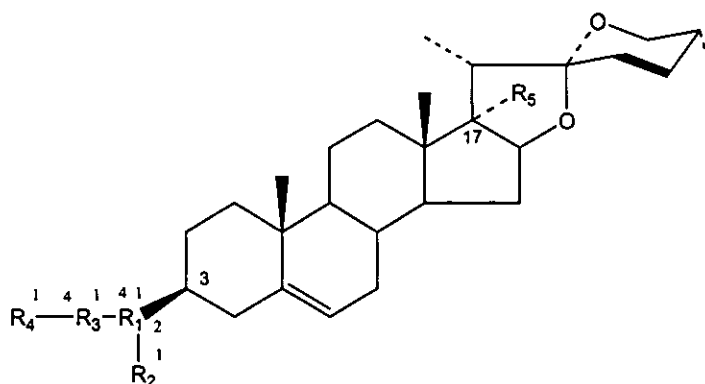
E importante realçar que os mesmos resíduos de açúcares podem desempenhar diferentes papéis em diferentes saponinas.

A actividade hemolítica e antifúngica do composto XXXa é maior do que a do composto XXXb, devido à maior contribuição para estas actividades dos resíduos de açúcares Ramanose(1→2)Glucose do que Ramanose(1→4)Glucose.

A *Dioscinina* e seus derivados mostraram também que as suas actividades variavam de modo semelhante às da *Dioscina* e seus derivados. Contudo, na *Dioscinina* e seus derivados os resíduos de açúcares ligados por ramificações contribuem mais para estas actividades (hemolítica e antifúngica) do que os resíduos ligados em cadeia linear.

A actividade hemolítica e antifúngica destes compostos estão representadas na tabela-1. Por outras palavras, quando as actividades hemolíticas e antifúngicas dos compostos XXX–XXXc foram comparadas com as dos compostos XXXIa, XXXIc–XXXIe, observou-se

que as actividades dos compostos XXX-XXXc eram mais elevadas do que as dos compostos XXXIa, XXXIc-XXXIe. Consequentemente, o grupo hidroxilo presente no C₁₇ dos derivados da Dioscinina parece reduzir a actividade biológica destes compostos.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
XXX	β -D-Glcp	α -L-Rhap	α -L-Rhap	H	H
XXXa	β -D-Glcp	α -L-Rhap	H		H
XXXb	β -D-Glcp	H	α -L-Rhap	H	H
XXXc	β -D-Glcp	H	H		H
XXXd	H				H
XXXI	β -D-Glcp	α -L-Rhap	α -L-Rhap	α -L-Rhap	OH
XXXIa	β -D-Glcp	α -L-Rhap	α -L-Rhap	H	OH
XXXIb	β -D-Glcp	H	α -L-Rhap	α -L-Rhap	OH
XXXIc	β -D-Glcp	α -L-Rhap	H		OH
XXXId	β -D-Glcp	H	α -L-Rhap	H	OH
XXXIe	β -D-Glcp	H	H		OH
XXXIf	H				OH

Tabela-01: Valores correspondentes às actividades hemolítica (HD₅₀) e antifúngica (GID₅₀) da Dioscina (1-5) e Dioscinina (6-12) [25].

	HD ₅₀ (µM)*	GID ₅₀ (µM)#
XXX	2.1±0.3	0.91±0.15
XXXa	7.5±0.9	2.8±0.4
XXXb	15±2.0	7.8±1.1
XXXc	200±20	11±2
XXXd	140±10	>100
XXXI	1.6±0.2	0.76±0.11
XXXIa	4.5±0.5	1.7±0.2
XXXIb	55±7	28±3
XXXIc	33±4	7.9±1.1
XXXId	93±10	28±3
XXXIe	230±30	17±2
XXXIf	180±20	>100

* Significa desvio padrão (n=8);

Significa desvio padrão (n=6);

HD₅₀ representa a concentração da amostra que causa 50% de hemólise.

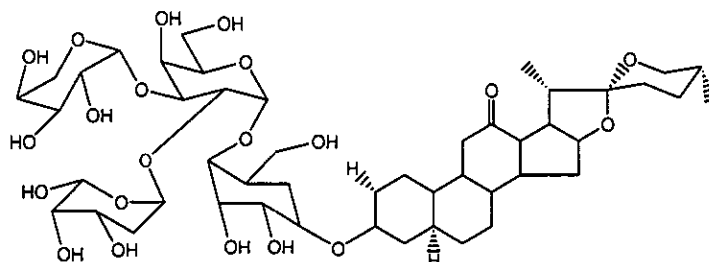
GID₅₀ representa a concentração da amostra que causa 50% de inibição no crescimento dos fungos.

4.7. Saponinas isoladas das plantas da família Liliaceae com actividade biológica

Das raízes das plantas *Asparagus africanus* foi isolada a *Muzanzagenina* (XXIX) que é uma sapogenina esteroideal que possui uma actividade moderada contra a leishmania e a malária [4][21].

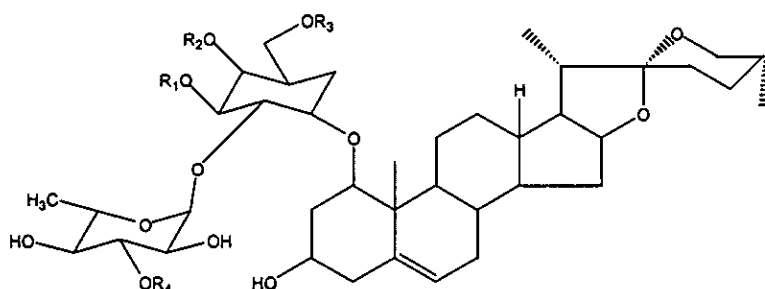
Da planta *Chlorophytum comosum* que é usada na medicina tradicional na África do Sul para o tratamento de bronquites, fracturas e queimaduras foi isolada uma saponina

denominada de (25R) -3 β -hidroxi-5 α -Spirotan-12-ona- (hecogenina) -3-O- {O- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O-[- β -D-Xilopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosido} (XXXIII) que apresenta actividade inibidora sobre o ATP estimulado pela incorporação do ^{32}P dentro dos fosfolípidos das células-HeLa [18].

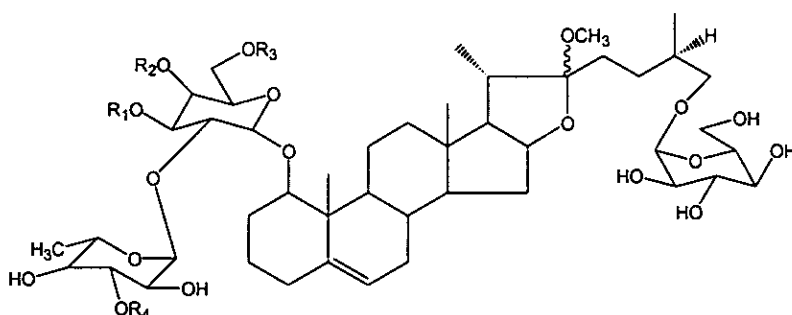


(XXXIII)

Das raízes da planta *Ruscus aculeatus* que é amplamente distribuída na Europa e que é usada para o tratamento de doenças das veias foram isoladas quatro saponinas esteroidais [duas saponinas com genina Spirostanol (XXXIVa e XXXIVb) e outras duas saponinas com genina Furostanol (XXXVa e XXXVb)] que mostraram uma actividade citostática inibidora sobre as células da Leucemia HL-60 [18].



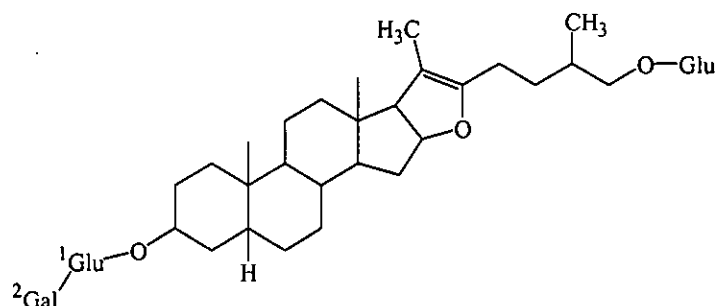
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
XXXIVa	Ac.	Ac.	Ac.	H
XXXIVb	H	H	H	H



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
XXXVa	Ac.	Ac.	Ac.	H
XXXVb	H	H	Ac.	H

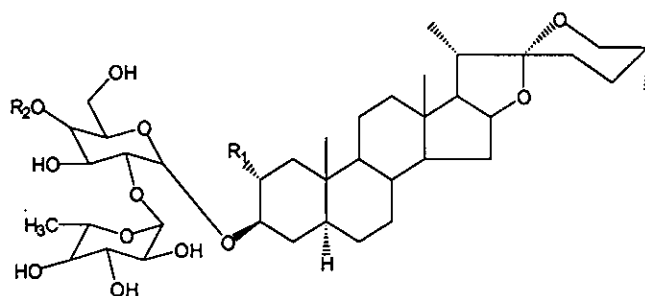
Das raízes da planta *Anemarrhena asphodeloides* que é usada na medicina chinesa como diurético, antipirético, sedativo e antiinflamatório foi isolada uma saponina esteroidal denominada de anemarsaponina-B {26-O- β -D-glicopiranosfurost-20 (22) -ene-3 β ,26-diol-3-

O- β -D-glicopiranosil- (1 \rightarrow 2) - β -D-galactopiranosido} (XXXVI) que se mostrou capaz de inibir *in vitro* a PAF-induzida na agregação das plaquetas dos coelhos [12].



(XXXVI)

Das raízes da planta *Hosta longipes* foram isoladas três saponinas (XXXVIIa - XXXVIIc) que apresentam actividade antitumoral contra os promotores do tumor porque inibem o metabolismo dos fosfolípidos (são inibidores sobre a ATP-estimulada pela incorporação do ^{32}P dentro dos fosfolípidos) [17].



	R ₁	R ₂
XXXVIIa	OH	H
XXXVIIb	OH	Glu
XXXVIIc	H	Glu

Da planta *Asparagus filicinus* foram isoladas três saponinas esteroidais asfafilósido A [uma saponina com genina Spirostanol (XXVa)], asfafilósido B e C [duas saponinas com genina Furostanol (XXVb e XXVc)] que mostraram um efeito inibidor sobre a mobilidade do espermatozóide humano e como agentes espermicidas [28].

4.8. Caracterização e descrição da planta em estudo

Asparagus plumosus baker pertence à família das liliaceae, família esta que compreende cerca de 4000 espécies agrupadas em mais de 280 géneros e é formada maioritariamente por ervas providas de bolbos, rizomas e tubérculos. Muitas delas são plantas de jardim e são usadas para a elaboração de produtos medicinais e cosméticos. Outras como o alho

(*allium sativum*), cebola (*allium cepa*) e o espargo comestível (*asparagus officinalis*) são utilizados para a alimentação.

Os géneros mais significativos são: *Allium androcymbium*, *anthericum* e *asparagus*.

O *Asparagus plumosus* Baker é um bom diurético e laxativo. As partes mais usadas são as raízes e folhas e servem para curar a tuberculose, pneumonia, malária, leishmania e parar vômitos.

4.9. Descrição botânica da planta *Asparagus plumosus baker*

Sinónimo: *Asparagus Setaceus*

Nome comum: *Asparagus Ornamental*

Género: *Asparagus*

Família: *Liliaceae* e também pode ser posta na família *Asparagaceae*

Descrição: é uma planta trepadeira com 5m, raízes fibrosas com 4 – 7mm de comprimento, 0.5mm de largura, tem folhas escamosas e são duras, de flores simples e de cor branca esverdeada, articulada na base e justa por cima, as pétalas têm 3 – 4mm de comprimento e as sementes têm cerca de 1.0 – 3.5 mm de diâmetro.

Propagação: A sua propagação é feita por sementes, expansão da fruta de plantas antigas por pássaros.

Ocorrência: África do Sul - Província do Natal, Transvaal, Cape Town; Zâmbia, Quênia e Moçambique.

