

Q. ORL. 57



**UNIVERSIDADE  
EDUARDO MONDLANE**



**Faculdade de Ciências  
Departamento de Química**

**TRABALHO DE LICENCIATURA**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS NAFTOQUINONAS  
NAS RAIZES E CASCAS DE CAULE DA PLANTA *KIGELIA*  
*AFRICANA***



*Kigelia africana*

**Autor : Tendai Sairosse Mujanje**

**Maputo, Maio de 2007**



**UNIVERSIDADE  
EDUARDO MONDLANE**



**Faculdade de Ciências  
Departamento de Química**

**TRABALHO DE LICENCIATURA**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS NAFTOQUINONAS  
NAS RAIZES E CASCAS DE CAULE DA PLANTA *KIGELIA*  
*AFRICANA***



*Kigelia africana*

**Autor :** Tendai Sairosse Mujanje

**Supervisor:** Prof. Doutor François Munyemana

U. E. M. DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
BIBLIOTECA
R. E. 76-T.L.
DATA 08.04.2008
AQUISIÇÃO Oferta
COTA

**Maputo, Maio de 2007**

## DEDICATORIA

Dedico este trabalho especialmente a Dona Maria Rosa Guidione, uma mãe muito especial, amável, educativa, criativa encorajadora e muito zelosa desde o meu primeiro dia de vida até o dia de hoje.

Ao Dr. Felisberto D. Navalha, aos meus irmãos e primos: Jossefa Sairosse , Fanivel Sairosse, Nora Sairosse, Itai Dinis Navalha , Rita Dinis Navalha ,Daina Dinis Navalha, minha cunhada e meu cunhado Marta C.Pedro Navalha, Pedro Carlos Almeida e minhas sobrinhas Denilza Dinis Navalha e Deizy Dinis Navalha pela coragem, educação, instrução, delicadeza, paciência e a segurança dada mesmo nos momentos mais difíceis da minha carreira estudantil.

## AGRADECIMENTOS

- Em primeiro lugar quero agradecer a Deus pela vida, saúde e a protecção que ele tem me proporcionado dia pós dia.
- Quero endereçar os meus agradecimentos ao meu precioso supervisor Prof. Doutor Francois Munyemana pela orientação sábia, acompanhamento e ensinamento transmitido e todo apoio prestado no decorrer de todo o trabalho.
- Ao Prof. Felisberto Pagula, pelo esforço prestado durante a leitura dos espectros de massa.
- Ao Dr. Felisberto Dinis Navalha meus agradecimentos pois sempre fez com que não faltasse nada durante meus estudos.
- Ao dr. Julião meu muito obrigado pelo apoio prestado durante a leitura dos espectros de UV-Vis.
- Um “TINOTENDA” ao dr. Samuel Garicai Arone pelo apoio, espírito de companheirismo e apressado prestado durante toda minha estadia desde o primeiro ano até a culminação deste trabalho.
- A Sra. Amélia Furvela pela ajuda prestada na realização do meu trabalho experimental.
- A minha família em especial aos meus irmãos e primos, meu muito obrigado por tudo o que fizeram para este trabalho possa chegar até ao fim.
- Os meus agradecimentos a todo corpo Docente, CTA e aos estudantes do departamento de Química da UEM. Pelos momentos de simpatia, compreensão ao longo dos anos da minha formação.
- Aos meus colegas Nuno vieira, Benedito Facla, Manuel Chironda, Magan vão também meus agradecimentos pelo espírito de companheirismo
- A todos aqueles que directa ou indirectamente contribuíram para a realização deste trabalho endereço vos 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

Tendai SAIROSSE MUJANJE

( Tendai Sairosse Mujanje)

**Автор**

Mujanje, Tendai Sairoso

## Obra

Obra Trabalho de Licenciatura

Cota

[illegible]

**ÍNDICE GERAL**

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJECTIVO DO TRABALHO.....	3
2.1. Objectivo geral .....	3
2.2. Objectivos específicos .....	3
3. METODOLOGIA.....	3
4. NAFTOQUINONAS.....	3
4.1. Ocorrência e distribuição das naftoquinonas.....	5
4.2. Classificação das naftoquinonas.....	6
4.2.1. Classificação segundo a posição dos grupos quinonoídicos. ....	6
4.2.2. Classificação segundo a estrutura. ....	7
4.3. Biossíntese das Naftoquinonas.....	8
4.4. Métodos de identificação das naftoquinonas .....	9
4.4.1. Teste de Borntraeger .....	10
4.4.2. Análise por cromatografia em camada fina.(TLC) .....	10
4.4.3. Análise por espectroscopia de UV-Vis .....	10
5. ACTIVIDADE BIOLÓGICA .....	11
5.1. Actividade antimicrobiana. ....	11
5.2. Actividade Tripanossomícida.....	12
5.3. Actividade antiinflamatória.....	13
5.4. Actividade antiulcerogénica e anticancerígena .....	13
5.5. Actividade antiprotozoária .....	14
5.6 . Actividade antiviral.....	16
5.7. Relação estrutura actividade antimicrobiana.....	16
6. OUTROS COMPOSTOS ISOLADOS DA PLANTA KIGELIA AFRICANA COM ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	17
6.1. Iridoides.....	18
6.2. Lignanes .....	18
6.3. Esteróides .....	19
8. CARACTERIZAÇÃO E DESCRIÇÃO DA PLANTA EM ESTUDO.....	19
8.1. Caracterização taxonómica .....	19
8.2. Uso medicinal.....	20
8.3. Outros usos .....	20

9.0. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO USADOS .....	20
9.1. Maceração .....	21
9.2. Soxhlet. ....	21
10. MÉTODOS DE ANÁLISE USADOS.....	22
10.1. Cromatografia líquida de Média Pressão (MPLC) .....	22
10.2. Cromatografia em Camada Fina (TLC) .....	23
10.2.1. Aplicação da amostra .....	23
10.2.2. Fase estacionária .....	23
10.2.3. Fase móvel.....	23
10.2.4. Métodos de visualização .....	24
10.2.5. Determinação do Rf. ....	25
10.3. Análise por espectroscopia de UV-Vis.....	25
10.4. Análise por espectroscopia de massa.....	26
11. PARTE EXPERIMENTAL .....	26
11.1. Colheita, Secagem e Moagem das amostras. ....	26
11.2. Extracção .....	26
11.2.1. Extracção das cascas do caule da <i>Kigelia Africana</i> .....	27
11.2.2. Extracção das raízes da <i>Kigelia africana</i> .....	27
11.3. Cromatografia em Camada Fina (TLC).....	27
11.4. Fraccionamento por cromatografia líquida de média pressão.....	29
11.4.1. Fraccionamento do extracto clorofórmico das cascas de caule de <i>kigelia africana</i> .....	30
11.4.2. Fraccionamento dos extractos clorofórmicos das raízes da <i>kigelia africana</i> .....	33
11.5. Análise das fracções isoladas por espectroscopia de uv-vis.....	38
11.6. Espectroscopia de massa de algumas fracções isoladas nas raízes.....	38
12. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS .....	39
13. CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES. ....	42
13.1. Conclusão.....	42
13.2. Recomendações.....	43
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. ....	44

-ANEXOS-



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura.1. Aparelhagem para extracção por soxhlet.....	21
Figura .2. Aparelhagem de MPLC.....	23
A figura 3. Cromatograma dos extractos brutos das raízes e cascas de caule de Kigelia Africana. ....	29
Figura 4. Cromatograma das fracções obtidas do fraccionamento do extracto bruto das cascas de caule ( MPLC1).....	31
Figura 5.Cromatograma das fracções agrupadas da MPLC.1.....	31
Figura.6. Cromatografia das fracções obtidas do fraccionamento da fracção 6-7 das cascas de caule (MPLC.2).....	32
Figura 7.Cromatograma das fracções agrupadas da MPLC.2.....	33
Figura 8. Cromatograma das fracções obtidas por fraccionamento do extracto bruto das raízes.....	34
Figura 9.Cromatograma das fracções agrupadas da MPLC.3.....	34
Figura.10.Cromatograma das fracções obtidas do fraccionamento das fracções 6-12 das raízes (MPLC.4).....	35
Figura 11.Cromatograma das fracções agrupadas da MPLC.4.....	36
Figura 12.Cromatograma dos extractos brutos de cascas de caule e raízes reveladas.....	37
Figura 13. Cromatograma comparativa das fracções 15-16,17 de cascas de caule e fracções 20-21 , 23 de raízes.....	37

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.Distribuição da ocorrência das naftoquinonas por famílias e espécies.....6

Tabela 2. Algumas doenças causadas por micróbios..... 11

## ABREVIATURAS

- OMS      Organização Mundial de Saúde.
- AcOEt    Acetato de Etilo.
- MeOH    Metanol
- RNA      Ácido Ribonúcleico.
- DNA      Ácido Desoxiribonucleico.
- HPLC    Cromatografia Líquida de Alta Resolução.
- MPLC    Cromatografia Líquida de Média Pressão.
- CP       Cromatografia em Papel.
- GLC      Cromatografia Gás-Líquido.
- GSC      Cromatografia Gás-Sólido.
- TLC      Cromatografia em Camada Fina.
- U.V      Ultravioleta e Visível.
- V/V      Volume por Volume.
- R.f       Factor de Retenção
- R        Radical

## RESUMO

- ❖ A planta *Kigelia Africana* da família Bignoniaceae é usada na medicina popular para o tratamento de várias doenças.
- ❖ Em Moçambique é usada como antimalárico, antimicrobiano, purgativo, para o tratamento de sífilis, tratamento de câncer da pele, antiinflamatório, contra sinusite, etc.
- ❖ A acção medicinal desta planta está relacionada em grande parte com a presença de substâncias activas na sua composição fitoquímica de compostos conhecidos por naftoquinonas que possuem varias actividades biológicas.
- ❖ Neste trabalho fez-se o estudo fitoquímico das Raízes e das cascas de caule e fez-se a comparação da composição fitoquímica dos extractos brutos das raízes e das cascas de caule.
- ❖ Neste trabalho foram usadas duas técnicas de extracção: Extracção por Maceração e extracção por soxhlet usando clorofórmio como solvente de extracção.
- ❖ O método de extracção por soxhlet foi escolhido para a obtenção de extractos brutos usados no fraccionamento por Cromatografia Líquida de Média Pressão (MPLC). As diferentes fracções obtidos foram analisadas por Cromatografia em Camada Fina (TLC) no sistema de solvente n-Hexano/Acetato de etilo.
- ❖ As fracções isoladas foram analisadas por espectroscopia de massa.
- ❖ Dos compostos isoladas, as naftoquinonas Kigelinona e Isopinnatal foram identificadas nas raízes

## 1.INTRODUÇÃO

A fitoterapia foi criada para designar tradições populares de tratamentos, nas quais as plantas medicinais são usadas como medicamentos. Os produtos de origem vegetal, denominados fitoterápicos, aqui compreendidos em toda sua abrangência, estão relacionadas com qualquer exploração tecnológica e económica de vegetais empregados na prevenção, no tratamento, na cura de distúrbios ou doenças dos homens e animais.

A utilização de plantas como medicamento pela humanidade é tão antiga quanto a história do homem e ainda constitui uma realidade entre os povos de todo o mundo. A prática da medicina tradicional está intrinsecamente ligada à vida das comunidades que habitam o território Moçambicano. Esta prática baseia-se no tipo de organização social e económica que caracterizava estas comunidades, pois inúmeros eram os desafios que lhes impunham, como doenças, as epidemias e entre outros fenómenos da natureza. Deste modo para fazer face a estas diversidades, as comunidades tiveram que adoptar formas de defesas e salvaguarda das suas famílias. Assim o processo de evolução da arte da cura se deu de forma empírica, em processos de descoberta por tentativas de erros e acertos.

Neste processo os povos primitivos propiciaram a identificação de espécies e de géneros vegetais bem como das partes dos vegetais que se adequam ao uso medicinal do reconhecimento do habitante. Este processo foi lento e longo, no qual a situação aliada ao ensaio vagarosamente converteu a experiência do saber em memória colectiva, como forma de repassar às gerações seguintes o conhecimento acumulado e desta forma, preservando-o.

Por outro lado, devido a rede de cobertura do serviço nacional de saúde estima-se que 60% da população no país utiliza os serviços fornecidos pela medicina tradicional para os cuidados de saúde.

Segundo Addae-Mensah; I.(1988) a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 80% da população deste planeta utilizam as plantas medicinais para satisfação total ou parcial das suas necessidades em cuidados de saúde.

Dada a importância da medicina tradicional, a conferencia de Alma-Ata (1978) , exortou os governos a dar máxima importância ao uso desta e integrar aspectos de comprovada eficiência, promovendo o cultivo e conservação de plantas medicinais. As plantas constituem um verdadeiro tesouro verde, elas carregam sobre si os chamados princípios activos. Na velocidade em que ocorre o fenómeno de extinção das espécies vegetais, uma quantidade enorme de plantas com propriedades medicinais correm o risco de desaparecer

antes de seu valor ser reconhecido, o que torna ainda mais urgente intensificar os investimentos nesta área.

As plantas chamadas medicinais são assim denominadas quando a partir delas podem ser feitos ou extraídos produtos que tenham a capacidade de curar, aliviar dores, ou que de alguma forma possam ajudar o organismo humano ou vegetal. As plantas medicinais continuam sendo importantes na descoberta de novas drogas, como fornecedores de princípios activos ou medicamentos semi-sintéticos baseados em compostos secundários de plantas.

A flora Moçambicana é rica em recursos de origem vegetal, recursos estes que podem ser aproveitados para o estudo e a investigação sobre plantas medicinais. A população Moçambicana no geral a residente nas zonas rurais baseia-se no uso de plantas medicinais para o tratamento de certas doenças assim como também para a prevenção. Neste contexto torna-se pertinente o estudo das plantas medicinais moçambicanas, pois poucos estudos foram realizados.

É importante saber que metabólitos secundários são encontrados nas plantas, estes podem fornecer uma base para seu uso na medicina tradicional e na medicina moderna como é caso da planta em estudo *Kigelia Africana*, também conhecida como **Mufunguti** na zona Sul de Moçambique, **Muvhé** na Zona Centro de Moçambique, que é um membro da grande família de Bignoniaceae, uma família constituída por cerca de 113 géneros e 800 espécies arbustivas, árvores e trepadeiras. Família esta notável para ocorrência de naftoquinonas, iridóides, lignanes, cumarinas e esteróides. (Hegnauer 1964) [2].

A variedade de metabólitos encontrados nestas plantas é que condiciona a diversificada actividade biológica, tais como: Antimicrobiana, antimalárica, purgativa, no tratamento de sífilis, câncer da pele, etc.

Nos primeiros estudos realizados sobre a *Kigelia africana*, a fruta era a parte mais explorada, mais recentemente alguns investigadores interessaram-se também em outras partes da planta.

É neste contexto que no presente trabalho propõe-se realizar o estudo fitoquímico das raízes e cascas de caule da planta *Kigelia africana*, no âmbito de isolar as naftoquinonas e outros compostos com actividade antimicrobiana para comprovar o seu uso como antimicrobiano na medicina tradicional.

**2. OBJECTIVO DO TRABALHO.****2.1. Objectivo geral**

❖ Estudar a composição fitoquímica das raízes e cascas de caule da planta *Kigelia africana*.

**2.2. Objectivos específicos**

❖ Estabelecer a comparação por cromatografia em camada fina entre a composição fitoquímica das raízes e das cascas de caule da *Kigelia africana*

❖ Isolar e caracterizar as naftoquinonas nas raízes e cascas de caule da *Kigelia africana*.

❖ Comparar os produtos isolados das raízes e isolados da casca de caule da planta *Kigelia africana*.

**3. METODOLOGIA.**

O presente trabalho seguiu a seguinte sequência:

❖ Pesquisa bibliográfica.

❖ Recolha de amostras no campo.

❖ Trabalho experimental que teve seguintes etapas:

➤ Secagem e moagem de amostras.

➤ Extração e fraccionamento.

➤ Análise cromatográfica e espectroscópica dos resultados.

❖ Discussão dos resultados.

❖ Elaboração do relatório final

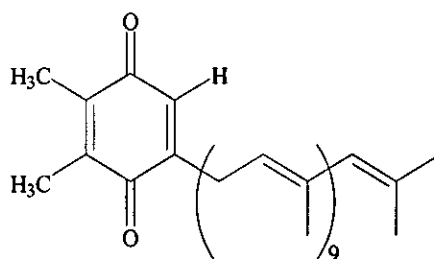
**4. NAFTOQUINONAS.**

As quinonas representam uma ampla e variada família de metabólitos de distribuição natural e encontram-se em quase todas partes das plantas. O interesse nestas substâncias é devido a sua importância nos processos bioquímicos vitais e também ao destaque cada vez maior que representam em vários estudos farmacológicos. Na natureza, estão envolvidos em etapas importantes do ciclo de vida de seres vivos, principalmente nos níveis de cadeia

respiratória e da fotossíntese. De um modo geral as quinonas naturais são de vital importância para vegetais, artrópodes, fungos, líquenes, bactérias, algas e vírus.

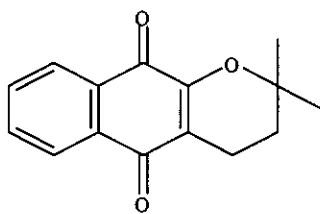
Com base na sua estrutura molecular as quinonas podem se dividir em diferentes grupos, utilizando-se como critério o tipo de sistema aromático que sustenta o anel quinonoídica[16]. Assim distingue-se:

- a) **Benzoquinona**: contem um anel benzénico. Exemplo da Plastoquinona (1).

