MARIA CLEMÊNCIA ARÊDE GASPAR DE LEMOS MOURÃO

PREPARAÇÃO DE DERIVADOS HIDROSSOLÚVEIS DA DIOSMINA

PORTO
1 9 9 0

MARIA CLEMÊNCIA ARÊDE GASPAR DE LEMOS MOURÃO

Assistente da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

PREPARAÇÃO DE DERIVADOS HIDROSSOLÚVEIS DA DIOSMINA

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

PORTO

1990

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Química Orgânica e teve o apoio financeiro do Instituto Nacional de Investigação Científica por intermédio do Centro de Estudos de Química Orgânica Fitoquímica e Farmacologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

AO CORPO DOCENTE DA FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

Ao Augusto

Às minhas filhas

Foi a convite do Exmº Senhor Professor Doutor Joaquim Polónia, que então dirigia o Laboratório de Química Orgânica da Faculdade que iniciei, nesta casa, a minha vida profissional. Foi Mestre insigne e sobretudo o Amigo de todas as horas, a quem muito devo tanto cientifica como humanamente. Este trabalho foi concepção sua e realizado sob sua orientação até ao dia em que,infelizmente, bem cedo, a morte o levou. Pôs nele todo o empenho e muita esperança, por isto mesmo impus a mim própria, a tarefa de o levar a cabo. Pressentindo a aproximação do momento de partida quis encorajar-me e expressou-me a vontade de que fosse o Exmº Senhor Professor Correia Alves a suceder-lhe na orientação deste trabalho, convicto que este seu colega e amigo aceitaria de bom grado, tal incumbência.

Fica-me, neste momento, o vazio amargo de não poder dizer de viva voz ao Mestre e Amigo por, tudo e foi muito, o que me deu, obrigada.

Ao Prof. Doutor Correia Alves expresso o meu mais profundo agradecimento pela confiança que em mim, desde logo, depositou, e pelo apoio a nível pessoal e científico que me concedeu e sem o qual este trabalho nunca teria sido dado à estampa.

A todos quantos trabalharam e trabalham no Laboratório de Química Orgânica e que contribuiram de algum modo para a execução deste trabalho, o meu agradecimento.

No Laboratório de Farmacognosia onde desenvolvi uma das últimas fases deste trabalho, encontrei por parte de todos permanente incentivo nos momentos de desânimo, pelo que lhes expresso o meu profundo reconhecimento.

Recebi ainda valioso apoio de outros serviços da Faculdade, nomeadamente do serviço de Farmacologia, Iconografia, Química-Física, Tecnologia Farmacêutica e Toxicologia, a quem agradeço nas pessoas dos seus responsáveis.

À Senhora D. Maria Fernanda Pereira, o meu agradecimento pelo interesse e

competência com que fez o processamento deste texto.

A todo o corpo docente e demais colaboradores da Faculdade de Farmácia, que de algum modo me apoiaram e incentivaram na realização deste trabalho, o meu reconhecimento.

Quero ainda expressamente agradecer:

-Ao Departamento de Química da Universidade de Aveiro nas pessoas do Prof. Doutor José A. Cavaleiro e Drª Maria da Graça Santana Marques

-Ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade de Coimbra nas pessoas dos Prof. Doutores Victor Gil e Carlos Geraldes.

-Ao Instituto Superior Técnico - Complexo Interdisciplinar - na pessoa do Prof. Doutor José Ascenso

-À Senhora Drª Maria Adelina Macedo Vieira da Faculdade de Ciências do Porto, pela execução de alguns espectros de RMN

-Ao Midwest Center for Mass Spectrometry

-Aos Laboratórios Bial pelo apoio bibliográfico prestado.

-Ao Instituto Nacional de Investigação Científica que, por intermédio do Centro de Estudos de Química Orgânica, Fitoquímica e Farmacologia, linha 1, concedeu o apoio financeiro indispensável.

Por último, mas não em último, quero agradecer ao Augusto e às minhas filhas,a quem privei de tantas horas de convívio, a compreensão que manifestaram nos momentos de desânimo e o apoio que sempre me deram.

"É admitido na elaboração da dissertação o aproveitamento, total ou parcial, do resultado de trabalhos já publicados mesmo em colaboração, devendo, neste caso, o candidato esclarecer qual a sua contribuição pessoal".

Decreto Lei nº338/70. Artº 8º, parágrafo 2

Alguns dos resultados apresentados nesta dissertação constam das seguintes comunicações:

POLONIA, M.A.; MOURÃO, M.C. e POLONIA,J.: " Preparação de derivados solúveis de compostos de estrutura benzopirânica", I Congresso Nacional das Ciências Farmacêuticas, Lisboa, 1982

MOURÃO, M.C.G.L.: "Estudo da síntese de derivados hidrossolúveis da diosmina", I Congreso Hispano-Portugués de Química Terapêutica, Santiago de Compostela, 1987

MOURÃO, M.C.G.L.: "Separação e caracterização dos derivados mono e di(2-hidroxietilado) da diosmina", II Congresso Nacional das Ciências Terapêuticas, Montechoro, 1988

MOURÃO, M.C.G.L.: "Derivado dicarboximetilado da diosmina", 11º Encontro Anual da Sociedade Portuguesa de Química, Lisboa, 1988

INDICE

PÁG.

1.INTRODUÇÃO 1

2. PREPARAÇÃO DE DERIVADOS HIDROSSOLUVEIS DA DIOSMINA

Resultados e discussão 8

2.1. Carboximetilação da diosmina 9

2.1.1. Estudo das condições de reacção 9

2.1.2. Análise do produto bruto resultante das diferentes experiências 19

2.1.3. Separação e purificação dos constituintes flavónicos 20

2.1.4. Elucidação estrutural dos compostos flavónicos separados 33

2.1.5. Determinação da percentagem relativa dos derivados formados nas diferentes experiências 66

2.1.6. Hidrólise dos derivados monocarboximetilado em C-3′ e dicarboximetilado da diosmina e caracterização das aglíconas resultantes 70

2.2. 2-Hidroxietilação da diosmina 91

2.2.1. Estudo das condições de reacção 91

2.2.2. Análise do produto bruto resultante das diferentes experiências 95

2.2.3. Separação e purificação dos constituintes flavónicos 97

2.2.4. Elucidação estrutural dos compostos flavónicos separados 105

2.2.5. Determinação da percentagem relativa dos derivados formados nas diferentes experiências 151

2.3. Esterificação da diosmina pela acção do ácido clorossulfónico 155

2.3.1. Estudo das condições de reacção 155

2.3.2. Estudo analítico do produto bruto resultante das diferentes experiências 157

3.CONCLUSÕES 160

4. PARTE EXPERIMENTAL 163

4.1. Métodos gerais e especificação dos materiais e instrumentos utilizados 164

4.2. Obtenção dos derivados carboximetilados da diosmina 168

4.2.1. Estudo analítico do produto bruto formado (DCM) 168

4.2.2. Separação e purificação dos componentes flavónicos da mistura DCM 171

4.2.2.1. Cromatografia de adsorção em camada fina 171

4.2.2.2. Cromatografia de adsorção em coluna 171

4.2.2.3. Cromatografia líquida de alta pressão 171

4.2.3. Comportamento cromatográfico dos flavonóides isolados 173

4.2.4. Características físicas e espectrais dos derivados monocarboximetilado em C-3' e dicarboximetilado da diosmina 175

4.2.4.1. 7-O-Ramnoglucosil-5-hidroxi-3'-carboximetoxi-4'-metoxiflavona (IV) 175

4.2.4.2. 7-O-Ramnoglucosil-5,3'-bis(carboximetoxi)-4'-metoxiflavona (V) 176

4.2.5 Determinação da percentagem relativa de derivados obtidos em diferentes experiências. 176

4. 2. 6 Obtenção e características físicas e espectrais das agliconas resultantes dos derivados monocarboximetilado em C-3′ e dicarboximetilado da diosmina 177

4. 2. 6. 1. 5,7-Di-hidroxi-3′-carboximetoxi-4′- metoxiflavona (IX) 177

4. 2. 6. 2. 5-3′-Bis(carboximetoxi)-7-hidroxi-4′-metoxiflavona (X) 178

4. 3. Obtenção dos derivados 2-hidroxietilados da diosmina 179

4. 3. 1. Estudo analítico do produto bruto formado (DHE) 180

4. 3. 2. Separação e purificação dos componentes flavónicos da mistura DHE 181

4.3.2.1. Cromatografia líquida de alta pressão 181

4. 3. 3. Comportamento cromatográfico dos flavonóides isolados 182

4. 3. 4 Características físicas e espectrais dos derivados 2-hidroxietilados da diosmina 183

4. 3. 4. 1. 7-O-Ramnoglucosil-5,3′-bis(2-hidroxietoxi)-4′-metoxi-flavona(XI) 183

4. 3. 4. 2. 7-O-Ramnoglucosil-5-hidroxi-3′-(2-hidroxietoxi) -4′-metoxiflavona (XII) 184

4. 3. 4. 3. 7-O-Ramnoglucosil-5-(2-hidroxietoxi)-3′-hidroxi-4′-meto-xiflavona (XIII) 185

4. 3. 5. Determinação da percentagem relativa de derivados obtidos em diferentes experiências 186

4. 3. 6 Obtenção e características físicas e espectrais das agliconas resultantes dos derivados 2-hidroxietilados da diosmina 186

4. 3. 6. 1. 5,3′-Bis(2-hidroxietoxi)-7-hidroxi-4′-metoxiflavona (XIV) 186

4. 3. 6. 2. 5,7-Di-hidroxi-3´-(2-hidroetoxi)-4´-metoxiflavona(XV) 187

4. 3. 6. 3. 5-(2-Hidroxietoxi)-7,3´-di-hidroxi-4´-metoxiflavona(XVI) 188

4. 3. 7. Análise dos açúcares resultantes da hidrólise ácida dos derivados 2-hidroxietilados da diosmina 189

4. 3. 7. 1 Cromatografia em camada fina 190

4. 3. 7. 2 Cromatografia em fase gasosa 190

4. 4. Obtenção dos ésteres sulfúricos da diosmina 191

.4. 4. 1 Estudo analítico do produto bruto formado (DS) 192

5. Bibliografia 193

Abreviaturas e símbolos

CG- Cromatografia em fase gasosa

DCM- Derivados carboximetilados

DHE- Derivados hidroxietilados

DS- Derivados sulfúricos

EM - Espectrometria de massa

CA - Activação colisional ou por colisão

FAB - Bombardeamento por átomos rápidos

G - Glicerol

IE - Ionização por impacto electrónico

$M^{\cdot+}$ - Ião molecular

M^{*} - Ião metaestável

m/e - Relação massa/carga

MIKES - Espectrometria de energia cinética de iões de massa seleccionada

Mr - Massa molecular relativa

u.m.a. - Unidade de massa atómica

F - Ponto de fusão

Glc - Glucose

HPLC - Cromatografia líquida de alta pressão

AUFS - Unidades totais de absorvência

inj. - Injecção

RP-18 - Fase de hidrocarboneto (C_{18}), fixada quimicamente a

gel de sílica (fase reversa)

IV - Infravermelho

$\bar{\upsilon}$ - Número de onda, em cm^{-1}

Ram - Ramnose

RMN ^{13}C - Ressonância magnética nuclear de carbono 13

RMN ^{1}H - Ressonância magnética nuclear de protão

d - Dupleto

dd - Duplo dupleto

m - Multipleto

s - singuleto

J - Constante de acoplamento, em Hertz

δ - Deslocamento químico, em ppm

TMS - Tetrametilsilano

DMSO - Dimetilsulfóxido

TLC - Cromatografia em camada fina

Rf - Em cromatografia , designa a razão entre a distância percorrida por uma substância e a distância percorrida pelo solvente utilizado, a partir do ponto de aplicação

UV - Ultravioleta

i - Inflexão

λ - Comprimento de onda, em nm

ϵ - Coeficiente de extinção molar

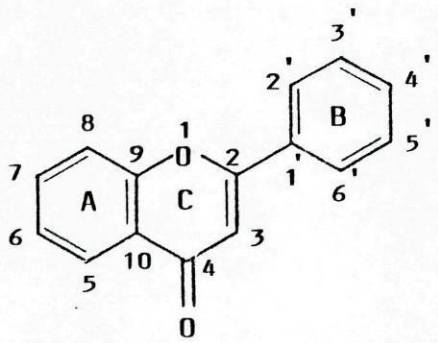
INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O termo flavonóide foi introduzido em 1952 por Geissman e Hinreiner (1) e emprega-se hoje, em sentido lato, para designar os compostos com uma estrutura de quinze átomos de carbono numa configuração C_6-C_3-C_6, isto é, dois anéis benzénicos (A e B) ligados por uma estrutura com três átomos de carbono que pode ou não formar um terceiro anel. Conforme a natureza desta estrutura de ligação assim surgem as diferentes classes de flavonóides (2), entre as quais se encontra a das flavonas, constituída pelos anéis A e B ligados por um heterociclo (γ-pirona), designado por anel C.

A designação de flavona foi introduzida pela primeira vez em 1895 por Kostanecki e Tambor (3) para indicar a 2-fenilbenzopirona cuja estrutura ainda não estava estabelecida.

Na Fig.1 apresenta-se a estrutura deste composto com indicação da numeração actualmente aceite para os seus átomos (4).



Flavona

(2-Fenilbenzopirona)

Podem ocorrer modificações na estrutura básica de qualquer das classes de flavonóides, nomeadamente por hidroxilação do núcleo flavonóide, metilação ou isoprenilação de grupos hidroxilos ou do núcleo flavonóide, formação de metileno-

dióxidos a partir de grupos *orto*-di-hidroxilos, dimerização, formação de "bissulfatos", glicosilação de grupos hidroxilos (originando O-glicosilflavonóides) ou directamente do núcleo flavonóide (originando C-glicosilflavonóides). Destas modificações, as mais frequentes são a hidroxilação e a posterior glicosilação ou metilação desses hidroxilos (4).

Os flavonóides são constituintes normais das plantas verdes, formando um dos mais numerosos e variados grupos de compostos naturais. A importância destes compostos é enorme não só porque contribuem para a coloração das plantas mas, também, porque muitos deles são fisiologicamente activos e alguns apresentam interesse terapêutico (5,6).

É necessário recuar até 1936 para encontrar a primeira referência à utilização dos flavonóides em terapêutica. Nessa época Rusznyák e Szent-Gyorgyi (7) observaram que o ácido ascórbico era incapaz de curar afecções caracterizadas pela fragilidade dos capilares ou aumento da sua permeabilidade, enquanto que preparações impuras daquela substância (extractos de *Capsicum annuum* e *Citrus limon*) conseguiam facilmente tratar esta afecção. Um fraccionamento destes extractos mostrou que a fracção activa era constituída por flavonóides que, administrados por via endovenosa no homem, em pouco tempo restabeleciam a resistência capilar normal. Estes investigadores propuseram o nome de vitamina P para as substâncias responsáveis pela acção sobre a permeabilidade capilar.

Desde então, a investigação efectuada sobre os efeitos farmacológicos destes compostos mostrou o seu interesse terapêutico em diversas situações clínicas. Havsteen, em artigo de revisão publicado em 1983 e intitulado "Flavonoids, a Class of Natural Produts of High Pharmacological Potency" (8), reune uma numerosa lista de efeitos terapêuticos até então comprovados ou atribuídos aos flavonóides. Aí se refere o seu interesse como anti-inflamatórios e a sua aplicação no tratamento de doenças tão diversas como a diabetes melitus, alergias, úlcera duodenal, dôr de cabeça, etc.

Os flavonóides têm sido também apontados como agentes anti-microbianos (9,10), potenciais protectores hepáticos (11), e anti-agregantes plaquetários (12,13,14).

A diosmina é um heterósido flavónico natural cuja estrutura química

corresponde ao 7-ramnoglucósido da 5,7-3´-tri-hidroxi-4´-metoxiflavona (15) Fig. 2.

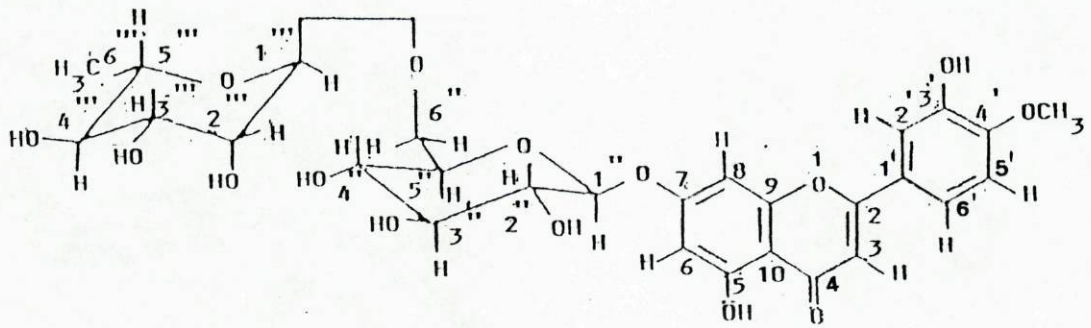


Fig. 2

Este composto foi isolado em 1925 por Oesterle e Wander a partir de *Scrophularium nodosa, e Hyssopus officinalis,* assim como de várias espécies de *Conium, Barosma, Hedeoma, Menika, Toddalia e Linaria* (16), tendo a sua estrutura sido estabelecida em 1930 por Lovecy (17).

Posteriormente este flavonóide foi encontrado em numerosas plantas, nomeadamente em Rutaceas por Arthur, (18,19) nas flores de *Sophora* por Briggs (20) e na casca de limão por Horowitz (21). Também E. Milheiro isolou a partir de *Gallium mollugo* um produto que designou por "gomesosídeo" (22) e que Polónia e Polónia identificaram como sendo a diosmina (23).

Terá sido E. Milheiro o autor dos primeiros trabalhos sobre a actividade farmacológica da diosmina ao mostrar, em 1939, que o princípio activo isolado de *Gallium mollugo* tinha acção terapêutica sobre algumas doenças do fígado, principalmente sobre a chamada icterícia catarral (24). Só em 1960 aparece novo trabalho sobre a actividade farmacológica da diosmina, desta vez da autoria de Schibata, que anuncia o seu poder espasmolítico, e em 1968 surge o primeiro estudo que põe em evidência a sua actividade vitamínica P (25). Posteriormente, foram publicados diversos trabalhos sobre o metabolismo (26), propriedades toxicológicas (27) e actividade farmacológica (28-32) deste flavonóide, pondo em evidência o seu tropismo para as veias.

Este princípio activo foi introduzido na terapêutica devido às suas propriedades flebotrópicas, como protector vascular, no tratamento de afecções venosas caracterizadas por sinais de fragilidade capilar e ainda em situações de insuficiência venosa crónica.

Entre os efeitos farmacológicos apontados como responsáveis pela sua actividade terapêutica refere-se que a inibição da catecol-O-metiltransferase (COMT) por este fármaco conduz a um bloqueio da inactivação da noradrenalina (NA). Este bloqueio leva à elevação de níveis de NA que podem explicar o aumento do tónus da parede venosa.