5. MÉTODOS DE EXTRACÇÃO, PURIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DAS SAPONINAS

Sendo glicósidos e, portanto, substâncias polares, as saponinas são geralmente solúveis em água e pouco solúveis em solventes apolares. As saponinas apresentam como vantagem durante o seu processo de extracção a eliminação de lípidos e clorofila. No entanto, tem como desvantagem a possibilidade de se hidrolisarem durante o processo extractivo, ou hidrotermólise, no caso de extracção a quente.

Portanto, por essas razões e de um modo geral, a extracção é feita utilizando o seguinte:

- Preparação da amostra (pó das raízes ou folhas) com posterior extracção com solventes por maceração, decocção, infusão, soxhlet e percolação ou extracção exaustiva [16].
- Precipitação fraccionada e a formação de complexos com colesterol, diálise e cromatografia de permuta iónica [30].

As saponinas de um modo geral ocorrem na forma de misturas complexas, em variações quanto ao número de açúcares presentes para uma aglicona específica e/ou abrangendo variações quanto às agliconas e aos açúcares presentes tornando difícil o seu isolamento. Portanto, sendo o processo de isolamento dos seus constituintes individuais moroso e com técnicas dispendiosas, permite-se que sejam caracterizados as agliconas e os açúcares presentes.

O seu isolamento a partir das plantas é dificultado pela interacção com outras substâncias e possíveis mudanças estruturais no processo de extracção [24].

Em geral as saponinas são isoladas por uma extracção alcoólico-aquosa e os componentes não saponínicos são retirados de extractos por métodos físicos ou químicos.

5.1. 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.

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

- Maceração e,
- Soxhlet.

5.1.1. Maceração

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

5.1.2. Soxhlet

A extracção por Soxhlet consiste num processo de extracção exaustiva de um sólido (amostra) previamente moído por meio de um líquido: faz-se um refluxo contínuo durante um certo tempo até a descoloração do material em extracção contido no interior de um cartucho de material poroso.

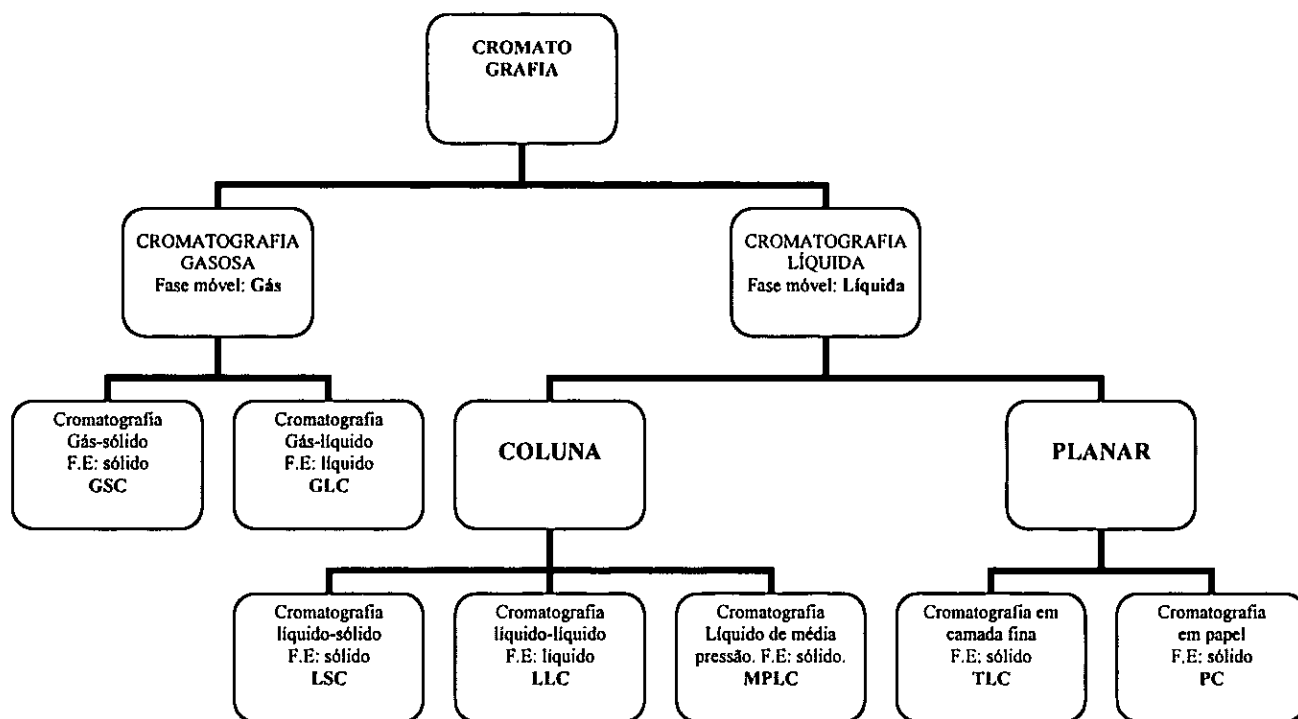
5.2. Métodos de análise usados

5.2.1. 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 que podem ser subdivididas em vários tipos de acordo com 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.



As técnicas cromatográficas usadas neste trabalho foram: Cromatografia em Papel (PC), Cromatografia em Camada Fina (TLC) e a Cromatografia Líquida de Média Pressão (MPLC).

5.2.2. Cromatografia em Papel (PC)

A Cromatografia em Papel (PC) é uma das técnicas mais simples e que requer menos instrumentos para a sua realização, porém é a que apresenta as maiores restrições para a sua utilização em termos analíticos.

Neste tipo de cromatografia, uma amostra líquida flui por uma tira de papel adsorvente disposto verticalmente. O papel é composto por moléculas de celulose que possuem uma forte afinidade pela água presente na mistura de solvente, mas muito pouca afinidade pela fase orgânica, actuando como suporte inerte contendo a fase estacionária aquosa (polar).

À medida que o solvente contendo o soluto flui através do papel, uma partição deste composto ocorre entre a fase móvel orgânica (pouco polar) e a fase estacionária aquosa. A separação dos açúcares foi realizada no sentido ascendente (unidimensional), onde o

solvente é colocado na tina na qual o papel é disposto verticalmente em forma de um cilindro estável. A eluição ocorre sobre o papel por acção de capilaridade e a fase móvel leva cerca de 2 a 4 horas para percorrer os 10 cm estabelecidos [9].

A figura-6 mostra o esquema geral das análises realizadas por Cromatografia em Papel de modo ascendente (unidimensional):

A **fig-6a** apresenta o papel disposto em forma de cilindro para a cromatografia ascendente e as pregas (clips) devem ser colocadas a 1/3 e 2/3 da margem do papel;

A **fig-6b** apresenta a disposição completa para a cromatografia ascendente. O papel cromatográfico é fechado na tina que contém o solvente;

A **fig-6c** apresenta o esquema geral das experiências realizadas em análises por cromatografia em papel de modo ascendente.

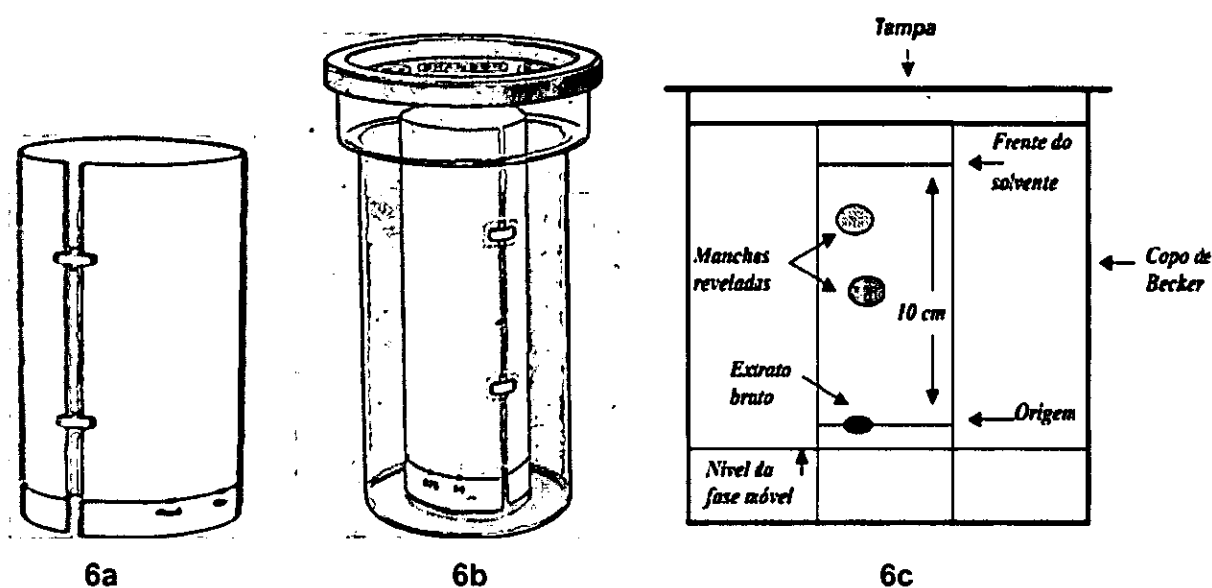


Figura-6: Esquema geral das análises realizadas por Cromatografia em Papel de modo ascendente (unidimensional).

5.2.3. Cromatografia em Camada Fina (TLC)

A Cromatografia em Camada Fina (TLC) 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 (TLC) 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 solventes pode ser alterado em pouco tempo;
- Permite que se analisem na mesma placa várias amostras ao mesmo tempo. Numa placa de dimensão 20x20 cm podem-se analisar simultaneamente cerca de dezoito amostras.
- É uma técnica de baixo custo e com boa reprodutibilidade dos resultados.

A maior desvantagem da TLC consiste na dificuldade de pulverização uniforme da amostra contida na camada adsorvente nas placas de suporte.

Desenvolvimento das placas

A eluição foi feita de modo ascendente em tintas cromatográficas adequadas previamente saturadas com o eluente a usar para cada caso tendo-se o cuidado de controlar o nível do eluente de modo que não atingisse os pontos de aplicação da amostra durante o processo de imersão.

Sistema de Detecção

A visualização das manchas foi feita com base no uso da lâmpada UV (254 e 366 nm) e, após a eluição, foram usados para a revelação das placas desenvolvidas os reagentes reveladores Vanilina-H₃PO₄ e Hidrogenoftalato de anilina.

5.2.4. 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 fraccionamento 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.

6. PARTE EXPERIMENTAL

Neste capítulo descreve-se os procedimentos usados quer no trabalho de campo (colheita das amostras) assim como na realização dos ensaios laboratoriais de acordo com os objectivos definidos no princípio do trabalho e face às condições técnicas e materiais disponíveis para que o mesmo se efectivasse.

A figura-7 esquematiza a sequência das actividades seguidas durante a realização do presente trabalho.

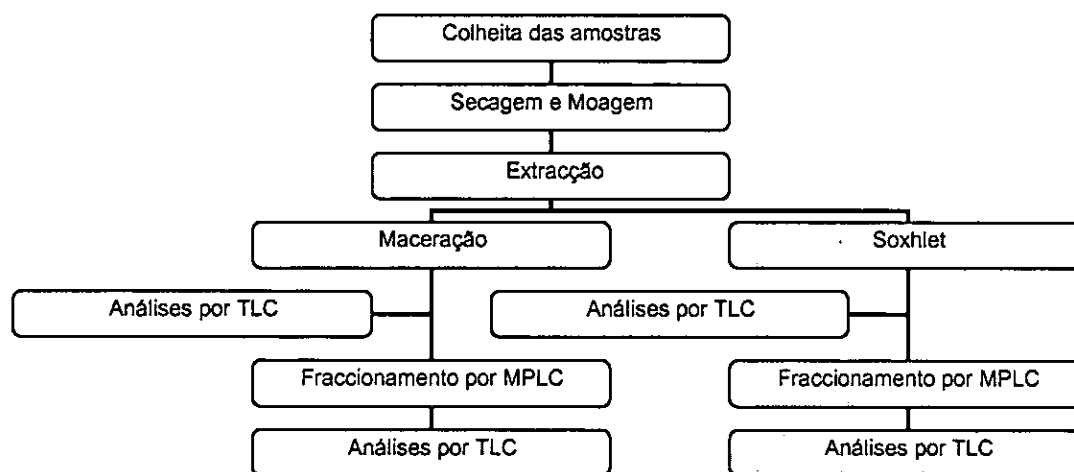


Figura-7: Esquema geral das etapas do procedimento seguido no presente trabalho

6.1. Colheita das amostras

As amostras da planta *Asparagus plumosus* Baker foram colhidas no dia 15 de Janeiro de 2005 na localidade de *Mumemo* concretamente no distrito de Marracuene que dista cerca de 20 Km da cidade de Maputo. A colheita das amostras só foi possível graças à ajuda de um cidadão local que nos facilitou na localização da planta e de um técnico e funcionário afecto no herbário do Departamento de Biologia da Universidade Eduardo Mondlane que nos confirmou a veracidade da planta ora em estudo neste trabalho.