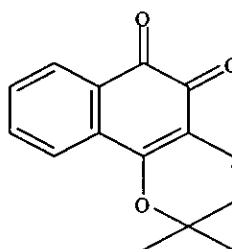


(1)

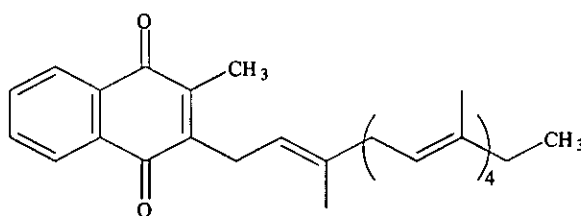
- b) **Naftoquinona** contem um anel naftalénico. Exemplos de  $\alpha$ -Lapachona (2) que é uma para-naftoquinona,  $\beta$ -Lapachona (3) que é uma orto-naftoquinona e a Vitamina K (4) que é uma  $\alpha$ -naftoquinona com cadeia lateral Oligoisoprénica.



(2)



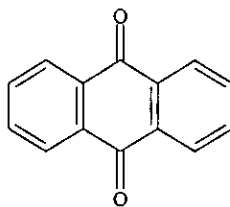
(3)



(4)

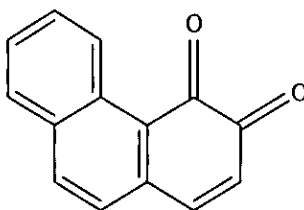
- c) **Antraquinona**(5) contem um anel antracénico





(5)

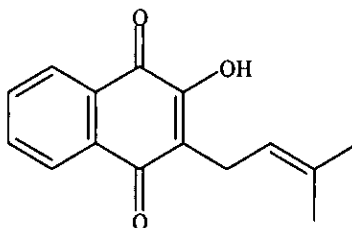
d) **Fenantraquinona (6)** contém um anel fenantrênico



(6)

Numa observação mais apurada sobre a importância das quinonas, é de destacar as naftoquinonas que possuem aplicações práticas importantes e comprovadas.

Dentre as naftoquinonas naturais destaca-se o Lapachol (7) que tem sido encontrado como constituinte de várias plantas das família Bignoniaceae, Verbenaceae e Proteaceae[1][4].



(7)

#### 4.1. Ocorrência e distribuição das naftoquinonas.

As naftoquinonas são distribuídas extensamente nas plantas, fungos e em alguns animais. Na natureza estão envolvidas nas etapas importantes do ciclo de vida de seres vivos, principalmente nos níveis de cadeia respiratória e da fotossíntese. Estas substâncias tem sido encontradas como constituintes principais de várias plantas da família Bignoniaceae, Proteacea e outros como é mostrado na tabela 1.

Tabela 1. Distribuição da ocorrência das naftoquinonas por famílias e espécies

Famílias	Espécies
Bignoniaceae	Tabebuia flavescens Benth - & Hook. F. ex. Griseb. T. avellanadae Lor., Kigelia africana
Verbenaceae	Tectona grandis L. fil. Avicenia officinalis
Proteaceae	Conospermum teretifolium R. Br.
Leguminosae	Diphyssa robinoide
Sapotaceae	Bassia latifolia
Outras famílias	Markhamia stipulata Wall, Stereocarpus Salignus

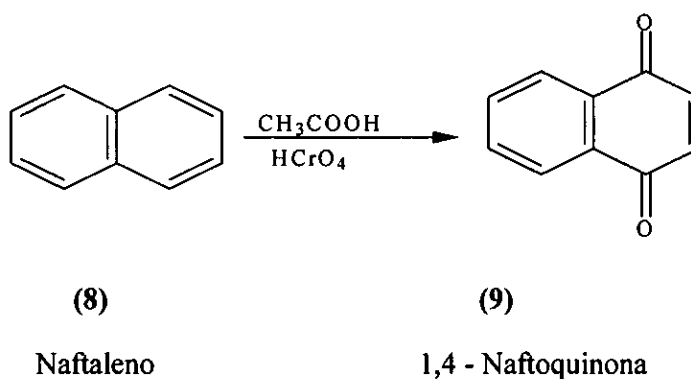
Entretanto, sua ocorrência é maior na família Bignoniaceae, principalmente no gênero das Tabebuia (Tecoma). Estas espécies destes taxons encontram-se distribuídas nas regiões tropicais de todo o mundo, sendo de ocorrência frequente no continente americano e na flora africana.

#### 4.2. Classificação das naftoquinonas.

##### 4.2.1. Classificação segundo a posição dos grupos quinonoídicos.

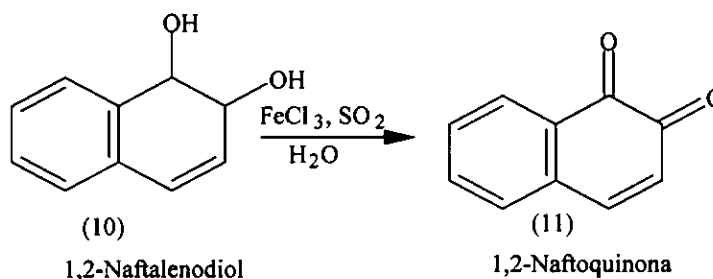
Existem três grupos de naftoquinonas

1°.  $\alpha$  - naftoquinonas são aquelas em que o grupo quinonoídico encontra-se nas posições 1,4 do sistema naftalênico e podem ser sintetizados pela oxidação do naftaleno (esquema 1).



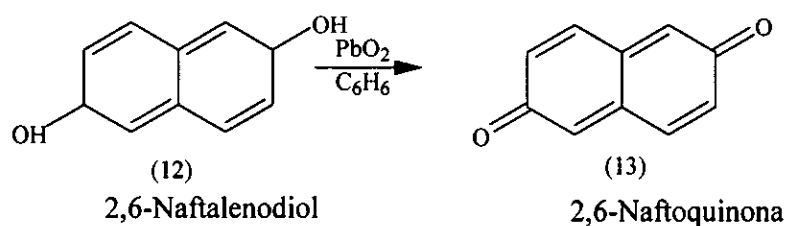
Esquema 1: Oxidação do Naftaleno em 1,4- Naftoquinone

2°. **β - naftoquinonas** são naftoquinonas que tem o grupo quinonoídico nas posições 1,2 do sistema naftalénico, e podem ser obtidos dissolvendo 1,2 naftalenodiol em água na presença do dióxido de enxofre e cloreto de ferro (III)(esquema 2).



Esquema 2: Obtenção de 1,2-Naftoquinona a partir de 1,2- Naftalenodiol.

3°. **Amfi-naftoquinonas** são substâncias que tem o grupo quinonoídico nas posições 2,6 do sistema naftalénico, e podem ser obtidas pela oxidação de 2,6-naftalenodiol (12) em benzeno com dióxido de chumbo(esquema 3).



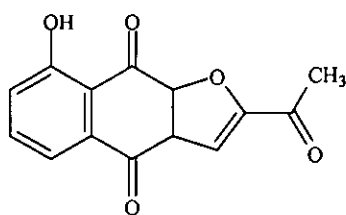
Esquema 3: Oxidação do 2,6-Naftalenodiol em 2,6- Naftoquinona.

#### 4.2.2. Classificação segundo a estrutura.

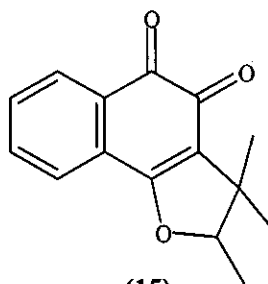
Sob o ponto de vista estrutural, em grande parte destaca-se nas naftoquinonas anéis furânicos e pirânicos, normalmente nas posições 2,3 e 3,4 do sistema naftalénico.

**1° Naftoquinonas Pirânicas**- são naftoquinonas que tem o sistema naftalénico acoplado ao anel Pirânico: É o caso de α -lapachona (2) e β- Lapachona (3).

**2° Naftoquinonas Furânicas** - são naftoquinonas que tem o sistema naftalénico acoplado ao anel furânico. Exemplo da Kigelinona (14) e Duniona (15)



(14)

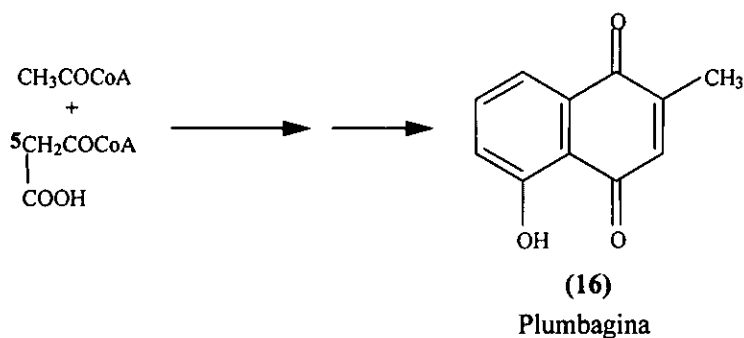


(15)

#### 4.3. Biossíntese das Naftoquinonas [2][4][15]

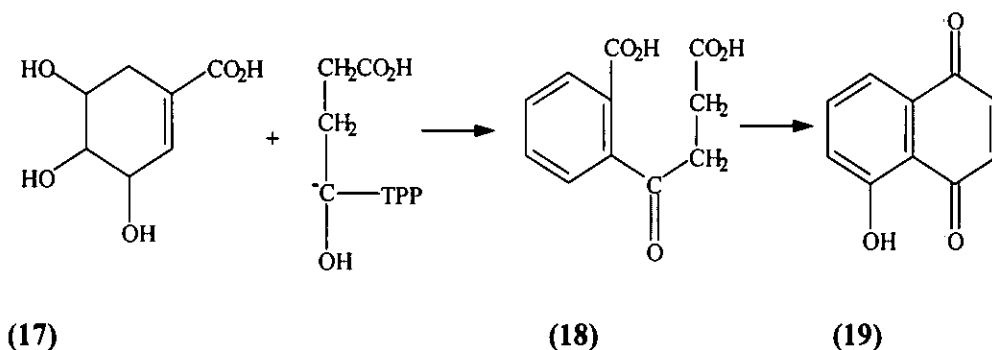
A diversidade biossintética é particularmente bem ilustrada pelas naftoquinonas das plantas. Estes pigmentos fenólicos amarelos podem ser formados por quatro vias distintas.

1- A primeira via, talvez a mais primitiva, a partir do acetil coenzima A e do malonil coenzima A, para a síntese da Plumbagina (16)(esquema 4).



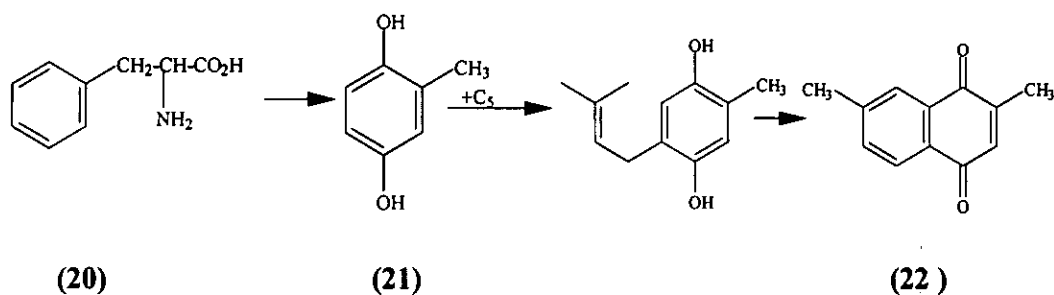
Esquema 4: Síntese da Plumbagina

2- A segunda via conhecida como via do ácido o-succinilbenzóico (18) para a produção da Juglona (19), o produto inicial é o ácido Shikímico (17)(esquema 5).



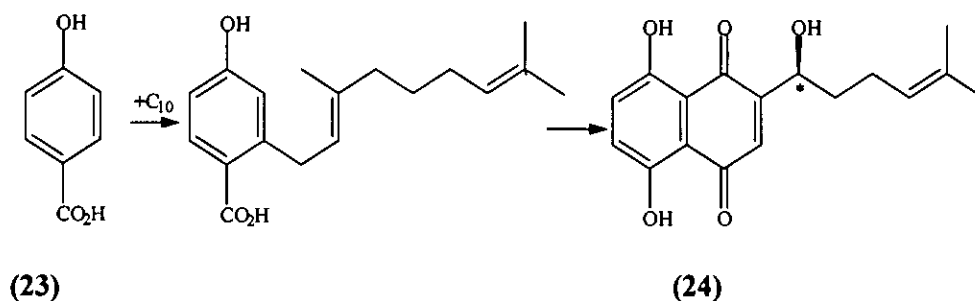
Esquema 5: Síntese da Juglona

3- A terceira via das naftoquinona opera na Chimafla, que produz uma dimetilnaftoquinona chamada chimaflina (22). Esta é formada a partir da fenilalanina (20) na via do ácido Homogentísico cujo intermediário é Homoarbitina (21) (esquema 6).



Esquema 6: Síntese da Chimaflina.

4- A quarta via começa com ácido p-hidroxibenzoico (23), neste caso com adição do geranyl Pirofosfato ao produto inicial fenólico, ocorre uma diisoprenilação. O produto formado pode ser um ou dois estereoisômeros: Alcanino ou Shikonina (24).(esquema 7)



Alcanino ou Shikonina(isômero no C\*)

Esquema 7: Síntese de alcanino ou Shikonina.

#### 4.4. Métodos de identificação das naftoquinonas

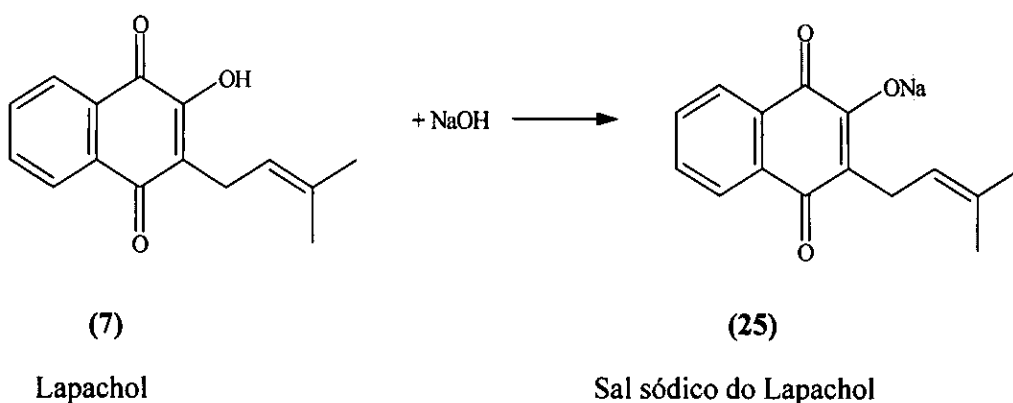
A identificação das naftoquinonas nos vegetais é realizada a partir das suas propriedades físicas e químicas, usando os métodos espectroscópicos e cromatográficos tais como: Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC), Cromatografia em Camada Fina (TLC), Espectroscopia em Ultravioleta e visível (UV-Vis), Infravermelho (IV), Espectroscopia de massa (MS), etc.

**4.4.1. Teste de Borntraeger.**

Esta técnica baseia-se em fazer reagir a substância com hidróxido de sódio para formar uma substância com a cor característica desta substância.

As naftoquinonas dissolvem-se prontamente em solução alcalina, formando o sal correspondente. Todas naftoquinonas dissolvidas na água quente formam uma solução de cor amarela, alaranjada e alaranjada intensa.

Por exemplo para identificação do Lapachol (7), adiciona-se 3-6 gotas de solução de hidróxido de sódio na substância e obtém-se uma solução de cor vermelha brilhante.



Esquema 8: Reacção do Lapachol com solução aquosa de Hidróxido de sódio.

**4.4.2. Análise por cromatografia em camada fina.(TLC)[5]**

Nesta técnica as placas cromatográficas são reveladas por uma solução de hidróxido de potássio (KOH) em 5 a 10% de etanol .As naftoquinonas quando são reveladas por esta solução apresentam as cores que variam de amarela, alaranjada, violeta, etc.

Ainda neste tipo de técnica também pode-se determinar o factor de retenção  $R_f$  que varia de 0,20 a 0,75 no sistema de solvente n-Hexano /Acetato de etilo (7:3).

**4.4.3. Análise por espectroscopia de UV-Vis.[24]**

Nesta técnica o reconhecimento das naftoquinonas é feita determinando os comprimentos de ondas de absorção que varia de 249 a 310 nm [24].

**5. ACTIVIDADE BIOLÓGICA.**

As naftoquinonas são distribuídas extensamente nas plantas de diferentes famílias.

As suas estruturas lhe conferem variadas biodinamicidades tanto nos vegetais como nos animais, destacando-se dentre muitas as propriedades microbidas, tripanossomicidas, viruscidas e antitumorais[9].

**5.1. Actividade antimicrobiana.[12]**

Os antimicrobianos são fármacos capazes de destruir ou suprimir microorganismos são produzidos por diversas espécies de microorganismos ( bactérias, fungos, etc.) que suprimem o crescimento de outros microorganismos. Antimicrobianos são importantes pois possuem um largo campo de aplicação em medicina humana, veterinária, nas farmácias, na agricultura, nos cosméticos e outras áreas. Também são importantes componentes do sistema imunitário de muitas espécies, compreendendo as classes de antibacterianos, antiprotozoários e antifúngicos[7][13].

Os antimicrobianos podem ser classificados segundo a sua estrutura química e mecanismo de acção:

- Agentes que inibem a síntese da parede celular bacteriana.
- Agentes que bloqueiam enzimas essenciais no metabolismo.
- Agentes inibidores da protease ( enzima que quebra as proteínas em polipéptidos).

**Algumas doenças causadas por micróbios.**

A maioria das doenças causadas por microorganismos, são contagiosas. As mais perigosas são as infecções gastrointestinais, tuberculose e a malária[9].