Este heterósido natural foi obtido posteriormente por Zémpler e Bognár, por semi-síntese a partir da hesperidina (7-ramnoglucósido da 5,7,3´-tri-hidroxi-4´-metoxiflavanona), da qual pode considerar-se um produto de desidrogenação (33). Mais tarde, também Lorete obteve a diosmina a partir daquela flavanona, utilizando a N-bromossuccinimida em presença de peróxido de benzoílo como desidrogenantes (33a).

Actualmente quase toda a diosmina comercializada se obtém sinteticamente, livre de contaminantes. (34).

O interesse por este princípio activo de baixa toxicidade tem-se mantido a avaliar pelo número de trabalhos apresentados ao "IV European-American Symposium on Venous Diseases" (1987),no decorrer do qual foi apresentada uma nova especialidade farmacêutica cujo princípio activo é constituído por 90% de diosmina (35-42), e por outros trabalhos publicados mais recentemente (43-51).

A diosmina é terapeuticamente usada em diversos países, integrada no grupo dos medicamentos venotrópicos. Entre nós, presentemente, existem quatro especialidades farmacêuticas, duas das quais com o princípio activo constituído exclusivamente por diosmina de síntese (52). Em Espanha, das três especialidades existentes, apenas duas são constituídas exclusivamente por diosmina sintética (53), enquanto que em França, das quatro existentes, três são constituídas por diosmina sintética (54).

A diosmina caracteriza-se por uma acentuada hidrofobia, que dificulta a sua experimentação farmacológica em órgãos isolados e a sua administração por via

endovenosa.

Sabe-se que a modificação molecular é um dos métodos mais usado para obter novos fármacos, por ser um dos mais recompensadores (55). Basicamente, consiste em tomar um composto de natureza química bem determinada e de acção farmacológica conhecida e a partir dele sintetizar e ensaiar novos compostos que sejam congéneres ou análogos estruturais. Os objectivos pretendidos podem ser vários, nomeadamente obter produtos farmacologicamente superiores ou que apresentem propriedades mais desejáveis. Daí ter surgido a ideia de tentar modificações moleculares da diosmina, com a finalidade de a tornar hidrossolúvel, de modo a melhorar a sua biodisponibilidade e ainda permitir outras vias de administração, que não a oral, nomeadamente a via endovenosa.

O trabalho que agora se apresenta e do qual se foi dando notícia em diversos congressos (56-59), foi iniciado em 1981 por sugestão do Prof. Doutor J. Polónia e teve como objectivo a obtenção de derivados hidrossolúveis da diosmina, terapêuticamente activos.

Pelo que se conhecia àcerca de transformações já descritas para outro flavonóide de reconhecido interesse terapêutico, a rutina (60-61), e pela análise de um trabalho de Cavallini e Mazzucchi sobre a obtenção de um novo fármaco hidrossolúvel (62), decidiu-se fazer o estudo da carboximetilação e da 2-hidroxietilação da diosmina, bem como ensaiar a esterificação deste composto por acção do ácido clorossulfónico, pois não havia qualquer publicação nesta área. Neste estudo encarou-se, fundamentalmente, o estabelecimento das condições reaccionais capazes de conduzir à transformação completa da diosmina com obtenção dos correspondentes derivados dissubstituídos. Como se obtiveram invariavelmente misturas de derivados mono e dissubstituídos da diosmina procurou-se quantificar a composição dessas misturas nas diferentes experiências efectuadas.

Entretanto, em finais de 1987, fomos surpreendidos pelo lançamento de um novo produto, derivado da diosmina, designado como "mistura standard de derivados 5-mono (β-hidroxietil) diosmina, 3´-mono (β hidroxietil) diosmina e 5,3´-di-(β-

hidroxietil) diosmina" (63,64). A mistura destes três derivados constitui o princípio activo de um novo medicamento incluido pela primeira vez no Indice Nacional Terapêutico de 1990, o qual se encontra, como a diosmina, integrado nos medicamentos venotrópicos. Este facto veio evidenciar o interesse do trabalho que estava a ser realizado e incentivar o seu prosseguimento.

No que se refere aos derivados 2-hidroxietilados, para além da sua obtenção em condições reaccionais que se desconhece serem ou não coincidentes com as usadas por A. Orjales(63), conseguiu-se a separação dos três derivados obtidos, encontrando-se cada um deles devidamente caracterizado. Quanto aos ésteres sulfúricos da diosmina e aos derivados carboximetilados não há conhecimento de que tenham sido referidos anteriormente na literatura e daí parecer-nos que o trabalho que se apresenta é inédito.

Os ensaios farmacológicos realizados com a mistura dos derivados carboximetilados obtidos (derivado monocarboximetilado em C-3´ e dicarboximetilado) mostram que esta mistura mantem o efeito inibidor sobre a actividade da COMT, tal como foi observado para a diosmina (65).

Não há, ainda, dados sobre os efeitos farmacológicos dos diferentes derivados isolados; seria, entretanto, de interesse um estudo neste sentido, já que é lógico admitir que se possa verificar, tanto uma certa diversidade quanto aos efeitos dos diferentes derivados como ainda esperar que, pela introdução de novos grupos químicos, surjam outras acções farmacológicas.

PREPARAÇÃO DE DERIVADOS HIDROSSOLÚVEIS DA DIOSMINA - Resultados e discussão

2. PREPARAÇÃO DE DERIVADOS HIDROSSOLUVEIS DA DIOSMINA

Resultados e discussão

2.1. CARBOXIMETILAÇÃO DA DIOSMINA

2.1.1. Estudo das condições de reacção

Inspirados num trabalho de Carl Müller sobre a rutina (61) decidiu-se fazer um estudo semelhante aplicado à diosmina, com o objectivo de conseguir a sua carboximetilação total.

A diosmina (Fig. 3) apresenta na sua estrutura dois grupos fenólicos, um em C-5 outro em C-3', possuindo reactividade diferente.

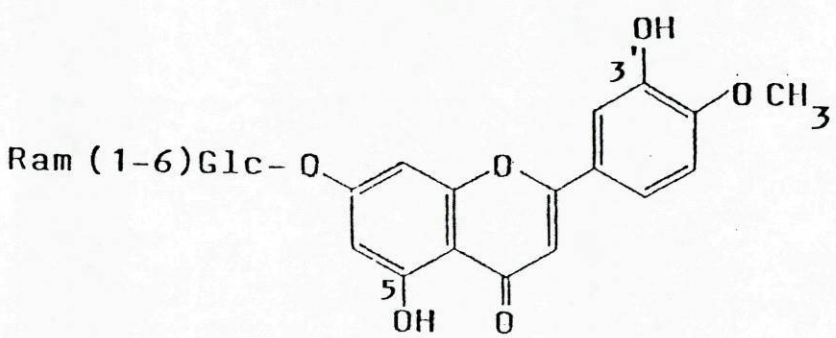


Fig.3

Sabe-se que são frequentes as ligações de hidrogénio intramoleculares nos compostos flavónicos hidroxilados em C-5, nos quais se encontra o conjunto *o*-hidroxiacetofenona. Será, portanto, de prever, no caso da diosmina, a formação de uma ligação de hidrogénio entre o grupo fenólico em C-5 e o oxigénio do grupo carbonilo do anel adjacente (Fig. 3a).

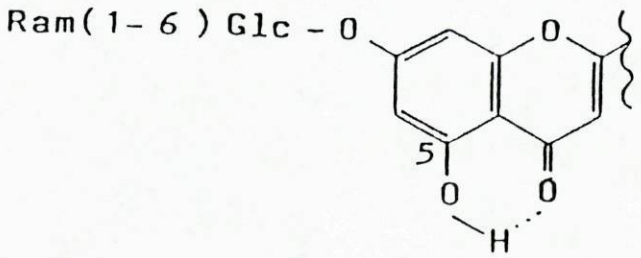


Fig. 3a

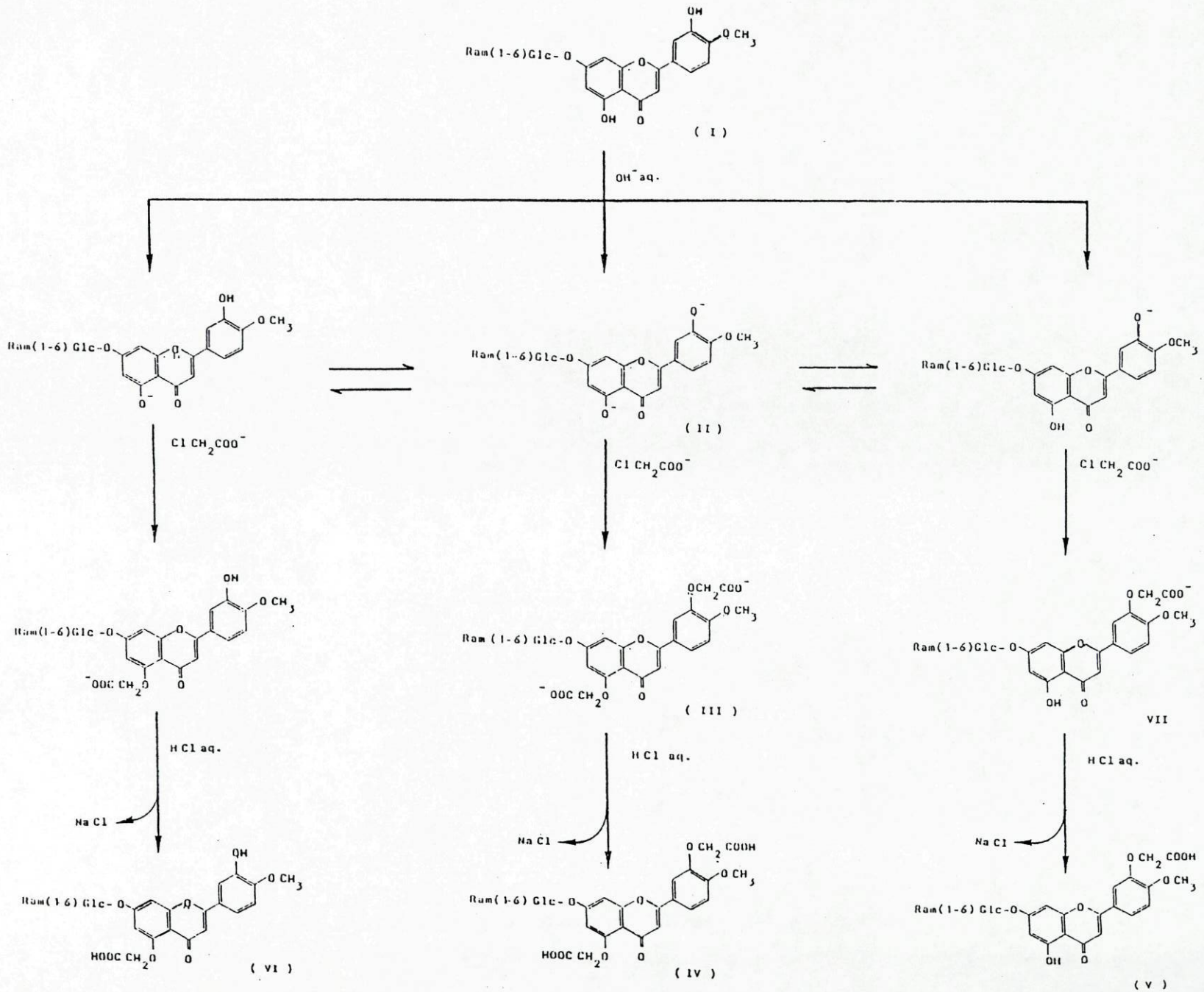
As ligações de hidrogénio, neste caso, são relativamente mais fortes por levarem à formação de um anel de seis átomos, podendo a sua existência diminuir a reactividade do grupo fenólico (66). Em consequência deste facto e dependendo das condições reaccionais usadas, poder-se-á obter o derivado dicarboximetilado, um derivado mono ou evidentemente uma mistura de derivados.

Contrariamente ao que Carl Müller fez para a rutina, decidiu-se efectuar as reacções com a diosmina em condições estequiométricas para a carboximetilação total ou com um excesso de reagentes, a fim de se obterem, tanto quanto possível,reacções completas. Decidiu-se, no entanto, manter a composição da mistura-reagente (M) usada por aquele autor [$ClCH_2COOH$, 10g (0,1058 mol) + Na_2CO_3 , 10g (0,0943 mol) + H_2O até perfazer 50ml] , isto é, manter um excesso de carbonato de sódio para tornar a reacção quantitativa.

$$2ClCH_2COOH + Na_2CO_3 \longrightarrow ClCH_2COONa + H_2O + CO_2$$

Numa primeira fase a diosmina (I) foi transformada no seu derivado dissódico (II) por reacção com solução de hidróxido de sódio. Seguidamente, a reacção deste sal com cloroacetato de sódio permitiu transformar os grupos fenóxidos dos carbonos

C-5 e C-3´ nos grupos $-OCH_2COO^-$ (III). Este composto, acidificado com ácido clorídrico, levou à obtenção do derivado dicarboximetilado (IV). No final da reacção verificou-se também a existência do derivado monocarboximetilado em C-3´(V). O derivado monocarboximetilado em C-5 (VI), apesar de esperada a sua formação em menor quantidade, não foi detectado (Esquema 1, pág.12).


Ram(1-6)Glc-O
OH
O CH3
OH
O
(I)
OH⁻ aq.
(II)
Cl CH2COO⁻
OCH3
OH
VII
(III)
(IV)
(V)
(VI)
HCl aq.
Na Cl
OCH2COO⁻
O CH2COO⁻
O CH2COOH
HOOC CH2O
⁻OOC CH2O

ESQUEMA 1

O estudo foi iniciado partindo de uma amostra de diosmina (5,00g; 0,0082mol) que se fez reagir com solução aquosa de hidróxido de sódio até solubilização completa da amostra. Para conseguir esta solubilização houve necessidade de ultrapassar a quantidade estequiométrica de hidróxido de sódio (0,66 g; 0,016 mol), apesar de se ter favorecido a reacção com agitação magnética e aquecimento (60-80°C).

Este facto não surpreendeu, já que a existência de uma ligação de hidrogénio intramolecular entre o grupo fenólico em C-5 e o oxigénio do grupo carbonilo adjacente diminui a reactividade desse grupo fenólico, diminuindo igualmente a solubilidade do composto (66).

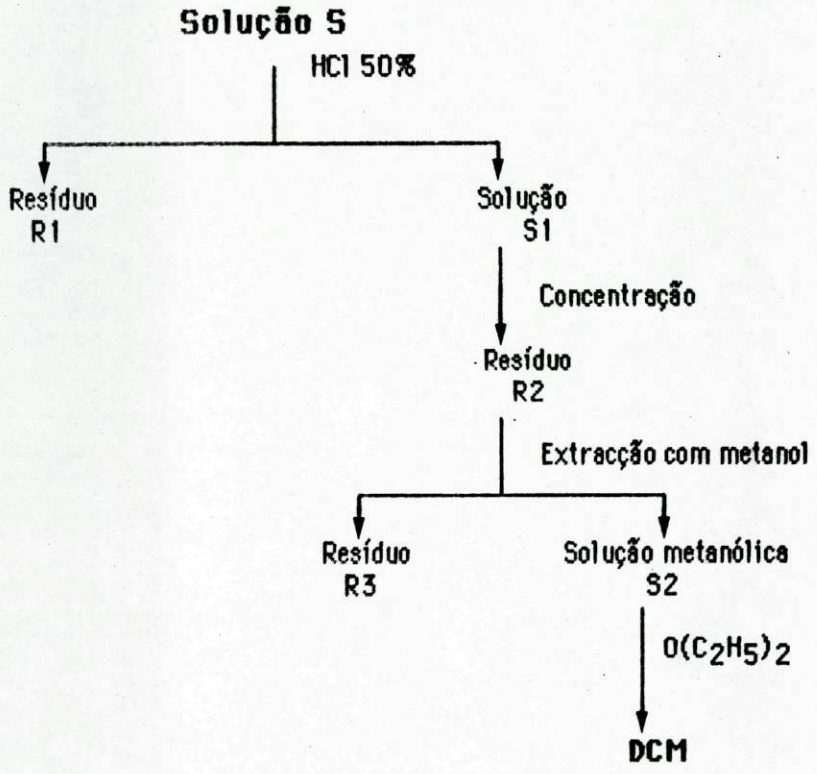
A reacção do sal sódico da diosmina com 7,8 ml (0,0164 mol) de M (quantidade estequiométrica relativa ao cloroacetato de sódio) foi feita em balão adaptado com refrigerante de refluxo e agitação magnética, em banho de silicone (60-63°C). Após arrefecimento, a acidificação da solução (S) deu origem a um resíduo (R1) que depois de separado e analisado mostrou ser constituído por diosmina, a qual foi recuperada e usada em novos ensaios. Como era de prever, ao baixar o pH do meio reaccional, a diosmina que não reagiu insolubilizou-se, enquanto que os derivados carboximetilados eventualmente formados, agora na forma ácida, desde que hidrossolúveis, deverão permanecer em solução.

A fase aquosa (S1), concentrada à secura, originou um resíduo (R2) que posteriormente foi extraído por metanol a frio.

A extracção foi executada em cadinho filtrante, renovando sucessivamente o solvente até se verificar por TLC que a extracção tinha sido completa, designando-se o resíduo resultante por R3. Esta operação foi demorada e exigiu um certo consumo de metanol, mas, apesar deste inconveniente, decidiu-se não recorrer à extracção contínua (Sohxlet), a fim de evitar a esterificação dos grupos carboxilos existentes na molécula, visto que, em presença de metanol e ácido mineral, com aquecimento, havia condições para a formação de ésteres metílicos (67). Com a extracção a frio minimiza-se ainda a interferência do cloreto de sódio existente no meio reaccional, uma vez que este composto, ligeiramente solúvel em metanol a quente, passaria para a solução

metanólica e, ao ser insolubilizado pelo éter, iria fazer parte do resíduo final.

À solução metanólica (S2) adicionou-se éter étilico em excesso, que insolubilizou os compostos extraídos pelo metanol (Esquema 2). O resíduo final, designado por DCM (derivados carboximetilados), indicou a massa do produto bruto resultante da carboximetilação da diosmina. Este valor e a massa de R1 forneceram uma indicação grosseira da extenção da reacção e foi o processo usado, inicialmente, para avaliar o resultado da experiência.



Esquema 2 - Tratamento da solução S

Após esta primeira experiência, que não permitiu a reacção completa da diosmina, decidiu-se fazer novos ensaios variando os seguintes parâmetros:

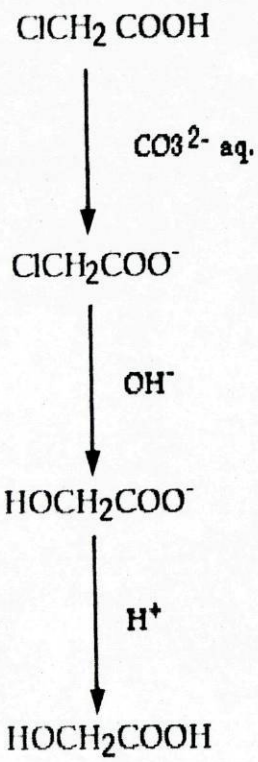
- pH do meio reaccional (por variação das quantidades de hidróxido de sódio e / ou de reagente M)
- Temperatura
- Tempo de reacção.

