

ALFREDO P. GOUVEIA

A. J. A. DE GOUVEIA

GABRIELA S. FIGUEIREDO

ABÍLIO M. DA SILVA

Laboratório Químico da Universidade
Coimbra



MÉTODOS MICRO-ANALÍTICOS DE DOSAGEM DA PLUMBAGINA E NAFTOQUINONAS RELACIONADAS, EM SOLUÇÕES AQUOSAS E EM MEIOS FISIOLÓGICOS. DIFERENÇAS DE COMPORTAMENTO COM A ESTRUTURA⁽¹⁾

Estabelece-se um método micro-analítico para determinação quantitativa da plumbagina, empregando 4-carboxifenil-hidrazina que permite distinguir entre as 5-hidroxi e 1-4-naftoquinonas e as que não têm o grupo hidroxilo nesta posição. Ao contrário do que se passa com a menadiona não foi possível recuperar a plumbagina do sangue do plasma ou das soluções aquosas da cisteína pelos métodos descritos. Propõe-se uma interpretação da reacção corada da di-hidrazona e da estabilidade da ligação da plumbagina com o sangue, o plasma e a cisteína.

1 — INTRODUÇÃO

Muitas naftoquinonas são produtos naturais, com notáveis propriedades fisiológicas — anti-hemorrágicas, bacteriostáticas, com larga aplicação em quimioterapia. Dentre as naftoquinonas-1,4, temos considerado particularmente a *plumbagina* (2-metil-5-hidroxi-naftoquinona-1,4), agulhas alaranjadas, p.f. 77°C, encontrada em plantas do género *Plumbago* (existentes no Portugal europeu e ultramarino) e também em plantas das famílias das Droséraceas e das Ebanáceas. A quinona tem cheiro irritante, afecta a membrana mucosa, tinge a pele e é vesicante. As raízes, os frutos, a seiva, de plantas que contêm a quinona, são utilizados em várias regiões com fins específicos (1).

2 — MICRO-ANÁLISE DA PLUMBAGINA

DENOËL (2) (1949) extrai as naftoquinonas com clorofórmio, em meio ácido, com passagem subsequente para hidróxido de sódio diluído. Não distingue a presença de antraquinonas.

O *Codex Medicamentarius Gallicus* (3) (1949) destila as preparações em meio fosfórico e identifica a plumbagina destilada por adição de hidróxido de sódio.

GORIS e LIOT (4) (1949) utilizam o processo anterior e doseiam a plumbagina colorimetricamente com o reagente de acetato de níquel a 5 por cento — cor vermelha vinosa.

PRISTA *et al.* (5) (1959) destilam a plumbagina em corrente de vapor de água e utilizam a reacção de cor anterior, com medidas de extinção em 560 mμ.

2.1 — SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA PLUMBAGINA

No presente trabalho, verificou-se que por destilação de solventes (clorofórmio ou éter etílico) de soluções de plumbagina havia perdas desta substância, variáveis com a temperatura de evaporação. A partir duma solução de plumbagina, em clorofórmio, com 2,5 μg/ml, por destilação a 50°C

⁽¹⁾ Trabalho apresentado ao XXIX Congresso Luso-Espanhol para o Progresso das Ciências, realizado em Lisboa em Abril de 1970.

e 80°C, obtiveram-se os seguintes resultados, por determinação de extinções em 425 m μ :

$$50^{\circ}\text{C} \quad E_{1\text{cm}}^{1\%} = 4100$$

$$80^{\circ}\text{C} \quad E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2225$$