6.2. Secagem e Moagem das amostras

A secagem da amostra obedeceu a fases distintas de acordo com a parte da planta (raízes ou folhas) em questão:

- ✓ Para as raízes procedeu-se em duas fases sendo que a primeira fase de secagem decorreu durante cerca de 75 dias no laboratório dos produtos naturais do Departamento de Química, e foi realizada à temperatura ambiente; a segunda fase de secagem das raízes foi procedida numa estufa a uma temperatura regulada aproximadamente a cerca de 50°C durante um período de 12 dias também no laboratório dos produtos naturais do Departamento de Química;
- ✓ Para as folhas apenas foi realizada a sua secagem à temperatura ambiente também no laboratório dos produtos naturais durante cerca de 180 dias.

A moagem quer das raízes quer das folhas foi feita no **INIA** (Instituto Nacional de Investigação Agronómica).

6.3. Extracção

Para a preparação do extracto das folhas assim como das raízes para o presente trabalho foram usados dois métodos de extracção:

- ✓ A extracção por Maceração na qual a amostra previamente seca e moída foi macerada em metanol durante 72 horas.

- ✓ A extracção por Soxhlet foi realizada seguindo dois métodos diferentes: No primeiro caso a extracção realizou-se usando como solventes o éter de petróleo 40-70 seguido do diclorometano e por fim o metanol. No segundo caso a amostra apenas foi extraída com metanol.

Os extractos obtidos foram analisados por cromatografia em camada fina (TLC) e depois submetidos a outros tratamentos: extracção por solventes adequados e fraccionamento por cromatografia líquida de média pressão (MPLC).

6.3.1. Extracção por Maceração

Na extracção por maceração, 190 gramas do pó das raízes foram tratados com o éter de petróleo 40-70 (1350 ml) depois com diclorometano (1100 ml). O pó das raízes extraído com éter de petróleo e diclorometano depois da secagem foi dividido em 4 balões Erlenmeyers de 500 ml, para cada foram adicionados 300 ml de metanol e submeteu-se a maceração sob agitação durante 72 horas. Filtrou-se e o filtrado foi concentrado no rotavapor até quase à secura obtendo-se assim um resíduo de cor castanha cuja massa foi de 17.93 gramas. Este resíduo foi dissolvido em 150 ml de água destilada e depois procedeu-se a extracções sucessivas (2 e 3 vezes respectivamente), primeiro com o solvente acetato de etilo (AcOEt) com volumes iguais de 50 ml cada e em seguida o n-Butanol com volumes iguais de 40 ml cada obtendo-se duas fases: a fase orgânica e a fase aquosa. A fase n-butanólica (orgânica) foi concentrada no rotavapor, obtendo-se assim 9.40 gramas de um resíduo mucoso de cor castanha que em seguida foi submetido à análise por cromatografia em camada fina (TLC) e fraccionamento por cromatografia líquida de média pressão (MPLC).

6.3.2. Extracção por Soxhlet

Para o método do Soxhlet foram feitas duas extracções seguintes:

- ✓ Na primeira extracção, o pó das raízes submetido a extracção com metanol é o que foi previamente tratado com éter de petróleo e diclorometano. Depois da secagem dividiu-se o pó em três cartuchos adequados para a extracção com Soxhlet e

adicionou-se um volume igual de 150 ml de metanol para cada balão de fundo redondo com 250 ml de capacidade e submeteu-se a um refluxo contínuo durante 8 horas. Filtrou-se e o filtrado foi concentrado no rotavapor obtendo-se um resíduo de cor castanha de massa 10.11 gramas. Dissolveu-se este resíduo em 150 ml de água destilada e depois procedeu-se a extracções sucessivas (3 vezes) com o n-Butanol com volumes iguais de 40 ml cada obtendo-se assim duas fases, a orgânica e a aquosa. A fase n-butanólica (orgânica) foi concentrada no rotavapor obtendo-se um resíduo mucoso de cor castanha de massa 3.18 gramas que em seguida foi submetido a análises posteriores por cromatografia em camada fina (TLC) e fraccionamento por cromatografia líquida de média pressão (MPLC);

- ✓ Para a segunda extracção a amostra bruta não foi submetida a extracção com éter de petróleo e diclorometano, apenas foi feita a extracção com o metanol. Neste caso 40.00 gramas do pó de raízes foram repartidos em três cartuchos, adicionou-se um volume igual de 150 ml do solvente para cada balão de 250 ml e submeteu-se a amostra a um refluxo contínuo durante 8 horas. Filtrou-se e o filtrado foi concentrado no rotavapor tendo sido obtido um resíduo de cor castanha de massa 10.50 gramas. Dissolveu-se este resíduo em 150 ml de água destilada e depois procedeu-se a extracções sucessivas (3 vezes) com o n-Butanol com volumes iguais de 35 ml cada obtendo-se duas fases (orgânica e aquosa). A fase n-butanólica foi concentrada no rotavapor obtendo-se um resíduo mucoso de cor castanha de massa 7.03 gramas que em seguida foi submetido a análises posteriores por cromatografia em camada fina (TLC) e fraccionamento por cromatografia líquida de média pressão (MPLC).

6.4. Cromatografia em camada fina (TLC)

Neste trabalho usou-se a técnica da cromatografia de camada fina (TLC) para as análises dos extractos brutos das raízes do *Asparagus plumosus* Baker e das fracções obtidas do fraccionamento por cromatografia líquida de média pressão (MPLC). Foram usadas para as análises por TLC a *Sílica-gel 60 F₂₅₄* sobre as placas de alumínio (MERCK) e os

sistemas eluentes seguintes: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$; $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$; AcOEt/MeOH e o $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$.

As seguintes condições cromatográficas foram usadas:

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

6.4.1. Aplicação da amostra e sistema de detecção

As amostras dos extractos brutos e fracções obtidas do fraccionamento por MPLC das raízes do *Asparagus plumosus* Baker foram aplicadas na base das placas de TLC com ajuda de capilares de 2µl sobre um traço horizontal feito a lápis, a 0.5cm de um dos bordos da placa cromatográfica razoavelmente separadas umas das outras (cerca de 1.0 cm).

Para os compostos corados presentes numa dada amostra, é possível identificá-los a olho nu; no entanto, para os que não eram corados, tivemos que recorrer a técnicas de revelação. Para os compostos não visíveis com uma lâmpada de UV, utilizaram-se como reveladores Vanilina- H_3PO_4 e Hidrogenoftalato de Anilina. Estes reveladores foram aplicados com ajuda do frasco spray nas placas depois de desenvolvidas e secadas à temperatura ambiente. A sua activação foi feita por aquecimento sobre uma placa eléctrica a uma temperatura de 100 -110°C por um período de 3 a 10 minutos.

- Para a detecção das saponinas foi usado o revelador Vanilina- H_3PO_4 preparado dissolvendo 1 grama de vanilina em 50 ml de Ácido Fosfórico e 50 ml de Etanol.
- Para a detecção dos açúcares foi usado um outro revelador Hidrogenoftalato de Anilina, preparado dissolvendo 1.60 gramas do ácido ftálico em 1 ml de anilina, depois adiciona-se 47 ml de n-butanol, 47 ml de éter dietílico e por fim completa-se o volume com água.

O sistema eluente mais usado é o mencionado na hidrólise ácida (n-BuOH - H₂O - AcOH (8: 2: 10)) porque possibilita a separação clara dos açúcares quando se usa papel cromatográfico WHATMAN Nº 1 [9][10].

6.4.2. Cromatograma dos extractos brutos

Fez-se a Cromatografia em Camada Fina (TLC) para os dois extractos brutos, quer o extracto previamente tratado (Br-Trat.) com éter de petróleo e diclorometano assim como o sem tratamento prévio (Br-Mãe). O sistema de solvente usado foi CH₂Cl₂/EtOH (7:3) e observou-se que os dois extractos apresentavam as manchas comuns (TLC-1) seguintes como ilustra a figura-8:

- ✓ Os dois extractos apresentaram uma mancha única de cor castanha (UV 254nm) e azul fluorescente (UV 366nm) de R_f 0.86 que, depois do uso do revelador Vanilina-H₃PO₄ não foi visível tendo porém sido observadas outras seis manchas;
- ✓ As 6 manchas observadas aquando do uso do revelador Vanilina-H₃PO₄ apresentaram as seguintes características: vermelho-acastanhado e R_f 0.93; violeta e R_f 0.84; castanho-claro e R_f 0.57; castanho-escuro e R_f 0.31; violeta e R_f 0.18 e violeta intensa quase no ponto de aplicação da amostra.

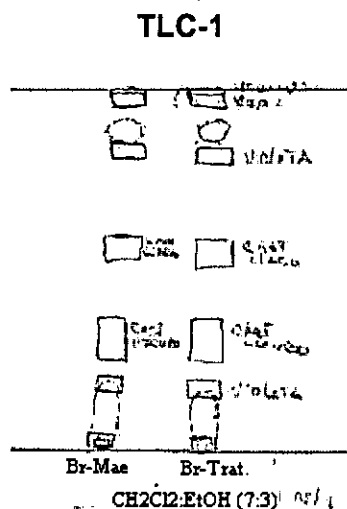


Figura-8: Cromatograma dos extractos brutos *n*-butanólicos

6.5. Ensaaios qualitativos (testes preliminares)

Três testes qualitativos foram realizados com o objectivo de provar a existência ou não das saponinas (esteroidais ou triterpénicas) nas raízes da planta *Asparagus plumosus* Baker.

6.5.1. Teste de Liebermann-Burchard para esteróides e triterpenóides

Foram realizados dois testes para os extractos obtidos por maceração, para o primeiro teste usou-se 0.10 gramas do extracto bruto metanólico concentrado no rotavapor e para o segundo usou-se 0.10 gramas do extracto bruto metanólico obtido do pó previamente tratado com éter de petróleo e diclorometano. Transfere-se para um copo e extrai-se com 2 ml de Clorofórmio. Filtra-se a solução clorofórmica para um tubo de ensaio seco, adiciona-se 1 ml de anidrido acético e agita-se suavemente. Adiciona-se depois três gotas de ácido sulfúrico e agita-se suavemente. Observou-se a formação duma coloração vermelha [10].

6.5.2. Teste de espuma

Tomou-se o resíduo insolúvel em clorofórmio no teste anterior, redissolveu-se em água e filtrou-se para um tubo de ensaio. Agitou-se suavemente o tubo de ensaio contendo o filtrado. Observou-se a formação de espuma persistente na superfície do líquido no tubo de ensaio.

6.5.3. Teste para confirmação da presença de saponinas

Juntou-se 2 ml de ácido clorídrico ao tubo de ensaio do teste anterior contendo o filtrado. Deixou-se em banho-maria durante 1 hora. Depois de passado este tempo deixou-se arrefecer e por fim neutraliza-se com o NaOH agitando suavemente. Observou-se a formação de um precipitado que é a aglicona (sapogenina) [3].

6.6. Hidrólise ácida do extracto *n*-butanólico

Para a hidrólise ácida, 0.20 gramas do extracto bruto foram dissolvidos em 15 ml de metanol (MeOH) e adicionou-se depois 45 ml de HCl 20%. A mistura da reacção foi aquecida a refluxo durante 6 horas num banho-maria e deixou-se arrefecer. Procedeu-se à extracção sucessiva (3 vezes) com volumes iguais de 30 ml de clorofórmio (CHCl₃) produzindo-se duas fases: a fase orgânica que é suposta conter a parte aglicona e a fase aquosa suposta conter os carboidratos.