Ao utilizar excesso de reagentes teve-se em consideração o seguinte:

a) Com um excesso de hidróxido de sódio, a solução manter-se-à suficientemente alcalina para comportar M sem que o pH do meio reaccional baixe para valores que comprometam a solubilização da diosmina.

b) Desde que a diosmina permaneça na forma sódica, poder-se-à usar um excesso de M, de modo a favorecer a formação do produto final.

Ao operar-se com excesso de reagentes estávamos, contudo, precavidos contra o facto de se poder verificar uma reacção paralela que leve à obtenção de ácido glicólico, já que este composto se pode formar por reacção entre o ácido cloroacético e o hidróxido de sódio(68).



O ácido glicólico, devido às suas características de solubilidade (solúvel em água, metanol e éter) (68), seria extraído pelo metanol conjuntamente com os derivados carboximetilados e permaneceria em solução.

No decorrer deste trabalho e no sentido de estudar as melhores condições da carboximetilação, além da experiência descrita anteriormente (Exp.1), foram feitas várias outras que se resumem no Quadro I.

Condições de reacção \ Exp. nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Diosmina g(mol)	5,00 (0,0082)													
NaOH g(mol)	1,0 (0,025)	1,2 (0,03)	1,0 (0,025)	1,2 (0,03)	2,0 (0,05)	3,0 (0,075)	3,5 (0,088)	4,5 (0,113)	4,5 (0,113)	2,8 (0,07)	2,8 (0,07)	2,8 (0,07)	2,8 (0,07)	2,8 (0,07)
Vol de # (ml)	7,8	7,8	10,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	25,0	18,0	20,0	22,0	18,0	18,0
$ClCH_2COO^-$ (mol)	0,0164	0,0164	0,0211	0,0380	0,0380	0,0380	0,0380	0,0380	0,0529	0,0380	0,0423	0,0465	0,0380	0,0380
pH	11,3	11,6	11,1	11,4	11,8	12,2	>13	>13	>13	12,1	12,0	12,0	12,1	12,1
Temp (º C)	60-63	80-83	80-83	80-83	80-83	80-83	80-83	80-83	87-90	60-63	60-63	60-63	70-73	80-83
Tempo de aquecimento (horas)	10	10	12	11	11	5	8	22	36	5,5	6,5	7	5,5	5
R_1 (g)	1,52	0,33	0,61	1,00	0,20	-	0,40	2,4	3,2	-	-	-	-	-
DCM (g)	2,80	2,95	2,66	1,90	2,05	3,48	3,39	-	-	3,91	3,47	3,29	3,32	3,36

- [$ClCH_2COOH$, 10 g (0,1058 mol) + Na_2CO_3, 10 g (0,0943 mol) + H_2O até perfazer 50 ml]

QUADRO I - Condições reaccionais usadas nas diferentes experiências referentes à carboximetilação da diosmina

Pela análise do Quadro I, pode verificar-se o seguinte:

a) Nas Exp. 1, 2, 3, 4 e 5 obteve-se sempre diosmina por reagir (RI).

b) Com uma solução de diosmina sódica a pH = 11,5-11,8 , à medida que se aumentou o volume de M, observou-se um aumento de R1 e, simultâneamente, uma diminuição de DCM. (Exp. 2, 3 e 4).

c) O aumento da temperatura (Exp.2) favoreceu a reacção (aumento de DCM e diminuição de R1).

d) Nas Exp.4, 5 e 6 registou-se uma diminuição de R1, possivelmente resultante do aumento do pH do meio reaccional, visto ter-se mantido constante o volume de M.

e) Na Exp. 6 conseguiu-se, pela primeira vez, a reacção completa da diosmina (ausência de R1).

f) As Exp. 7, 8 e 9, realizadas em meio fortemente alcalino (pH>13), conduziram de novo ao aparecimento de R1, apesar de ter sido aumentado o volume de M e prolongado o tempo de aquecimento.

g) Na Exp. 10, realizada a pH =12.1 e com um volume de M igual ao ensaiado nas Exp. 5,6,7 e 8, observou-se:

- ausência de R1
- aumento de DCM
- diminuição do tempo de reacção

h) As Exp.11 e 12, comparadas com a Exp. 10, mostraram que o aumento de M conduz a uma diminuição de DCM, embora continue a verificar-se a reacção completa

da diosmina (ausência de R1).

i) A Exp.10 foi repetida a diferentes temperaturas (70-73°C ; 80-83°C), sem que tenha sido observado aumento de DCM mas apenas uma ligeira diminuição do tempo de reacção (Exp. 13 e 14).

2.1.2. Análise do produto bruto resultante das diferentes experiências

O estudo do DCM referente a cada experência foi iniciado verificando o seu comportamento em TLC.

Cada amostra foi cromatografada simultâneamente com a diosmina tendo sido ensaiados vários adsorventes e diversas fases móveis na tentativa de se encontrar um sistema capaz de resolver a mistura (69,70) (Parte experimental). Do estudo realizado concluiu-se que em placas de celulose e usando como fase móvel uma solução aquosa de ácido acético a 30% (v/v) se conseguia uma boa separação dos componentes das amostras. Na revelação dos cromatogramas utilizou-se a luz U V (366 nm).

É sabido que a partir da utilização da luz UV (366nm) antes e após a aplicação de certos reveladores químicos é possível obter algumas informações àcerca da estrutura dos flavonóides. No presente trabalho os reveladores utilizados com este objectivo foram : vapores de uma solução concentrada de amónia (71,72) e solução metanólica de cloreto de alumínio a 5% (73). Utilizou-se ainda, como revelador químico, uma solução de $FeCl_3$ a 2,5% (74).

A revelação dos cromatogramas referentes aos DCM resultantes das diferentes experiências mostrou, em todos os casos, duas manchas com as características que se resumem no Quadro 2.

Quadro 2: Características cromatográficas das manchas *a* e *b*

Mancha	Detecção			Rf*
	UV(366nm)	Vap.amónia (UV 366nm)	$AlCl_3$ (UV366nm)	
a	azul fluorescente	amarela fluorescente	azul fluorescente	0,74
b	castanha escura	amarela	amarela fluorescente	0,54

*Em placa de celulose desenvolvida em ac. acético: água (30:70)

Os resultados obtidos levaram a inferir que o produto bruto deveria ser constituído por dois compostos de natureza flavónica responsáveis pelas manchas formadas. A mancha *a* seria devida a um composto com o grupo fenólico em C-5 ocupado; a mancha *b* deveria corresponder a um composto com o grupo fenólico em C-5 livre (71,72,73).

2.1.3. Separação e purificação dos constituintes flavónicos existentes no produto bruto resultante das diferentes experiências

Com a finalidade de isolar estes compostos recorreu-se à cromatografia preparativa de adsorção em placa, utilizando o mesmo adsorvente e fase móvel escolhidos para a cromatografia analítica (Parte experimental).

Após o isolamento dos compostos correspondentes a cada uma das manchas atrás referidas, o seu controlo analítico mostrou que o composto correspondente à mancha ***a*** se alterou subsequentemente, originando três novas manchas muito próximas, que observadas à luz UV de 366 nm mostraram fluorescência amarela, fluorescência azul e cor castanha, não tendo sido possível separá-las. Na cromatografia preparativa em placa apenas se conseguiu isolar o composto correspondente à mancha ***b***.

Com o objectivo de se conseguir uma melhor separação, decidiu-se explorar as possibilidades da cromatografia de adsorção em coluna. Depois de terem sido experimentados, como adsorventes, gel de sílica, poliamida ou celulose e ensaiadas diversas sequências de eluentes, (75,76), decidiu-se optar por uma coluna de celulose (enchimento a seco) e usar como eluente a mesma mistura de solventes usada para a cromatografia preparativa de adsorção em placa (sol. aquosa de ácido acético a 30% v/v).

A eluição, acompanhada com luz UV (366nm), permitiu recolher várias fracções as quais analizadas por TLC, mostraram que apenas o composto correspondente à mancha ***b*** se encontrava isolado. Com esta técnica também não foi possível isolar o composto correspondente à mancha ***a*** , que novamente mostrou desdobrar-se.

Concluiu-se, portanto, que a cromatografia preparativa de adsorção em placa e em coluna não se revelaram eficazes, na medida em que, exigindo um tempo de análise longo, podem implicar possíveis alterações nos compostos em solução. Entretanto, a cromatografia em coluna apresentou sobre a técnica anterior a vantagem de permitir um maior rendimento na separação do composto referente à mancha ***b*** (Parte experimental).

Tentou-se ainda a cromatografia preparativa em papel (técnica descendente), ensaiando várias fases móveis, entre as quais ácido acético em diferentes concentrações

(77). Com esta técnica também não foram obtidos resultados satisfatórios.

Em face dos resultados obtidos admitiu-se que a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), pelas suas características, seria o processo indicado para a separação destes compostos. Esta técnica cromatográfica provara já ser de grande interesse na análise de flavonóides como mostra o trabalho de revisão de Kingston (78) e, em 1982 (79,80)), prespectivara se a sua utilização no isolamento e determinação quantitativa destes compostos pelo que se resolveu aplicá la ao isolamento dos derivados obtidos na carboximetilação da diosmina.

O estudo prévio da base do método (81,82,83) e a pesquisa realizada (84-87) levaram a concluir que para a análise a efectuar seria adequado utilizar um sistema em fase reversa. Para fase móvel foi ensaiada uma mistura de metanol e água usando ácido acético como "supressor iónico". Dos ensaios realizados, modificando a composição percentual de fase móvel e as condições de detecção, concluiu-se que usando uma fase estacionária RP-18 (10 µm) era possível uma separação satisfatória com eluição isocrática de uma mistura de metanol, água e ácido acético (45:53:2), usando para a detecção o comprimento de onda de 254 nm.

Nestas condições foi possível analizar o produto bruto resultante de cada uma das experiências efectuadas, sendo de realçar que todas as amostras ensaiadas mostraram um pico principal, bem isolado, a mais elevado valor de tempo de retenção. Exemplifica-se o que se diz com os cromatogramas obtidos nas mesmas condições analíticas com os CMD resultantes das Exp. 2, 6 e 10 (Fig.4,5 e 6, pag.25, 26 e 27).

Com o objectivo de conseguir uma melhor resolução da parte inicial do cromatograma,alterou-se a composição percentual da fase móvel referida anteriormente para metanol, água e ácido acético (40:58:2). Com esta fase móvel obteve-se uma melhor separação dos picos mais significativos dos cromatogramas referentes ao produto bruto resultante das Exp. 2 e 6 (Fig.7 e 8,pag.28 e 29).

Foi usando uma fase móvel com esta composição percentual (pH=3,1) e uma coluna preparativa RP-18 (40µm) que se iniciou a separação dos componentes do DCM referente às diferentes experiências. A fim de manter a eficiência da coluna e evitar os

picos com caudas demasiado longas, típicas dos flavonóides, não se analizou de cada vez mais de 100 mg de amostra (2 ml de uma solução a 50 mg/ml). Exemplifica-se com o cromatograma correspondente à separação de 100 mg de DCM resultante da Exp. 6 (Fig.9,pag.30).

O controlo analítico, também por HPLC, das diferentes fracções recolhidas, mostrou que apenas tinham sido isolados os compostos correspondentes aos picos 6 e 7. Foram infrutíferas as tentativas feitas com esta coluna no sentido de melhorar a resolução do cromatograma (modificação da composição percentual da fase móvel, variação do fluxo, tentativas várias de análise em gradiente). Foi ainda testada a fase móvel usada por Wulf e Nagel (metanol:água: ácido acético - 30:65:5) (84), sem que tenha havido melhoria na separação. A mistura ensaiada com 2% de ácido acético (pH=3,1) mostrou ser suficientemente acídica para a separação em causa e apresentou sobre a mistura de Wulf e Nagel (pH=2,5) a vantagem de ser menos agressiva para a coluna. A mistura de acetonitrilo e água, ensaiada em diferentes proporções, também se mostrou ineficaz.

Só a utilização de uma coluna semi-preparativa, também RP-18, permitiu separar os componentes de menor tempo de retenção. Com esta coluna optimizou-se a resolução cromatográfica da mistura das fracções 1, 2, 3, 4 e 5, tendo-se conseguido, por diminuição da quantidade de metanol na fase móvel (MeOH:H_2O: AcOH - 35:63:2), obter todos os picos separados (Fig.10,pag.31). Nestas condições foi possível cromatografar, de cada vez, 20 mg de amostra e recolher separadamente as fracções correspondentes a cada pico.

As fracções recolhidas na separação foram concentradas e seguidamente liofilizadas, sendo os compostos isolados, por sua vez, analizados por HPLC e, sempre que necessário, recromatografados, até se obter para cada composto um único pico.

A análise cromatográfica em placa e a análise espectral no UV mostraram que apenas os compostos 4, 6 e 7 apresentavam características de flavonas. O composto 4 correspondia à mancha ***a*** (TLC) enquanto o composto 6 correspondia à mancha ***b*** (TLC). Os cromatogramas representados nas Fig. 11 e 12 (pag.32) mostram estes

compostos isolados.

O composto 7 desde logo surpreendeu pela dificuldade que apresentou em ser solubilizado. Pelo ponto de fusão (F) que mostrou e pelo seu espectro de IV, sobreponível ao da diosmina (23), concluiu-se que se tratava deste composto, possivelmente formado por decomposição do produto bruto em solução aquosa. Esta hipótese foi confirmada ensaiando o comportamento de uma solução aquosa de CMD conservada à temperatura ambiente durante 5 dias. A identidade do resíduo formado nestas condições foi estabelecida por comparação de dados de F, IV e RMN^{1}H com uma amostra autêntica de diosmina.

Este facto levou a que as amostras analizadas posteriormente fossem dissolvidas em metanol: água (9,5 : 0,5) e utilizadas no mesmo dia. Esta medida revelou-se eficaz, como pode ser comprovado pelos cromatogramas (Fig.40,41 e 42), que serão apresentados posteriormente.