A tabela 2. Algumas doenças causadas por micróbios [6,9,11,16,19 ,20].

Doenças	Sintomas
Doença de sono	Lesões meningoencefálica, ingorgitamento de gânglios cervicais
Doença de chaga	Lesões da musculatura do tubo digestivo (esófago)
Leishmaniose	Ulceração no rosto, braços e pernas
Malária	Febre, anemia, lesão no fígado.
Carcinoma Sarcoma	Câncer, aumento do tempo de coagulação e

Como já foi reportado os agentes antimicrobianos são drogas usadas para o tratamento de infecções causadas por micróbios. As naftoquinonas foram testadas intensivamente no passado contra diferentes parasitas, incluindo *Plasmodium*, *Leishmania*, *Taxo-plasma guidii* e *Tripanossoma* sp. Como exemplo do composto testado tem-se a Plumbagina (16) que é uma naftoquinona natural isolada das raízes do *Scandes do plumbago*; planta esta usada na medicina tradicional para o tratamento de várias doenças. O composto mostrou a inibição do crescimento do *Staphylococcus Aureos* causador das infecções adquiridas nas feridas resultantes da cirurgia e infecções devido a não esterilização dos instrumentos nos hospitais e os fungos *Cândida Albicans*(agente causador da candidíase) [11][16].

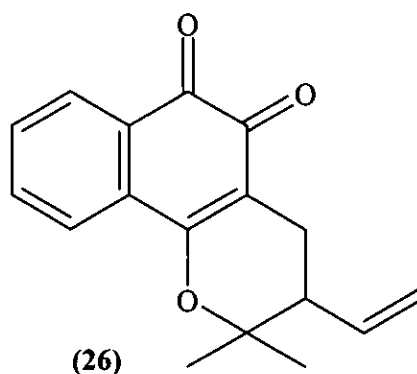
Das naftoquinonas com actividade antimicrobiana destaca-se o Lapachol (7) por ser um dos representantes do grupo das quinonas e por possuir várias actividades biológicas. Esta naftoquinona pode ser isolada nas árvores das famílias *Bignoniaceae*, *Verbenaceae*, *Proteaceae*, *Leguminoseae*, *Sapotaceae*, etc. O Lapachol (7) foi também matéria prima para a síntese de muitas outras substâncias de distinta biodinamicidade. O mais activo é o derivado sintético  $\beta$  -lapachona (3), esta substância tem sido encontrada como constituinte minoritária durante o isolamento do Lapachol (7)[16][20].

Os estudos feitos por Oswaldo Gonçalves de Lima e Ivan D'Albuquerque sobre a actividade antibiótica da  $\beta$  -lapachona (3) e do Lapachol (7) mostraram que há uma predominância de actividade contra certos microorganismos Gram-positivos e baixa actuação contra microorganismos Gram-negativos excepto contra o género *Brucella*.

## 5.2. Actividade Tripanossomícida[11][16]

Num estudo realizado sobre a actividade tripanossomícida de naftoquinonas, usando tripanossoma cruzi e crithidia fasciculata, foi observada que o Lapachol (7) tem pouca actividade e os mais activos são os compostos  $\beta$  -lapachona(3) e alil - $\beta$  -lapachona (26). Também foi demonstrada uma estreita relação entre a indução de produção de espécies reactivas de oxigénio (superóxido e peróxido) e a letalidade in vitro de naftoquinonas sobre o *Tripanossoma cruzi* nas formas amastigota, epimastigota e tripomastigota.

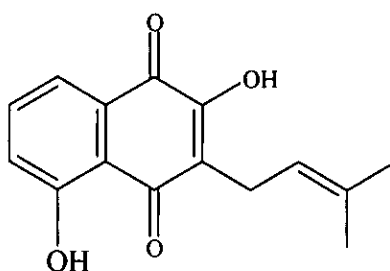




### 5.3. Actividade antiinflamatória.[19]

Em 1992 , Grazziotin, isolou da *Tabebuia Chysotricha* três naftoquinonas: Lapachol (7) , hidroxilapachol (27) e 5-hidroxi-2(1-hidroxietil)nafto[2,3-b]furano-4,9-quinona e somente os compostos (7) e (27) foram submetido ao ensaio biológico para determinar a actividade analgésica. A análise estatística do tempo de resposta ao estímulo ao calor em ratos tratados mostrou uma significativa diferença, mais o Lapachol (7) mostrou maiores propriedades antiinflamatórias e analgésica do que o hidroxilapachol (27) após testes clássicos de indução de edema em ratos e analgesia.

Sister também constatou que formulações tópicas do Lapachol (7) mantêm suas propriedades antiinflamatórias e analgesicas[19].



### 5.4. Actividade antiulcerogénica e anticancerígena.[3]

Uma das áreas onde as naftoquinonas são promissórias é nos estudos neoplásicos. Os primeiros estudos antineoplásicos desenvolvidos por Hartwell em 1967 mostraram uma

actividade antineoplásica do Lapachol (7) sobre o sarcoma de Yochida( 86% de inibição). O sal sódico do Lapachol (25) também foi activo contra Leucemia L1210.

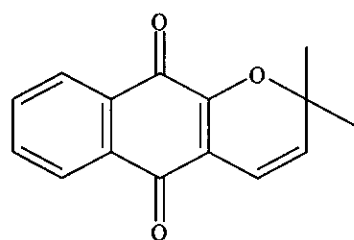
Os estudos feitos por Goel et al, mostraram que a administração oral do Lapachol (7) na ulcera induzida pelo stress durante três dias, promoveu uma redução de 56%.

Rão confirmou a actividade antitumoral do Lapachol (7) e da Xiloidona (28) sobre o carcinosarcoma de Walker 256. O derivado do lapachol,  $\alpha$ -lapachona (2) mostrou a actividade contra o carcinoma ascítico, inibindo o crescimento tumoral em 95,4 - 99,6%[19].

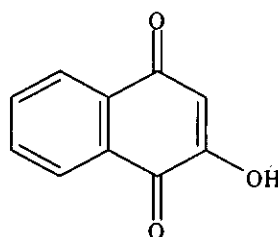
Gonçalves comparou a actividade do lapachol (7) e da Lawsona (29) contra o sarcoma 180 e constatou que a Lawsona (29) é mais activa do que o Lapachol (7).

Pardee e colaboradores relataram que a Salvicina (30), uma naftoquinona de estrutura diterpenoídica da planta chinesa *Salvia Priomitis*, apresenta uma forte actividade anticancerígenica in vitro e in vivo contra tumores humanos sólidos [19].

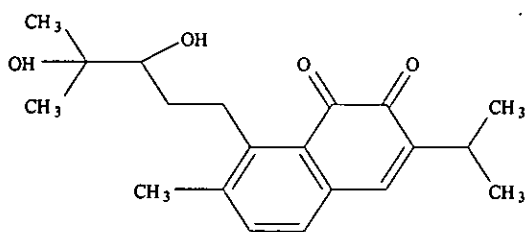
Os exames etnobotânicos feitos na Nigéria dirigidos por Dr. Akunyili da universidade de Nigéria revelaram que as naftoquinonas Kigelina (14) e 2-acetilnafto [2,3-b] furan-4,9 quinona (31) indicaram alguma actividade no tratamento de edemas, úlceras, tratamento de feridas e também são antiinflamatórias.



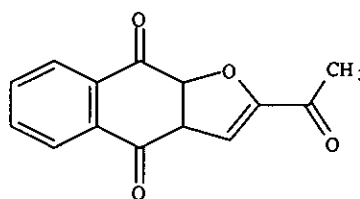
(28)



(29)



(30)



(31)

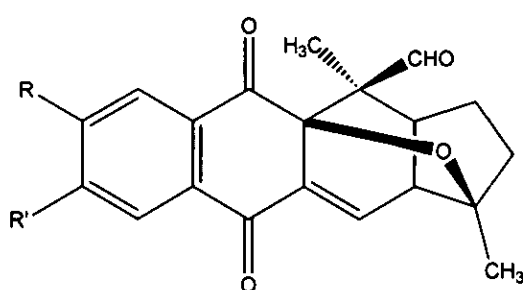
### 5.5. Actividade antiprotozoária

Na busca de potentes agentes antimaláricos, tendo como protótipo as vitaminas K e o Lapachol foi feito um estudo com diversos análogos sintéticos; onde constatou-se que o composto Atovacone (36) apresentou melhor actividade em pacientes infectados por *Plasmodium Vivax*[19].

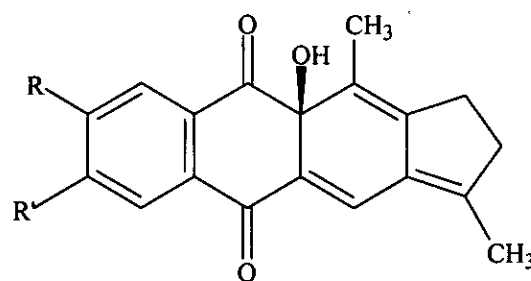
Num ensaio in vitro com 12 substância naftoquinonicas em busca de acção antimalária sobre *Plasmodium Falciparum* em estágio eritrocitário, verificou-se que o Lapachol (7) apresentou actividade inibitória sobre o crescimento de parasitas, sendo parcialmente activo.[19]

O professor H.Kolodziej Freie da universidade de Berlim mostrou que algumas naftoquinonas isoladas na *Kigelia africana* exibem a actividade antiprotozoária[7]. Nas cascas de caule da *Kigelia africana* foi isolado o composto 2-(1-hidroxetil) -nafto [2,3-b] fura-4,9 quinona (35) que mostrou a actividade antiprotozoária[7].

Das raízes foram isolados os compostos Isopinatal (32), kigelinol (33) e Isokigelinol (34) que mostraram também a actividade antiprotozoária in vitro do *Rhodesiense* e do *Tripanossoma cruzi* (agente causador da doença de sono) e *Falciparum* do *Plasmodium* (agente causador da Malária).



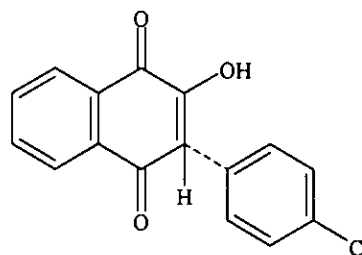
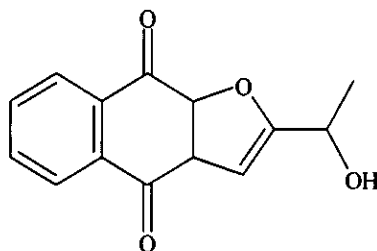
(33) R = OH, R' = H : Kigelinol



(32)

(34) R = H, R' = OH Isokigelinol

R = H, R' = OH Isopinatal



### 5.6 . Actividade antiviral.[8][11]

Os compostos  $\beta$ -Lapachona (3) e 3-alil- $\beta$ -lapachona (26) inibem selectivamente a replicação do vírus HIV, atuando na inibição da enzima LTR,[16][20]. Da mesma forma a  $\beta$ -Lapachona(3) é um potente inibidor de enzima transcriptase reversa do vírus mieloblastose aviária e Leucemia murina de Rauscher; também inibem a  $\alpha$ - polimerase da DNA,[20]. O Lapachol (7) inibe o crescimento de diversos vírus perigosos. Por exemplo o vírus do herpes dactilografo I e II, Poliomielite, Stomatitis vesicular, Myeloblastosis avian, Vírus murine do Leucemia Rauscho[8][11][16].

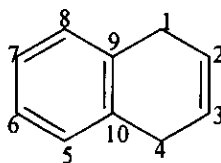
### 5.7. Relação estrutura actividade antimicrobiana [11][16][18].

No estudo da relação estrutura-actividade antimicrobiana de naftoquinonas foi escolhido o microorganismo *Staphylococcus Aureus*.

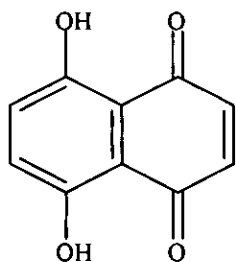
Os estudos feitos indicaram que a actividade antibacteriana de uma família dos isoxazol naftoquinonas requerem um grupo ceto livre na posição 1 e o substituinte na posição 2 deve ser um grupo hidroxilo ou qualquer substituinte não lipofílico, pois um grupo lipofílico ou moléculas pesadas diminuem a actividade[9].

As naftoquinonas testadas nos recentes estudos têm um grupo ceto livre, mas os mais eficazes não tem o grupo hidroxilo na posição 2. O composto (39), que tem um grupo hidroxilo na posição 2, mostrou uma actividade mais baixa do que o composto (38).

E o composto (40) não acusou a inibição pois não possui o grupo ceto livre na posição 1 que é responsável pela actividade [18][22].

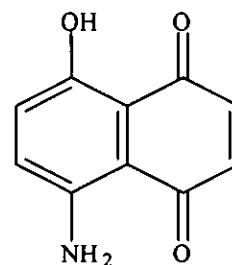


Sistema naftalénico



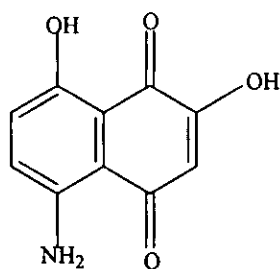
(37)

5,8-dihidroxi-1,4-naftoquinona



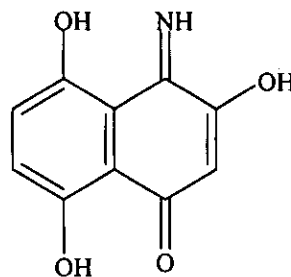
(38)

5-amino-8-hidroxi-1,4-naftoquinona



(39)

2,8-dihidroxi-5-amino-1,4-naftoquinona.



(40)

3,5,8-Trihidroxi-4-imino-1(4H)-  
naftoquinona

As naftoquinonas mais eficazes foram testadas de encontro a vários microorganismos. Por exemplo, o composto (38) inibiu o crescimento de diversas espécies dos staphylococci, dos bacilos, dos Streptococci, e de algumas bactérias gram- negativas, tais como *Mirabilis do proteus*, *gallinarum* dos *Salmonella*. O composto (39) inibiu o crescimento dos Staphylococci e dos bacilos[21][22].

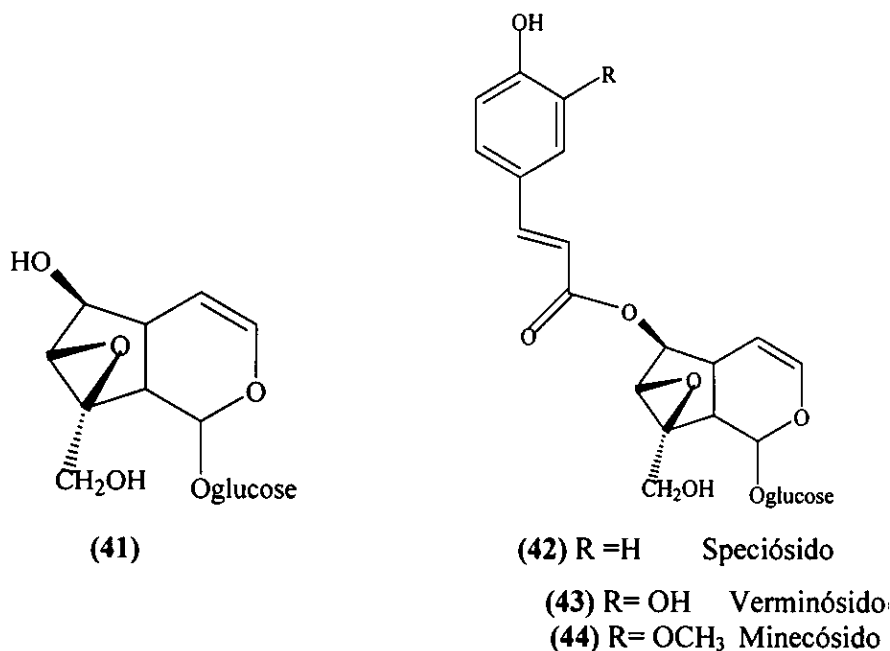
## 6. OUTROS COMPOSTOS ISOLADOS DA PLANTA KIGELIA AFRICANA COM ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para além das naftoquinonas existem outros compostos isolados da planta *Kigelia Africana* possuindo actividade antimicrobiana.

### 6.1. Iridóides.

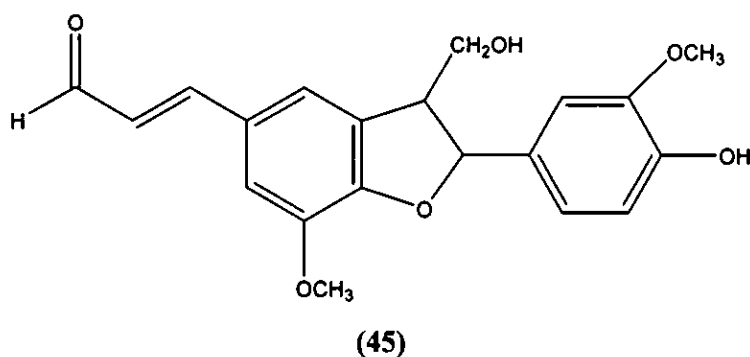
Os Iridóides principais isolados nas raízes e cascas de caule foram o Catapol(41) e seus derivados Speciósido (42), Verminósido (43) e Minecósido (44) que mostraram a actividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus*

*Aureus, Aeruginosa do Bacillus- Subtilis, do Escherichia coli, dos Pseudomonas e os albicans do cândida.* [7]



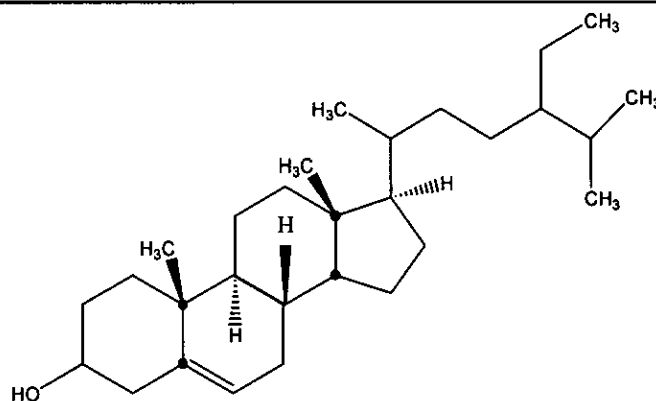
## 6.2. Lignanes

A lignane que mostrou a actividade antimicrobiana foi a Balanofonina (45) que foi isolada nas cascas de caule. Mostrou-se activo no tratamento de infecções génito-urinárias e também para o tratamento de infecções da pele causadas por microorganismos tais como *Dermatophytes e bactérias* [7].