A fase aquosa foi neutralizada com NaHCO₃ e depois concentrada até quase à secura obtendo-se assim os açúcares (monossacáridos) enquanto que à fase orgânica (aglicona) foi adicionado MgSO₄ anidro de modo a eliminar pequenas quantidades de água presentes e depois foi concentrada até quase à secura.

Os açúcares presentes foram identificados por cromatografia em papel em comparação com amostras-padrão de açúcares e dados da literatura. O sistema de eluentes utilizado foi a mistura complexa seguinte: *n*-BuOH - AcOH - H₂O (8:2:10) e o revelador usado foi o Hidrogenoftalato de Anilina [2][10].

Fez-se uma PC (PC-1) para os extractos obtidos depois da hidrólise ácida na tentativa de identificar os açúcares presentes e o sistema de solventes usado foi uma mistura de *n*-BuOH-HOAc-H₂O (8:2:10). Para esta análise por PC foram usados quatro padrões (Galactose, Xilose, Glucose e Arabinose) dissolvidos em água e adicionou-se algumas gotas de propanol [10][22].

- ✓ A fase aquosa apresentou uma mancha de cor azul fluorescente (UV 254nm e 366nm) a R_f 4.50 e depois de revelado com Hidrogenoftalato de Anilina apresentou duas manchas, uma de cor castanha a R_f 1.20 e a outra de cor amarela-acastanhada a R_f 3.20;
- ✓ Na fase orgânica, neste sistema de eluentes tudo sobe na frente do solvente (visível só na lâmpada de UV).
- ✓ O extracto bruto apresentou uma mancha de cor castanha a R_f 1.80 que só foi visualizada depois do uso de revelador mas na lâmpada de UV verifica-se que o resto subiu na frente do solvente.

Com base nesta PC presume-se que haja Glucose e Ramanose devido às características (coloração e R_f) semelhantes às dos padrões reportados na literatura como ilustra a figura-9.

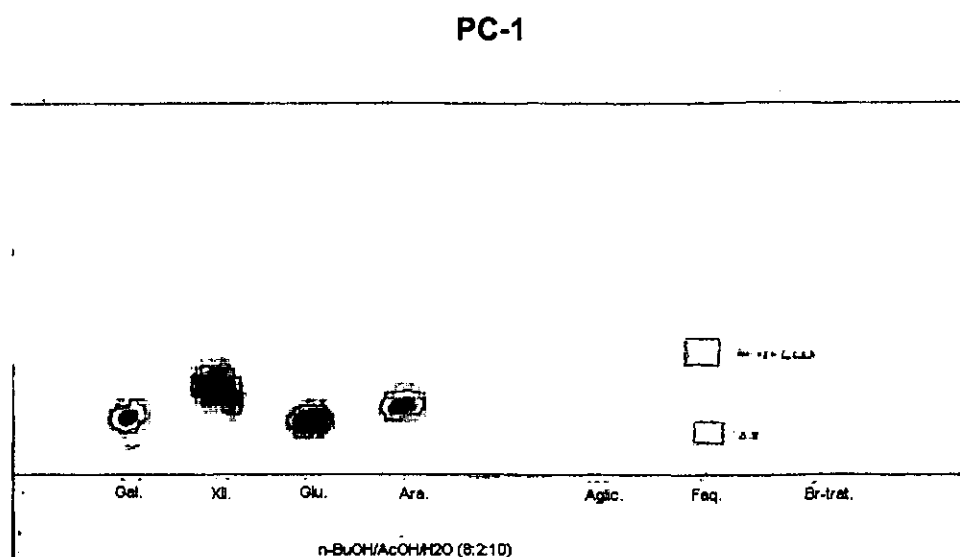


Figura-9: Cromatograma referente à identificação dos açúcares

6.7. Fraccionamento por Cromatografia líquida de Média Pressão

Os extractos brutos foram fraccionados usando a Cromatografia Líquida de Média Pressão (MPLC).

6.7.1. Enchimento e montagem da coluna MPLC

Para o enchimento da coluna foi usado o seguinte material:

- ❖ Uma coluna cromatográfica com os respectivos acessórios;
- ❖ Dois suportes com as respectivas garras;
- ❖ Um agitador magnético;
- ❖ Uma bomba de média pressão;
- ❖ Dois funís;
- ❖ Tubos de ensaio dispostos num *carrossel*.

Fixa-se o pistão numa das extremidades da coluna e a seguir introduz-se o filtro. Monta-se a coluna no suporte com o pistão firmemente apoiado na base do suporte. Coloca-se então, na extremidade superior aberta da coluna cromatográfica, um funil de haste larga e introduz-se Sílica-Gel 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, introduz-se então cuidadosamente o outro pistão e fixa-se firmemente o pistão e a tampa. Monta-se finalmente a coluna para a eluição conforme a figura-10.

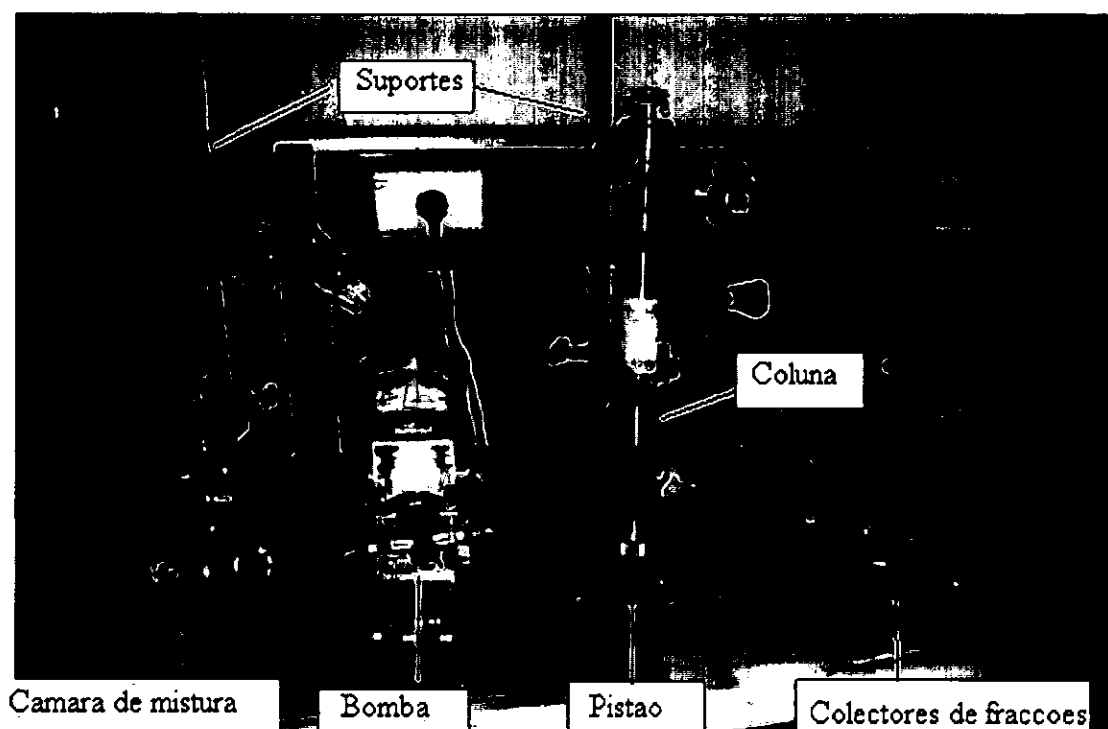


Figura-10: Fotografia da montagem de Coluna de MPLC

6.7.2. Fraccionamento do extracto *n*-butanólico

O extracto bruto previamente tratado com éter de petróleo e diclorometano (Br-Trat.) foi submetido a Cromatografia Líquida de Média Pressão (MPLC-1), na tentativa de isolar

produtos cujas manchas na TLC correspondiam aos produtos principais com características (coloração e R_f) de saponinas. Para este fracionamento usou-se cerca de 0.40 gr da amostra e o sistema de solventes usado foi nas seguintes proporções: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (30:3; 25:5 e 15:15), $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (21:10:2), $\text{MeOH}/\text{CH}_3\text{COCH}_3$ (27:3), $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (27:3) e por fim $n\text{-BuOH}/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$ (15:3:12). Deste fracionamento resultou em 33 fracções e em seguida fez-se uma análise por TLC (TLC-2) e o sistema eluente usado foi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (10:2). As 37 fracções foram agrupadas em 5 fracções como ilustra a figura-11:

- ✓ As fracções de 1 a 6 (agrupadas na fracção-I) são somente visíveis na lâmpada de UV 366nm e apresentaram uma única mancha de cor azul fluorescente e R_f 0.82.
- ✓ As fracções de 7 a 13 (agrupadas na fracção-II) apresentaram 5 manchas: uma mancha de cor amarela (UV 254nm) que depois do uso de revelador (Vanilina- H_3PO_4) se tornou vermelha-acastanhada de R_f 0.80; as fracções de 7 a 12 apresentaram uma mancha de cor azul fluorescente (UV 366nm) R_f 0.76; as fracções de 8 a 13 apresentaram uma mancha de cor castanha (UV 254nm) R_f 0.50; as fracções de 8 a 11 apresentaram duas manchas de cor amarela (UV 254nm) R_f 0.08 e 0.05;
- ✓ As fracções de 14 a 16 (agrupadas na fracção-III) apresentaram uma única mancha de cor castanha-clara R_f 0.17 somente depois do uso do revelador.
- ✓ As fracções de 17 a 22 (agrupadas na fracção-IV) apresentaram duas manchas, uma mancha de cor amarela (UV 254nm) e azul fluorescente (UV 366nm) e que depois do uso do revelador se tornou violeta R_f 0.16 e uma outra mancha de cor amarela R_f 0.11 somente visível na lâmpada de UV 254nm;
- ✓ As fracções de 23 a 33 (agrupadas na fracção-V) apresentam mancha de cor amarela (UV 254nm) e de cor azul fluorescente (UV 366nm) que depois do uso de revelador (Vanilina- H_3PO_4) se tornaram violeta e se deslocaram um pouco do ponto de aplicação no sistema de solvente usado.

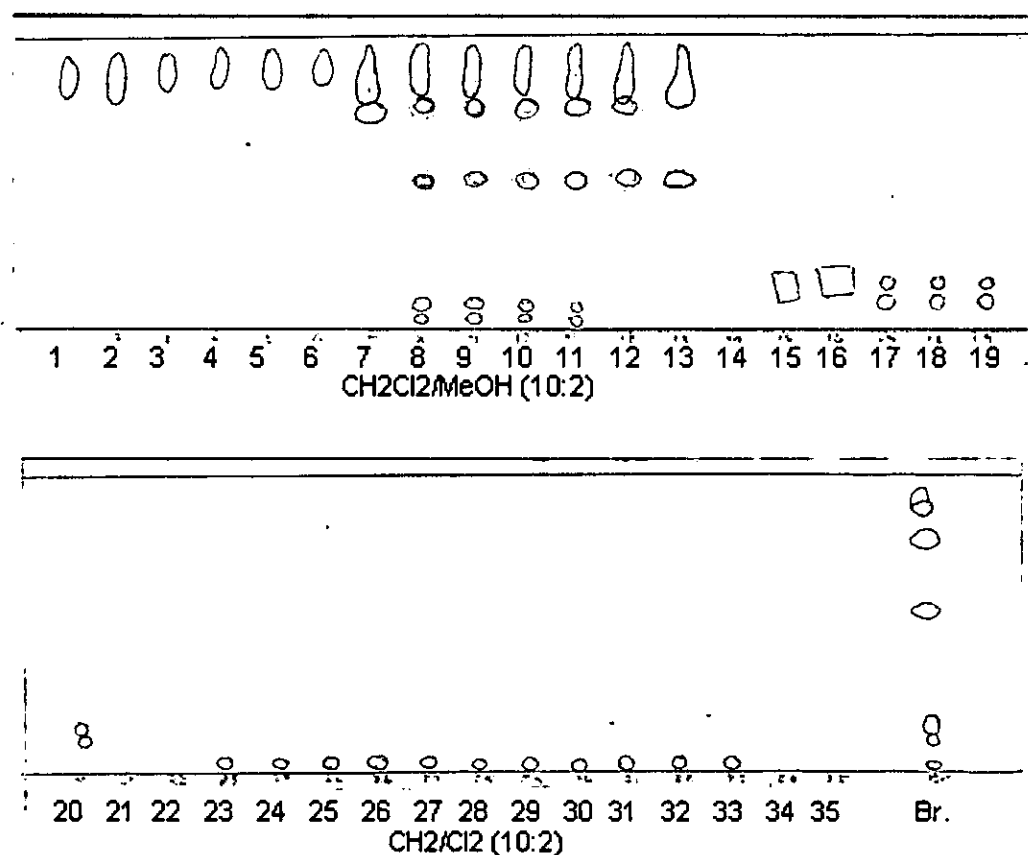


Figura-11: Cromatograma das 33 fracções da MPLC-1 (TLC-2)

As fracções agrupadas de 1 a 5 foram concentradas e submetidas a análises por TLC num sistema de solventes diferentes como ilustra a figura-12.