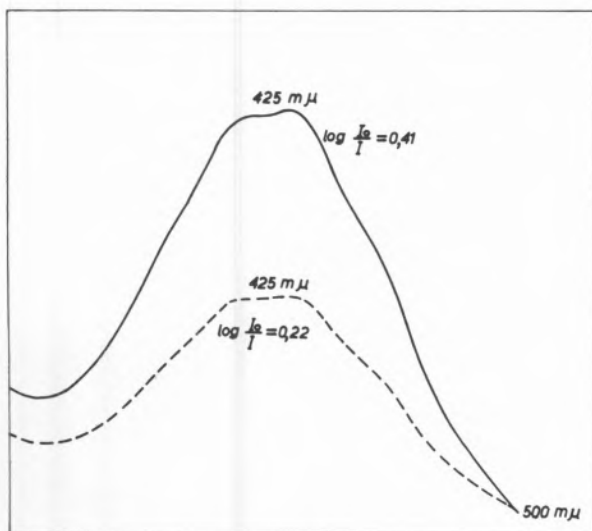


Fig. 1 — Plumbagina em CHCl_3

$$c = 2,5 \mu\text{g/ml}$$

— destilado a 50°C

---- destilado a 80°C

Ensaio, realizados nas mesmas condições mas utilizando como solvente o éter etílico, mostraram igualmente perdas apreciáveis por evaporação.

As separações da plumbagina por extracção com clorofórmio ou éter e sequente extracção com solução aquosa, diluída, de hidróxido de sódio, dão perdas em virtude da instabilidade da plumbagina em meio alcalino; a redução com excesso de hidrossulfito de sódio, em meio alcalino, e seguinte acidulação e oxidação com peróxido de hidrogénio, ou cloreto férrico, dão destruição praticamente total da plumbagina; se a redução for feita com pequenas quantidades de hidrossulfito e mantivermos a técnica anterior, verifica-se somente uma recuperação parcial da quinona; assim, este método de separação e de concentração não é utilizável; também, a dosagem em meio alcalino, com hidróxido de sódio, não é quantitativa.

Em virtude destes resultados, experimentaram-se outras técnicas, para a separação e concentração da plumbagina, e fixámos o seguinte processo,

em que se verifica uma recuperação praticamente total. Destila-se a solução com plumbagina em corrente de vapor de água, havendo um arrastamento total da quinona por destilação de cerca de 10 por cento do volume inicial; acidula-se o destilado com ácido clorídrico e, para prosseguimento da purificação e redução de volume, passa-se o destilado através duma pequena coluna de Dowex 2X8 (Fluka), previamente lavada com uma solução aquosa, diluída, de ácido clorídrico, ou de cloreto de potássio acidulado. A plumbagina é retida no topo da coluna e, em seguida, eluída com 3 ml de metanol, a que se juntou uma gota de ácido clorídrico concentrado.