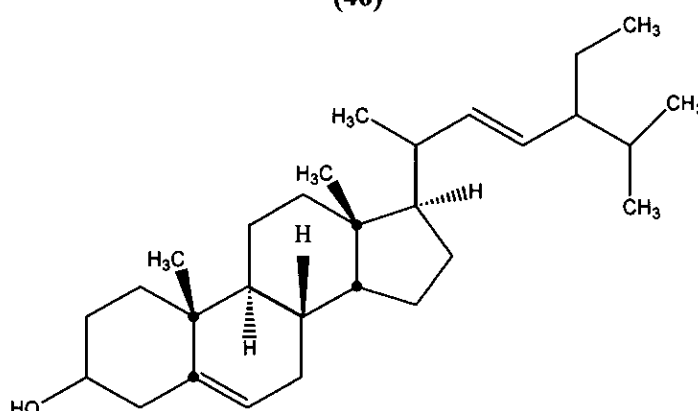


## 6.3. Esteróides

Os esteróides stigmasterol (46) e  $\beta$ -sitoesterol (47) que foram isolados nas cascas de caule e raízes mostraram as actividades antiprotozoária, antibacteriana e antiinflamatória nos ratos [7].



(46)



(47)

## 7. CARACTERIZAÇÃO E DESCRIÇÃO DA PLANTA EM ESTUDO (*Kigelia Africana*)

Esta planta pode ser descrita de várias formas, tais como: Taxionômica ou em função do seu uso medicinal ou terapêutico.

### 7.1. Caracterização taxionômica

A *Kigelia Africana* pertence a família Bignoniaceae, família esta constituída por cerca de 113 gêneros e 800 espécies de plantas arbustivas, árvores e trepadeiras. As espécies deste taxon encontram-se distribuídas nas regiões tropicais de todo o mundo, sendo de ocorrência frequente no Continente Americano as Ipê amarela e roxo, no Continente Africano a *Kigelia Africana* [7].

A *kigelia africana* conhecida por árvore de sausage ou *Kigelia pinnata*, classificada na família Bignoniaceae, é muito comum nas savanas africanas, principalmente na África do sul, Malawi, Zimbabwe, Moçambique e Botswana. É uma árvore grande que pode atingir 18 metros de altura e 1 metro de largura, com um tronco grosso arredondado com cascas

cinzentas e lisas. As flores são muito atractivas, mais tem um cheiro desagradável de cor castanha avermelhada e enrugadas; as frutas são enormes com a forma de salsichas; podem atingir 1 metro de comprimento e podem pesar mais ou menos 10kg[22][23].

## **7.2. Uso medicinal.**

Em Africa usa-se principalmente a fruta e as cascas da planta [7,12,17].

As cascas e as frutas são usadas tradicionalmente para o tratamento de doenças causadas por microorganismos e como um remédio para o tratamento de câncer da pele.

As frutas secas pulverizadas são usadas no tratamento de úlceras, sífilis e especialmente na África do sul onde tem uma reputação considerável por ser eficaz ao encontro de Keratosis solar que pode desenvolver ao câncer da pele. As frutas verdes não podem ser comidas pois são venenosas e servem como purgativos fortes e causam borbulhas na boca e na pele.

## **7.3. Outros usos**

Esta planta é usada na construção civil, carpintaria no fabrico de armários, gavetas e na construção de instrumentos musicais devido a natureza rígida da madeira, em planeamento urbano é usado como planta de ornamentação, devido a beleza da sua floração. O exemplo mais conhecido é no paisagismo urbano[14][23]. Em Moçambique os médicos tradicionais usam o tronco para finalidades cerimoniais. As raízes rendem uma tinta amarela brilhante[12].

# **8. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO USADOS**

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

-maceração

- soxhlet.

## **8.1. Maceração [5]**

A maneira mais comum para se extrair os princípios activos das plantas é por extracção simples, conhecida como maceração.

A maceração consiste em submeter um material sólido previamente moído à acção de um



solvente à temperatura ambiente. A amostra é deixada em contacto com o solvente de extracção recomendado por algum tempo que varia de horas, semanas ou mesmo meses. Algumas substâncias sólidas solubilizam-se no solvente de acordo com a sua polaridade.

### 8.2. Soxhlet[5].

Para além da maceração existe outra maneira usada nos laboratórios de pesquisa que é uso do extractor soxhlet.

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

A metodologia desta extracção é amplamente utilizada por pesquisadores que trabalham com produtos naturais.

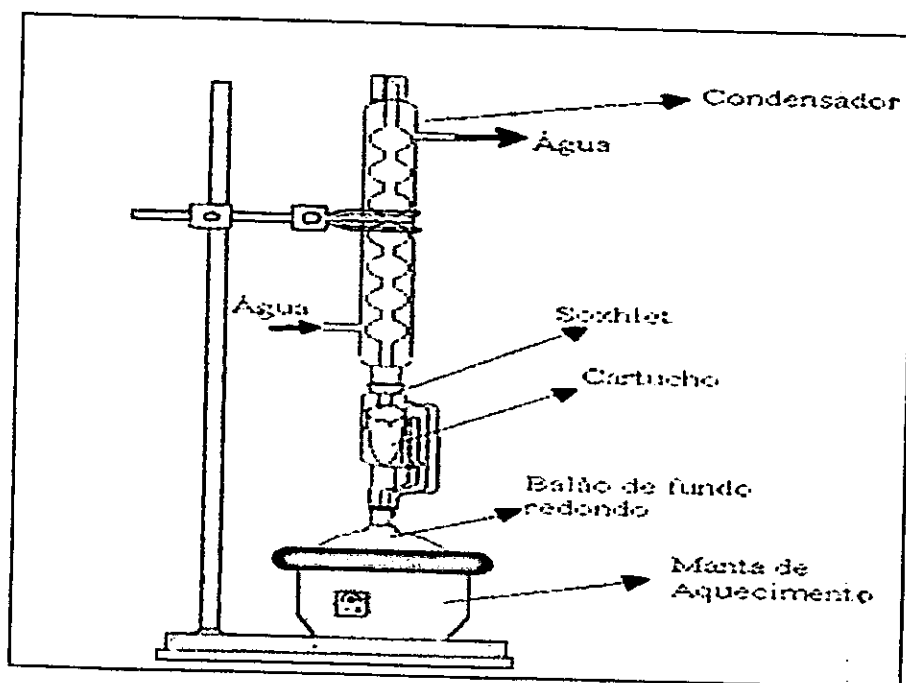


Figura.1. Aparelhagem para extracção por soxhlet

## 9. MÉTODOS DE ANÁLISE USADOS.

Métodos cromatográficos [5][10].

A cromatografia é 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 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 purificação e identificação desses componentes.

Existem várias técnicas cromatográficas.

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

As técnicas cromatográficas usadas no presente trabalho são:

- Cromatografia Líquida de Média Pressão (MPLC)
- Cromatografia em Camada Fina (TLC)

### **9.1. Cromatografia líquida de Média Pressão (MPLC) [10]**

É uma técnica usada para a separação de misturas, onde a adsorção ocorre no interior de uma coluna contendo o adsorvente empacotado e uma mistura a separar. Os componentes da mistura são separados de acordo com o grau de polaridade.

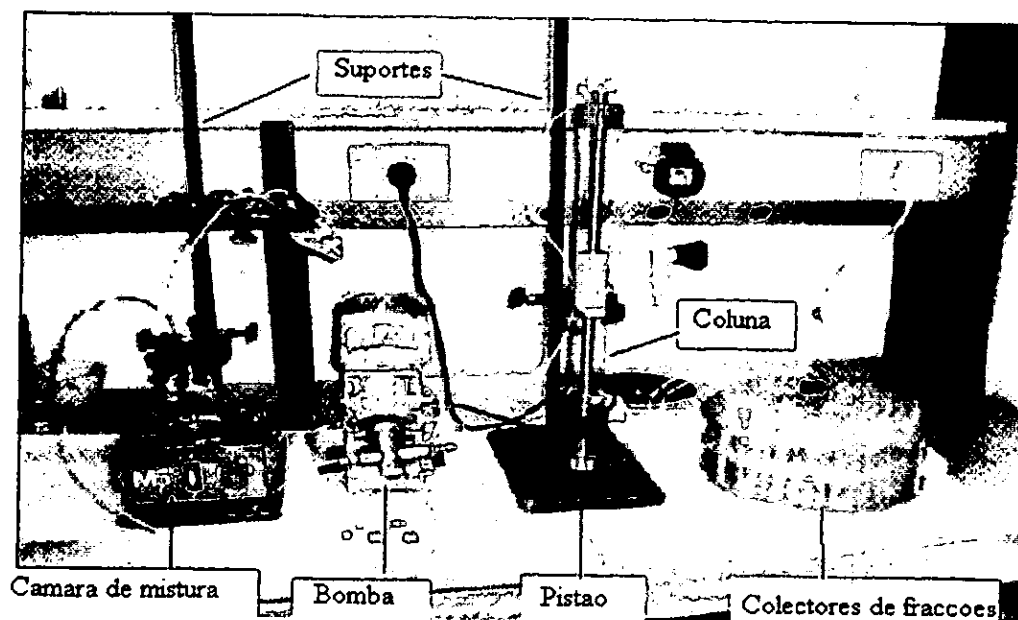


Figura .2. Aparelhagem de MPLC.

## 9.2. Cromatografia em Camada Fina (TLC) [5][10].

A cromatografia em camada fina é um tipo de adsorção na qual os componentes de uma mistura são adsorvidas à superfície do sólido, 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 afinidade que as substâncias a separar tem, entre a fase estacionária e a fase móvel (eluente), requerendo neste caso que os componentes da mistura sejam polares.

Esta técnica é de fácil execução, larga aplicação a diversas amostras, elevada sensibilidade, velocidade de separação é de baixo custo.

Consiste numa camada fina adsorvente (por exemplo: sílica gel, Pó de celulose ou alumina) que reveste o material de suporte, rígido e inerte como uma chapa de vidro ou uma folha de plástico ou mesmo alumínio, de modo que o processo de separação ocorra numa superfície plana, essencialmente bidimensional.

### 9.2.1. Aplicação da amostra

A amostra a analisar é geralmente aplicada na forma de um pequeno ponto (um a dois centímetros de diâmetro) colocado cerca de um a dois centímetros da extremidade inferior da placa. A aplicação pode ser feita com uma microseringa ou com um capilar de vidro.

Deve aplicar-se a amostra tão pequena quanto possível, de modo a minimizar a largura dos rastros e a sobreposição das manchas.

Deve-se também ter cuidado de não perfurar o adsorvente, caso contrário o eluente pode percorrer a placa da forma desigual. É necessário indicar a altura a que se faz a aplicação da amostra com pequeno traço num dos bordos da placa.

### **9.2.2. Fase estacionária**

A fase estacionária (adsorvente) pode ser a sílica gel, Alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) ou um determinado tipo de celulose.

Pode-se incorporar à sílica-gel indicadores ultravioletas de modo a facilitar a localização dos componentes separados através da absorção da luz ultra-violeta aos 254 nm e 366 nm de comprimento de onda.

### **9.2.3. Fase móvel**

Para ter um bom sucesso numa TLC é importante saber escolher adequadamente a fase móvel que permitirá a separação dos componentes. Os solventes a serem usados para a fase móvel devem ser puros. Alguns são higroscópicos e podem ser afectados pela humidade, diminuindo a reprodutibilidade.

Deve-se também ter em conta as condições e o tempo de armazenamento destes solventes. Quando se usa uma mistura de solventes, esta não deve ser usada repetidamente, pois a mistura pode sofrer alteração da composição devido a humidade, ou componente mais voláteis podem evaporar-se quando se abre a tina.

### **9.2.4. Métodos de visualização**

Considera-se a visualização ideal em TLC quando oferecer uma área visualizada que seja suficientemente estável; permitindo a visualização quantitativa dos componentes na ordem de microgramas e dar uma área suficientemente estável e adequada a medidas quantitativas.

Neste trabalho foram usados dois métodos:

- Métodos físicos que consiste no uso da luz ultravioleta à diferentes comprimentos de ondas ( 254 nm e 366 nm).

- Método químico que consiste na solução da vanilina-ácido sulfúrico para produzir uma

mancha com determinada cor[11][22]. E para confirmar as manchas que representam as naftoquinonas usou-se o reagente de Borntraeger.

#### 9.2.5. Determinação do $R_f$ .

O factor de retenção exprime a razão entre a distância percorrida pela substância ao longo da placa e a distância percorrida pelo eluente.

$$R_f = a/x$$

Onde  $a$  é a distância desde o ponto de aplicação das amostras até ao centro da mancha.

$X$  é a distância desde o ponto de aplicação até a linha de frente.

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

O valor do  $R_f$  é constante para cada substância se forem usadas mesmas condições operacionais. Muitas vezes as condições não são as mesmas por isso o valor de  $R_f$  é um valor indicativo mais não conclusivo pois apenas pode fornecer uma indicação da possível identidade da substância.

#### 9.3. Análise por espectroscopia de UV-Vis.[24]

A absorção molecular na região do ultravioleta e do visível (UV-Vis) depende da estrutura electrónica da molécula. A absorção da energia nesta radiação electromagnética é quantificada e provoca transferência de electrões dos orbitais de energia mais baixa.

O espectro de moléculas simples no estado gasoso consiste em picos de absorção finos, representando cada um, a transição de uma combinação particular de níveis rotacionais e vibracionais no estado fundamental para uma combinação correspondente do estado excitado.

Os espectros de UV-Vis são geralmente registados com amostras dissolvidas num solvente que não absorve, tal como etanol, metanol, hexano, etc. os comprimentos de onda na região de UV-Vis variam de 200nm a 800nm.[24]

#### 9.4. Análise por espectroscopia de massa.[24]

Na espectroscopia de massa, as moléculas são bombardeadas com um feixe de electrões de alta energia. As moléculas ionizam-se e cindem-se em muitos fragmentos, alguns dos quais são iões positivos. Cada espécie de iões possui determinado valor da razão de massa para a carga, ou valor  $m/z$ . Como na maioria dos iões a carga é 1  $m/z$  que é simplesmente a massa do ião.

O GC/MS é o sistema que permite a separação de substâncias presentes na amostra. A identificação dessas substâncias é através da obtenção do respectivo espectro de massa.

O espectro de massa é o resultado obtido através da fragmentação da substância em diversos iões característicos.

O espectro de massa é a impressão digital da substância, pois não existem duas substâncias com o mesmo espectro.

### 10. PARTE EXPERIMENTAL

#### 10.1. Colheita, Secagem e Moagem das amostras.

As amostras das raízes e cascas de caule da *Kigelia Africana* (Bignoniaceae) foram colhidas no distrito de Marracuene, localidade de Bobole, no vale do Rio Incomate, na manhã do dia 13 de Agosto de 2005 e foram transportadas para o Laboratório dos produtos naturais do Departamento de Química da Universidade Eduardo Mondlane; onde foram deixadas a secar à temperatura ambiente durante 90 dias. A moagem foi feita no Instituto de Investigação Agronómica de Moçambique (IIAM).

#### 10.2. Extração

Para a preparação dos extractos brutos das raízes assim como das cascas de caule da *Kigelia Africana* foi usado principalmente o método de extracção por soxhlet; só no ensaio preliminar foi usado a extracção por maceração das raízes.

**10.2.1. Extracção das cascas do caule da *Kigelia Africana***

120gr de pó de cascas de caule foram submetidos a extracção por soxhlet durante 24 horas; para tal foram efectuadas diferentes operações, introduzindo em cada cartucho o pó de cascas de caule em quantidades que dependiam da capacidade de cada cartucho. Nesta operação foram usados 400ml de clorofórmio como solvente de extracção.

Depois desta operação filtrou - se; e o filtrado foi concentrado no rotavapor até quase a secura para a obtenção do extracto bruto clorofórmico e obteve-se 1160mg de resíduo de cor castanha amarelada.

O extracto obtido foi submetido a análise por cromatografia em camada fina (TLC) e ao fraccionamento por cromatografia líquida de média pressão (MPLC)

**10.2.2. Extracção das raízes da *Kigelia africana*.**

- Extracção com soxhlet

200gr de raízes foram submetidos a extracção por soxhlet durante 24 horas, tendo usado 780ml do solvente clorofórmio, seguindo a mesma sequência usada na extracção de cascas de caule. Foram obtidos 2390mg de resíduo de cor castanha amarelada que foi submetido a análise por cromatografia em camada fina e ao fraccionamento por cromatografia líquida de média pressão.

- Extracção por maceração

Num ensaio preliminar foi realizada também a técnica de maceração dinâmica, onde 30gr de pó de raízes foram submetidos à maceração durante 24 horas com agitação em 150ml de clorofórmio. Filtrou-se e o filtrado foi concentrado no rotavapor até a secura, obtendo assim 70mg de resíduo de cor castanha amarelada e que em seguida foi submetido a análise por cromatografia de camada fina.