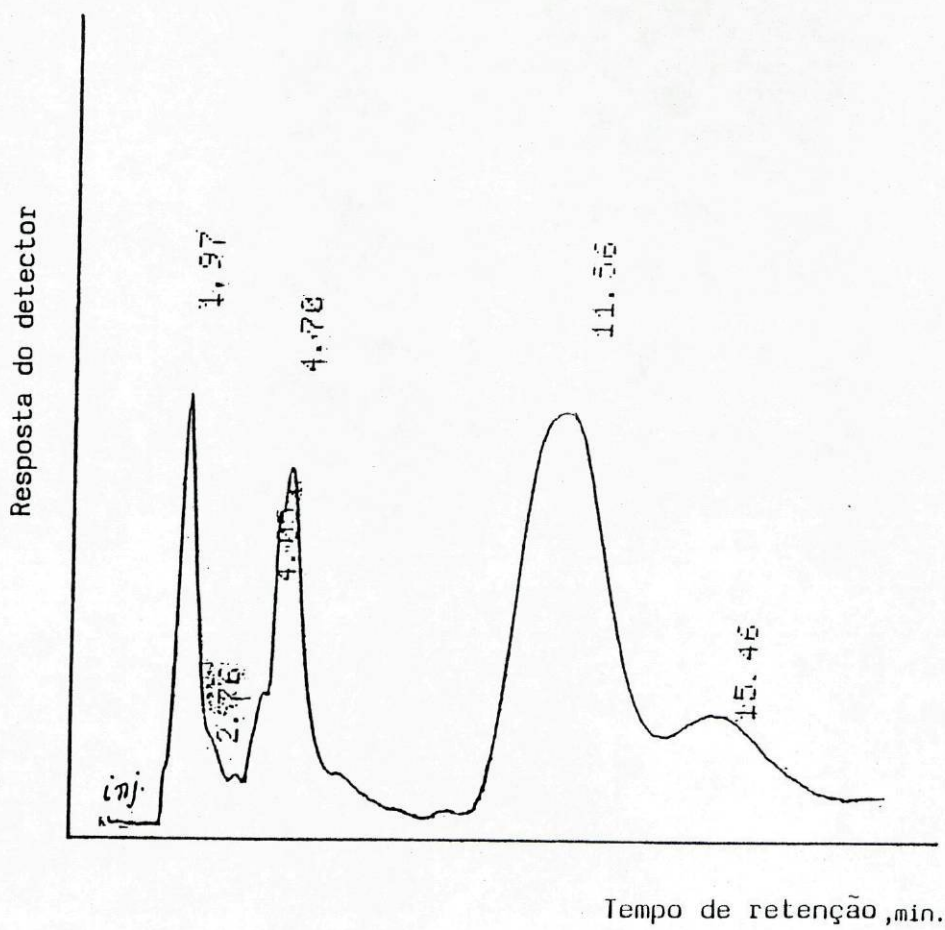


Fig. 4 - Cromatograma (HPLC) referente ao DCM resultante da Exp.2

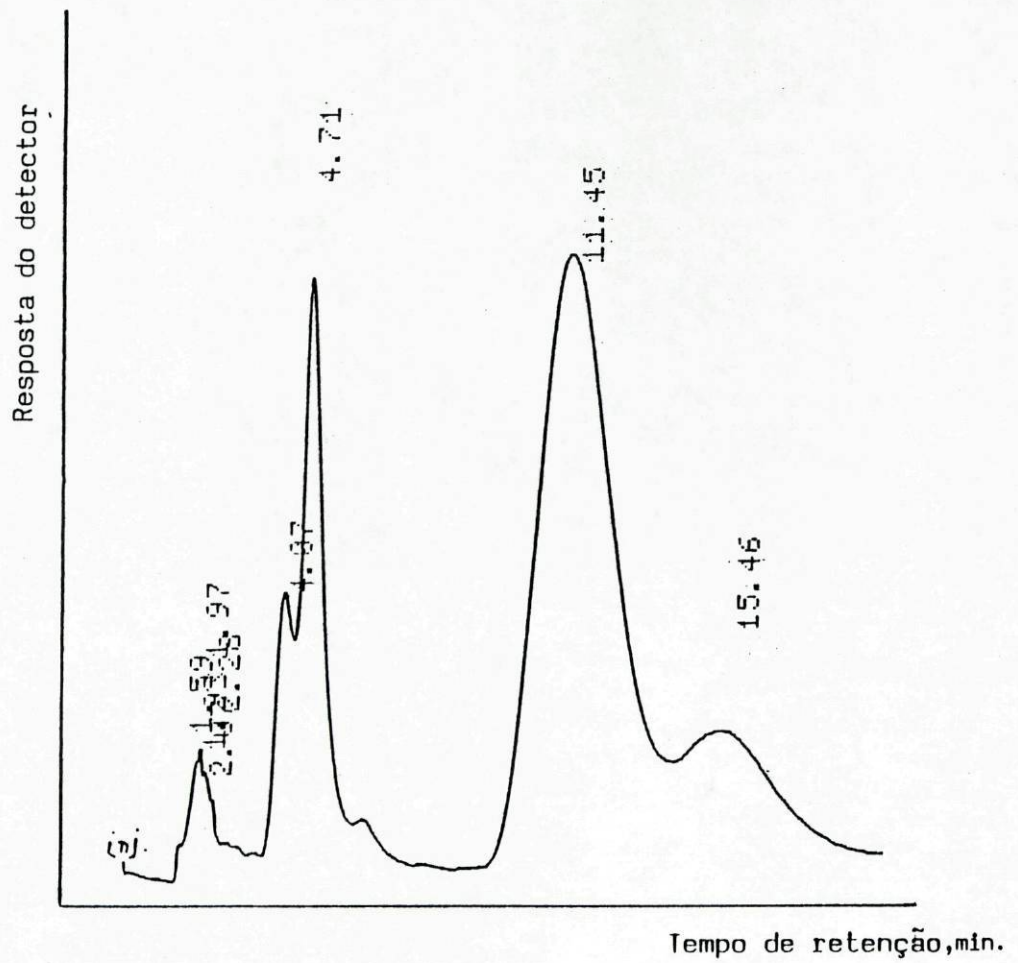


Fig. 5 - Cromatograma (HPLC) referente ao DMC resultante da Exp. 6

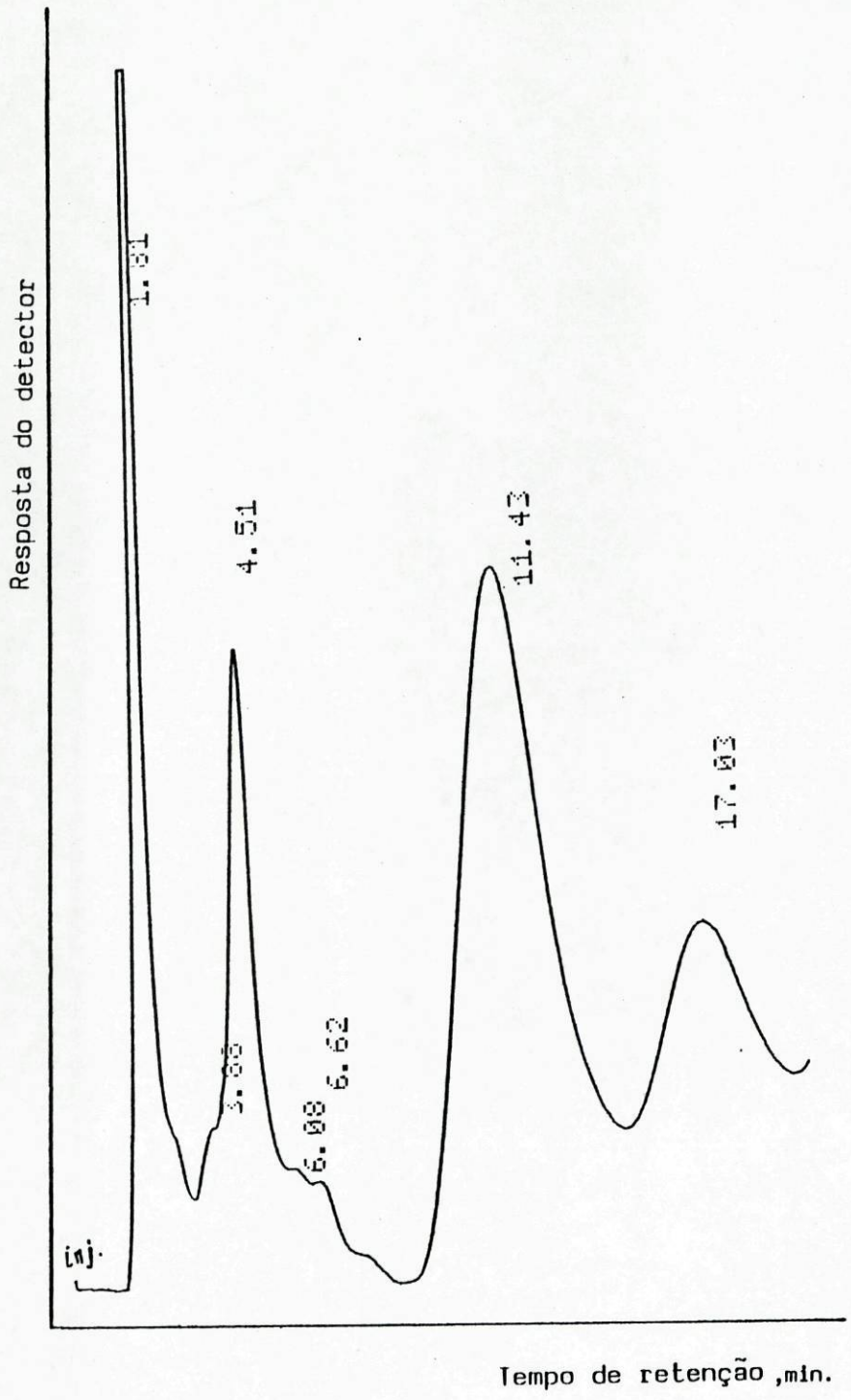


Fig.6 - Cromatograma (HPLC) referente ao DCM da Exp. 10

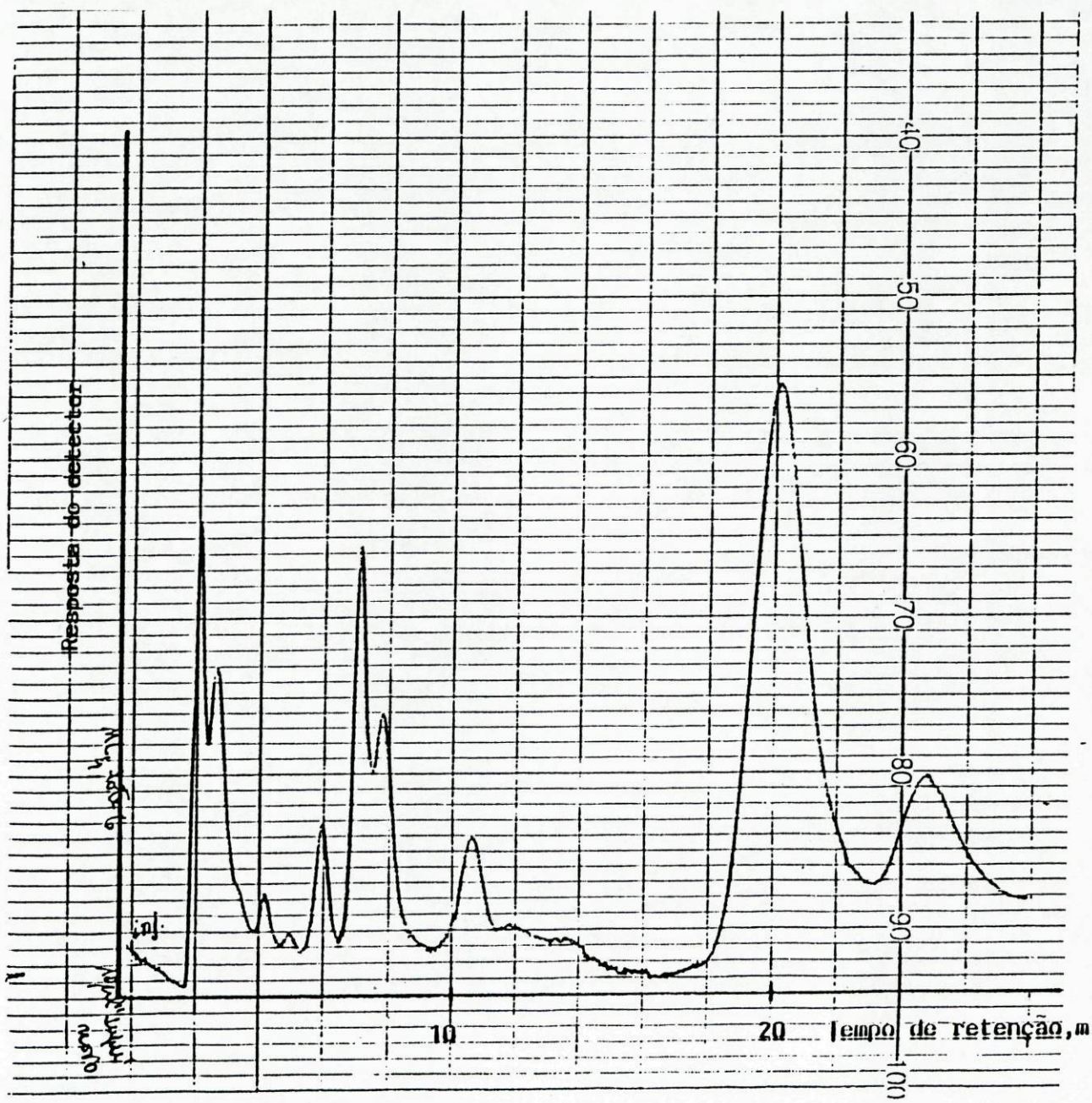


Fig.7 - Cromatograma (HPLC) referente ao DCM resultante da Exp. 2

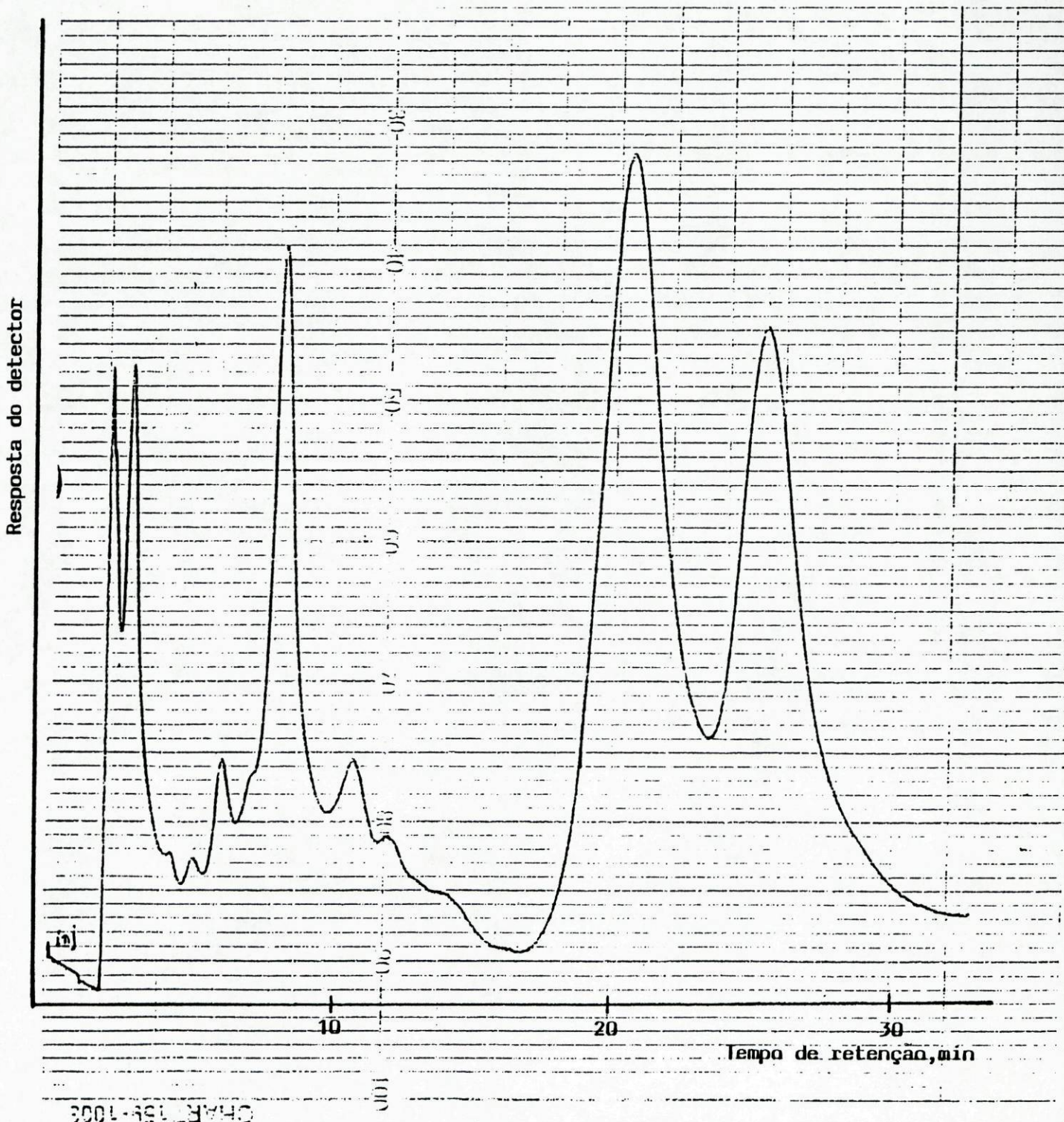


Fig. 8 - Cromatograma (HPLC) referente ao DCM resultante da Exp. 6

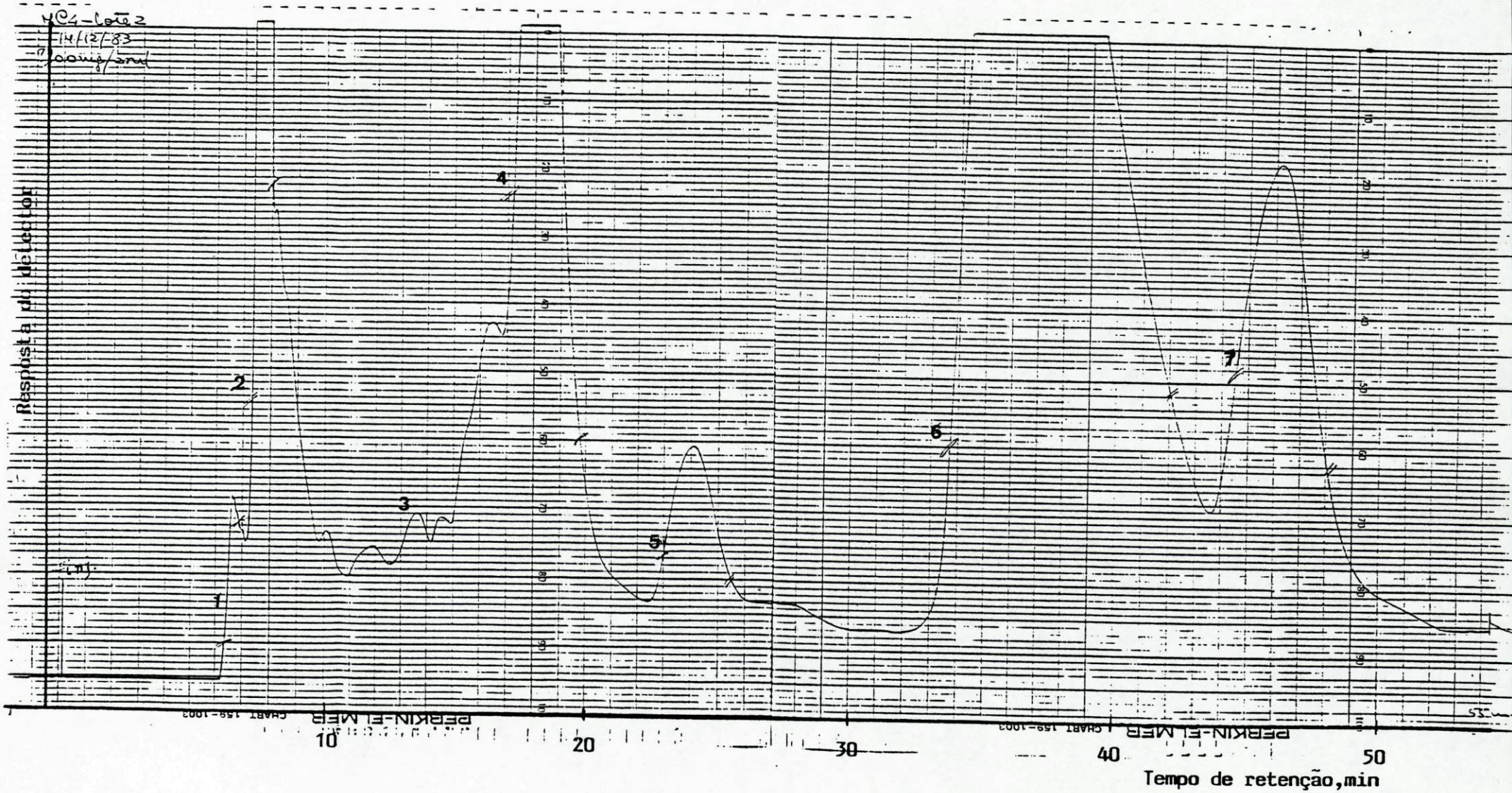


Fig. 9 - Cromatograma (HPLC) referente à separação de 100 mg (2 ml de sol. a 50 mg/ml) de DCM resultante da Exp. 6

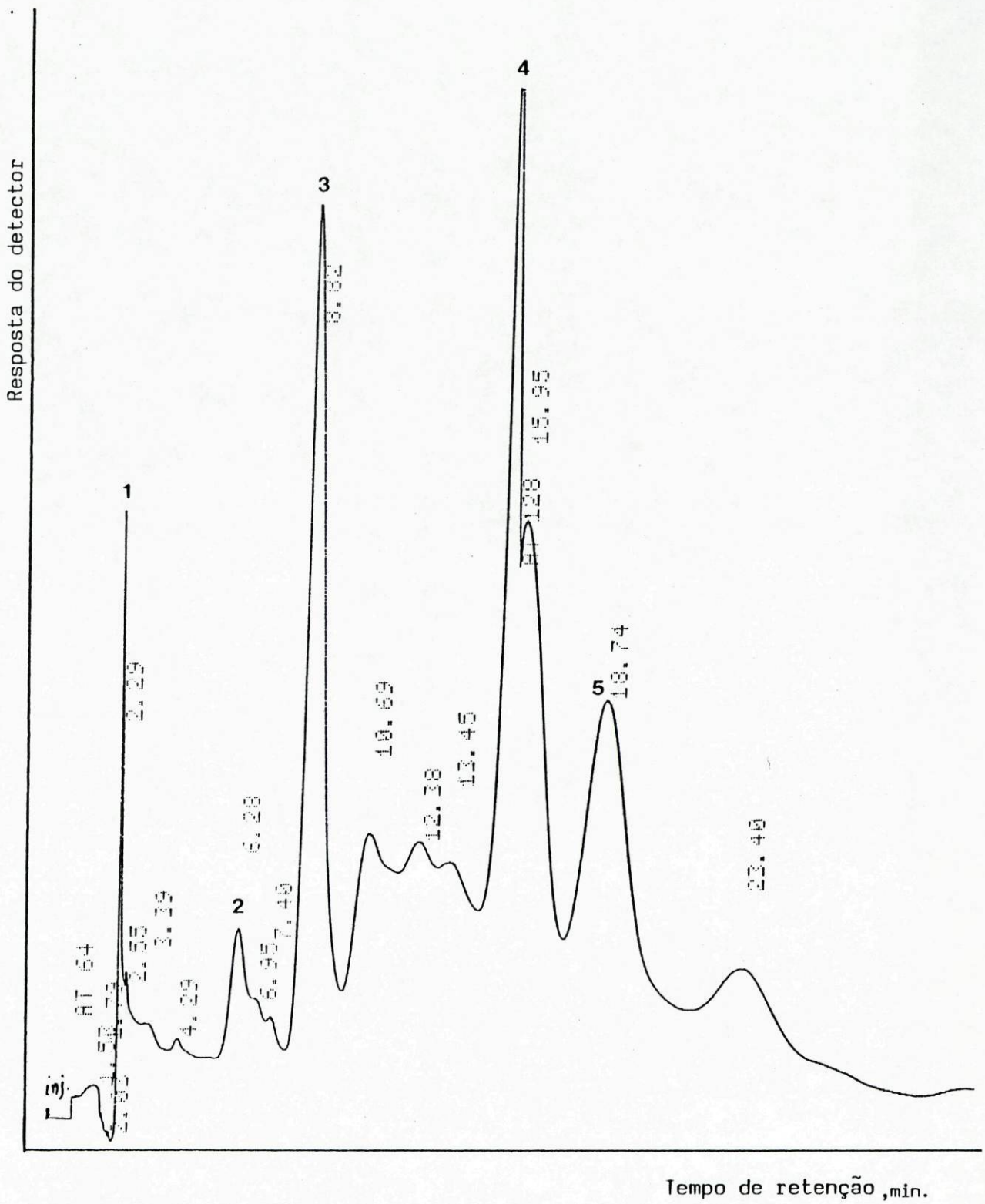


Fig. 10 - Cromatograma (HPLC) referente à separação da mistura das fracções 1, 2, 3, 4 e 5