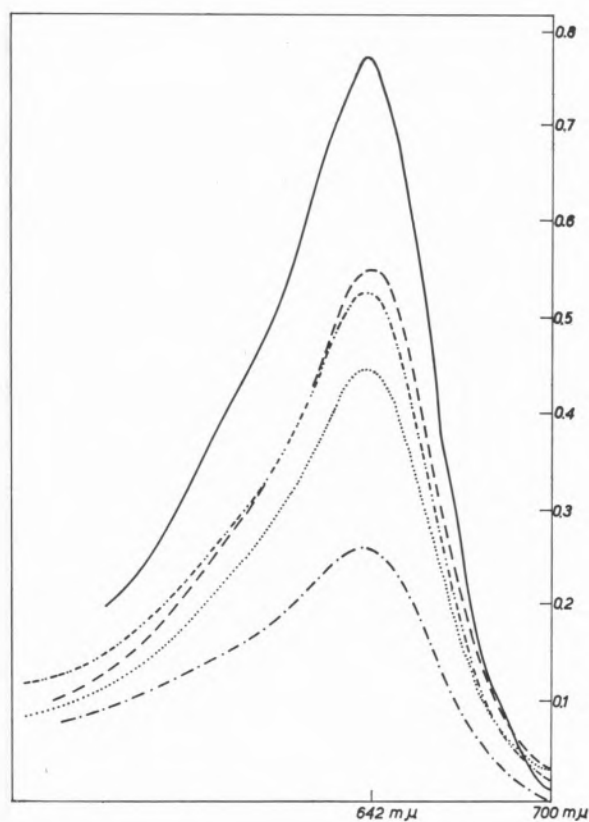


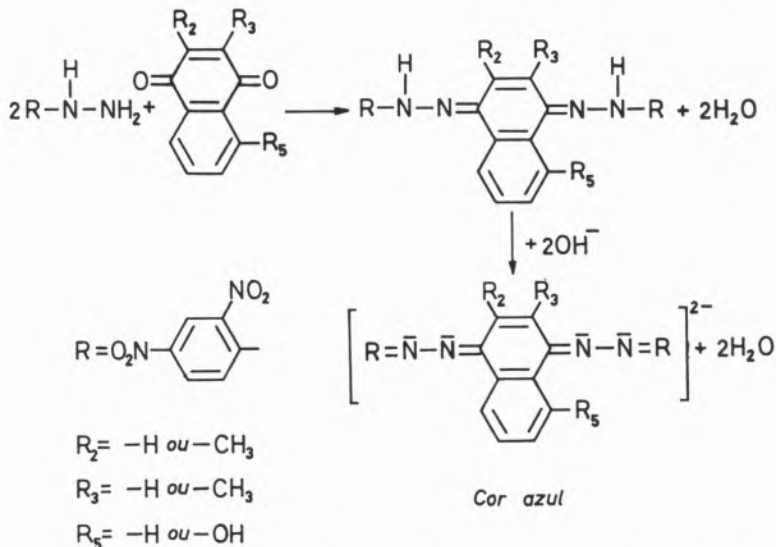
Fig. 2 — Reagente 2

— . — . — . 1h	$E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2160$	70°
..... 1h 30m	$E_{1\text{cm}}^{1\%} = 3680$	70°
----- 2h 30m	$E_{1\text{cm}}^{1\%} = 4480$	70°
———— 3h	$E_{1\text{cm}}^{1\%} = 6240$	70°
-- 3h	$E_{1\text{cm}}^{1\%} = 4240$	80°

2.1.1 — Escolha de reagentes

Fixamo-nos nos seguintes compostos:

- (1) 4-nitrofenil-hidrazina;
- (2) 2,4-dinitrofenil-hidrazina;
- (3) 4-carboxifenil-hidrazina;



os dois primeiros foram usados anteriormente em ensaios colorimétricos de compostos de α -dicarbonilos ou de dicarbonilos conjugados (6); a utilização da 4-carboxifenil-hidrazina foi escolhida para termos um reagente da mesma natureza de (2), mas com o efeito de grupos menos acentuado (substituição dos dois grupos nitroilos, nas posições 2 e 4, por um único grupo carboxilo na posição 4, e mais variadas possibilidades de desprotonização.

A nossa atenção fixou-se especialmente nos reagentes (2) e (3).

2.1.2 — Reacção de cor

Aos 3 ml de eluato juntou-se 1 ml de solução de fenil-hidrazina substituída (reagentes (2) ou (3)); a reacção de formação de hidrazonas procedeu-se a várias temperaturas, tempos, acidez e concentrações das hidrazinas; após a reacção e arrefecimento, diluiu-se o sistema com água e extraíu-se com éter etílico; a solução etérea seca-se, evapora-se e junta-se o reagente básico (piridina ou dimetil-sulfóxido com 2 por cento de dietanolamina); dissolve-se e faz-se a colorimetria da solução. As reacções são representadas pelas equações químicas representadas acima.

2.1.3 — Comportamento com a 2,4-dinitrofenil-hidrazina

Com este reagente, a formação de cor em meio alcalino, com naftoquinonas-1,4, dá-se semelhantemente para todas as quinonas estudadas, não

havendo possibilidade de distinguir qualitativamente as naftoquinonas que contém ou não um grupo hidroxilo na posição 5, mesmo com mudança de solventes (utilização da piridina ou do dimetil-sulfóxido).