**10.3. Cromatografia em Camada Fina (TLC)**

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

- **Fase móvel**

Mistura n-Hexano : EtOAc(7:3; 8:2;9:1).

Tinas cromatográficas para o desenvolvimento das placas.

Tubos capilares

Pulverizadores

- **Fase estacionária**

Silica-gel 60F<sub>254</sub> (MERCK) sobre placas de alumínio 5x 20 cm e de vidro 20 x 20 cm.

- **Aplicação da amostra**

Os extractos clorofórmicos de raízes e de cascas de caule foram dissolvidos em clorofórmio e aplicados em placas cromatográficas a uma distância de 1cm da extremidade inferior usando tubos capilares de 2microlitros, mantendo uma separação mínima de 1cm entre os pontos de aplicação.

- **Desenvolvimento das placas**

As placas foram introduzidas em tinas cromatográficas previamente saturadas de solventes, tendo o cuidado de o nível do solvente de eluição não atingir os pontos de aplicação da amostra durante a imersão [11][22].

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

- **Sistema de detecção [22].**

As manchas foram visualizadas usando uma lâmpada UV a 254 nm e 366 nm e foram reveladas usando o reagente Vanilina-ácido sulfúrico, preparado a partir da dissolução de 1grama de Vanilina em 10ml do ácido sulfúrico e 90ml de Etanol. Esta mistura reveladora foi aplicada usando um frasco spray (pulverizador). As placas foram seguidamente levadas à placa eléctrica de aquecimento durante cerca de 10 minutos à temperatura de 90 °C [11][22].

- **Cromatograma dos extractos brutos de cascas de caule e de raízes.**



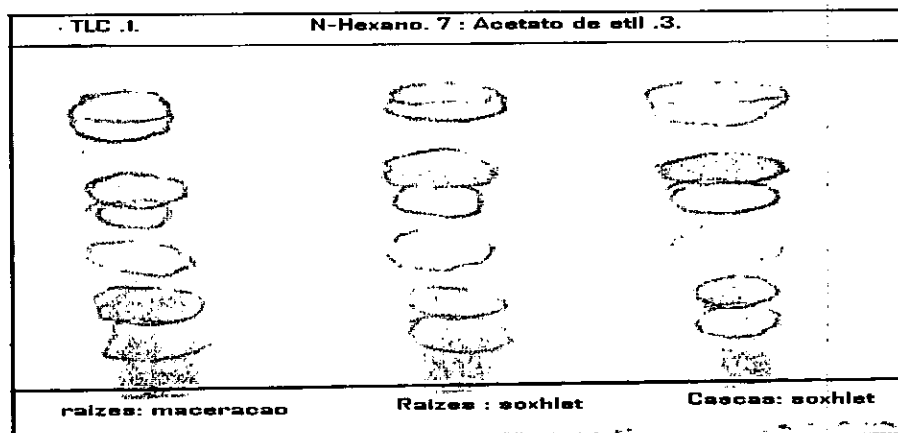


Figura 3. Cromatograma dos extratos brutos das raízes e cascas de caule de *Kigelia Africana*.

No cromatograma TLC 1 apresenta-se os resultados de análise por cromatografia em camada fina dos extractos brutos clorofórmicos respectivamente de maceração e soxhlet das raízes e soxhlet de cascas de caule.

O cromatograma mostra uma complexidade de manchas nos três casos e notou-se que as manchas são semelhantes; a única diferença nota-se nas cascas de caule onde aparece uma mancha de  $R_f = 0,22$  no sistema de solvente n-Hexano/Acetato de etilo (9:1) de cor vermelha na UV 366 nm e que torna-se verde quando revelado com Vanilina/ácido sulfúrico (VS); o restante das manchas são semelhantes quer nas cascas de caule quer nas raízes.

#### 10.4. Fraccionamento por cromatografia líquida de média pressão

Enchimento e montagem da coluna MPLC.

Material usado:

Aagitador magnético

Bomba de Média Pressão

Coluna cromatográfica com respectivos acessórios

Dois suportes com respectivas garras

Tubos de ensaio dispostos num *carrossel*

Funis.

Fixa-se o pistão numa das extremidades da coluna introduzindo-se depois o filtro. Monta-se a coluna no suporte com o pistão firmemente apoiado na base do suporte, coloca-se então, na extremidade superior aberta da coluna cromatográfica, um funil de haste larga e introduz-se sílica-gel 60 até uma altura de 5cm, 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 sobre a sílica-gel e coloca-se um filtro na extremidade superior, introduz-se então o outro pistão, fixando-o cuidadosamente e por fim monta-se a coluna para a eluição. Para todos os fraccionamentos em cromatografia líquida de média pressão (MPLC) foi usado o sistema de solvente n-Hexano/Acetato de etilo (v/v) nas proporções 100%; 95/5; 90/10; 85/15; 80/20; 75/25; 70/30; 50/50; 0/100%.

#### **10.4.1. Fraccionamento do extracto clorofórmico das cascas de caule de kigelia africana**

1gr de extracto bruto de cascas de caule, foi submetido a cromatografia líquida de media pressão (MPLC1), na tentativa de isolar os produtos cujas manchas correspondiam aos produtos principais que possuíam a cor amarela em UV a 366nm e cor castanha clara em UV a 254nm e quando revelado com vanilina-ácido sulfúrico adquirem uma cor alaranjada intensa e que com tempo passa para cor violeta; usando o sistema de solvente n-Hexano/Acetato de etilo (v/v) nas proporções 100%; 95/5; 90/10; 85/15; 80/20; 75/25; 70/30; 50/50; 0/100%.

O fraccionamento resultou em 19 fracções que foram analisadas por cromatografia de camada fina(TLC) no sistema de solvente n-Hexano /Acetato de etilo (7:3), onde verificou-se que:

As fracções 1-5 não apresentaram nenhuma mancha.

As fracções 6-7 apresentam três manchas comuns, duas bem visíveis; a primeira de cor amarela na UV a 366nm e quando revelada com Vanilina/ácido sulfúrico passa para a cor alaranjada que com tempo passa para violeta; e a outra de cor vermelha na UV a 366 nm e quando revelada com Vanilina/ ácido sulfúrico passa para a cor verde claro e outra mancha que só é visível na UV a 366 nm de cor azul fluorescente.

As fracções 8-9 apresentam quatro manchas semelhantes de cores amarela, castanha clara, amarela e violeta pálida respectivamente em UV a 366nm e quando reveladas com vanilina/ácido sulfúrico mudam respectivamente para cores amarela pálida, invisível,

alaranjada intensa que com tempo passa para violeta e violeta intensa que desaparece com tempo.

As fracções 10-15 apresentam uma complexidade de manchas semelhantes.

As fracções 16-17 apresentam duas manchas principais semelhantes de cores verde e amarela em UV a 366nm e quando reveladas com vanilina/ ácido sulfúrico passam para cores amarela e azul-escuro respectivamente.

As fracções 18-19 apresentaram manchas semelhantes que não saíam do ponto de aplicação.

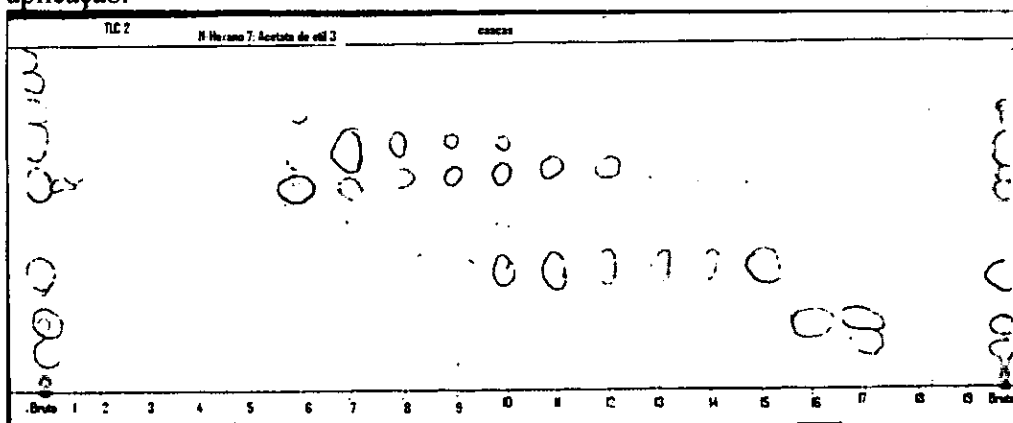


Figura 4. Cromatograma das fracções obtidas do fracionamento do extrato bruto das cascas de caule (MPLC1).

Em função da semelhança das manchas, as fracções 6-7, 8-9, 10-15, 16-17 e 18-9 foram misturadas para uma purificação posterior.

Depois da concentração das fracções misturadas foi realizada uma nova cromatografia de camada fina, no sistema de solventes n-Hexano/Acetato de etilo nas proporções (8:2).



Figura 5. Cromatograma das fracções agrupadas da MPLC.1

Na tentativa de isolar o composto correspondente a mancha principal de cor amarela em UV a 366nm e que quando revelado com vanilina/ácido sulfúrico passa para a cor alaranjada intensa e que com tempo passa para a cor violeta das fracções 6-7 efectuou-se

se um novo fracionamento em cromatografia líquida de média pressão (MPLC.2) da fracção 6-7 que resultou em 35 fracções que foram analisadas por cromatografia em camada fina (TLC) usando o sistema de solventes n-Hexano/Acetato de etilo nas proporções (7:3) tendo-se verificado que existem fracções com manchas semelhantes.

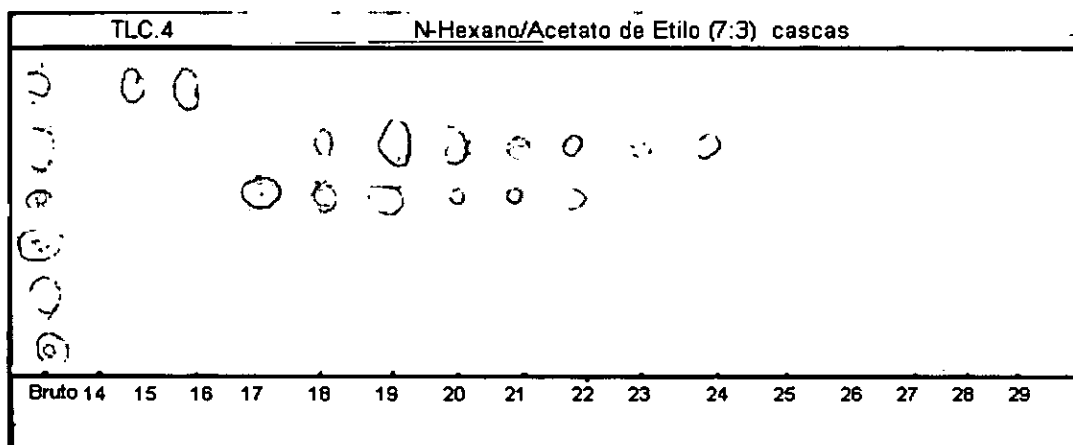


Figura.6. Cromatografia das fracções obtidas do fracionamento da fracção 6-7 das cascas de caule (MPLC.2)

Foram agrupadas em 6 fracções e após a concentração das fracções agrupadas realizou-se uma cromatografia de camada fina usando o sistema de solventes n-hexano/Acetato de etilo nas proporções (9:1) onde notou-se que:

As fracções 15-16 apresentam uma mancha de  $R_f = 0,48$  apenas visível em UV 366nm de cor azul fluorescente.

A fracção 17 apresentou uma mancha de  $R_f = 0,31$  de cor amarela em UV 366nm e quando revelada com Vanilina / ácido sulfúrico adquire uma cor alaranjada intensa que com tempo passa para violeta.

As fracções 18-19 ; 20 ; 21-22 apresentaram duas manchas semelhantes: Uma de  $R_f = 0,22$  de cor vermelha em UV 366nm e quando revelada com Vanilina / ácido sulfúrico adquire a cor verde e outra de  $R_f = 0,31$  de cor amarela em UV 366nm e quando revelada com Vanilina / ácido sulfúrico adquire a cor alaranjada intensa que com tempo passa para violeta com  $R_f$  de 0,31.

A fracção 23-24 apresentou uma mancha de  $R_f = 0,22$  cor vermelha em UV 366 nm e quando revelada com Vanilina / ácido sulfúrico passa para cor verde.

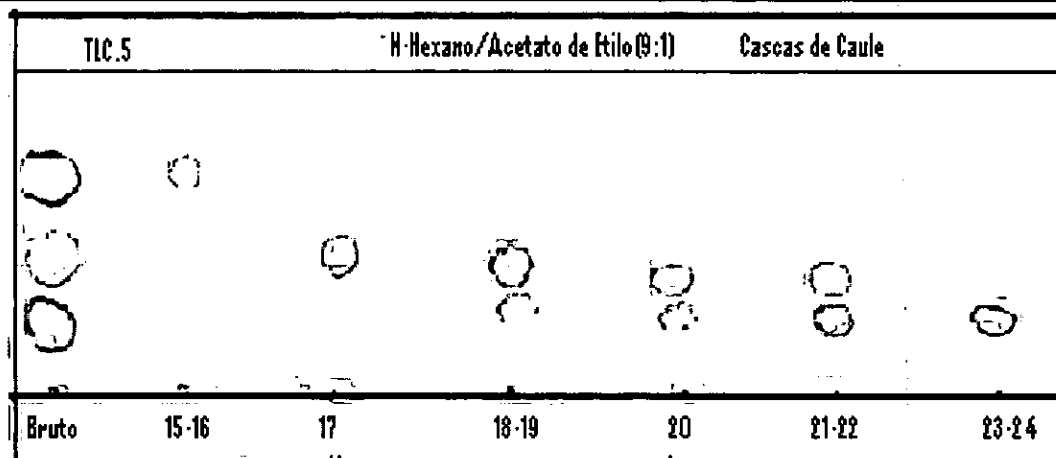


Figura 7. Cromatograma das fracções agrupadas da MPLC.2.

#### 10.4.2 .Fraccionamento dos extractos clorofórmicos das raízes da *kigelia africana*.

Tendo em conta os procedimentos efectuados no fraccionamento das cascas de caule foi feita uma TLC1 segundo o ilustrado na figura 3, onde se verificou uma complexidade de manchas. Deste modo o extracto bruto clorofórmico de raízes também foi submetido a cromatografia líquida de média pressão (MPLC3) usando o sistema de solventes n-Hexano/Acetato de etilo (v/v) nas proporções 100%; 95/5; 90/10; 85/15; 80/20; 75/25; 70/30; 50/50; 0/100%, que resultou em 25 fracções, que foram analisadas por cromatografia em camada fina (TLC6) usando um sistema de solventes n-Hexano/Acetato de etilo (7:3) e verificou-se o seguinte:

As fracções 1-5 não apresentaram nenhuma mancha.

As fracções 6-12 apresentaram uma complexidade de manchas semelhantes. Nesta TLC notou-se uma mancha principal de cor amarela em UV a 366nm e quando revelada com vanilina/ácido sulfúrico passa para a cor alaranjada intensa e que com tempo passa para a cor violeta.

As fracções 13-14 apresentaram várias manchas semelhantes; embora não bem visíveis.

As fracções 15-16 apresentaram uma complexidade de manchas semelhantes.

As fracções 17-20 apresentaram também manchas semelhantes.

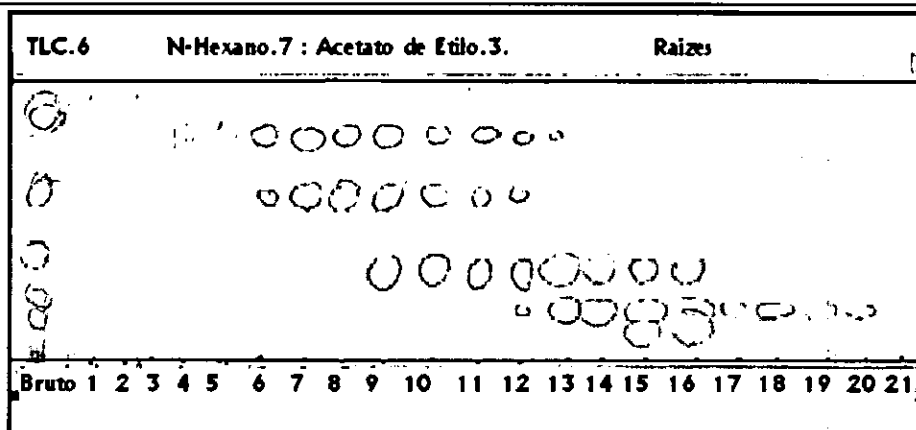


Figura 8. Cromatograma das fracções obtidas por fraccionamento do extracto bruto das raízes.

Em função da semelhança das manchas as fracções 6-12, 13-14, 15-16 e 17- 20 foram misturadas para uma purificação posterior.

Depois da concentração das fracções misturadas foi realizada uma nova TLC7, no sistema de solvente n-Hexano/Acetato de etilo na proporção (7:3), e verificou-se que:

A mistura das fracções 6-12 apresentou cinco manchas separadas.

As fracções 13-14;15-16 e 17-20 apresentaram 5 manchas bem visíveis e outras não visíveis que desaparecem com tempo.