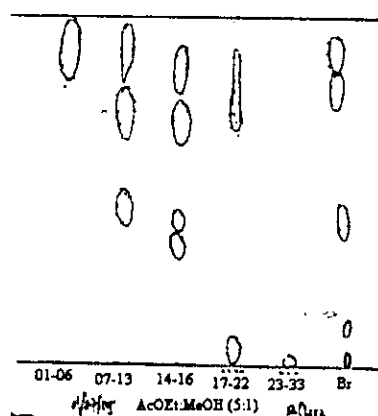


Figura-12: Cromatograma das 5 fracções agrupadas (TLC-3)

A fracção-II (fracções de 7 a 13) foi submetida a um novo fraccionamento por cromatografia líquida de média pressão (MPLC-2) e o sistema de solventes usado foi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ nas proporções seguintes 19:1; 18:2; 17:3; 16:4; 15:5; 10:10; 0:20.

Deste fraccionamento obteve-se 19 fracções conforme a figura-13 que foram analisadas por TLC (TLC-4) no sistema de solventes $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (10:2) e observou-se o seguinte:

- ✓ As fracções de 1 a 5 e 16 a 19 não apresentaram nenhuma mancha.
- ✓ A fracção 6 apresentou uma mancha de cor castanha (UV 254nm) e azul fluorescente (UV 366nm) que depois de revelado se tornou azul R_f 0.77.
- ✓ As fracções de 7 a 9 apresentaram duas manchas, uma idêntica à mancha da fracção 6 e a outra mancha de cor azul fluorescente (UV 366nm) que depois do uso do revelador (Vanilina- H_3PO_4) se tornou castanha-avermelhada R_f 0.58.
- ✓ As fracções de 10 a 15 apresentaram uma única mancha de cor azul fluorescente (UV 366nm) que depois do uso do revelador se tornou castanha-avermelhada R_f 0.58 (mesma mancha que nas fracções 7-9).

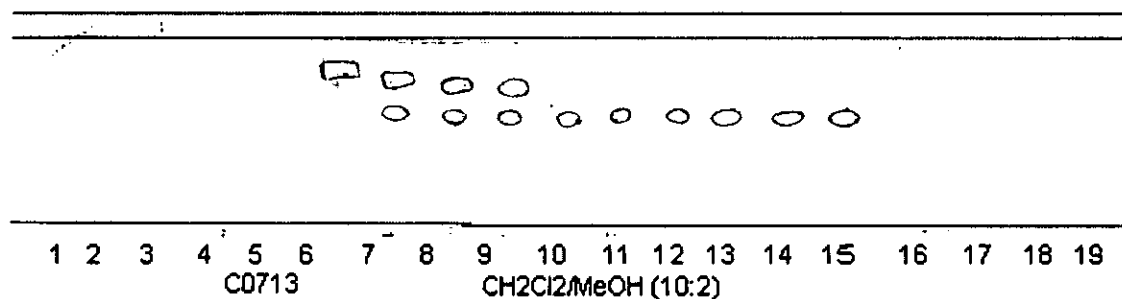


Figura-13: Cromatograma das 19 fracções da MPLC-2 (TLC-4)

De seguida as fracções 6-7 foram misturadas e concentradas, as fracções 10-15 foram também misturadas e concentradas e depois comparadas com o bruto no sistema de solventes $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ (7:3) como ilustra a figura-14.

- ✓ A mistura das fracções 6 a 7 apresentou uma mancha de cor castanha (UV 254nm) e azul fluorescente (UV 366nm) e que depois do uso do revelador (Vanilina- H_3PO_4) se tornou vermelha-acastanhada R_f 0.93;
- ✓ A mistura das fracções de 10 a 15 apresentou também uma única mancha de cor azul fluorescente (UV 366nm) e que depois do uso do revelador (Vanilina- H_3PO_4) se tornou verde-acastanhada R_f 0.63.

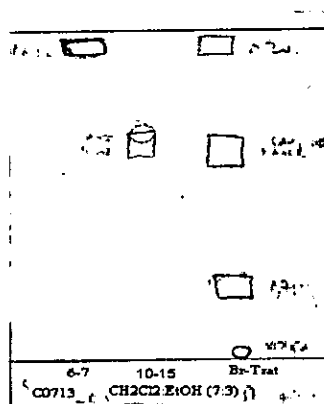


Figura-14: Cromatograma das misturas de fracções 6-7; 10-15 e o extracto bruto (TLC-5)

A fracção-IV (fracções de 17 a 22) foi de seguida submetida a um novo fraccionamento por cromatografia líquida de média pressão (MPLC-3) e o sistema de solventes usado foi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ nas proporções seguintes 28:2; 26:4; 24:6; 22:8; 20:10; 15:15; 0:30.

Deste fraccionamento obteve-se 27 fracções ilustradas na figura-15 que foram analisadas por TLC (TLC-6) no sistema de solventes $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ (7:3) e observou-se o seguinte:

- ✓ As fracções de 1 a 8 não apresentaram nenhuma mancha;
- ✓ As fracções de 9 a 10 apresentaram uma mancha única visível (UV 254nm) de cor amarela que depois do uso de revelador (Vanilina- H_3PO_4) se tornou castanha R_f 0.60;
- ✓ As fracções de 11 a 17 apresentaram uma única mancha somente visível depois de aplicado o revelador e que era idêntica à das fracções 9 a 10; verificou-se também um arraste nas fracções de 11 a 14 e, nas fracções de 15 a 17 observou-se uma sobreposição de manchas castanha e violeta;
- ✓ As fracções de 18 a 23 apresentaram uma mancha única de cor violeta R_f 0.25 somente depois de aplicado o revelador.
- ✓ As fracções de 24 a 27 não apresentaram nenhuma mancha.

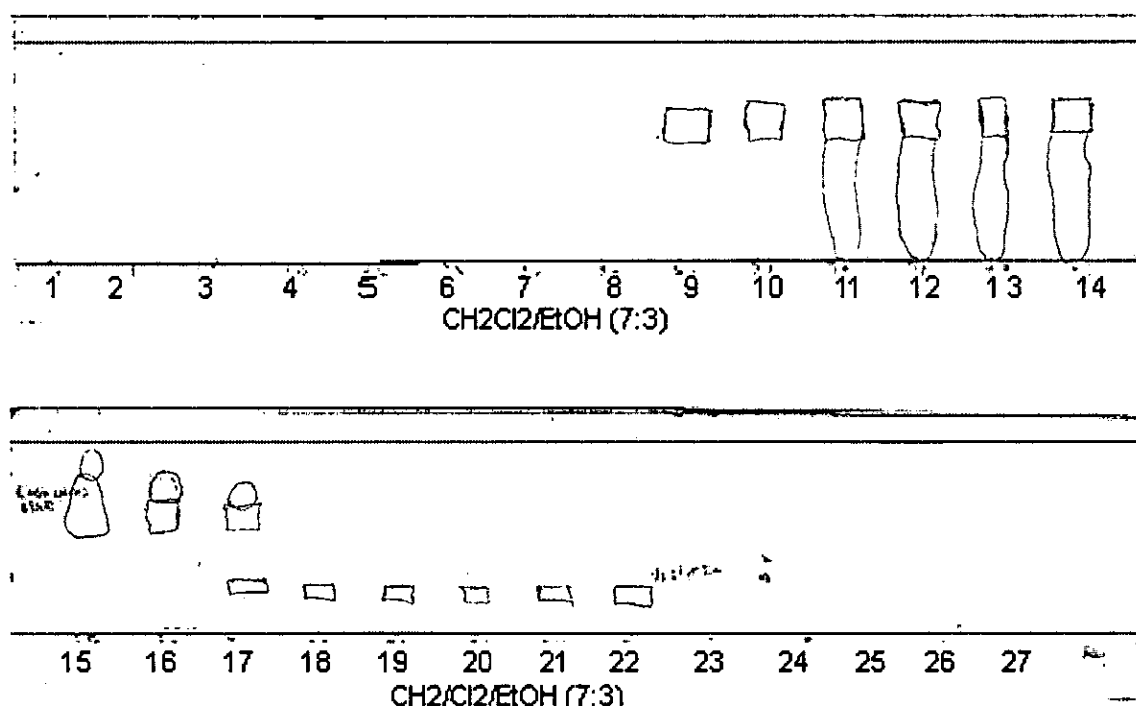


Figura-15: Cromatograma das 27 fracções da MPLC-3 (TLC-6)

Fez-se uma TLC final das fracções concentradas 6-7, 10-15, 18-23 e 23-33 e comparadas com o extracto bruto no sistema de solventes CH₂Cl₂/EtOH (7:3) como ilustra a figura-16.

- ✓ A mistura das fracções 6-7 (amostra **P1**; MPLC-2) apresentou uma mancha de cor castanha (UV 254nm) e azul fluorescente (UV 366nm) e que depois do uso do revelador (Vanilina-H₃PO₄) se tornou vermelha-acastanhada R_f 0.94;
- ✓ A mistura das fracções 10-15 (amostra **P2**; MPLC-2) apresentou uma única mancha de cor azul fluorescente (UV 366nm) e que depois do uso do revelador (Vanilina-H₃PO₄) se tornou verde-acastanhada R_f 0.62;
- ✓ A mistura das fracções 18-23 (amostra **P3**; MPLC-3) foi visível somente depois de aplicado o revelador e apresentou a cor violeta R_f 0.20;
- ✓ A mistura das fracções 23-33 (amostra **P4**; MPLC-1) foi visível somente depois de aplicado o revelador e apresentou a cor violeta intensa quase no ponto de aplicação da amostra.

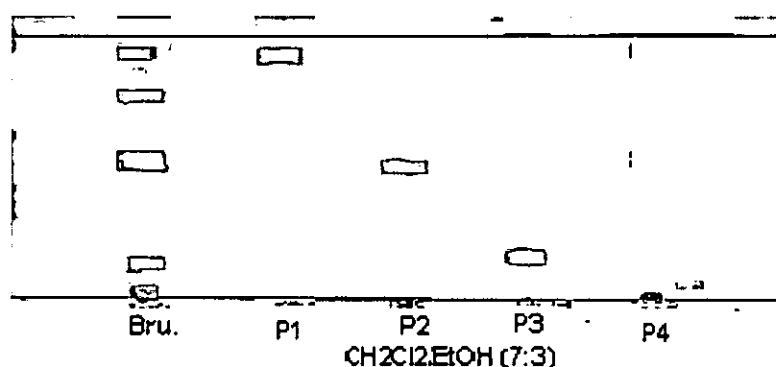


Figura-16: Cromatograma final dos compostos isolados (TLC-7)

De seguida as fracções 23-33 (amostra **P4**; MPLC-1) foram misturadas e concentradas e as fracções 18-33 (amostra **P3**; MPLC-3) também foram misturadas e concentradas e depois foram submetidas a uma análise por TLC (TLC-8) no sistema de solventes $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:9) na tentativa de verificar se a mancha era única como ilustra a figura-17.