A 2,4-dinitrofenil-hidrazina é apropriada para a determinação quantitativa da plumbagina. A di-hidrazona em meio alcalino (piridina com 2 por cento de dietanolamina) dá uma cor azul muito intensa, λ_{\max} 642 m μ , $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 6240$, utilizando o reagente com a concentração de 0,1 g/100 ml em ácido clorídrico 2N, e executando a formação da di-hidrazona a 70°C, durante 3 horas. As escolhas de concentração do reagente, do tempo de reacção e da temperatura estão exemplificadas na fig. 2. Nas nossas determinações utilizámos concentrações de plumbagina de 20 a 50 $\mu\text{g/l}$, podendo, contudo, ser muito inferiores, visto que para $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 6240$ podemos trabalhar com 1 a 5 μg da quinona. A remoção do excesso de 2,4-dinitrofenil-hidrazina faz-se com a pentanodiona-2,4 sem perda de cor.

2.1.4 — Comportamento com 4-carboxifenil-hidrazina em meio alcalino

- a) Em piridina com 2 por cento de dietanolamina:

Naftoquinona-1,4	Cor amarela	Não apresenta absorção selectiva entre 400 e 700 m μ
2-metilnaftoquinona-1,4 (Menadiona)	Cor amarela	Apresenta uma inflexão muito fraca entre 540 e 600 m μ e outra mais intensa entre 450 e 480 m μ
5-hidroxi-naftoquinona-1,4 (Juglona)	Cor vermelha vinosa	λ_{\max} 572 m μ
2-metil-5-hidroxi-naftoquinona-1,4 (Plumbagina)	Cor vermelha vinosa	λ_{\max} 586 m μ
3-metil-5-hidroxi-naftoquinona-1,4	Cor vermelha vinosa	λ_{\max} 578 m μ

A 5-hidroxi-naftoquinona-1,2 dá com dificuldade (tempo de reacção 18 horas a 50°C) cor vermelha, λ_{\max} 520 m μ (fig. 3).

Verifica-se, assim, em meio básico de piridina e dietanolamina, um comportamento diferente nos compostos que contêm ou não o grupo hidroxilo na posição 5. Sem o grupo hidroxilo, a formação da cor vermelha não se dá, enquanto com o hidroxilo na posição 5 a reacção de cor vermelha é positiva, permitindo distinguir as duas classes de compostos. Com o grupo hidroxilo afastado do grupo

ortoquinónico (5-hidroxi-naftoquinona-1,2), a reacção de cor é mais difícil e o máximo encontra-se deslocado para menor comprimento de onda. Na reacção de 4-carboxifenil-hidrazina com as 5-hidroxi-naftoquinonas-1,4, em meio de piridina-dietanolamina, os máximos de absorção, comparados com os obtidos na mesma reacção por intermédio da 2,4-dinitrofenil-hidrazina, encontram-se deslocados de cerca de 50 a 60 m μ para menores comprimentos de onda. Também as intensidades das extinções são mais baixas e errantes pelos efeitos