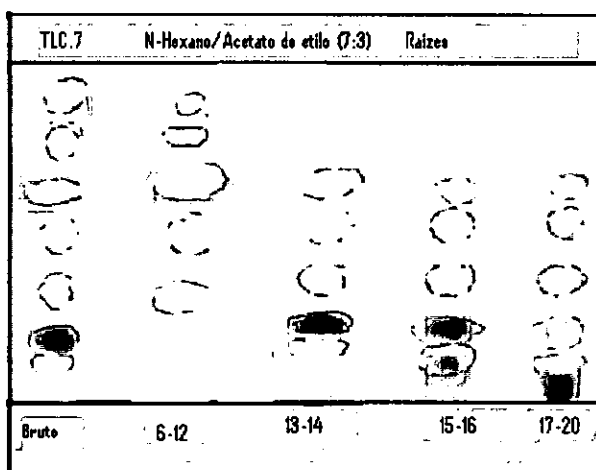


Figura 9. Cromatograma das fracções agrupadas da MPLC3.

Na tentativa de isolar o composto correspondente a mancha principal obtida da mistura das fracções 6-12 efectuou-se um novo fraccionamento por cromatografia liquida de media pressão (MPLC) usando o sistema de solventes n-Hexano/Acetato de etilo nas proporções usadas nos fraccionamentos anteriores e obteveram-se 47 fracções que foram analisadas por cromatografia em camada fina (TLC) no sistema de solventes n-Hexano/Acetato de

etilo (7:3).

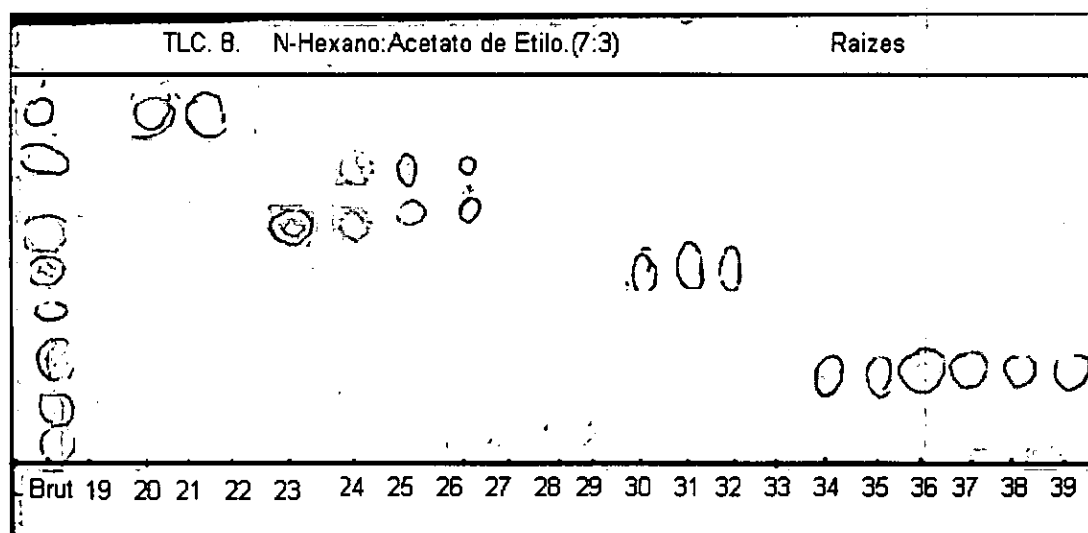


Figura.10.Cromatograma das fracções obtidas do fraccionamento das fracções 6-12 das raízes (MPLC4)

Foram agrupadas em 6 fracções segundo a semelhança das manchas com  $R_f$  aproximadamente iguais.

Depois da concentração das fracções misturadas foram analisadas por cromatografia em camada fina (TLC) onde se verificou:

As fracções 20-21 apresentaram uma mancha de  $R_f = 0,70$  de cor azul fluorescente que é visível somente em UV 366nm.

A fracção 23 apresentou uma mancha de  $R_f = 0,52$  de cor amarela em UV 366nm, castanha em UV 254nm e quando revelada com vanilina/ácido sulfúrico torna-se alaranjada intensa e com tempo passa para a cor violeta.

As fracções 24;25-26 apresentaram cada uma delas duas manchas uma de  $R_f = 0,52$  de cor amarela em UV 366nm, castanha em UV 254nm e quando revelada com vanilina/ácido sulfúrico torna-se alaranjada intensa e com tempo passa para violeta e outra de  $R_f = 0,69$  de cor castanha clara em UV 366nm e quando revelada com vanilina/ácido sulfúrico passa para violeta.

As fracções 30-32 apresentaram uma mancha de  $R_f = 0,41$  de cor amarela clara em UV 366nm e quando revelada com vanilina-ácido sulfúrico a sua cor mantém.

A fracção 34-39 também apresentou uma mancha de  $R_f = 0,31$  de cor amarela pálida em UV 366nm e quando revelada a cor mantém.

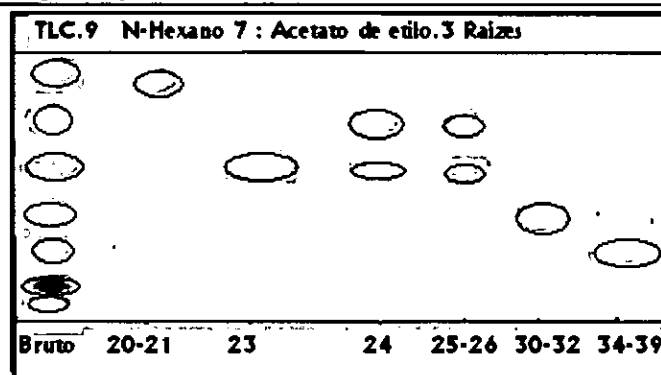


Figura 11. Cromatograma das fracções agrupadas da MPLC4.

Para comprovar a presença de naftoquinonas fez-se uma cromatografia de camada fina que foi revelada por hidróxido de potássio em 10% de etanol que é o revelador específico, tendo-se observado as seguintes cores:

No extracto bruto de cascas de caule observou-se 7 manchas de cores castanha, verde, amarela pálida, amarela clara, amarela, azul fluorescente e vermelha em UV 366 nm e quando reveladas com hidróxido de potássio em 10% de etanol as cores passam de castanha para castanha escura, de verde para azul, amarela pálida mantém-se, amarela clara passa para amarela, amarela passa para alaranjada intensa que com tempo passa para violeta, azul fluorescente mantém-se e somente visível em UV 366 nm e vermelha passa para castanha pálida(quase invisível).

O extracto bruto de raízes apresenta 6 manchas de cores castanha, verde, amarela pálida, amarela clara, amarela, azul fluorescente em UV 366 nm e quando reveladas com hidróxido de potássio em 10% de etanol as cores passam de castanha para castanha escura, de verde para azul, amarela pálida mantém-se, amarela clara passa para amarela, amarela passa para alaranjada intensa que com tempo passa para violeta e azul fluorescente mantém-se e somente visível em UV 366 nm .

As manchas de cores amarela pálida, amarela e alaranjada que com tempo passa para violeta, são as que correspondem as cores da naftoquinonas.



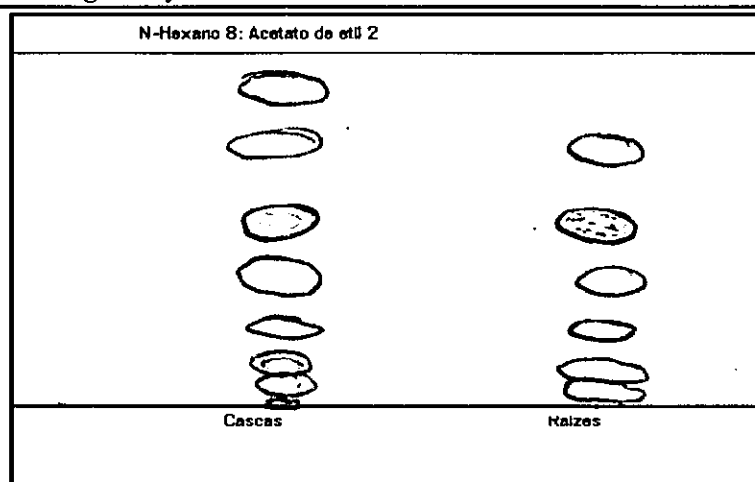


Figura 12. Cromatograma dos extractos brutos de cascas de caule e raízes reveladas por KOH a 10% de etanol.

Também fez-se uma análise por cromatografia de camada fina comparativa das fracções 15-16, 17 das cascas de caule e das fracções 20-21, 23 das raízes.

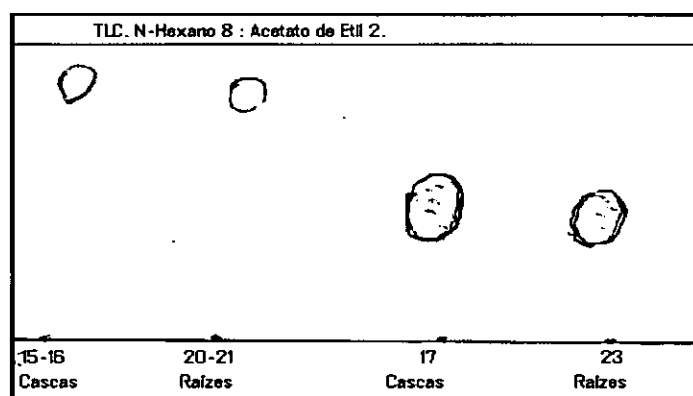


Figura 13. Cromatograma comparativa das fracções 15-16,17 de cascas de caule e fracções 20-21 , 23 de raízes.

A reacção da fracção 17 das cascas de caule e da fracção 23 das raízes com uma solução aquosa de hidróxido de sódio procedeu-se da seguinte forma: Adicionou-se 5 gotas de solução de hidroxido de sódio num frasco contendo a fracção 17 das cascas de caule e no outro frasco contendo a fracção 23 das raízes onde verificou-se a cor vermelha brilhante em todos frascos.

**10.5. Análise das fracções isoladas por espectroscopia de ultravioleta e visível (uv-vis).**

Algumas fracções isoladas das cascas de caule e raízes foram submetidas a análise por espectroscopia na região do Ultravioleta e Visível (UV-Vis) na tentativa de confirmar se os comprimentos de onda eram próximos dos compostos isolados das cascas de caule e raízes encontrados na Literatura e obteve-se os seguintes resultados:

- ❖ Para o solvente metanol observou-se  $\lambda_{\text{máx}} = 199 \text{ nm}$  – vide anexo -I .
- ❖ Para a fracção 15-16 de cascas de caule observou-se  $\lambda_{\text{máx}} = 221 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{máx}} = 267 \text{ nm}$  (MeOH,) – vide anexo - II .
- ❖ Para a fracção 17 de cascas de caule observou-se  $\lambda_{\text{máx}} = 282 \text{ nm}$  (MeOH) – vide anexo - III.
- ❖ Para a fracção 23-24 de cascas de caule observou-se  $\lambda_{\text{máx}} = 221 \text{ nm}$  (MeOH) – vide anexo - IV.
- ❖ Para a fracção 20-21 das raízes observou-se  $\lambda_{\text{máx}} = 214 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{máx}} = 267 \text{ nm}$  (MeOH ) – vide anexo - V.
- ❖ Para a fracção 23 das raízes observou-se  $\lambda_{\text{máx}} = 211 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{máx}} = 249 \text{ nm}$  (MeOH) – vide anexo -VI.
- ❖ Para a fracção 30-32 das raízes observou-se  $\lambda_{\text{máx}} = 208 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{máx}} = 274 \text{ nm}$  (MeOH) – vide anexo -VII.

Neste caso usou-se o espectrómetro **CARRY 100** para determinar os comprimentos de onda máximo de absorção das fracções.

**10.6. Espectroscopia de massa de algumas fracções isoladas nas raízes.**

Algumas fracções isoladas nas raízes foram submetidas a análise por espectroscopia de massa na tentativa de confirmar as suas estruturas, tendo usado o espectrómetro **GCMS- QP5000** e obteve-se os seguintes resultados:

Para a fracção 23 das raízes o espectro de massa confirmou que é a naftoquinona Kigelinona, pois o espectro apresenta um pico básico  $m/e = 43(100\%)$  que corresponde

a fragmentação  $\text{CH}_3\text{-C}\equiv\text{O}^+$  (vide anexo.VIII.) e o pico a  $m/e = 257$  correspondente a  $[\text{M-H}]^+$ .

Para a fracção 30-32 o espectro de massa confirmou que é a naftoquinona Isopinnatal, pois o espectro apresenta um pico básico  $m/e = 290(100\%)$  que corresponde a fragmentação  $[\text{M-H}_2\text{O}]^+$  (ver esquema de fragmentação do Isopinnatal no anexo. X )

Para a fracção 34-39 o espectro de massa mostrou um pico básico  $m/e = 41\%(100\%)$ , mais não foi possível determinar a sua estrutura.

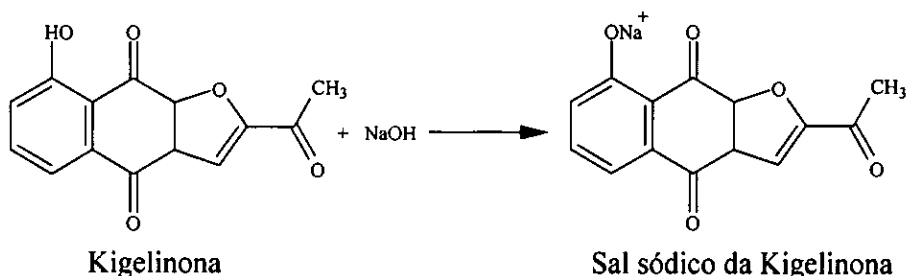
## 11.DISSCUSSÃO DOS RESULTADOS

- No presente trabalho num ensaio preliminar usou-se as duas técnicas de extracção: maceração e Soxhlet no âmbito de escolher a técnica mais eficiente a usar. A extracção por soxhlet revelou-se a mais eficiente e o solvente Clorofórmio foi escolhido para extracção pois é um dos solventes aconselhados na Literatura para extrair naftoquinonas das plantas.
- Segundo os resultados do estudo preliminar realizado sobre pequenas quantidades de pó de raízes e de cascas de caule de *Kigelia Africana* mostraram que a composição fitoquímica é a mesma nos extractos brutos clorofórmicos obtidos por Maceração e por Soxhlet.
- Quanto a comparação dos extractos brutos das cascas de caule e das raízes notou-se que a maioria das manchas são semelhantes no que concerne aos  $R_f$  e coloração.
- Notou-se na cromatografia em camada fina uma mancha de  $R_f = 0,80$  no sistema de solvente n-Hexano/ Acetato de etilo (7:3) de cor vermelha em UV 366 nm que quando revelada com Vanilina/Ácido sulfúrico torna-se verde e quando revelada com solução aquosa de KOH em 10% de Etanol torna-se quase invisível. Esta mancha não é presente nos extractos de raízes, só é presente nos extracto de cascas de caule. Este composto foi isolado e analisado por Espectroscopia de UV-Vis e tendo obtido o comprimento de onda máximo de absorção que é  $\lambda_{\text{máx}} = 221 \text{ nm}$  (MeOH).A característica cromatográfica e o valor do comprimento de onda na UV-Vis mostra que não é uma naftoquinona.
- Os resultados experimentais segundo análise por cromatografia em camada fina ( $R_f$

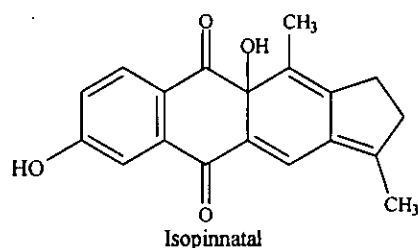
e cor das manchas) e análise por espectroscopia de UV-Vis confirmam a presença de naftoquinonas quer nas cascas de caule, quer nas raízes.

- Na cromatografia em camada fina (TLC1) aparece manchas de cor amarela, alaranjado e violeta cujos  $R_f$  variam de 0.20 até 0,75 no sistema de solvente n-Hexano /Acetato de etilo(7:3) que são as cores e  $R_f$  de naftoquinonas segundo a literatura [4][7][16].
- Na cromatografia de camada fina foram usados como reveladores além da Lâmpada UV a 254 nm e a 366 nm a Vanilina/Ácido sulfúrico e a solução aquosa de KOH em 10% de Etanol. Assim das fracções isoladas das cascas de caule e das raízes a fracção 17 de cascas de caule, as fracções 23, 30-32 e 34-39 das raízes apresentaram as características das naftoquinonas. A análise por espectroscopia de UV-Vis destas fracções confirmam que são naftoquinonas pois tem comprimentos de onda de absorção máxima que varia de 249 nm até 310 nm conforme o recomendado na literatura [4][7][16].
- A reacção do Lapachol com uma solução aquosa de NaOH forma o sal sódico do Lapachol com uma coloração vermelha brilhante como mostra esquema 8.
- As fracções 17 das casca de caule e 23 das raízes foram submetidas a reacção com solução aquosa de NaOH e observou-se a cor vermelha brilhante, o que pode deixar pensar que temos Lapachol; mas a análise por UV-Vis da fracção 23 das raízes mostrou o comprimento de onda máximo de absorção  $\lambda_{\text{máx}} = 249$  nm que é ligeiramente diferente do valor teórico do Lapachol ( $\lambda_{\text{máx}} = 251, 278$  e 310 nm) e a espectroscopia de massa da fracção 23 das raízes não confirmam que seja o lapachol porque o pico de base  $\{m/e = 43 (100\%)\}$  não corresponde ao pico reportado na literatura, onde o pico básico do Lapachol é  $m/e = 227 (100\%)$ .
- A fracção 23 de cascas de caule representa uma sobreposição de duas manchas. A GC-MS confirma que um dos dois produtos é a Kigelinona que possui o fragmento com  $m/e = [M-H]^+ = 257$  e o pico básico  $m/e = 43$  que corresponde a fragmentação  $\text{CH}_3 - \text{C} \equiv \text{O}^+$ . Este valor corresponde com o valor teórico dado na literatura.
- Não se conseguiu determinar o espectro de massa da fracção 17 das cascas de caule pois as quantidades eram muito poucas; mas determinou-se seu comprimento de onda máximo  $\lambda_{\text{máx}} = 282$  nm na UV-Vis que é diferente do obtido na fracção 23 das raízes, o que pode deixar pensar que são produtos diferentes, mesmo se aparentemente apresentam manchas semelhantes na cromatografia em camada fina.
- A cor vermelha brilhante observada na reacção com solução aquosa de NaOH pode

ser obtida no caso da fracção 23 das raízes pela formação do sal sódico da Kigelina porque também contém o grupo hidroxilo fenólico que pode reagir dando o sal sódico da Kigelina como mostra a reacção.