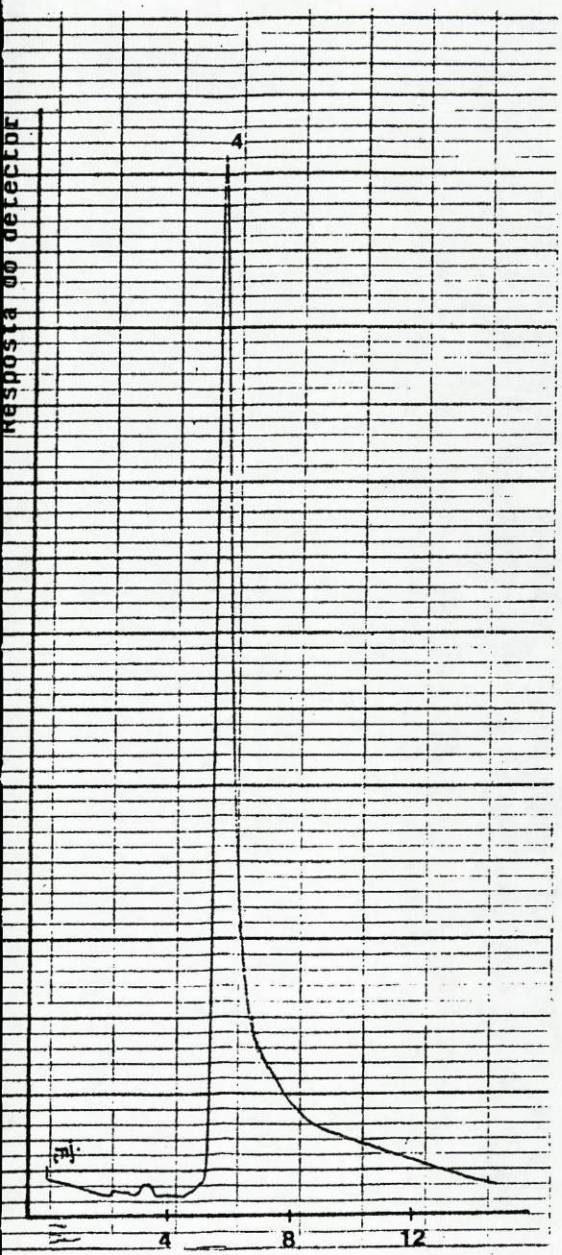


Fig. 11 - Cromatograma (HPLC) referente ao composto 4 isolado

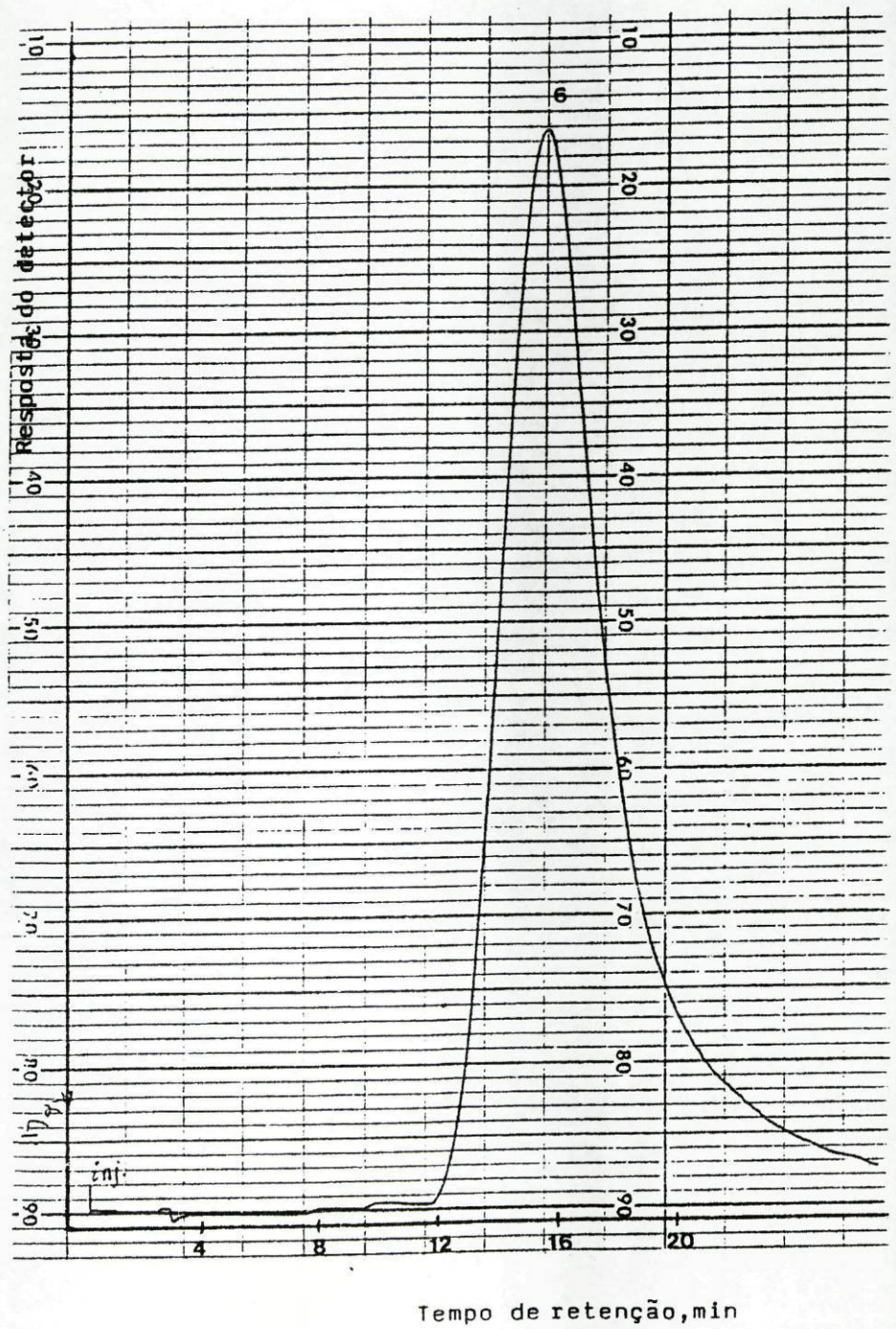


Fig. 12 - Cromatograma (HPLC) referente ao composto 6 isolado

2.1.4. Elucidação estrutural dos compostos flavónicos separados

A análise estrutural dos compostos isolados foi estabelecida a partir de dados de UV, IV, RMN ^{1}H, RMN ^{13}C e EM (FAB)

COMPOSTO 6

O espectro de IV (Fig 13, pág.41) mostrou uma banda de absorção larga, entre 3500 e 3300 cm^{-1} característica de grupo hidroxilo, bandas de estiramento de ligação C=C de anel aromático em 1610, 1510 e 1500 cm^{-1} e em 2930 cm^{-1} uma banda característica de estiramento de ligação C-H (nos grupos CH_2 e CH_3). Mostrou ainda uma banda em 1655 cm^{-1}, referente à ligação C=O do esqueleto flavónico, e bandas em 1370 e 1260 cm^{-1}, atribuíveis a grupo fenólico, (88). A ligação C=O de ácido carboxílico é evidenciada por uma banda em 1730 cm^{-1} (89).

A espectrofotometria no UV-VIS dos flavonóides foi exaustivamente estudada por T. J. Mabry e col (90). É uma técnica importante para a análise da estrutura básica destes compostos, pois permite localizar os grupos hidroxilos livres existentes nas moléculas pela análise do espectro em metanol e em metanol adicionado de determinados reagentes de deslocamento.

Para o composto em análise, o espectro de UV em metanol mostrou uma banda de absorção em 341,5 nm (banda I), e outra banda (banda II) desdobrada em dois picos, designados por banda IIa e banda IIb, em 270,0 e 253,0 nm, características de uma flavona dissubstituída em C-3´e C-4´ (91,92).

A adição de acetato de sódio à solução metanólica do composto não provocou deslocamento batocrómico na banda II, o que permitiu admitir que o grupo fenólico em C-7 se encontrava ocupado (93). Os espectros em metanol com cloreto de alumínio e em metanol com cloreto de alumínio e ácido clorídrico mostraram-se típicos de uma 5-hidroxiflavona evidenciando quatro picos de absorção (bandas Ia, Ib, IIa e IIb) deslocados batocromicamente em relação à sua posição original (Fig 14, pag.42). O deslocamento

batocrómico da banda I (em MeOH) para a banda Ia (em MeOH+$AlCl_3$+HCl) foi de 38,5nm, o que sugeriu a existência de um grupo fenólico livre em C-5 (Quadro 3).

Quadro 3: Absorção no UV do composto 6

Solvente e Reagentes	Máximos de Absorção λ , nm				
MeOH	341,5		270,0		253,0
MeOH+$AlCl_3$	379,5	352,0	276,5		263,0
MeOH+$AlCl_3$+HCl	380,0	347,5	295,0(i)	279,0	261,5
MeOH+NaOAc	338,0		271,5		

(i) - inflexão

O cloreto de alumínio complexou o grupo formado pelo carbonilo e o hidroxilo em C-5 , sem que a adição de ácido clorídrico provocasse efeito hipsocrómico (94) (Fig.15).

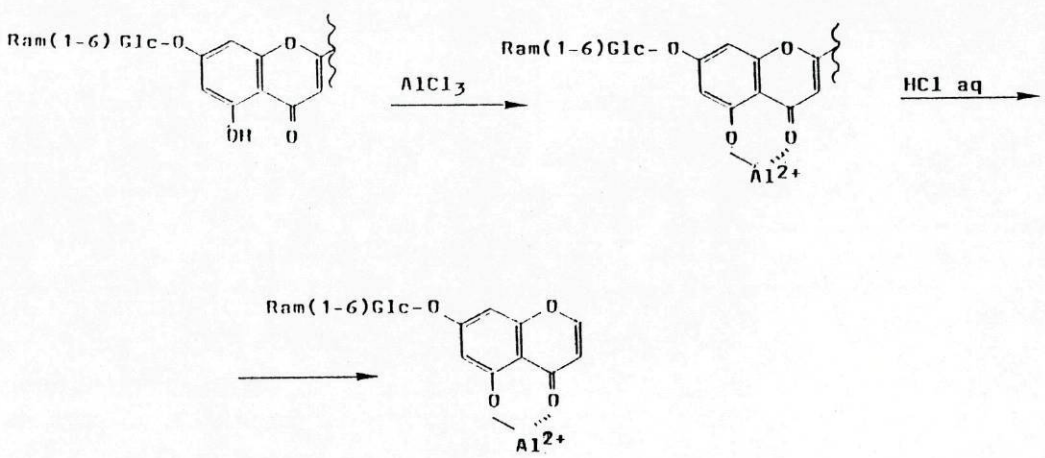


Fig.15

Os resultados até aqui obtidos levaram a inferir que apenas o grupo fenólico em C-3´ se encontrava ocupado. Este facto foi confirmado por espectroscopia de ressonância magnética nuclear, RMN, técnica preciosa para a determinação estrutural dos compostos flavónicos (95,96).

Oespectrode RMN^{1}H, do composto em análise (Fig.16, pag.43), mostrou todos os sinais atribuíveis à diosmina (Fig.16a,pag.44) (97) excepto o sinal referente ao protão do grupo fenólico em C-3´. Este espectro evidenciou ainda um singuleto em δ 4,73, cuja integração mostrou corresponder a dois protões.

Aplicando a regra e as constantes de Shoolery, calculou-se o valor de δ para os protões metilénicos do grupo O-OCH_2COOH. O valor calculado foi de 5,01 e o valor teórico encontrado em tabela é de 5,09 (98). Em face destes resultados e após observação do espectro do ácido fenoxiacético (99), deduziu-se que o singuleto a δ 4,73 é atribuível a protões metilénicos do grupo carboximetílico.

Não foi encontrado no espectro qualquer sinal correspondente a protão carboxílico entre os valores de δ 13,2 e 10,0. Este facto não surpreendeu, já que o protão carboxílico troca rapidamente com os protões da água ou de hidroxilos alcoólicos (100).

O espectro de RMN^{13}C (Fig17, pág.45) estudado comparativamente com o espectro que obtivemos da diosmina (Fig. 18 e 18a, pág.46 e 47), e no qual fizemos a atribuição dos valores de δ a partir dos dados referidos na literatura para a aglicona da diosmina, a diosmetina (101,101a), e para a hesperidina (102), mostrou, para além dos sinais referentes à diosmina, mais dois sinais a δ 170,03 e δ 65,65 (Quadro 4, pág.36). O sinal a δ 170,03 é atribuível a um carbono carboxílico (103), enquanto o sinal a campo mais alto (δ 65,65) pode resultar do carbono do grupo O-CH2- (104).

Quadro 4: Comparação de dados de RMN ^{13}C da diosmina e do composto 6

Atomo de carbono	DIOSMINA δ(ppm) DMSO	COMPOSTO 6 δ(ppm) DMSO
C2	162,80	162,79
C3	103,78	103,99
C4	181,90	181,80
C5	161,26	160,99
C6	99,60	99,52
C7	164,20	163,75
C8	94,80	94,67
C9	156,95	156,80
C10	105,50	105,33
C-1′	122,90	122,36
C-2′	113,09	112,08
C-3′	146,90	147,57
C-4′	151,15	152,14
C-5′	112,34	110,56
C-6′	119,04	120,22
C-1″	99,90	99,81
C-2″	72,97	72,97
C-3″	76,29	76,12
C-4″	70,87	70,50
C-5″	75,54	75,54
C-6″	66,78	66,03
C-1‴	100,52	100,38
C-2‴	70,35	70,22
C-3‴	69,80	69,55
C-4‴	72,13	72,02
C-5‴	68,27	68,23
C-6‴	17,86	17,69
$-OCH_3$	56,30	55,66
$-OCH_2-$		65,65
-COOH		170,03

Os dados até agora referidos levaram a admitir que o composto em análise deveria corresponder ao derivado monocarboximetilado em C-3´ da diosmina (V). Para confirmar a sua estrutura recorreu-se à espectrometria de massa.(105)

As técnicas de ionização por desadsorção vieram permitir a obtenção directa de espectros de massa de compostos de natureza polar com baixa volatibilidade e /ou termo-instáveis (106,107). Entre estas técnicas, a ionização por átomos rápidos (FAB) é das mais recentes e a de maior sucesso, pois permite obter massas exactas de compostos altamente polares e de elevado peso molecular, e a partir da fragmentação obtida colher-se uma importante informação estrutural.

Introduzida em 1981 por Barber (108,109) e Vikerman (110), foi rapidamente objecto de estudo de vários investigadores (111-116). A espectrometria de massa com ionização por bombardeamento por átomos rápidos foi aplicada a flavonóides em 1983 por Norio Saito e colaboradores (117), tendo sido, desde então, publicados alguns trabalhos aplicados a estes compostos (118-121).

Face às possibilidade desta técnica, decidiu-se aplicá-la ao composto em análise, para determinação da sua massa molecular e confirmação da estrutura. Para o efeito e atendendo às características polares do composto, escolheu-se para matriz o glicerol (G), já que a amostra se mostrou facilmente solúvel neste poliálcool.

Referentes ao composto 6 mostram-se dois espectros de massa FAB de iões positivos, obtidos em dois centros de espectrometria de massa.

O primeiro espectro (Fig.19, pag.48), obtido no Analytical Sciences Center (PCMU) , mostrou claramente o ião molecular protonado $[M+H]^+$ = 667, com uma abundância relativa de 55,00% do pico base. Este ião justifica para o composto em análise a fórmula molecular $C_{30}\ H_{34}\ O_{17}$. O espectro mostra ainda um fragmento a m/e 359, com 21,24% do pico base, correspondente à aglicona do composto.

O segundo espectro, feito no Midwest Center for Mass Spectometry (Fig 20, pag.49), do mesmo modo que o anterior, mostra o ião molecular protonado $[M+H]^+$= 667. De referir ainda os picos correspondentes ao glicerol, a valores de m/e: 185 ($2GH^+$),

369 ($4GH^+$) e 461 ($5GH^+$) (111)

A Fig. 21 (pag.50), representa uma expansão da zona de m/e 300-400, que confirma a massa do pico a m/e 359, o qual não tinha ficado marcado na Fig. 20 (pag.49). Este pico corresponde à aglícona protonada do composto $[358+H]^+$.

A Espectrometria de Energia Cinética de Iões de Massa Seleccionada (Mass Analysed Ion Kinetic Energy Spectrometry, MIKES) (122) permite a obtenção do espectro de um ião cuja massa se seleccionou. Quando da obtenção do segundo espectro foi seleccionado o ião protonado $[M+H]^+$=667 para registo do espectro dos fragmentos desse ião. Com o objectivo de aumentar quer o número quer a intensidade desses fragmentos, foi utilizado o hélio (He) como gás de colisão.

O espectro obtido (MIKES, CA) (Fig. 22-24, pag. 51,52) é dominado pelos iões resultantes da perda de um $[(M+H)-146]^+$ e dos dois acúcares $[(M+H)-146-162]^+$ da parte glicosídica da molécula. Estes fragmentos são claramente indicativos não só da massa molecular de cada açúcar mas, também, da sequência da ligação dos mesmos à aglícona (glucose seguida pela ramnose), visto a perda do segundo açúcar envolver um fragmento com mais 16 u.m.a que a perda do primeiro açúcar.

Nesta fragmentação ocorre, provavelmente, uma protonação no oxigénio da ligação glicosídica, seguida de quebra da ligação oxigénio-açúcar, com transferência de hidrogénio, formando-se um álcool (ou fenol) protonado (120) (Fig.25).