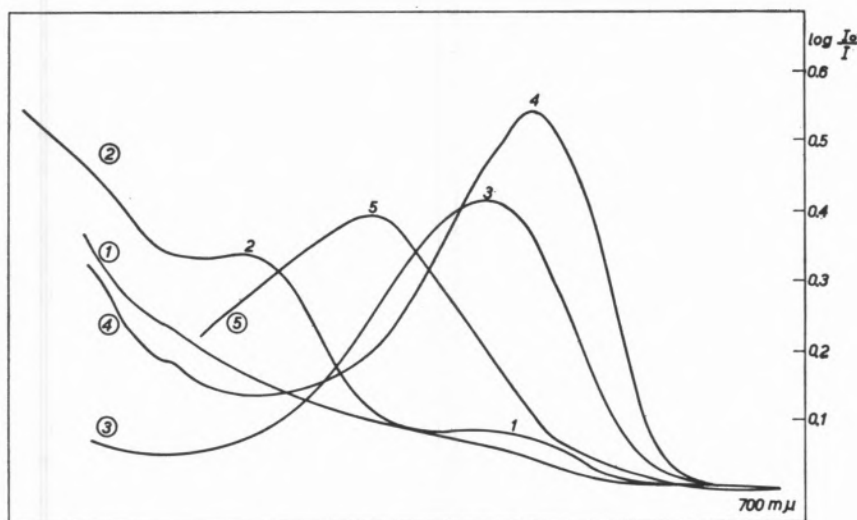


Fig. 3 — Reagente: *p*-Carboxifenil-Hidrazina

Solvente: Piridina + 2 % de Dietanolamina
 $c=2,5 \mu\text{g/ml}$

1 — Naftoquinona-1,4

2 — 2-metilnaftoquinona-1,4 (Menadiona)

3 — 5-hidroxi-naftoquinona-1,4 (Juglona)

4 — 2-metil-5-hidroxi-naftoquinona-1,4
 (Plumbagina)

5 — 5-hidroxi-naftoquinona-1,2

de tempo e temperatura. Deste modo, a reacção com a 4-carboxifenil-hidrazina tem interesse no sentido qualitativo da determinação da presença do grupo hidroxilo na posição 5 de naftoquinonas-1,4, mas sob o ponto de vista quantitativo é preferível a reacção com a 2,4-dinitrofenil-hidrazina.

b) Em dimetilsulfóxido com 2 por cento de dietanolamina:

em ácido clorídrico 2N, e manter a 70°C, durante 3 horas; juntar 2 gotas de pentanodiona-2,4; arrefecer à temperatura ambiente e diluir com água até 15 ml; juntar 5 ml de éter etílico e agitar bem; deixar separar as fases e extrair novamente com éter (5 ml). Juntar as soluções etéreas; evaporar o éter e adicionar ao resíduo, com uma pipeta, 10 ml do reagente de piridina com 2 por cento de dietanolamina; dissolver bem o resíduo e deter-

	Cor	λ_{max}
Naftoquinona-1,4	Vermelha	550 m μ
2-metilnaftoquinona-1,4 (Menadiona)	Vermelha	562 m μ
5-hidroxinaftoquinona-1,4 (Juglona)	Vermelha	555 m μ
2-metil-5-hidroxinaftoquinona-1,4 (Plumbagina)	Vermelha vinosa	585 m μ
3-metil-5-hidroxinaftoquinona-1,4	Vermelha	562 m μ
5-hidroxinaftoquinona-1,2	Vermelha	530 m μ

Neste caso a reacção de cor processa-se análogamente quer haja ou não na molécula o grupo hidroxilo na posição 5. As intensidades de absorção são aproximadamente iguais, nos dois meios básicos, com os compostos que têm o grupo hidroxilo na posição 5, e os máximos, em dimetilsulfóxido, encontram-se deslocados, cerca de 5 a 15 m μ , para menores comprimentos de onda; no caso da 5-hidroxinaftoquinona-1,2 o deslocamento é reverso. Esta diferença de comportamento nos dois solventes — piridina e dimetilsulfóxido — deve-se provavelmente à grande disparidade nos valores das constantes dieléctricas dos dois líquidos: piridina $\epsilon_{25}^0 = 12,3$, dimetilsulfóxido $\epsilon_{20}^0 = 48,9$.

2.2 — Método micro-analítico de dosagem da plumbagina em solução aquosa

2 a 50 μ g de plumbagina em solução aquosa; destilar em corrente de vapor de água até obter cerca de 10 por cento do volume inicial da solução; acidular o destilado com ácido clorídrico e passá-lo através de uma coluna de Dowex 2X8 (Fluka), com as dimensões de 0,9 cm de diâmetro e 2 cm de altura, previamente lavada com uma solução aquosa, diluída de ácido clorídrico; a plumbagina retida no topo da coluna, é eluída com 3 ml de metanol a que se juntou uma gota de ácido clorídrico concentrado; juntar ao eluato 1 ml da solução de 2,4-dinitrofenil-hidrazina, a 0,1 por cento,

minar a absorvência em 642 m μ . Absorvência por μ mole/ml: 117,1.