- A fracção 30-32 que de acordo com os dados cromatográficos é uma naftoquinona, o seu espectro de massa mostra um pico básico  $m/e = 290$  que corresponde a  $[M - H_2O]^+ = 290$  (100%) que é o pico básico do Isopinnatal.



- A fracção 34-39 das raízes também com características cromatográficas de naftoquinonas, o seu espectro de massa mostrou o pico básico  $m/e = 41$  (100%) e não se conseguiu determinar a sua estrutura.
- A fracção 15-16 das cascas de caule apresenta as mesmas características cromatograficas com a fracção 20-21 das raízes e sendo visível somente na UV a 366 nm. Esta mancha é de cor azul fluorescente na espectroscopia de UV-Vis apresentando o comprimento de onda  $\lambda_{\text{máx}} = 267$  nm e não se conseguiu determinar a sua estrutura e também esta fracção não possui características cromatograficas das naftoquinona.

## 12. CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES.

### 12.1. Conclusões

- ✓ Os resultados do ensaio preliminar sobre pequenas quantidades de pó de raízes e de cascas de caule revelaram que a composição fitoquímica é a mesma nos extractos brutos clorofórmicos obtidos por maceração e por Soxhlet.
- ✓ A composição fitoquímica dos extractos brutos clorofórmicos das cascas de caule é quase semelhante à dos extractos brutos das raízes.
- ✓ Um composto de  $R_f = 0,80$  (Hexano/Acetato de etilo 8:2) de cor vermelha em UV a 366 nm e verde quando revelado com Vanilina/ácido sulfúrico, foi isolado nas cascas de caule e não existe nos extractos das raízes.
- ✓ As análises efectuadas por cromatografia de camada fina confirmam a existência de naftoquinonas nas cascas de caule e nas raízes. Assim a fracção 17 das cascas de caule, as fracções 23, 30-32 e 34-39 de raízes apresentam características cromatograficas de naftoquinonas ( $R_f$  de 0,20 – 0,75 (Hexano /Acetato de etilo) e cores amarela, alaranjada ou Violeta.
- ✓ As análise por espectroscopia de UV-Vis vem completar os dados cromatograficos na confirmação da presença de naftoquinonas nos extractos clorofórmicos de cascas de caule e de raízes de *Kigelia Africana*.
- ✓ Assim a fracção 17 de cascas de caule, as fracções 23, 30-32 e 34-39 das raízes apresentam um comprimento de onda no intervalo de 249 nm a 310 nm que é característico das naftoquinonas.
- ✓ A análise por espectroscopia de massa permitiu identificar a naftoquinona Kigelinona na fracção 23 e a naftoquinona Isopinnatal na fracção 30-32.

## 12.2. Recomendações

- ✓ Globalmente recomenda-se ao Departamento de Química estudos nesta área de análise de plantas, em particular as medicinais da família Bignoniaceae usadas por praticantes da medicina tradicional. No em tanto as condições técnicas para a identificação, isolamento, determinação das estruturas químicas e da actividade biológica devem ser melhoradas.
- ✓ Recomenda-se que se façam testes para confirmar o grau de eficiência e grau de toxidade dos compostos isolados na planta *Kigelia Africana*.
- ✓ Recomenda-se também que em pesquisa desta natureza, a utilização de maior quantidade de amostra para obter maior quantidade do extracto bruto.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. ANDREANS MULLER, DÉLIO S. RASLAN.(2003). Análise de Naftoquinonas em extractos brutos de raízes e cascas da *Kigelia Africana*. Química nova , vol.22(2) disponível em <http://www.en.wikipedia.org/wiki/Kigelia> acesso em 20 de Setembro 2006
2. ATTA-ur-RAHMAN, et al.(1998). New trends in natural products-Chemistry , studies in organic chemistry, vol.26, pp.565-571.
3. BRIDE Mc.T.J, et al .(2002). Avaliação do Lapachol como agente anti-tumor. Pesquisa de câncer; disponível em <http://www.google.co/serch.ht-pt-Br;Re=150-8859-1> acesso em 28 de Outubro de 2005.
4. DAVID E. METZLER. (2000). Biochemistry, the chemical Reaction of living cells, Iowa state university New York ,pp. 855-856.
5. Degani, A.L.G, et al.(1998). Cromatografia, um breve ensaio, disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php;script=sci-art> acesso em 12 de Setembro de 2005.
6. Goel,R.K, Pathak, N.K.R, et al. (1987). Effect of Lapachol, a naphthoquinone isolated from tectona grandis, on experimental peptic ulcer and gastric secretion. Journal of Pharmacy and pharmacology. Vol.39 pp.138-140 .
7. HOUGHTON.P.J. (2003). Arvore do sausage, Etnobotanico, disponível em <http://www.Mokuti.co.za/refl.htm>. acesso em 15 de Fevereiro de 2006.
8. <http://biotec.cmb.utexas.edu/botany/beta.html>; Pharmacology of  $\beta$ -lapachona and Lapachol. acesso em 12 de Julho de 2006
9. <http://www.estado.com.br/edição/especial/plantas/jui8html>. acesso em 13 de junho de 2006.



10. Jirón, Z. (1996). Approaching Optimal Conditions for Running Liquid Adsorption Column Chromatography Using Simple Computational Models. Tese de Mestrado. (26-29). Stockholm, Department of Chemistry, Organic Chemistry, Royal Institute of Technology.
11. KELLY C.G, et al. (2001). Trypanocidal activity of isolated Naphtoquinones from Tabebuia and some Heterocyclic Derivatives, disponível em <http://j.bcs-sbq.org.br/j.bcs/2001,vol.12-n3/148-00.pdf>. acesso em 10 de Novembro de 2005.
12. KUNY A. Li, et al.(2004). Actividade anti microbial das cascas de caule e da raiz da *Kigelia Africana*, Ethopharmacology vol.35;disponível em <http://homolaicus.com/suenza/erbario/utility/botanica-sistematal> acesso em 12 de Setembro de 2006.
13. Lima, O.G, et al.(1962). Substancias antimicrobianas de plantas superiores. Comunicação XX. Actividade antimicrobiana do lapachol e seus derivados isolados do extracto da kigelia africana( Família bignoniaceae).Revista do instituto de antibióticos. Vol.4 . (1/2)
14. LOHMAN L.G. (2006). Untangling the Phylogeny of neotropical lianas (Bignoniae-Bignoniaceae)- American Journal of Botany vol.93 (2) disponível em <http://en.wikipedia.org/wiki/Bignoniaceae>. acesso 12 de Março de 2007
15. MANN.J. DAVIDSON R.S, et al. (1998). Natural Products, Their Chemistry and Biological Significance, British Library Catagving in Publication Data, 1ª edition , pp.367-369 e 381-383.
16. MILTON.N. da Silva, et al. (2003). Um panorama actual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na  $\beta$ - Lapachona e derivados, disponível em [htt://www.scielo.br/scielo.php.scrip//](http://www.scielo.br/scielo.php.scrip//). Acesso 12 de Novembro de 2005
17. PITTA JOFFE. (2003). *Kigelia Africana* Para Condição da pele; Jardim Botanical Nacional de Pretoria ; disponível <http://pt.wikipedia.org/wiki/kigelia> acesso em 8 de

Agosto de 2005.

18. RIFFEL A, MEDINA L.F.(2002). Na actividade antimicrobial de vitro de uma série nova de 1,4- naftoquinonas; Biol Res Braz. J. Med. Vol.35(7) (811-818) disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php/>. Acesso em 22 de Julho de 2006.
19. ROSSANA M.C. BRAGA, et al. (1998). Lapachol , Chemistry, Pharmacology and assay methods. Rev. Bras.Farm., vol.84(1) disponível em <http://www.tomdaservas.co.br/indiceplmed,htm> - acesso em 11 de fevereiro 2005.
20. SAID G.C. FONSECA, et al. (2004). Validação de metodologia analítica para doseamento de solução de Lapachol por CLAE, Química Nova, vol.27 nº 1 , disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php>; acesso em 20 de Fevereiro de 2006.
21. SELMA R. de PAIVA, et al. (2002). Métodos de extracção e perfil cromatografico de espécies de *Plumbaginaceae*; disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php.script=abstract/pid=s0074>. acesso em 27 de Fevereiro de 2006.
22. SEL MA R. de PAIVA, et al. (2003). Actividade antimicrobial em vitro de *Plumbagina* isolado de espécies do plumbago; disponível em [http://www.scielo.br/scielo.php;script=sci-art;abstract- vol 98 \(7\)](http://www.scielo.br/scielo.php;script=sci-art;abstract-vol 98 (7)), acesso em 7 de Setembro de 2005.
23. WATSON L. And DALL WITZ M.J. (1992). The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, information retrieval Bignoniaceae; disponível em <http://delta-intkey.com>. Acesso 12 de Dezembro de 2005.
24. WILLIAM. H. DUBLEY, IAN FLEMING. (1974). Métodos espectroscopicos em química orgânica; 1ª edição em espanhol pp.42- 296.

## ANEXOS

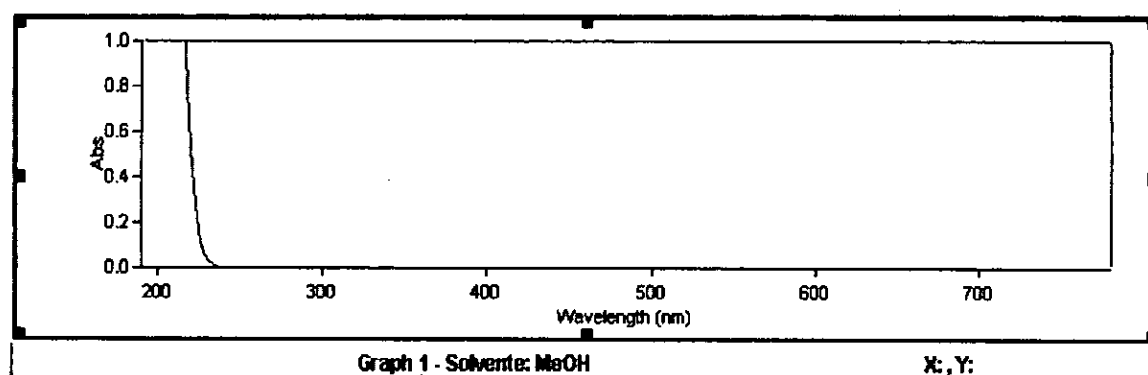
## ANEXO-I: Espectro do solvente MeOH

Scan Report Wed 18 Apr 09:11:35 AM 2007

Batch:

Software version: 01.00(6)

Operator: dr Monjane

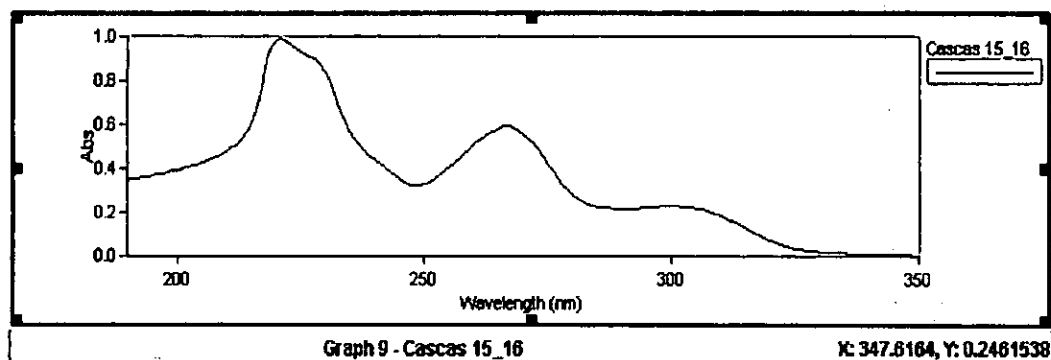
Sample Name: Solvente: MeOH

Wavelength (nm)	Abs
199.0	2.5915

Tendai Sairosse Mujanje

- I -

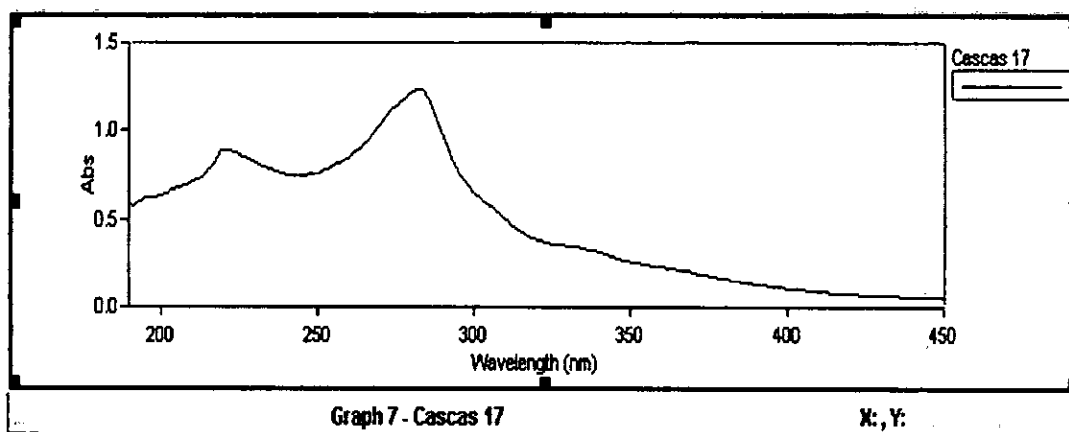
**ANEXO-II: Espectro da fracção 15-16 das cascas de caule**



Sample Name: 15 - 16 cascas de caule

Wavelength (nm)	Abs
267.00	0.6069
221.0	0.9919

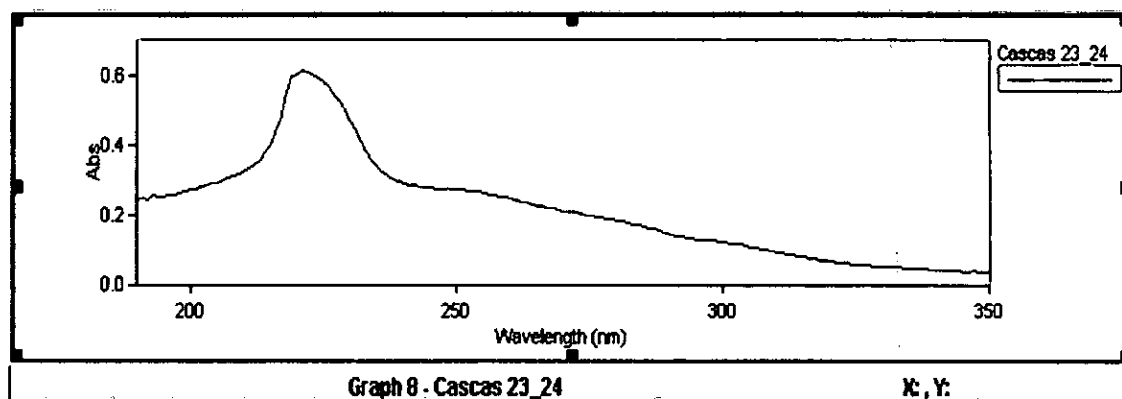
**ANEXO-III: Espectro da fracção 17 das Cascas de caule.**