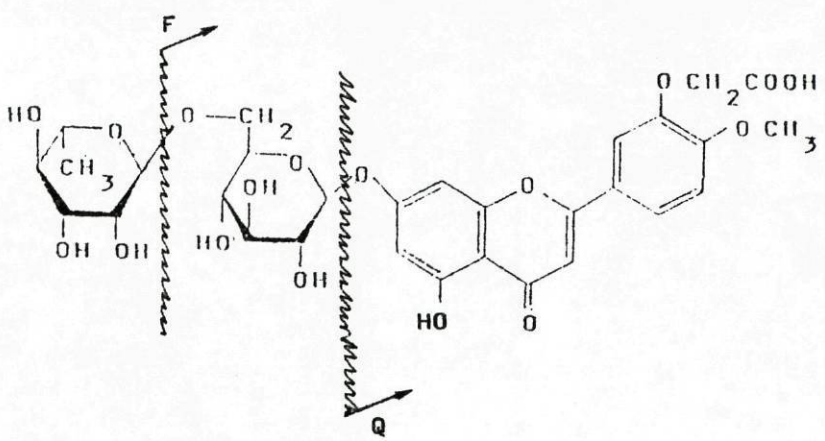


Fig.25

O pico a m/e 359, agora confirmadamente resultante da fragmentação da molécula em estudo, corresponde à aglicona protonada do composto (QH_2^+) (Fig 26).

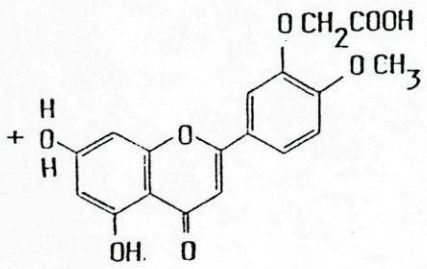
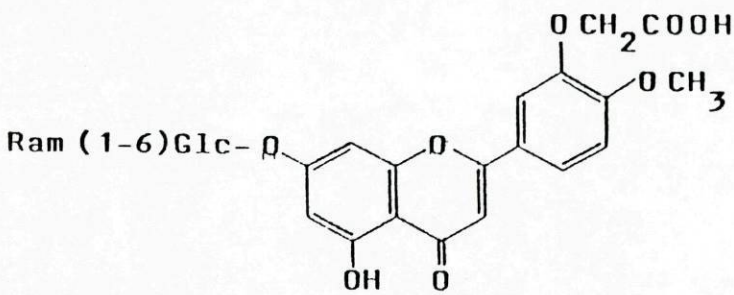


Fig.26

Depois do espectro de massa FAB de iões positivos, que mostrou não haver na amostra sinal de maior massa molecular , o espectro MIKES, C A do ião $[M+H]^+$=667 confirmou a estrutura do composto e as deduções até aqui efectuadas com os outros métodos de análise estrutural (Fig.27).

A elucidação estrutural deste novo composto hidrossoluvel foi apresentada em comunicação ao I Congresso Hispano-Português de Química Terapêutica (57).



7-O-Ramnoglucosil-5-hidroxi-3´-carboximetoxi-4´-metoxiflavona (V)

Fig.27

É ainda de interesse referir o seguinte:

-O espectro de massa FAB, obtido da primeira amostra enviada para análise (Fig .28, pag. 53), para além do ião molecular esperado $[M+H]^+$=667 e do pico correspondente à aglicona protonada $[358+H]^+$, mostrou um pico com mais 22 unidades de massa. Este pico, nitidamente atribuível a $[M+Na]^+$, levou a ponderar se o composto estaria na forma de ácido livre (V), como sal sódico (VII) ou como uma mistura de ambos, pois a presença de sódio na amostra pode dar picos $(M+Na)^+$, quer o sódio esteja ou não ligado ao grupo ácido. Acontece também que o sal sódico do ácido carboxílico pode dar em FAB o pico $[M+H]^+$.

Sabia-se que um dos aspectos mais importantes da técnica FAB era a preparação da amostra, havendo necessidade de minimizar a interferência do sódio (116). O espectro referido mostra nitidamente que a amostra continha sódio, como indica a presença dos picos intensos a m/e 115 [G+Na]$^+$, m/e 207 [2G+Na]$^+$, m/e 299 $[3G+Na]^+$ e a m/e 391 $[4G+Na]^+$. Este facto levou à necessidade de alterar o processo de purificação da amostra, nomeadamente a eliminação do sódio. Com este objectivo actuou-se em três vertentes:

a) Submetendo todo o material de vidro utilizado a um tratamento destinado a eliminar o sódio (116).

b) Acidificando mais fortemente a solução S, levando-a a pH=1,2.

c) Fazendo passar a solução aquosa do produto bruto (CMD) por uma coluna contendo uma mistura de resinas permutadoras de catiões e aniões (123).

As amostras dos compostos, isolados após estas alterações no protocolo de trabalho, foram analisadas por espectrometria de absorção atómica, não revelando a presença de sódio. Este facto pôde ser confirmado pela observação dos espectros FAB obtidos posteriormente.

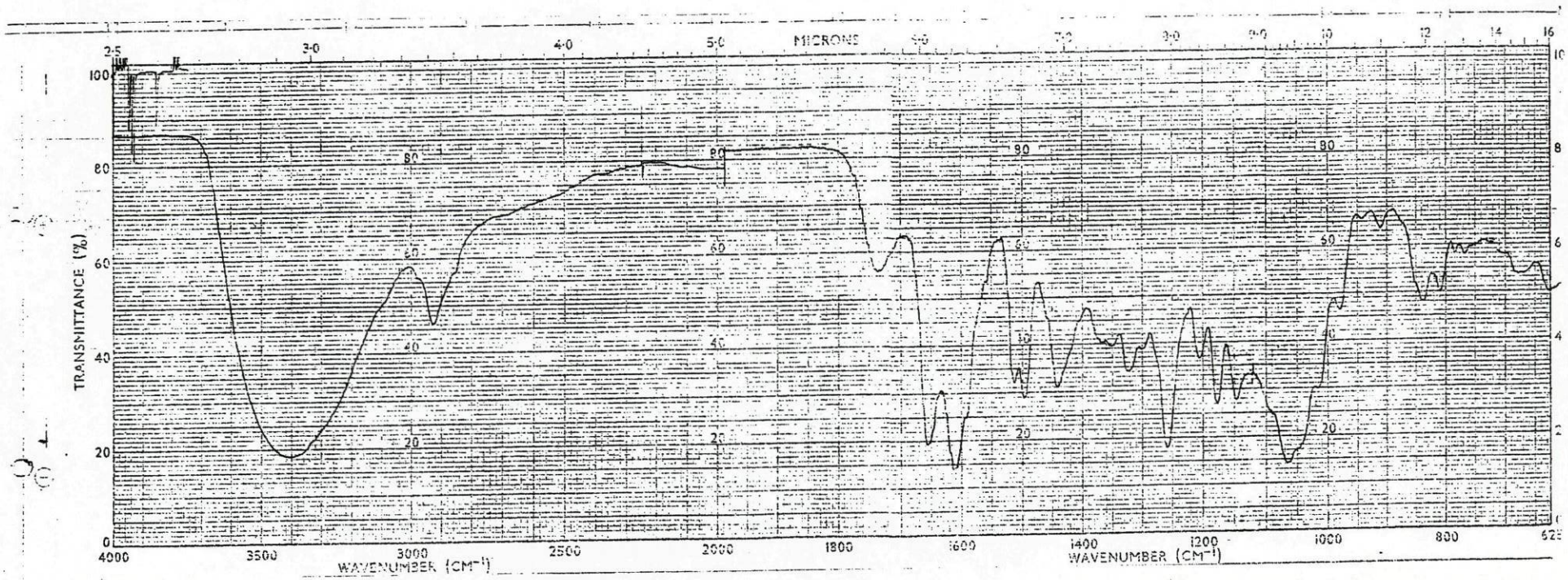
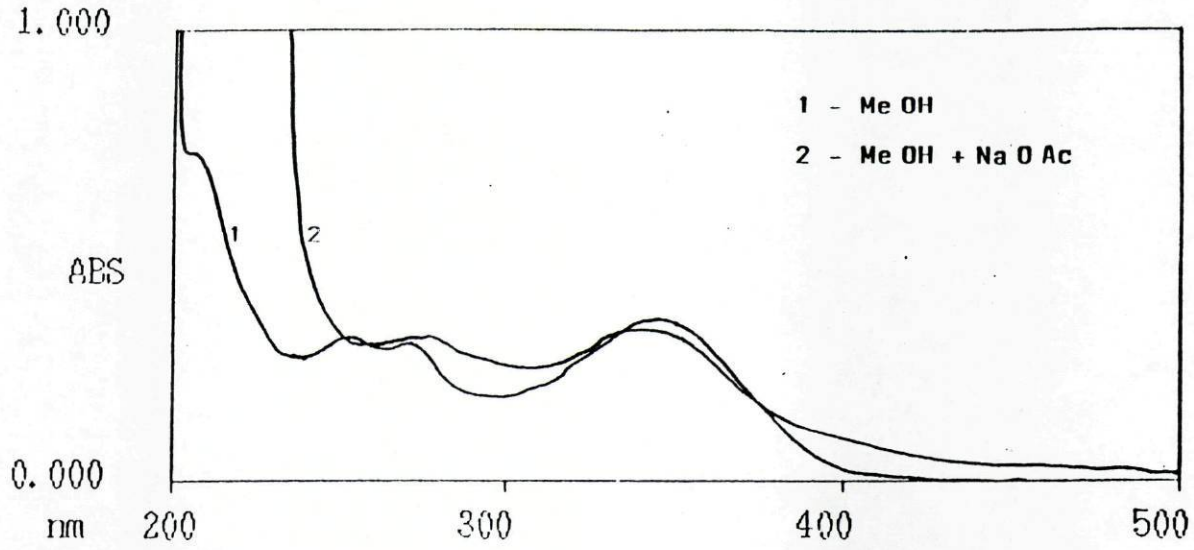