2.2.1 — Determinação qualitativa da presença de naftoquinona-1,4, com grupo hidroxilo na posição 5

Reagente: Solução a 1 por cento de 4-carboxifenil-hidrazina, em ácido clorídrico N.

Procede-se como no caso anterior, determinando a absorvência no máximo de absorção, ou melhor, obtendo a curva de absorção entre 500 e 700 m μ .

2.3 — TENTATIVAS DE RECUPERAÇÃO DA PLUMBAGINA A PARTIR DO SEU PRODUTO DE REACÇÃO COM O PLASMA SANGUÍNEO OU COM A CISTEÍNA

a) Reacção com o plasma

A reacção da plumbagina com o plasma sanguíneo é rápida. Se misturarmos 2 ml de plasma com 1 ml duma solução aquosa de plumbagina, com 50 μ g da quinona, após 45 minutos, a 37°C, não é reconhecível a plumbagina livre. A reacção das naftoquinonas-1,4 com o plasma sanguíneo e proteínas atribui-se à formação de tio-éteres, por intermédio de grupos sulfidrilos livres das proteínas que atacam as posições 2 ou 3 do grupo quinónico (7); a reacção do sangue com a menadiona e tentativas de recuperação foram estudadas por CANADY e ROE (8) (1956).

Com o fim de realizarmos a dosagem micro-analítica da plumbagina ligada às proteínas do plasma sanguíneo, experimentámos vários métodos de cisão da ligação de tio-éter, nomeadamente, por reacções de hidrólise em várias condições, seguidas de extracções com clorofórmio ou éter etílico.

Adoptámos a seguinte sequência de operações, só modificadas nas temperaturas e tempos de reacção e mudanças nos agentes redutores ou oxidantes: Misturar 2 ml de plasma com 2 ml de solução de plumbagina e deixar durante algumas horas. Juntar 4 g de cloreto estanoso (reductor), 10 ml de água e 15 ml de ácido clorídrico concentrado e aquecer na estufa a temperaturas determinadas (entre 70° e 140°C), por tempos também variáveis (até 17 horas). Arrefecer e tratar com a solução aquosa de cloreto férrico (20 g/80 ml), neste caso o oxidante. Extrair com éter etílico. Lavar o éter duas vezes com ácido clorídrico e três vezes com água. Extrair com solução diluída de soda cáustica (5 ml) e verificar se há cor. Se a houver, num outro ensaio, evitar a extracção com soda cáustica e proceder, a seguir à oxidação, como está indicado no método micro-analítico de dosagem da plumbagina em solução aquosa.

Noutros ensaios, utilizamos como agentes redutores o hidrossulfito de sódio e o níquel de Raney em meio acético, e como oxidante o peróxido de hidrogénio a 130 volumes, o ferricianeto de potássio ou o dicromato de potássio.

Em todos os casos a recuperação foi deminuta ou nula, indicando grande estabilidade do tio-éter, ou a actuação doutras possibilidades, como forte adsorção, polimerização ou destruição da quinona. CANADY e ROE (8), por hidrólise com ácido clorídrico e cloreto estanoso, recuperaram da mistura de sangue e menadiona, cerca de 90 por cento da quinona. Isto mostra, em comparação com os nossos resultados, que no caso da plumbagina, com um grupo hidroxilo na posição 5 do grupo naftoquinónico, esta, na hipótese da formação duma ligação de tio-éter, se encontra muito mais fortemente ligada aos constituintes proteicos do sangue, tornando impossível, pelos métodos experimentados, a recuperação da quinona.

b) *Reacção com a cisteína*

Seguindo a mesma sequência de operações, com substituição do plasma por solução aquosa de

cisteína, os resultados são comparáveis, com fraca recuperação de plumbagina.

c) *Ensaio em branco, sem plasma ou sem solução de cisteína*

Verifica-se a recuperação praticamente total da plumbagina.