- ✓ A mistura das fracções 23 a 33 (amostra **P4**; MPLC-1) apresentou uma mancha de cor castanha (UV 254nm) e azul fluorescente (UV 366nm) a R_f 0.11 e que depois de aplicado o revelador (Vanilina- H_3PO_4) se observou uma mancha adicional de cor azul R_f 0.18;
- ✓ A mistura das fracções de 18 a 23 (amostra **P3**; MPLC-3) apresentou uma única mancha de cor azul fluorescente (UV 366nm) e que depois do uso do revelador (Vanilina- H_3PO_4) se tornou violeta R_f 0.31.

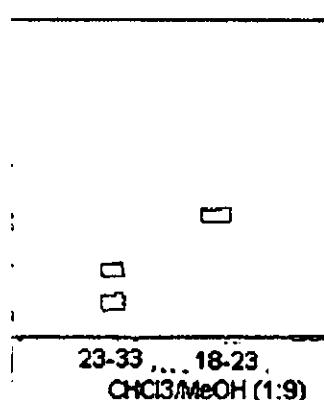


Figura-17: Cromatogramas das fracções 23-33 (amostra **P4**; MPLC-1) e das fracções 18-23 (amostra **P3**; MPLC-3) (TLC-8).

De seguida fez-se uma TLC dos extractos brutos butanólicos das raízes obtidas por maceração e soxhlet e o extracto bruto butanólico das folhas do *Asparagus plumosus* Baker para verificar se a composição química era a mesma (evidência de manchas comuns) e, para tal, foram usados diferentes sistemas de solventes seguintes:

- ✓ No sistema AcOEt/MeOH (9:1) apenas foram visualizadas três manchas comuns bem separadas (TLC-9);
- ✓ No sistema MeOH/CHCl₃ (7:3) apareceram 5 manchas diferentes (TLC-10);
- ✓ No sistema CH₂Cl₂/MeOH (1:1) também foi visualizado o mesmo número de manchas que no sistema MeOH/CHCl₃ só que a separação das manchas no sistema CH₂Cl₂/MeOH é mais nítida (TLC-11).

Com base nestas TLCs ilustradas na figura-18 pode-se concluir que o melhor sistema de eluente é o CH₂Cl₂/MeOH (1:1) porque apresenta melhor separação das manchas.

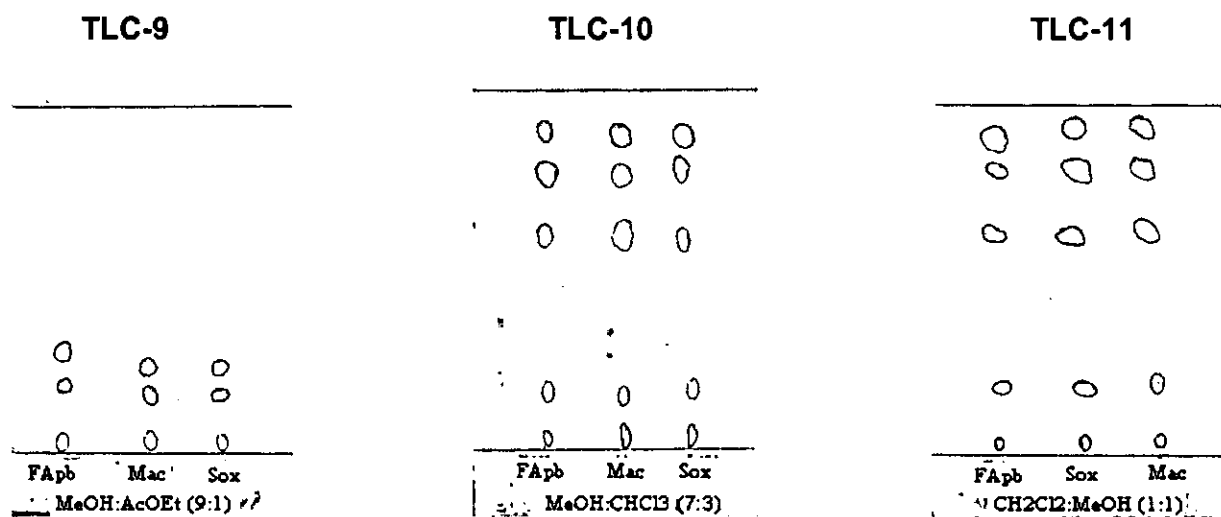


Figura-18: Cromatogramas dos extractos brutos *n*-butanólicos das raízes e folhas

6.8. Análise das fracções isoladas por espectroscopia na região de UV-Vis

As amostras isoladas foram submetidas a análises por espectroscopia na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) na tentativa de confirmar se os comprimentos de ondas eram próximos dos compostos isolados nas plantas do género *Asparagus* encontrados na literatura e os resultados foram os seguintes:

- ❖ Na amostra A1 (fracção 23-33) observou-se por espectrofotometria UV-Vis [(MeOH, λ_{max} = 213nm e quando adicionado HCl λ_{max} = 217nm) — vide anexo-II];
- ❖ Na amostra A2 (fracção 6-7) observou-se por espectrofotometria UV-Vis [(MeOH, λ_{max} = 207nm e quando adicionado HCl λ_{max} = 209nm) — vide anexo-III];
- ❖ Na amostra A3 (fracção 17-22) observou-se por espectrofotometria UV-Vis [(MeOH, λ_{max} = 212nm e quando adicionado HCl λ_{max} = 210nm) — vide anexo-IV] e;
- ❖ Na amostra A4 (fracção 10-15) observou-se por espectrofotometria UV-Vis [(MeOH, λ_{max} = 210nm e quando adicionado HCl λ_{max} = 208nm) — vide anexo-V].

7. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Para a obtenção da fracção total de saponinas (fracção *n*-butanólica), neste trabalho usamos dois procedimentos diferentes mas que dão os mesmos resultados:

- ❖ No primeiro procedimento, semelhante ao utilizado por Oketch-Rabah et al [21] no isolamento da Muzanzagenina da planta *Asparagus africanus*, o pó é tratado sucessivamente com éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo e finalmente o metanol. O extracto metanólico depois de concentrado é dissolvido em água e extraído com *n*-butanol. Depois da concentração da fracção *n*-butanólica obtém-se a fracção total de saponinas;
- ❖ No segundo procedimento, semelhante ao utilizado por Ahmad V. U. et al [2] no isolamento das saponinas esteroidais da planta *Asparagus dumosus*, o pó é directamente extraído com metanol. Depois da concentração o resíduo é dissolvido em água e a fase aquosa é extraída com acetato de etilo e *n*-butanol. A fracção *n*-butanólica é concentrada e obtém-se a fracção total de saponinas. Na falta de acetato de etilo, quando extraímos a fase aquosa directamente com o *n*-butanol sem tratamento prévio com acetato de etilo e quando comparamos os dois extractos

brutos *n*-butanólicos por TLC, não observamos nenhuma diferença. O cromatograma dos dois extractos brutos *n*-butanólicos (TLC-1) apresenta as mesmas manchas.

- ✓ Em geral, no isolamento das saponinas usa-se uma extracção alcoólica-aquosa. A extracção com *n*-butanol na fase aquosa serve para a eliminação de açúcares livres, clorofila, aminoácidos e ácidos orgânicos, entre outras substâncias hidrofílicas que ficam na fase aquosa obtendo-se assim a fracção purificada de saponinas na fase butanólica.

Todos os testes de reconhecimento e confirmação da presença de saponinas nos extractos brutos das raízes da planta *Asparagus plumosus* Baker foram positivos:

- ❖ Quando se efectuou o teste de Liebermann-Burchard para esteróides e terpenóides observou-se uma coloração vermelha que é o indicador dum teste positivo para heterósidos.
- ❖ Sobre o teste de espuma para a confirmação da existência de saponinas nos extractos brutos metanólicos obtidos por maceração e soxhlet notou-se a formação de espuma persistente na superfície do líquido no tubo de ensaio.
- ❖ Sobre a confirmação da existência de saponinas nos extractos obtidos por maceração e soxhlet notou-se a formação de um precipitado que é a parte aglicona (sapogenina). Este facto indica a presença de saponinas nos respectivos extractos porque contém duas partes sendo uma que precipita e é solúvel em clorofórmio enquanto que a outra (dos carboidratos) se mantém em solução.
- ✓ A hidrólise ácida foi realizada sobre a fracção total das saponinas dos dois extractos brutos (extracto metanólico obtido directamente extraíndo o pó com metanol e o extracto previamente tratado com éter de petróleo, diclorometano e acetato de etilo) em vez de se fazer sobre os compostos isolados devido a pouca quantidade destes.

- ✓ Na literatura, os estudos realizados sobre as plantas *Asparagus africanus* e *Asparagus dumosus* mostraram que os açúcares obtidos da hidrólise ácida das saponinas isoladas são: Glucose e Arabinose no caso de *Asparagus africanus* e Glucose e Ramanose no caso de *Asparagus dumosus*. Das análises cromatográficas realizadas sobre os produtos da hidrólise ácida da fracção total das saponinas (fracção *n*-butanólica) no caso de *Asparagus plumosus* Baker, presume-se que haja presença dos açúcares Glucose e Ramanose.
- ✓ Hidrogenoftalato de Anilina foi o revelador usado para a detecção dos açúcares em análises por Cromatografia em Papel (PC) e o sistema de solventes *n*-BuOH-AcOH-H₂O (8:2:10) foi a fase móvel que apresentou os melhores resultados. Entretanto, embora também tenham sido realizados alguns testes cromatográficos usando outros solventes (*n*-BuOH-EtOH-H₂O (8:2:5) e H₂O-MeOH-AcOH-AcOEt (2:4:2:12)), como fase móvel, os resultados obtidos não foram satisfatórios quanto à resolução das manchas.
- ✓ Antes da realização de análises por Cromatografia em Papel (PC), tentamos analisar os açúcares por Cromatografia em Camada Fina (TLC) mas sem sucessos. Os produtos da hidrólise ácida da fracção total das saponinas analisadas por Cromatografia em Papel (PC) usando como sistema de solventes *n*-BuOH-AcOH-H₂O apresentaram características semelhantes (coloração e R_f) às reportadas na literatura. Presume-se que haja Ramanose e Glucose porque se verificou a formação das cores amarela-acastanhada R_f 3.20 e castanha R_f 1.20 idênticas às da literatura. Apesar de não termos o padrão de Ramanose este foi confirmado mediante a coloração e o valor de R_f existentes na literatura.
- ✓ Os quatro padrões (Galactose, Xilose, Glucose e Arabinose) usados em análises por Cromatografia em papel (PC) foram dissolvidos em água e adicionadas algumas gotas de propanol para prevenirem a contaminação por bactérias.

- ✓ O fraccionamento com CH₂Cl₂/MeOH do extracto bruto obtido por maceração de 190 gramas do pó das raízes do *Asparagus plumosus* Baker permitiu evidenciar a existência de muitas manchas quando analisadas por TLC e visualizadas por UV a 254 e 366nm e reveladas usando o revelador Vanilina-H₃PO₄ que é um revelador específico para a detecção de lignanes, terpenóides, curcubitacinas e saponinas.
- ✓ Foram feitos vários fraccionamentos por Cromatografia Líquida de Média Pressão (MPLC) na tentativa de isolar produtos. Em algumas fracções, na Cromatografia em Camada Fina (TLC) evidenciou-se uma única mancha principal mas que devido às pequenas quantidades dos compostos obtidos não foi possível purificá-los. Foram isolados 3 compostos (vide TLC-7) que apresentaram as seguintes características: Fracção 6-7 apresentou cor vermelha-acastanhada R_f 0.94; Fracção 10-15 apresentou cor verde-acastanhada R_f 0.62; Fracção 17-22 apresentou cor violeta R_f 0.20.
- ✓ Foram feitas análises por espectroscopia na região de ultravioleta e visível (UV-Vis) para os compostos isolados e não foi encontrado nenhum comprimento de onda próximo do dos compostos isolados nas plantas da família *Liliaceae* do género *Aparagus* (*Asparagus africanus* e *Asparagus dumosus*).

8. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

8.1. Conclusões

Neste trabalho realizado sobre a planta *Asparagus plumosus* Baker conclui-se que:

- A fracção total de saponinas foi obtida usando uma extracção alcoólica-aquosa.
- Pelo facto de todos os ensaios qualitativos (testes preliminares) efectuados terem sido positivos, presume-se que haja presença de saponinas na planta em estudo:

este facto é sustentado pela formação duma coloração vermelha (teste de Liebermann-Burchard), formação duma espuma persistente na superfície do líquido (teste de espuma) e formação de precipitados no teste de confirmação da existência de saponinas.

- Por análises cromatográficas realizadas sobre os produtos da hidrólise ácida por meio da Cromatografia em Papel (PC) estão presentes os carboidratos Glucose e Ramanose.
- Por análises efectuadas por Cromatografia em Camada Fina (TLC-1) existem produtos semelhantes nos extractos brutos metanólicos obtidos das raízes por maceração e soxhlet.
- Das análises realizadas por espectroscopia de UV-Vis dos compostos isolados, nenhum comprimento de onda (λ_{\max}) corresponde ao das saponinas isoladas das plantas *Asparagus africanus* e *Asparagus dumosus*.
- Nas raízes desta planta em estudo foram isolados 3 compostos considerados como saponinas. A sua existência pode ser sustentada com base nas análises cromatográficas dos compostos isolados (coloração verde e castanha (UV 254nm) azul fluorescente (UV 366 nm) e R_f no intervalo entre 0.2 – 0.93); contudo, as estruturas destes compostos isolados poderiam ser elucidados só depois de análises espectroscópicas: Análise por RMN- ^1H e ^{13}C , Infravermelho (IV) e Espectroscopia de Massa (MS).

8.2. Recomendações

Recomenda-se ao Departamento de Química que no futuro:

- Se criem melhores condições técnicas para facilitar a identificação, determinação da estrutura e a actividade biológica dos compostos isolados.

- Se façam teste *in vitro* para poder confirmar se os compostos isolados na planta em estudo apresentam uma actividade biológica e, caso seja positivo avaliar a sua eficiência.
- Se façam estudos desta natureza em coordenação com o Departamento de Ciências Biológicas e a Faculdade de Veterinária ou Medicina da Universidade Eduardo Mondlane, a Universidade Pedagógica e o Ministério da Saúde de modo a que se realizem testes biológicos e provem a eficácia dos compostos isolados.
- Se criem condições para a reparação do aparelho da cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) e o de ressonância magnética nuclear (RMN) existentes no Departamento.

BIBLIOGRAFIA

1. Accame, M.E.C. (2001). Terpenos III: Triterpenos e esteroides. Plantas Medicinales, Panorama actual Med, 25, 240, 124-130. Consultado no dia 15/09/2004. (<http://portalfarma.com/pfarma/taxonomia/general/gp.00011.nsf.htm>)
2. Ahmad, V. U., Khaliq-uz-Zaman, S. M., Shameel, S., Perveen, S. and Ali, Z. (1998). Steroidal Saponins from *Asparagus dumosus* Baker. Phytochemistry, 50, 481-484
3. Berger, J. M. (2001). Isolation, Characterization and Synthesis of Bioactive Natural Products from Rainforest Flora. Dissertation for Doctor Degree of Phylosophy in Chemistry, pp. 64-103. Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg-Virginia.
4. Debella, A., Haslinger, E., Kunet, O., Michl, G. and Abebe, D. (1999). Steroidal Saponins from *Asparagus africanus*. Phytochemistry, 51, 1069-1075
5. Dorsaz, A. C. and Hostettmann, K. (1998). Molluscicidal Saponins from *Sesbania sesban*. Planta Medica, 54, 3, pp.225-227
6. Ekabo, O. A., Farnsworth, N. R., Henderson, T. O., Máo, G. and Mukherjee, R. (1996). Antifungal and molluscicidal saponins from *Serjania salzmanniana*. Journal of Natural Products, 59, 4, pp. 431-435
7. Ekabo, O. A., Cuéllar, M. J., Giner, R. M., Receio, M. C., Just, M. J., Máñez, S., Cerdá, M., Hostettman, K. and Ríos, J-L. (1997). Zanhasaponins A and B, Antiphospholipase A₂ saponins from an antiinflammatory extract of *Zanha africana* root bark. Journal of Natural Products, 60, 11, pp. 1158-1160
8. Faife, D. A. (2003). Contribuição ao estudo fitoquímico da planta *Asparagus plumosus* Baker. Tese de Licenciatura, pp 1-18, UEM-Maputo.

9. Feinberg, J. G. and Smith, I. (1962). Chromatography and Electrophoresis on Paper. Shandon Scientific Company Ltd. London, pp. 3-27
10. Harbone, J. B. (1998). Phytochemical Methods, A guide to modern techniques of plant analysis. 3rd-editon, pp 5-6. Chapman & Hall, London.
11. Heftmann, E. and Mosettig, E. (2002). Biochemistry of Steroids. Reinhold Publishing Corporation, New York, pp.45-60
12. Jun-Xing, D. and Yu, H. G. (1991). A new active steroidal saponins from Anemarrhena asphodeloides. Planta Medica, 57, 5, pp.460-462
13. Jun-Xing, D. and Yu, H. G. (1995). Antibacterial triterpenoids from Dillenia papuana and their structure-activity relationships. Phytochemistry, 40, 6, pp. 1691-1695
14. Korolkovas, A. and Burckhalter, J. H. (1988). Química Farmacêutica. Editora Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, pp. 507-521
15. Maússe, B. J. (2006). Isolamento e caracterização das lignanes nas raízes da planta Asparagus plumosus Baker. Tese de Licenciatura. UEM-Maputo.
16. Mayo, D. W., Pike, R. M., Butcher, S. S. and Trumper, P. K. (1991). Techniques for Organic Laboratory. pp 104. Jhon Wiley & Sons, New York-USA.
17. Mimaki, Y., Kanmoto, T., Sashida, Y., Nishino, A., Satomi, Y. and Nishino, H. (1996). Steroidal saponins from Hosta longipes and their inhibitory on tumour promoter-induced phospholipids metabolism of Hela Cells. Phytochemistry, 42, 4, pp. 1065-1070
18. Mimaki, Y., Kanmoto, T., Sashida, Y., Nishino, A., Satomi, Y. and Nishino, H. (1996). Steroidal Saponins from the underground parts of Chlorophytum comosum and their

- inhibitory activity on tumour promoter-induced phospholipids metabolism of HeLa cells. Phytochemistry, 41, 5. pp. 1405-1410.
19. Mimaki, Y., Kanmoto, T., Sashida, Y., Nishino, A., Satomi, Y. and Nishino, H. (1996). Steroidal Saponins from the underground parts of *Ruscus aculeatus* and their cytostatic activity on HL-60 Cells. Phytochemistry, 48, 3, pp.485-493
20. Mimaki, Y., Kauroda, M., Kameyama, A., Yokosuka, A. and Sashida, Y. (1998). Steroidal Saponins from the rhizome of *Hosta sieboldii* and their cytostatic activity on HL-60 Cells. Phytochemistry, 48, 3, pp.1361-1369
21. Oketch-Rabah, H. A., Dossaji, S. F., Christensen, S. B., Frydenvang, K., Lemmich, E., Cornett, C., Olsen, C. E., Chen, M., Kharazmi, A. and Theander, T. (1997). Antiprotozoal Compounds from *Asparagus africanus*. Journal of Natural Products, 60, 10, pp. 1017-1022
22. Pigman, W. (1998). The Carbohydrates, Chemistry, Biochemistry, Physiology. pp 55-63. Academic Press INC. Publishers, New York.
23. Roger, J. D. P. (1997). A saúde pelas plantas medicinais. Enciclopédia de educação e saúde. 2, pp. 649. Editora Porto, Portugal.
24. Schwarzbach, A. (2004). Vergleichende Untersuchungen zum Saponingehalt von *Asparagus officinalis*. Von Diplom-Lebensmitteltechnologin, pp 1-32, Technischen Universität Berlin-Alemanha. Consultado no dia 09/08/2004. (http://edocs.tu-berlin.de.com/diss/2004/Schwarzbach_anita.pdf)
25. Shimada, S., Takechi, M. and Tanaka, Y. (1991). Structure-activity of the Saponins Dioscin and Dioscinin. Phytochemistry, 30, 12. pp. 3943-3944

26. Tcheco, P. (1995). Estudo Fitoquímico da Planta Dicerocaryum. Tese de Licenciatura, pp. 19-25, UEM-Maputo.
27. Wagner, H. and Blatt, S. (1996). Plant Drug Analysis, A thin layer chromatography atlas. 2nd-Edition, pp 305-327. Springer, New York.
28. Yang, H. Y., et al (1996). Inhibitory effects of some Steroidal Saponins on Human Spermatozoa in vitro. Planta Medica, 62, 2, pp. 130-132
29. http://huitoto.udea.edu.co/~farmacogfit/Esteroides/Saponinas/I_main.html
Consultado no dia 15/09/2005
30. <http://bilbo.edu.uy/~planta/pdf/Quimica.PNPE2000/Saponinas.pdf> Consultado no dia 15/09/2005

ANEXOS

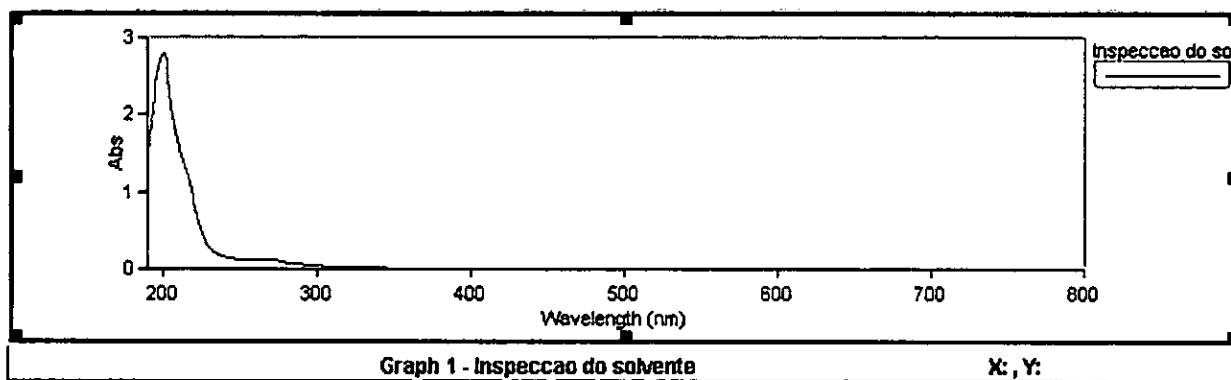
ANEXO-I: Espectro do solvente MeOH

Scan Report Thu 15 Jun 09:37:05 AM 2006

Batch:

Software version: 01.00(6)