Fig. 13 - Espectro no IV do composto 6



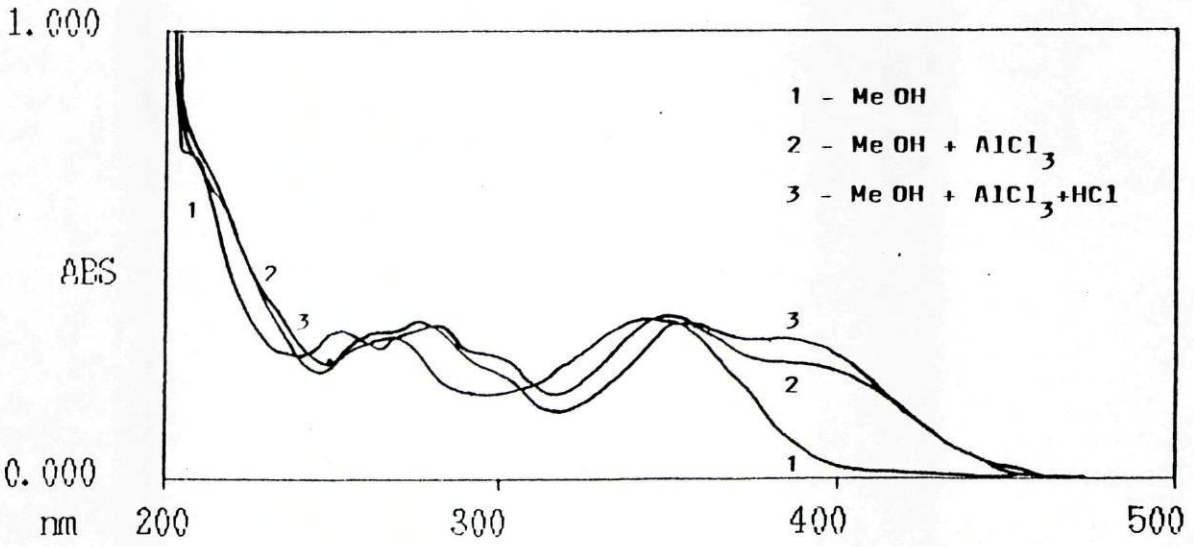


Fig. 14 - Espectros no UV do composto 6

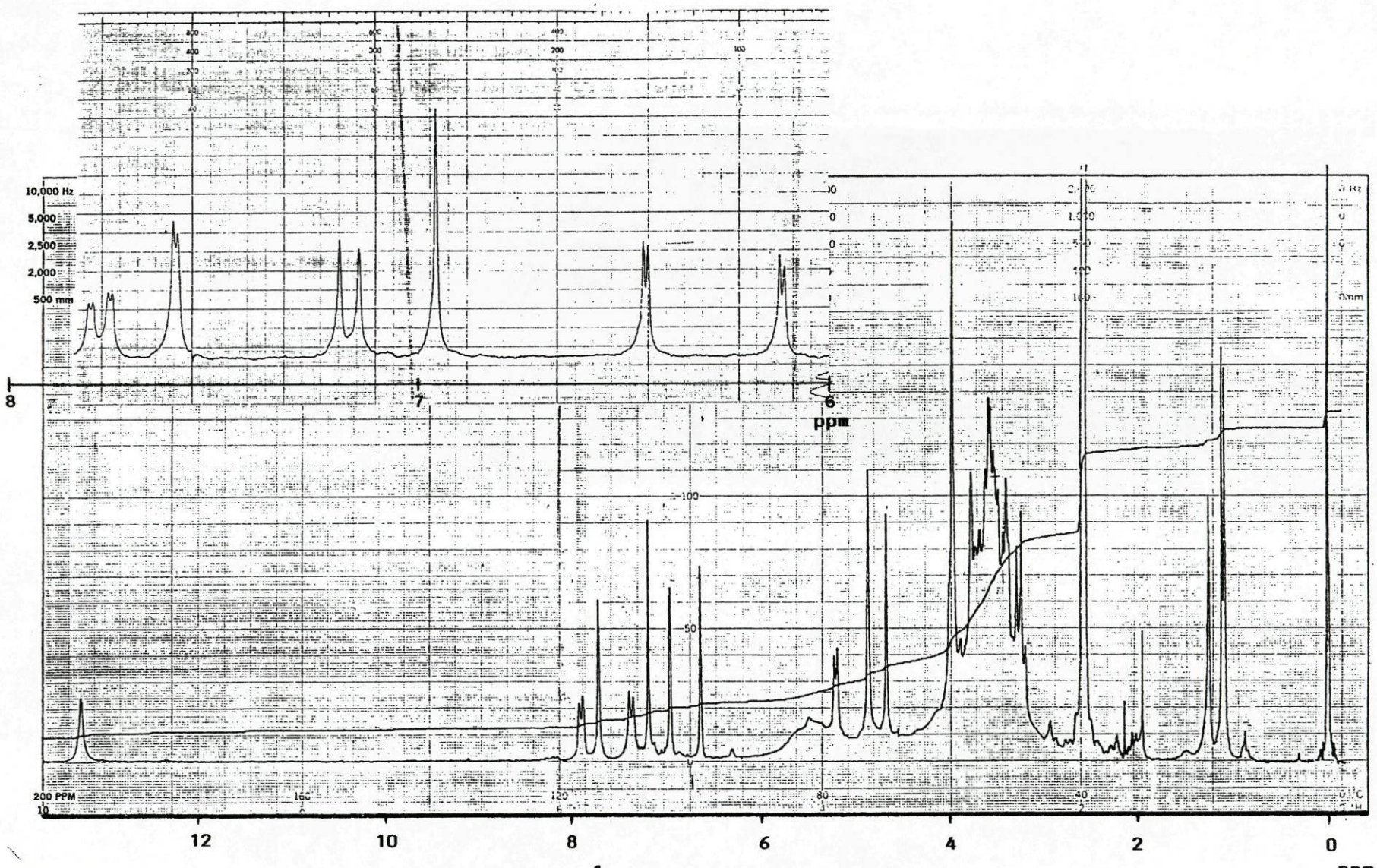


Fig. 16 - Espectro de RMN ^{1}H do composto 6

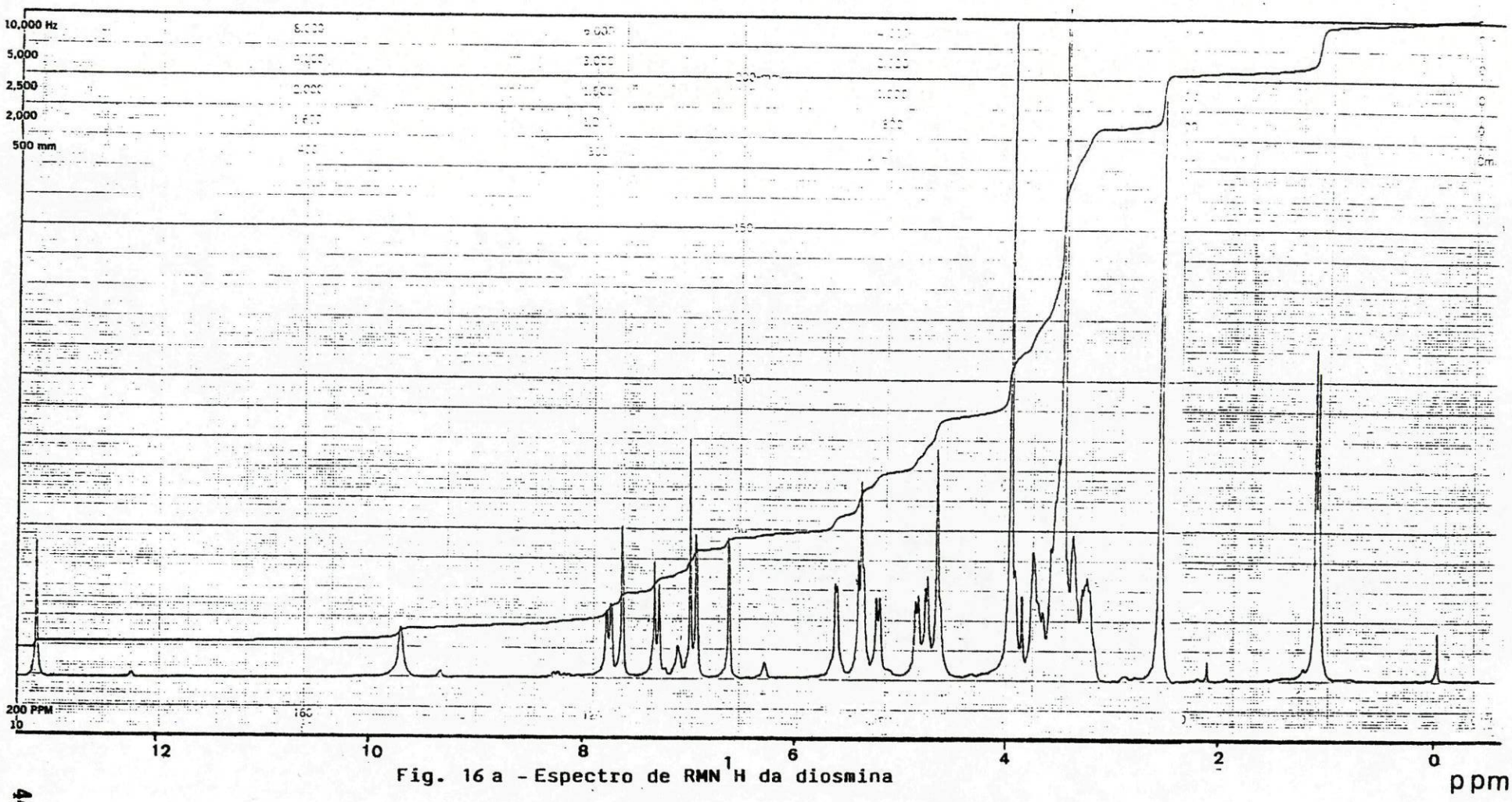


Fig. 16 a - Espectro de RMN ^{1}H da diosmina

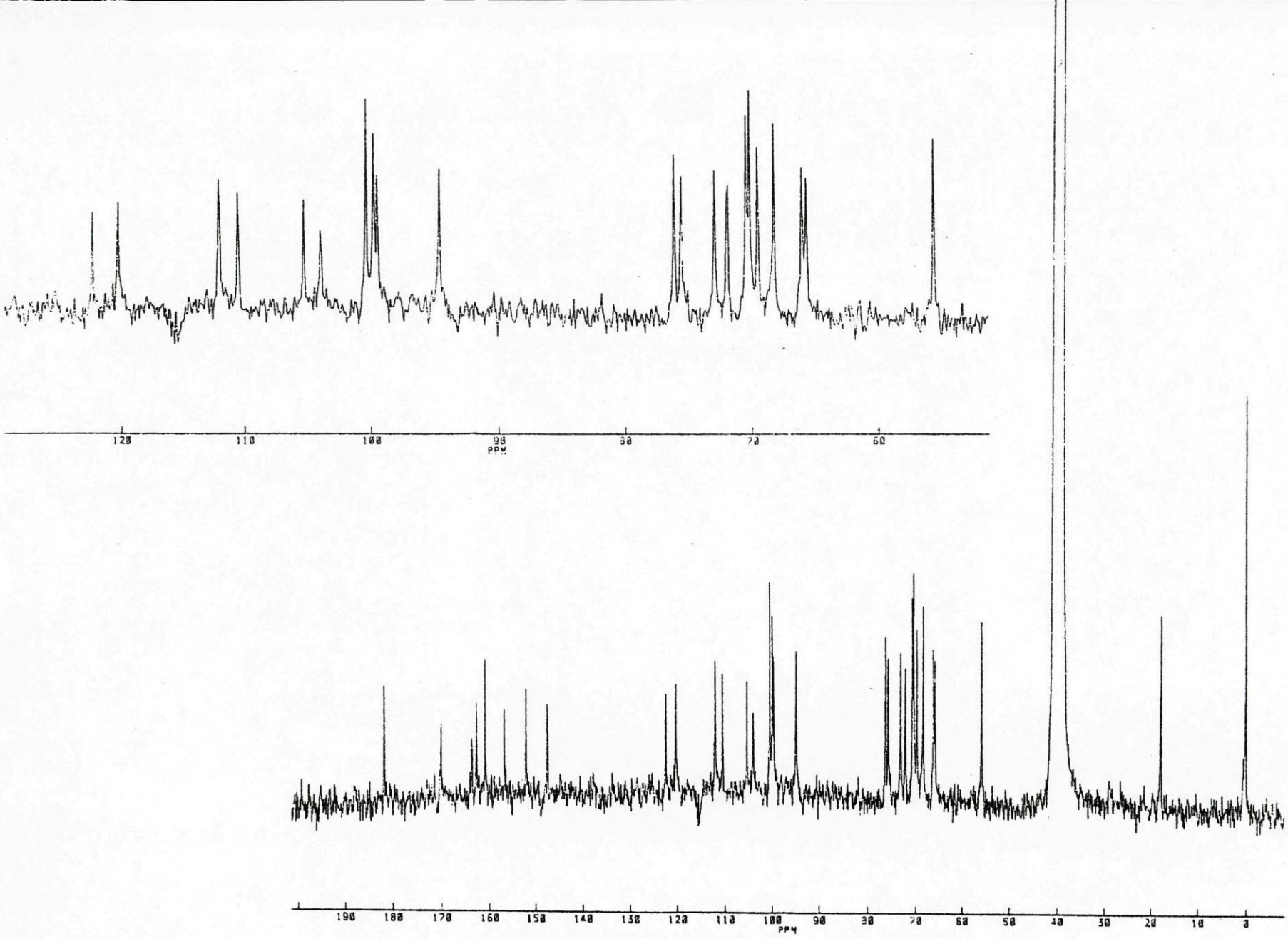


Fig. 17 - Espectro de RMN ^{13}C do composto *6*

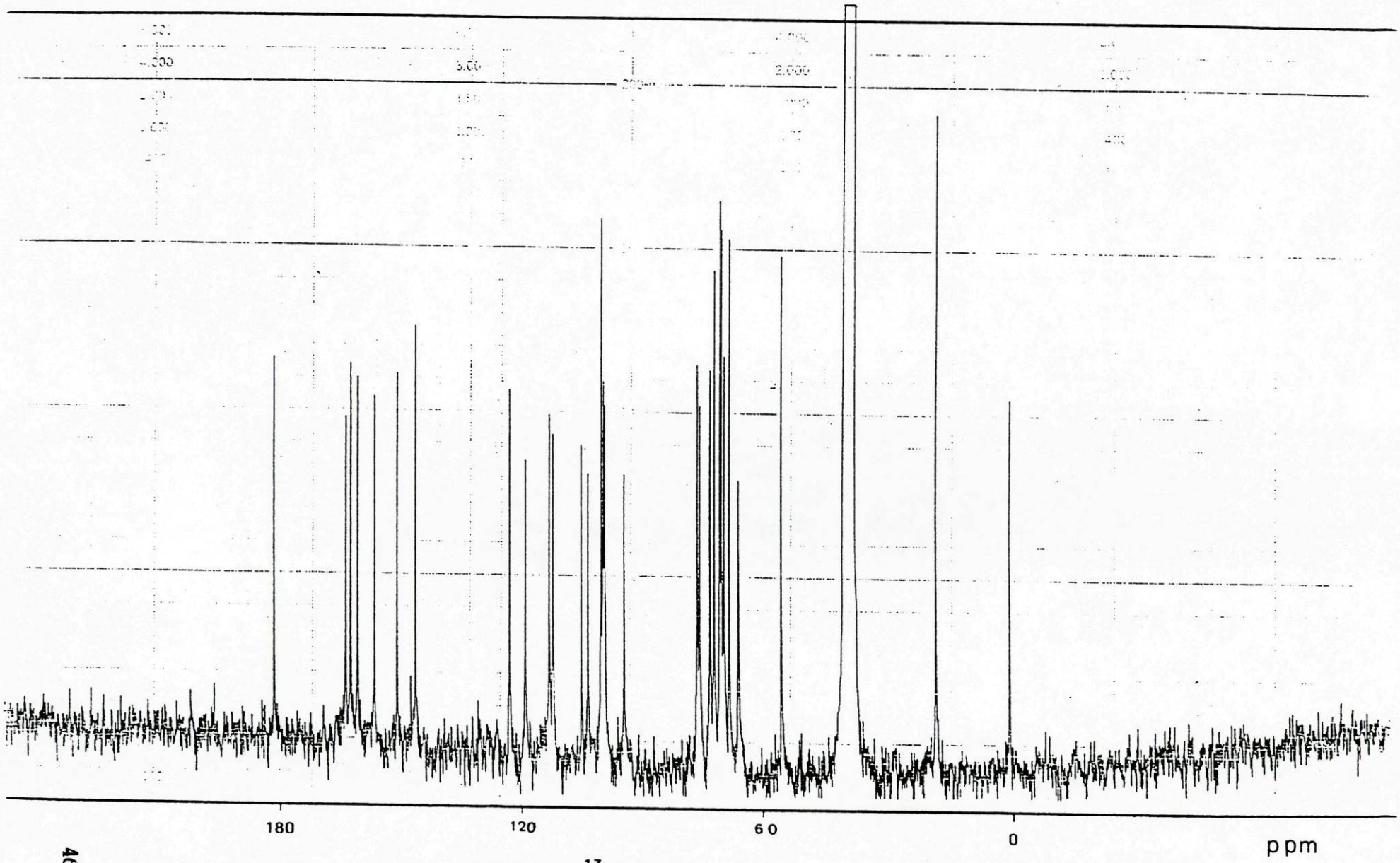


Fig. 18 - Espectro de RMN ^{13}C da diosmina

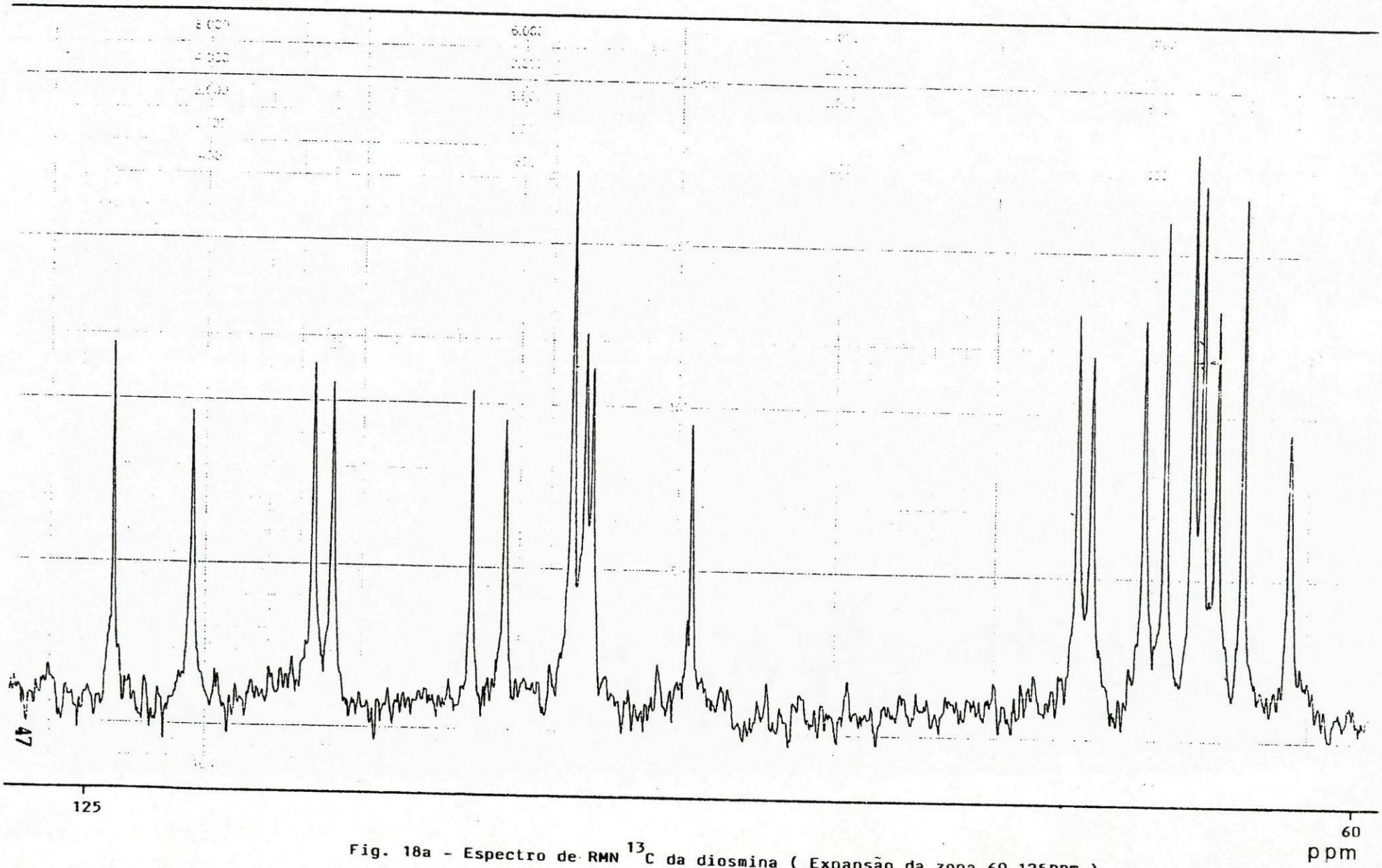


Fig. 18a - Espectro de RMN ^{13}C da diosmina (Expansão da zona 60-125ppm)