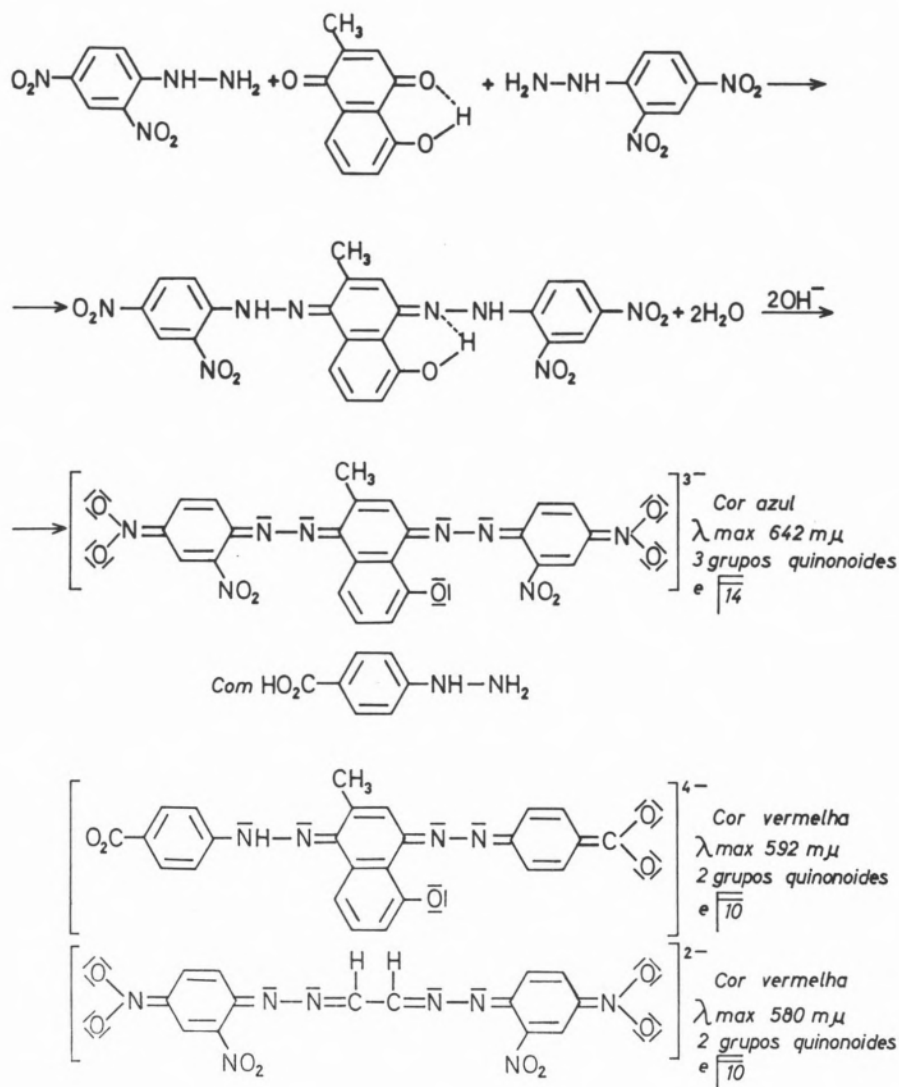
Associando os nossos resultados experimentais com os obtidos por CANADY e ROE, respeitantes à menadiona, parece poder concluir-se que nos dois casos se verifica a formação de um tio-éter, com ligação muito mais estável no caso da plumbagina.

3 — *DISCUSSÃO E INTERPRETAÇÃO DE ALGUNS RESULTADOS EXPERIMENTAIS*

3.1 — *COMPORTAMENTO DAS NAFTOQUINONAS COM A 4-CARBOXIFENIL-HIDRAZINA*

A cor azul (λ_{\max} 615 a 645 m μ), obtida com as 2,4-dinitrofenil-hidrazonas das naftoquinonas-1,4 em meio alcalino, é atribuída à presença nas moléculas de 3 grupos quinonoides conjugados. Se considerarmos compostos com grupos de α -dicarbonilo, a cor obtida é vermelha vinosa (λ_{\max} 570 a 590 m μ) e neste caso temos 2 grupos quinonoides conjugados.