Operator: dr. Monjane

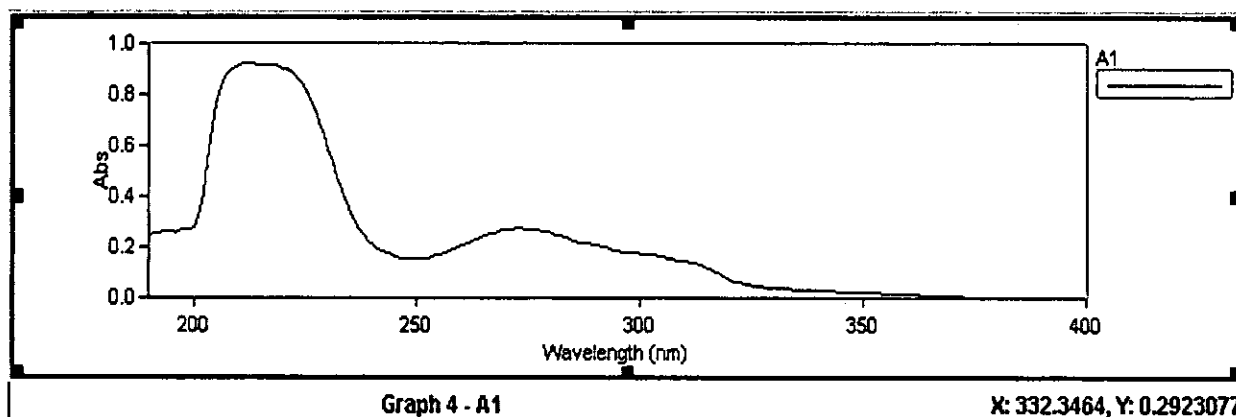


Sample Name: Inspeccao do solvente

Wavelength (nm) Abs

200.00 2.7987

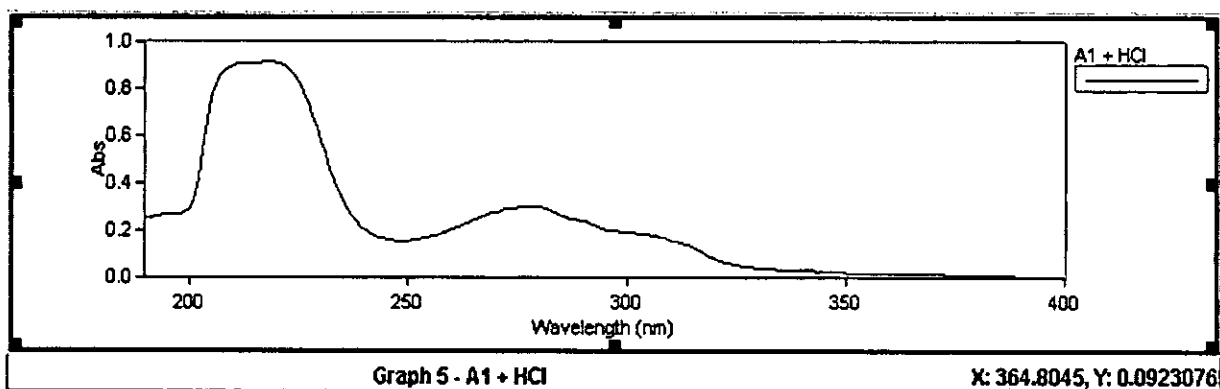
ANEXO-II: Espectro da Amostra A1 (Fracção 23-33)



Sample Name: A1

Wavelength (nm) Abs

213.00 0.9204

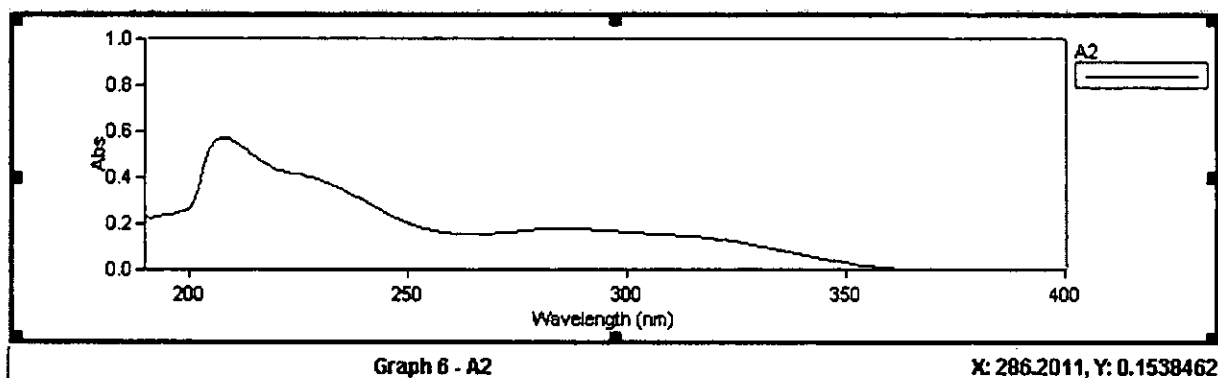


Sample Name: A1 + HCl

Wavelength (nm) Abs

217.00 0.9146

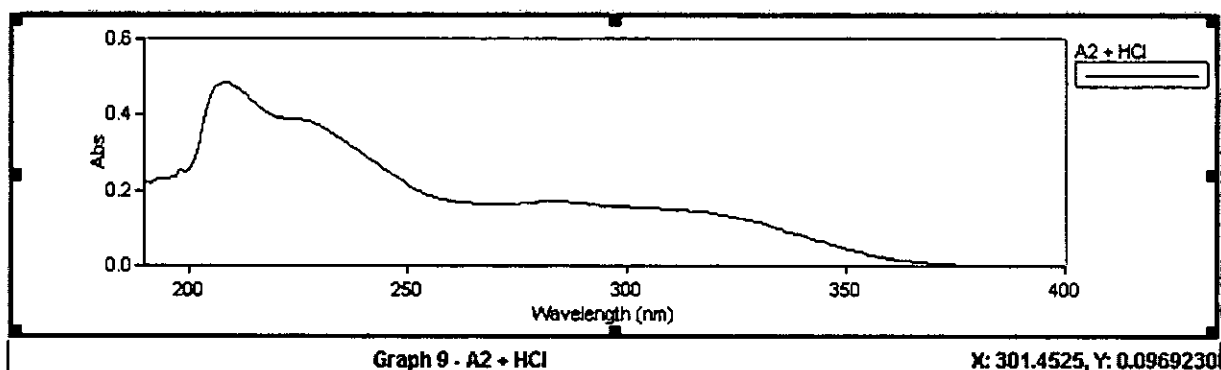
ANEXO-III: Espectro da Amostra A2 (Fracção 6-7)



Sample Name: A2

Wavelength (nm) Abs

207.00 0.5707

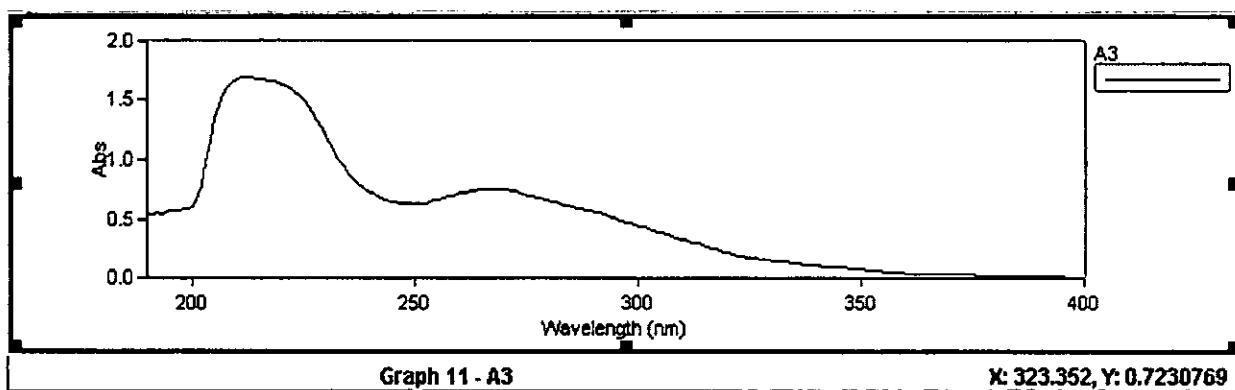


Sample Name: A2 + HCl

Wavelength (nm) Abs

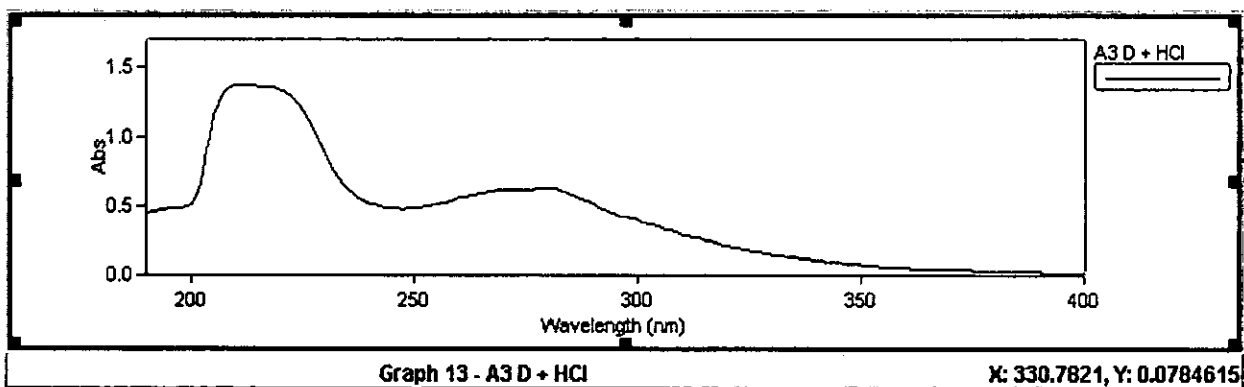
209.00 0.4853

ANEXO-IV: Espectro da Amostra A3 (Fracção 17-22)



Sample Name: A3

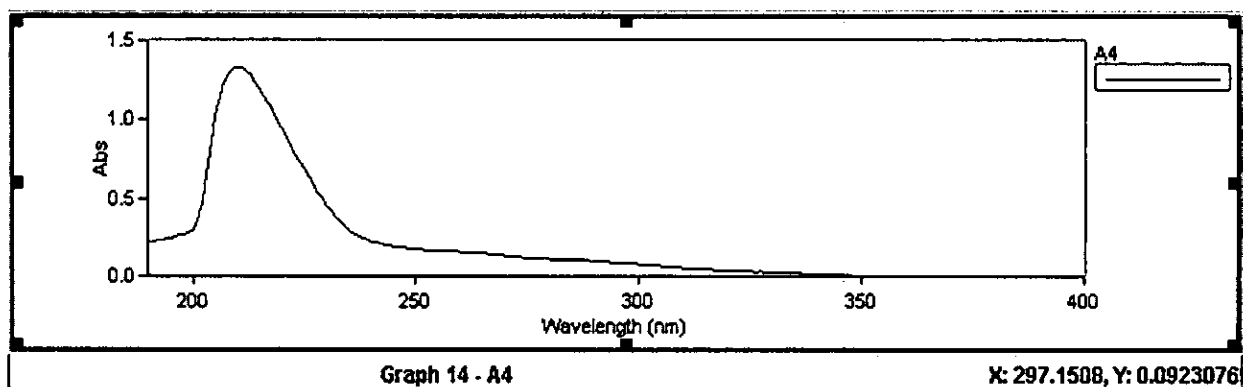
Wavelength (nm)	Abs
212.00	1.6882



Sample Name: A3 + HCl

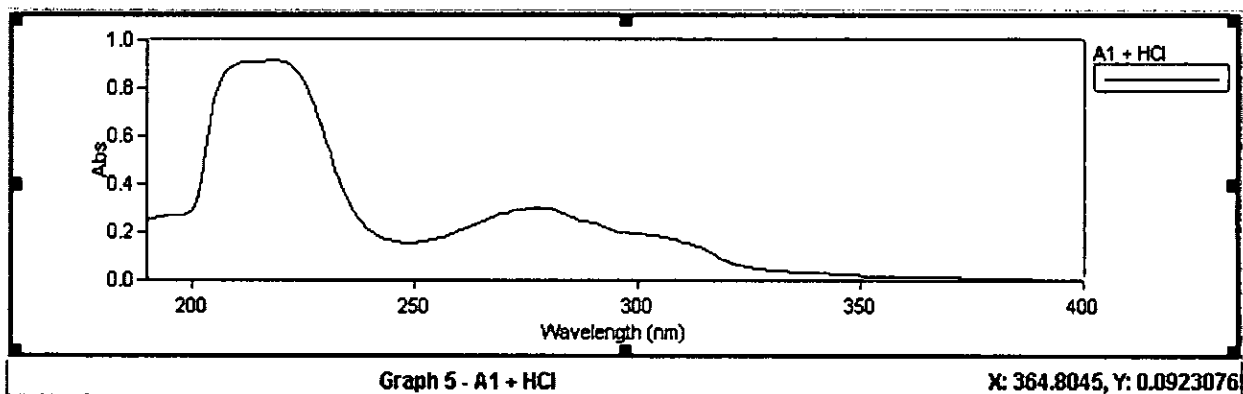
Wavelength (nm)	Abs
210.00	1.3739

ANEXO-V: Espectro da Amostra A4 (Fracção 10-15)



Sample Name: A4

Wavelength (nm)	Abs
210.00	1.3311



Sample Name: A4 + HCl

Wavelength (nm)	Abs
208.00	1.0849