Sample Name: 17 cascas de caule

Wavelength (nm)	Abs
282.00	0.6069

**ANEXO-IV: Espectros da fracção 23-24 de Cascas de caule.**



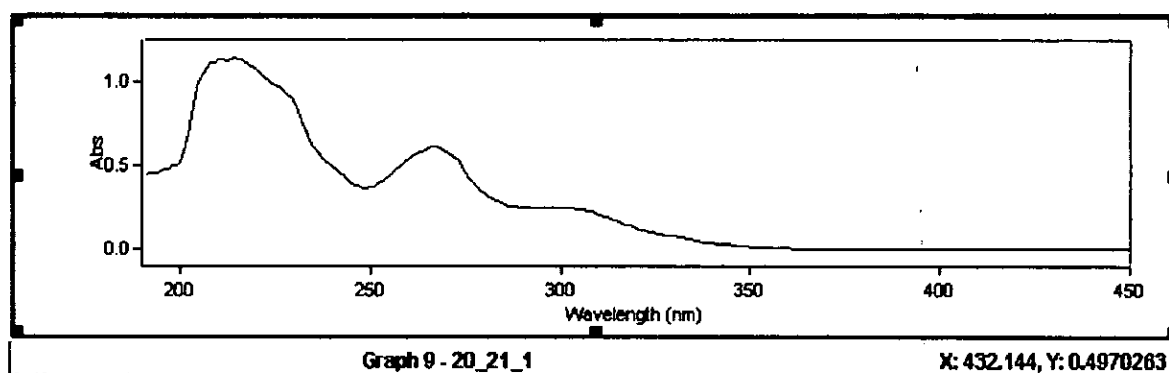
Sample Name: 23 - 24

Wavelength (nm)      Abs

---

221.00	0.5916
--------	--------

**ANEXO-V: Espectro da fracção 20-21 das raízes.**



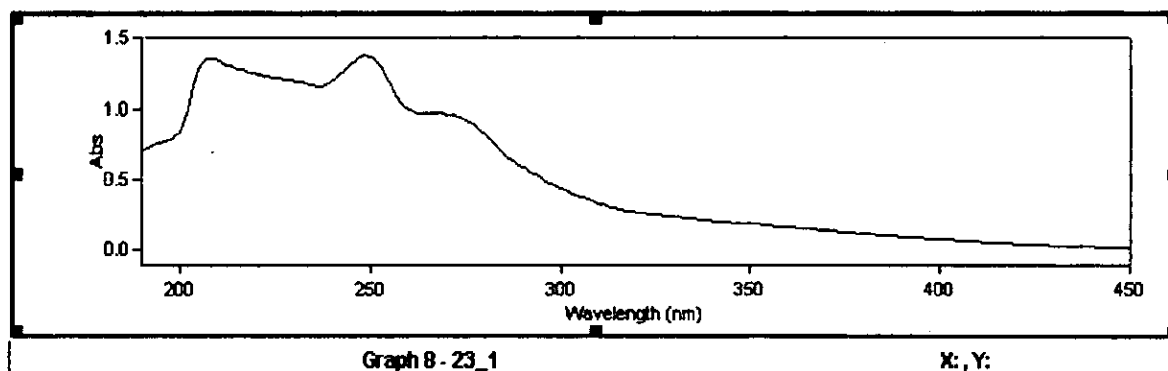
Sample Name: 20 - 21

Wavelength (nm)      Abs

---

267.00	0.6069
214.00	1.1419

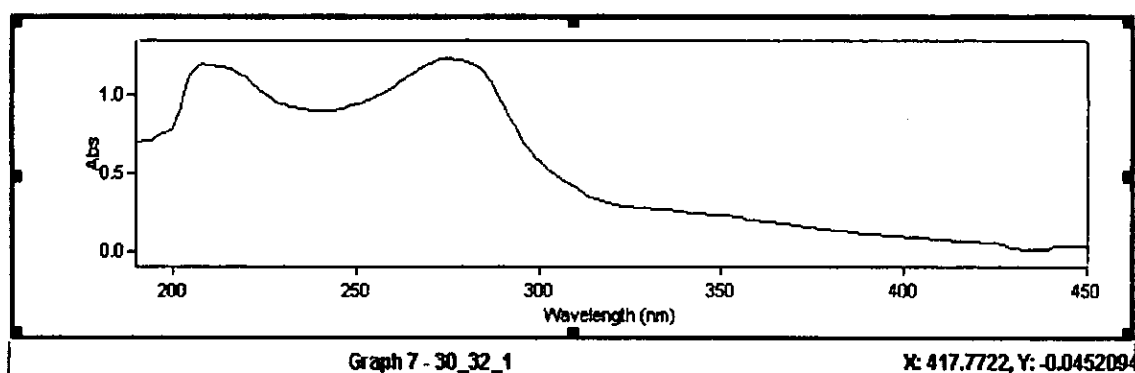
## ANEXO-VI: Espectro da fracção 23 das raízes.



Sample Name: 23\_1

Wavelength (nm)	Abs
249.00	1.3786
214.0	1.2999

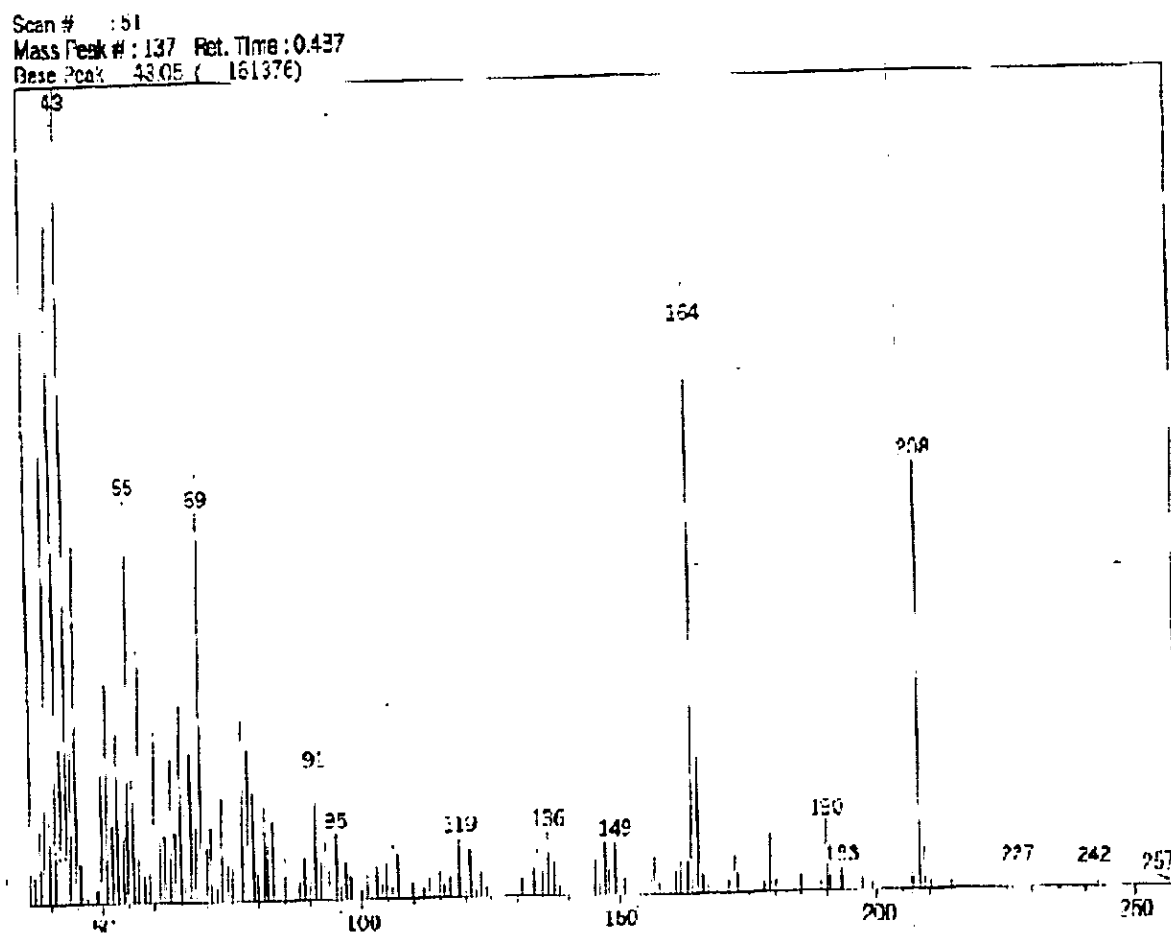
## ANEXO-VII: Espectro da fracção 30-32 das raízes



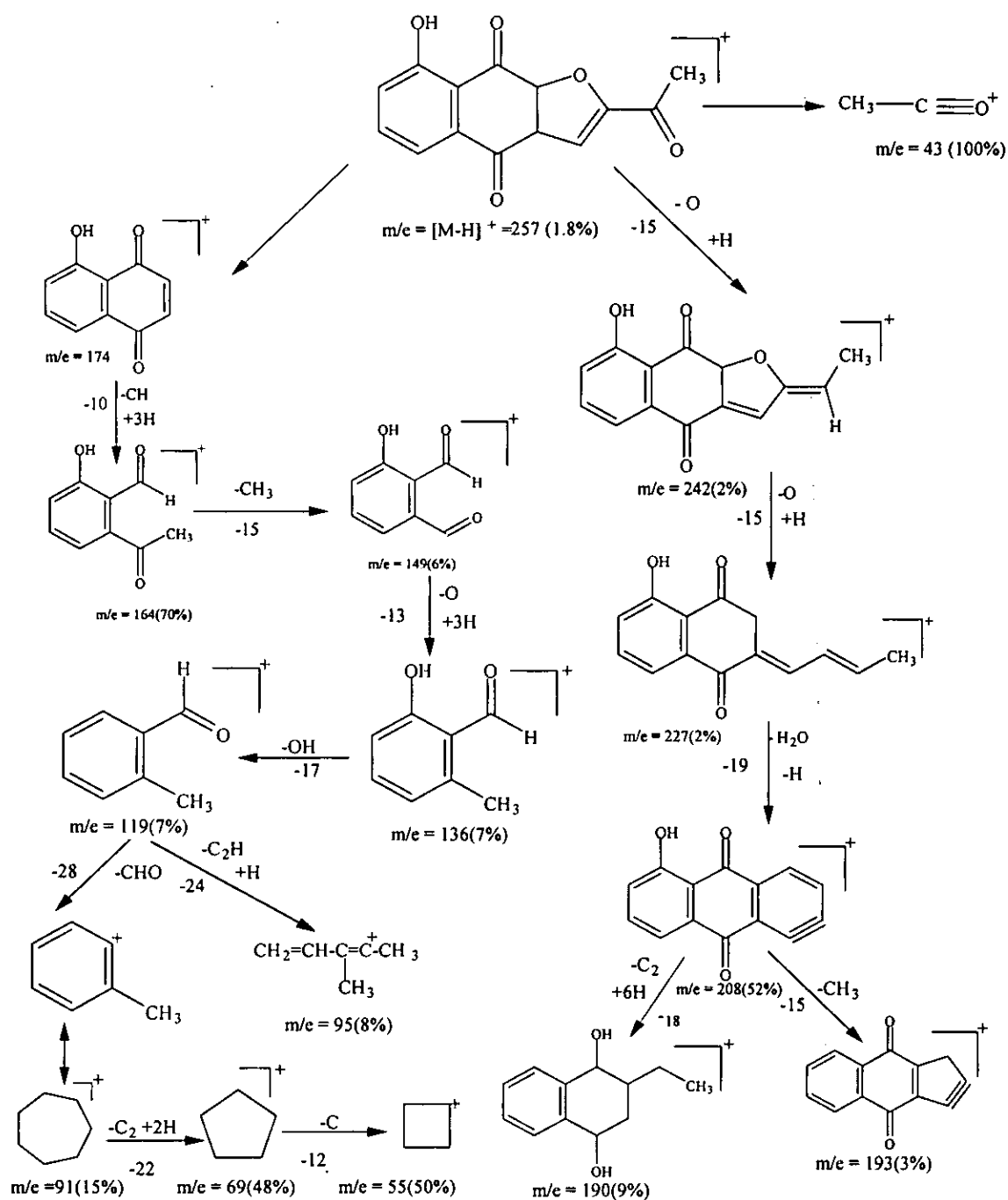
Sample Name: 30 - 32

Wavelength (nm)	Abs
274.00	1.2363
208.00	1.1989

**ANEXO.VIII. Espectro de massa da fracção 23 das raízes**

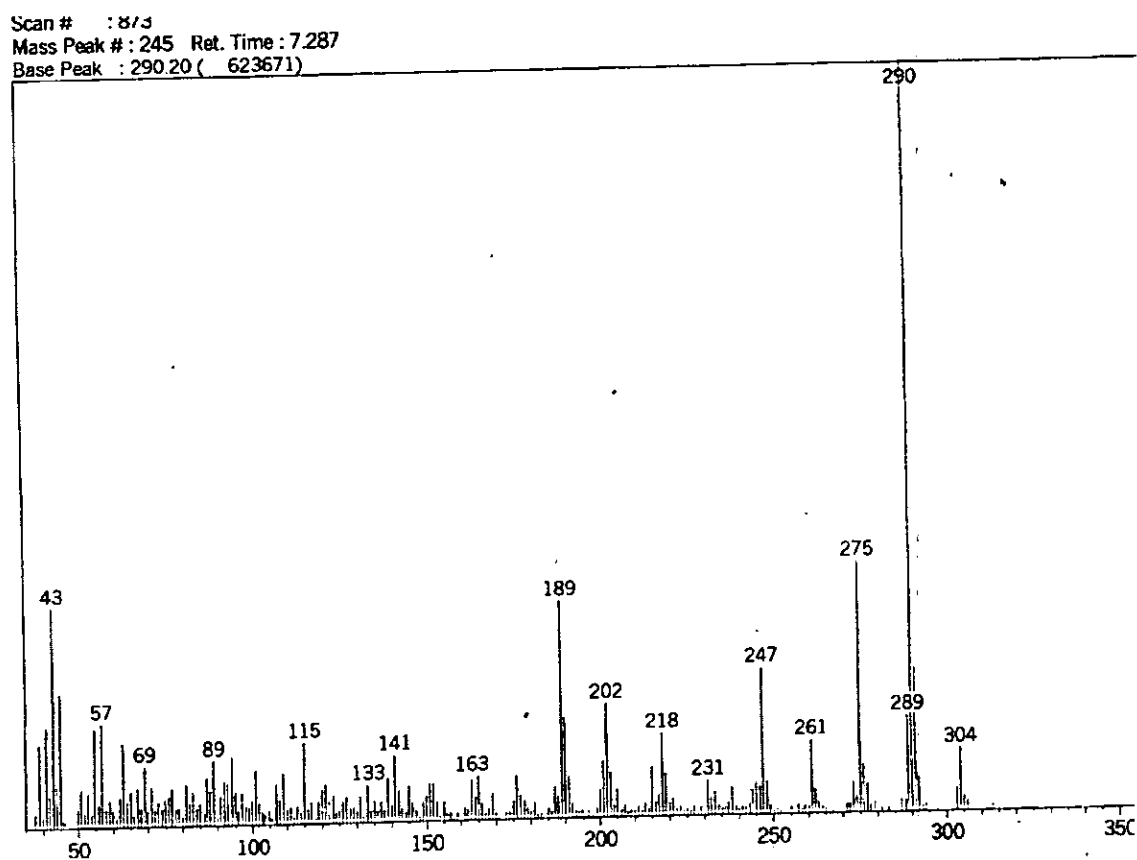


## ANEXO.IX. Esquema de fragmentação da Kigelinona.

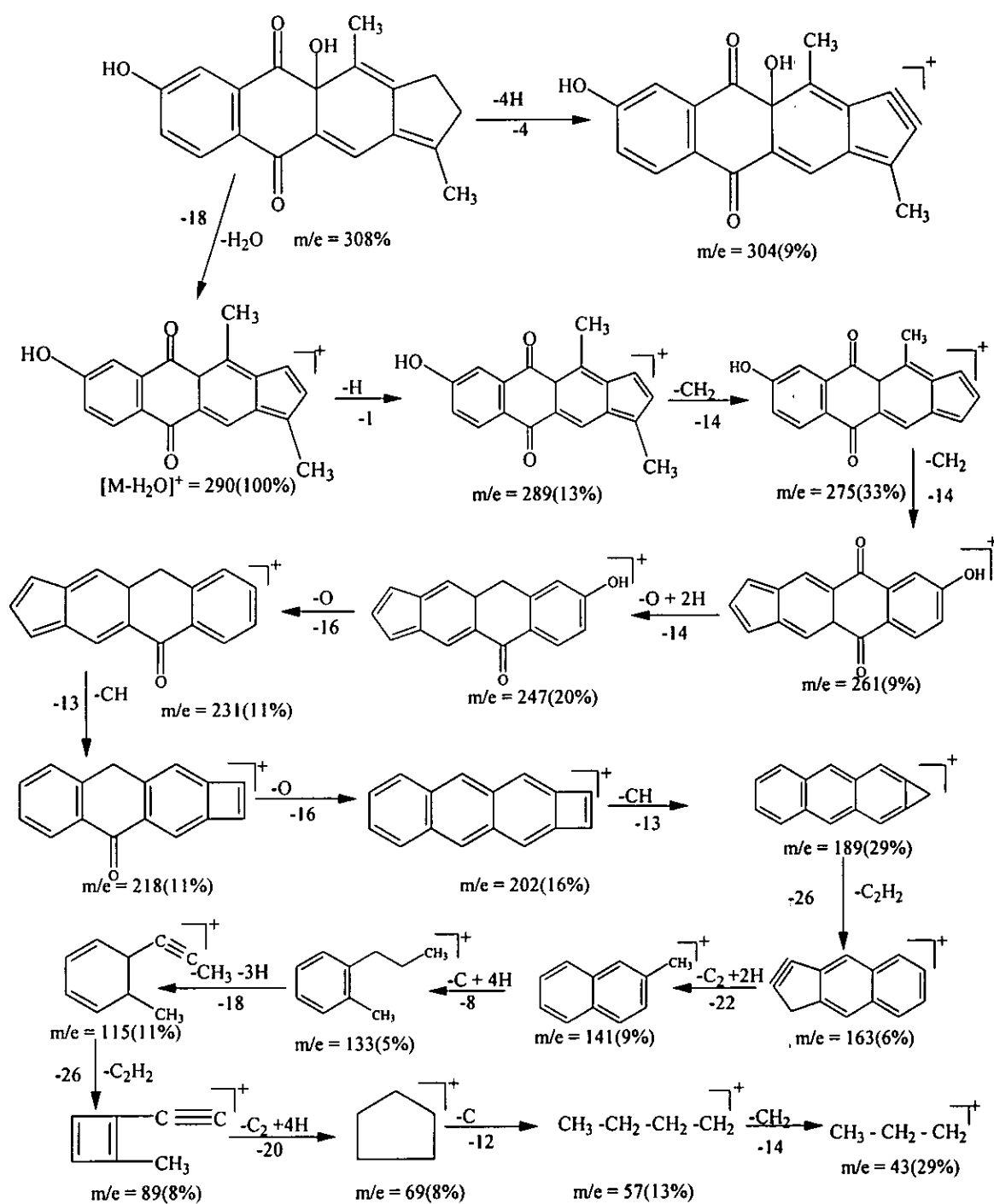




**ANEXO.X. Espectro de massa da fracção 30-32 das raízes**



## ANEXO.XI. Esquema de fragmentação do Isopinnatal.



**ANEXO.XII. Espectro de massa da fracção 34-39 das raízes.**