Se considerarmos a di-hidrazona da plumbagina obtida com a 4-carboxifenil-hidrazina, em meio ácido, e a tratarmos em seguida com a solução a 2 por cento de dietanolamina em piridina, a cor obtida é vermelha vinosa, λ_{\max} 592 m μ , devendo assim corresponder a um grupo cromóforo semelhante ao das di-hidrazonas derivadas de compostos com grupos de α -dicarbonilo. Isto pressupõe a existência apenas de dois grupos quinonoides conjugados e, por consequência, apenas a remoção de um protão dum dos grupos hidrazónicos (Quadro II). A remoção dar-se-ia preferencialmente no grupo hidrazónico próximo do grupo fenólico da plumbagina, pois, por ligação de hidrogénio ao átomo de azoto, diminuiria a carga negativa deste átomo e assim facilitaria a desprotonização. Nestas condições, a molécula desta di-hidrazona no meio alcalino, acima definido, teria a mesma ordem de insaturação das moléculas das di-hidrazonas dos compostos de α -dicarbonilo, dois grupos quinonoides num sistema conjugado de



10 ligações duplas. A 5-hidroxi-naftoquinona-1,2-bis (4-carboxifenil-hidrazona), com difícil obtenção de cor vermelha, λ_{max} 520 mμ, em que o grupo hidroxilo, na posição 5, se encontra afastado do grupo quinónico-1,2, no meio alcalino de piridina-dietanolamina, apenas deverá dar a desprotonização fácil dos grupos carboxílicos.

3.2—ESTABILIDADE DOS PRODUTOS DE REACÇÃO DA PLUMBAGINA COM A CISTEÍNA E COM AS PROTEÍNAS DO PLASMA

Em referência à grande estabilidade dos produtos de reacção da plumbagina com a cisteína ou com

as proteínas do plasma, em comparação com o comportamento da menadiona, aquela terá de ser interpretada pela presença do grupo hidroxilo na posição 5. Verificou-se, pela ausência da banda do grupo hidroxilo na região infravermelha do espectro, uma forte ligação de hidrogénio do grupo hidroxilo da plumbagina com o oxigénio do carbonilo na posição 4. Esta ligação terá como efeito uma diminuição da densidade electrónica na posição 3 do anel quinónico e, consequentemente, uma reacção dessa posição para a reacção de carácter nucleofílico com o grupo sulfidrílo e maior estabilidade do produto resultante.

BIBLIOGRAFIA

1. Thomson, R. H., «Naturally Occuring Quinones», Butterworths, London, 1957.
2. Denoël, A., *J. Pharm. Belg.*, **4**, 3 (1949).
3. «Codex Medicamentarius Gallicus», 1949.
4. Goris, A. e Liot, A., «Pharmacie Galénique», Paris, 1949.
5. Prista, L. N., Morgado, R. e Machado, M. L., *Anais Fac. Farm. Porto*, **19**, 71 (1959).
6. Johnson, D. P., Critchfield, F. E. e Ruch, J. E., *Anal. Chem.*, **34**, 1389 (1962).
7. Fieser, L. F., *Ann. Int. Med.*, **15**, 648 (1941).
Fieser, L. F., *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 2335, 2338 (1947).
8. Canady, W. J. e Ree, J. H., *J. Biol. Chem.*, **220**, 571 (1956).

ABSTRACT

A microanalytical method of quantitative determination of plumbagin was established. Using 4-carboxyphenyl-hidrazine, was established a micro-analytical method which allows the distinction between the 5-hydroxy-1,4-naphthoquinones and those without the hydroxyl group in that position. Contrary to the behaviour of menadione, it was not possible to recover plumbagin from blood, plasma or aqueous solutions of cysteine by the indicated methods. It is proposed an interpretation of the di-hidrazone colour reactions and of the stability of bondage between blood plasma proteins, or cysteine, and plumbagin.