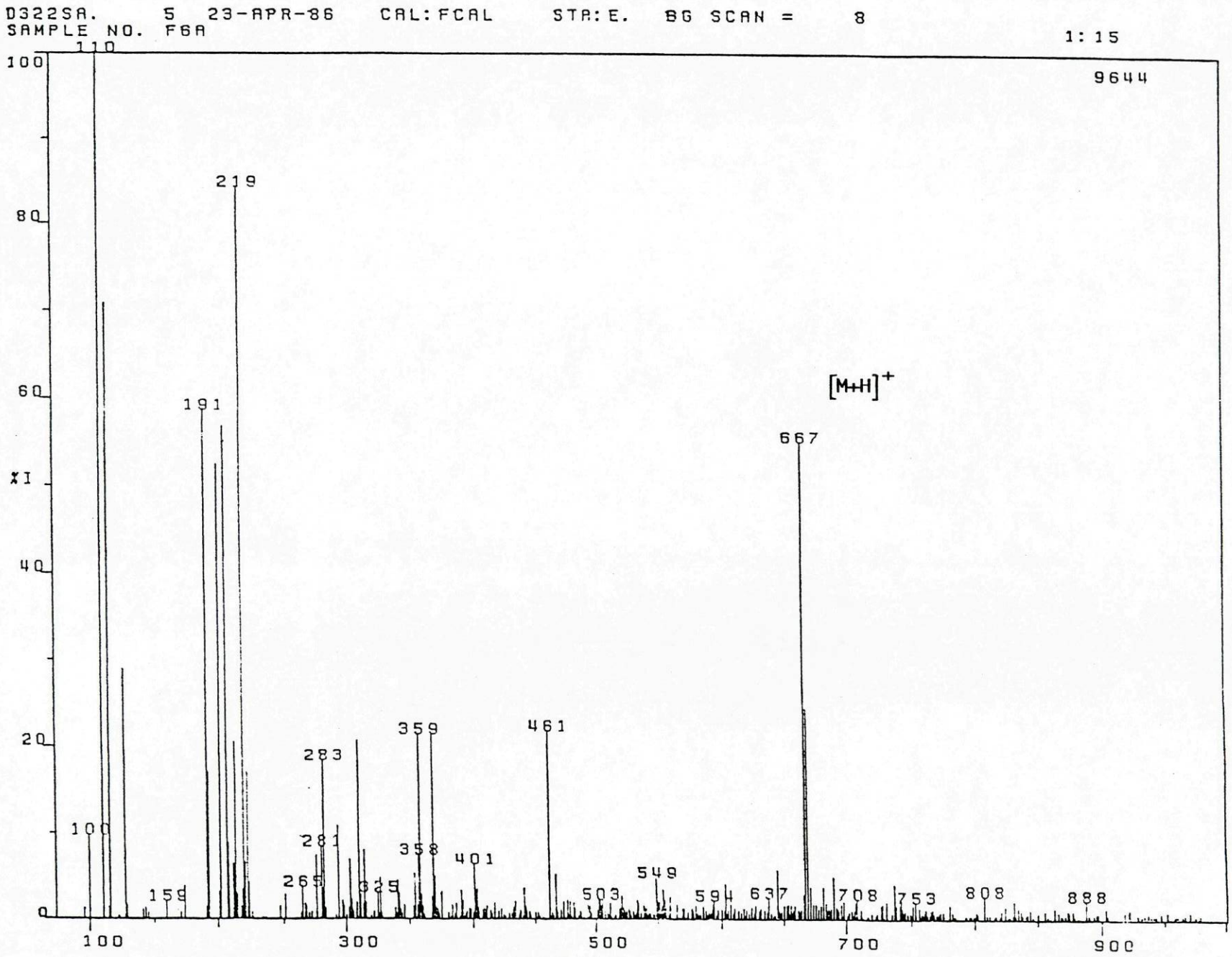


Fig. 19 - Espectro de massa FAB de iões positivos do composto 6

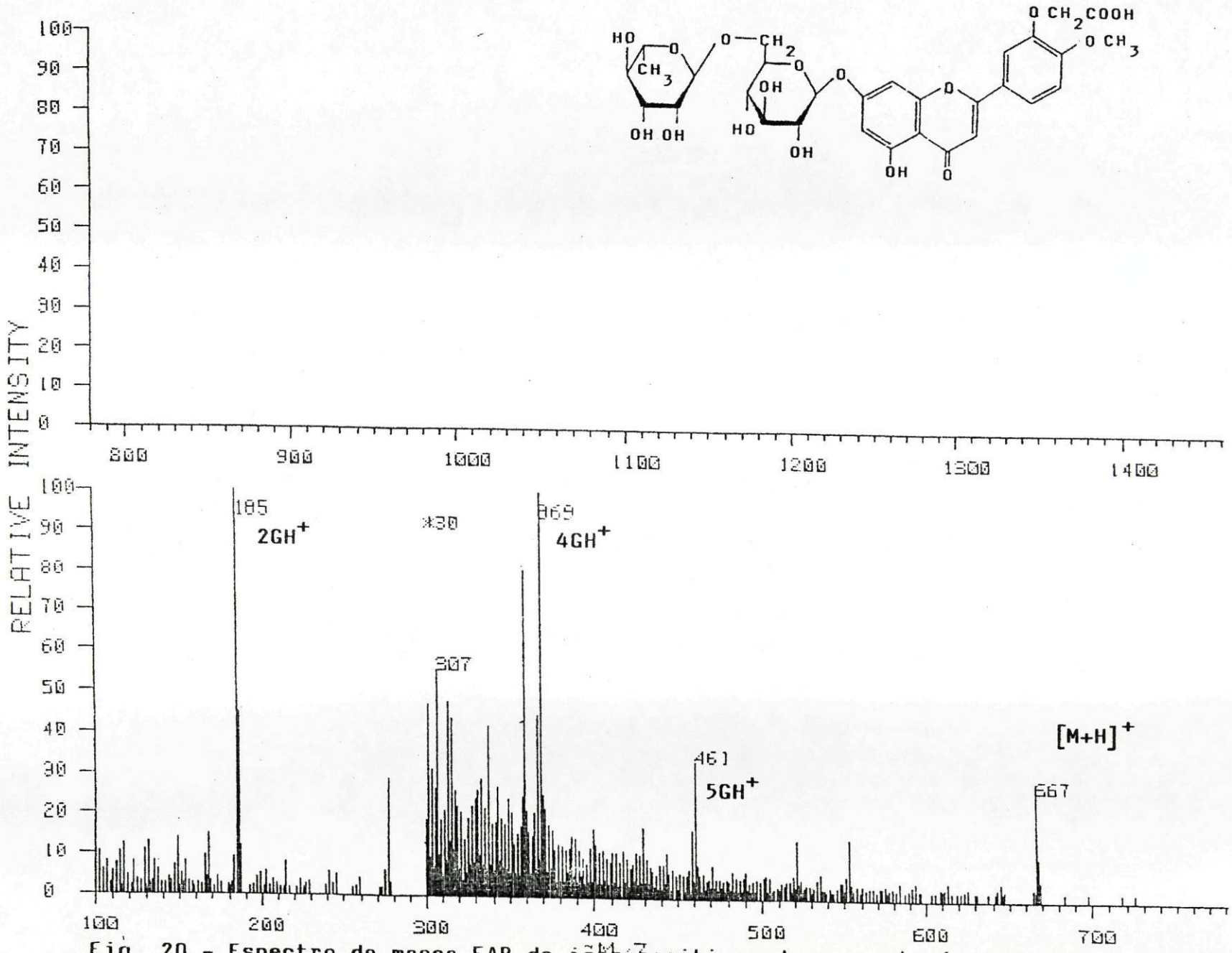


Fig. 20 - Espectro de massa FAB de íons positivos do composto 6

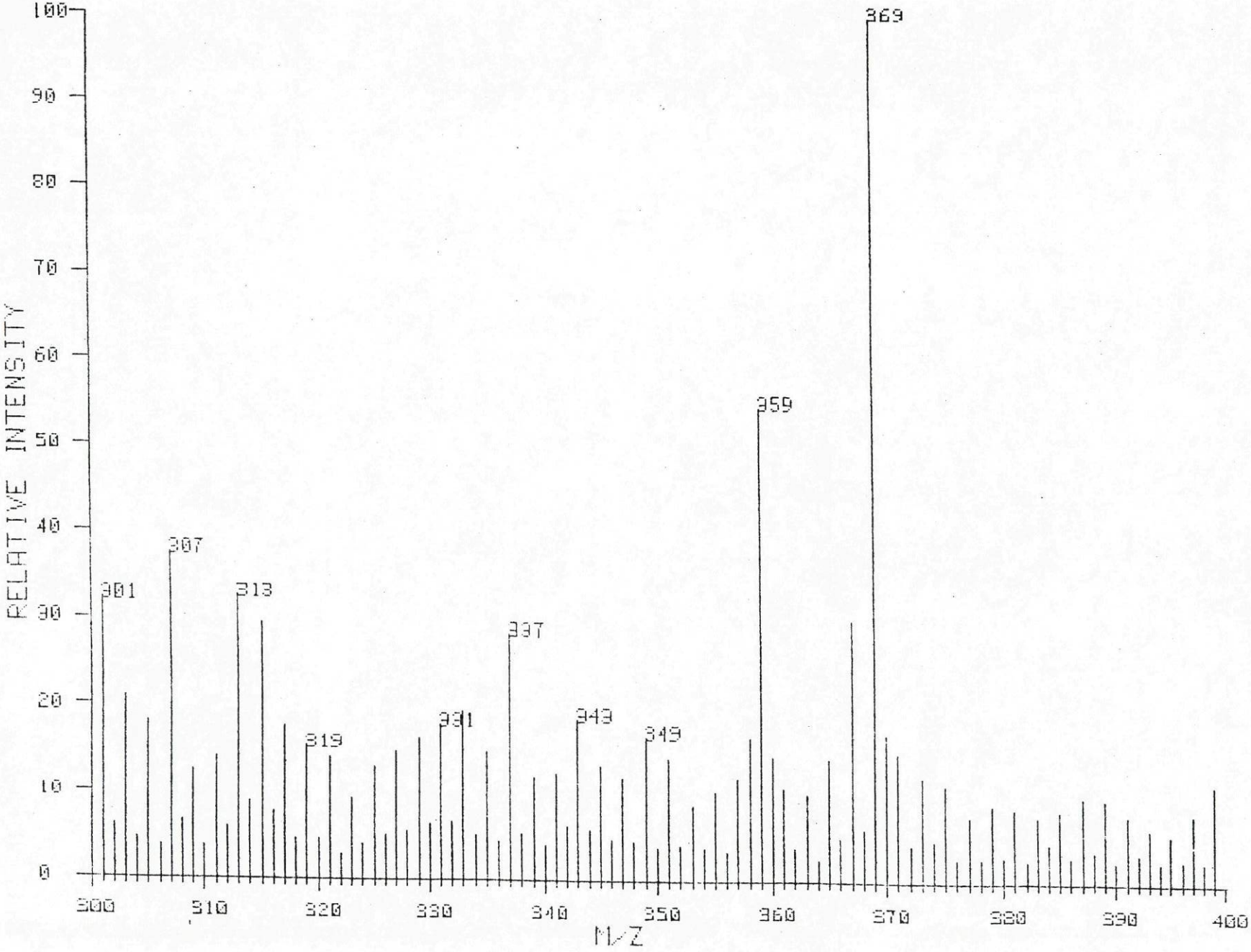


Fig. 21 - Expansão da zona de m/e 300-400 do espectro de massa FAB de iões positivos do composto 6

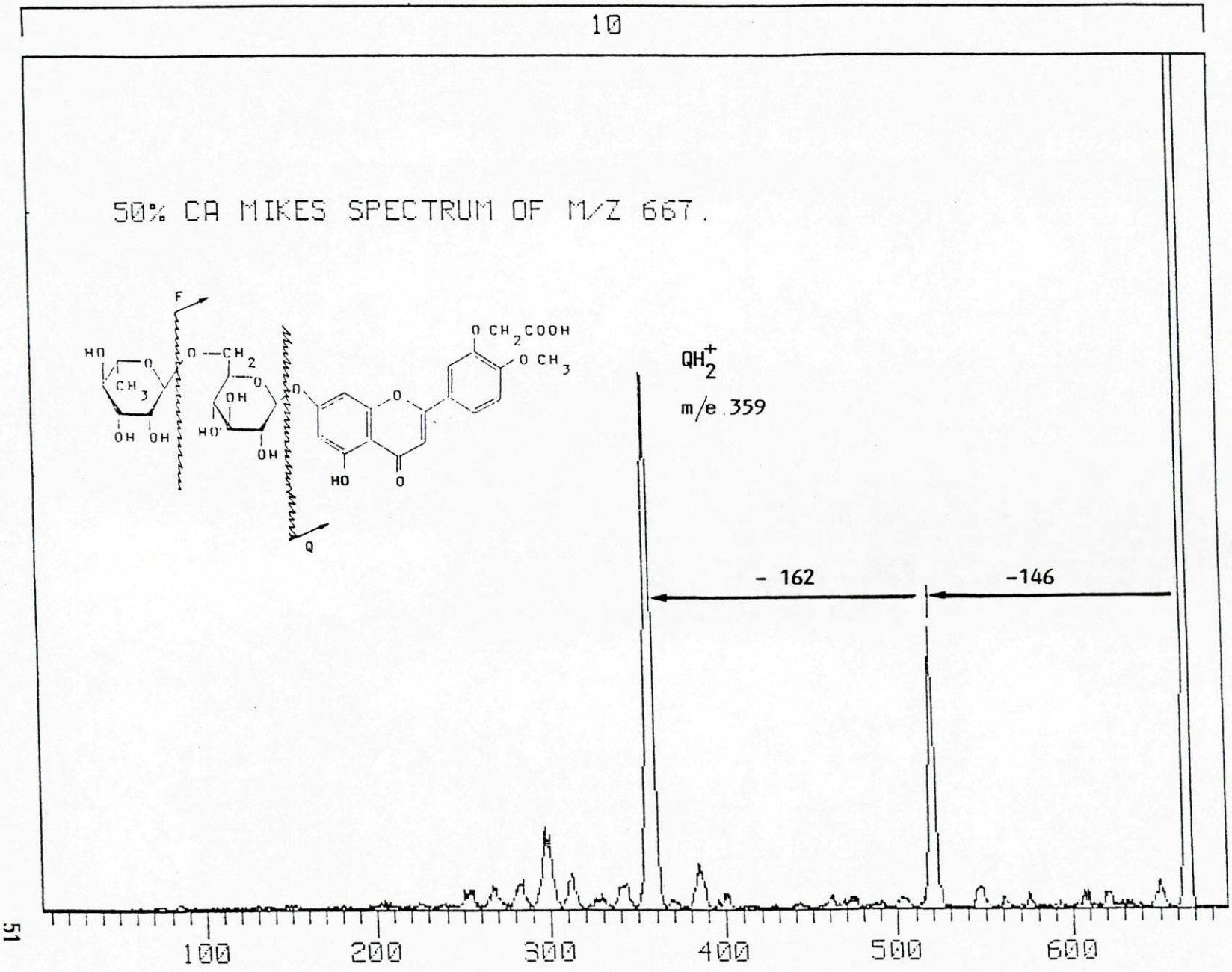


Fig. 22 - Espectro MIKES,CA do ião $[M+H]^+$ de m/e 667 referente ao composto 6

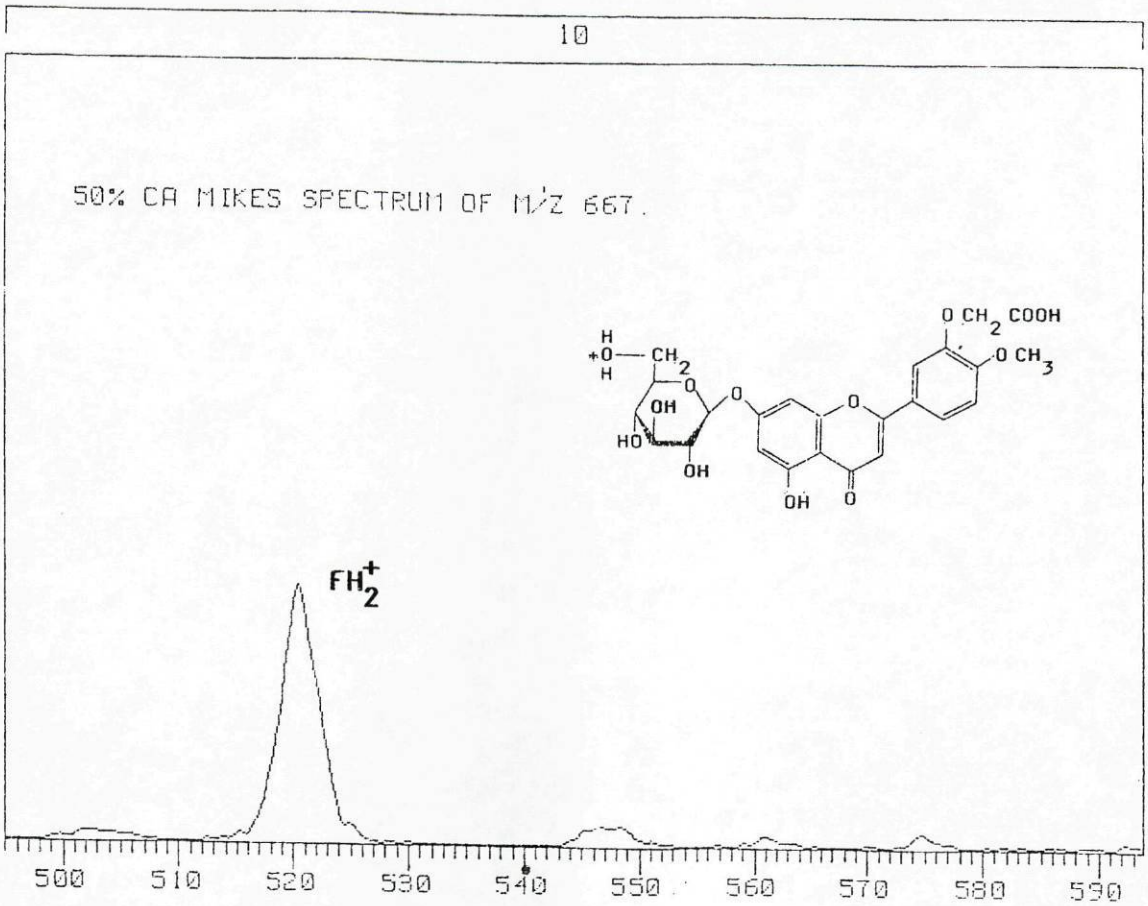


Fig. 23 - Zona do espectro MIKES,CA do ião $[M+H]^+$ de m/e 667 referente ao composto 6

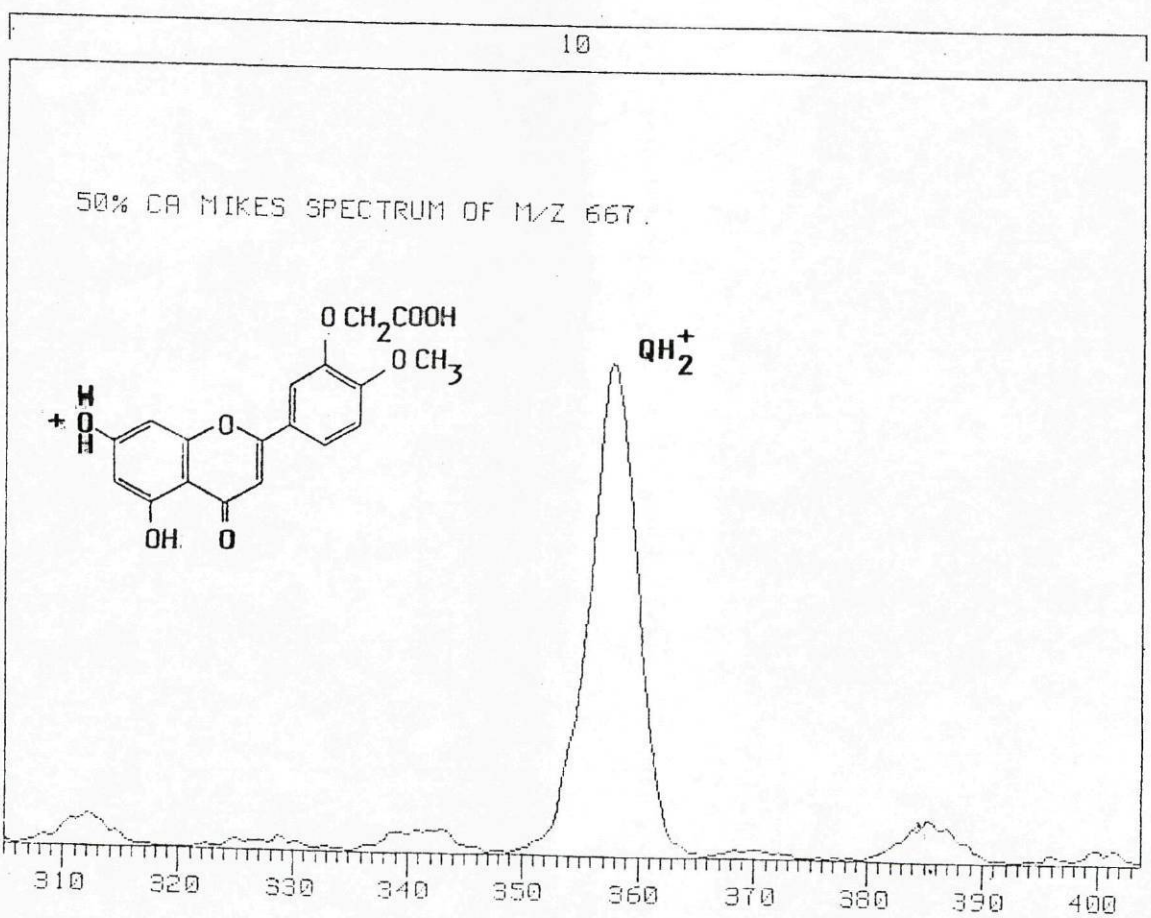


Fig. 24 - Zona do espectro MIKES,CA do ião $[M+H]^+$ de m/e 667 referente ao composto 6

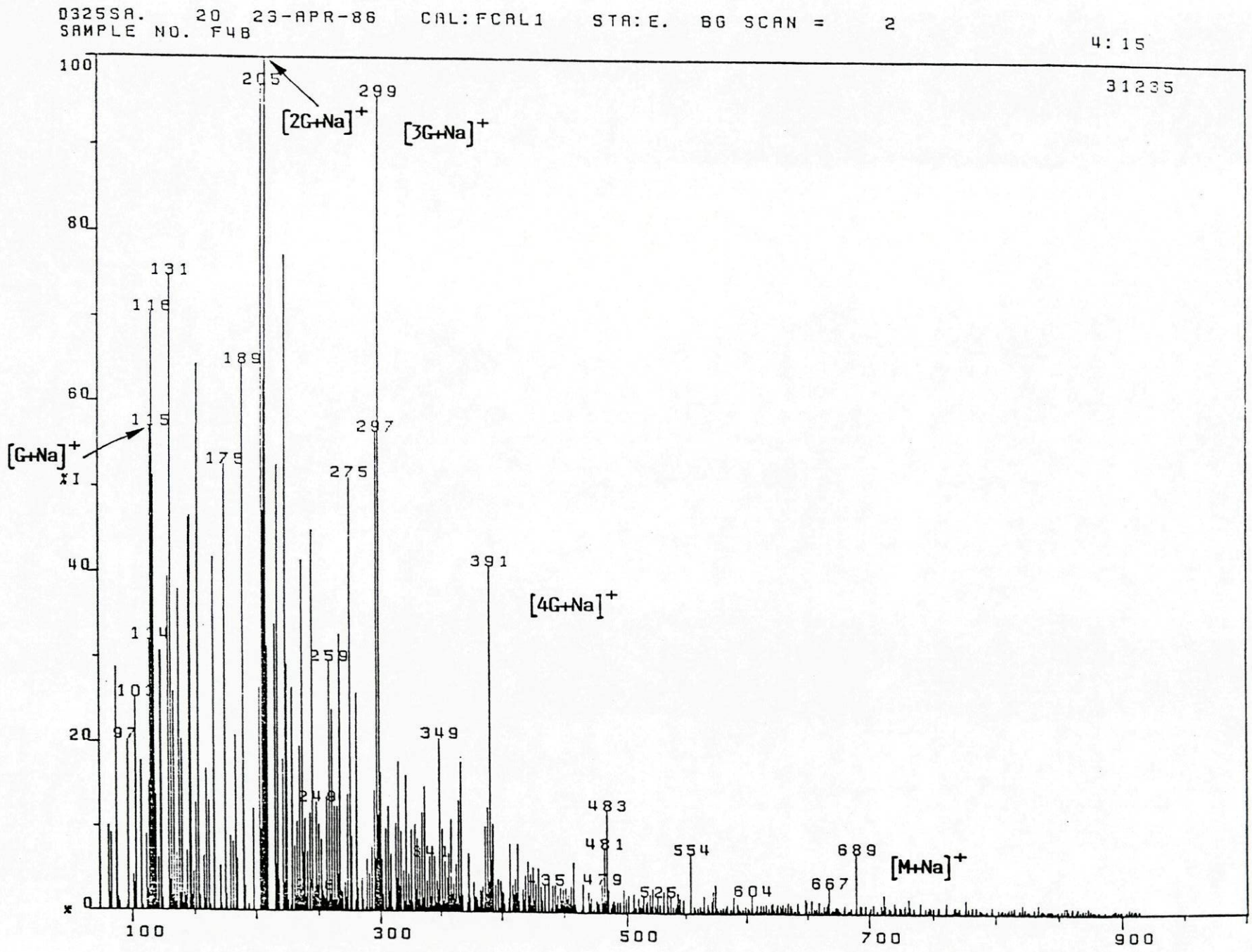


Fig. 28 - Espectro de massa FAB de iões positivos do composto 6 impuro

COMPOSTO 4

O espectro de IV do composto 4 (Fig 29, pag. 58) permitiu observar as bandas características dos vários grupos químicos da estrutura flavónica, sendo de realçar que a banda de absorção referente à ligação C=0 do núcleo flavónico se encontra em 1630 cm^{-1}, o que sugeriu que o grupo fenólico em C-5 estava ocupado (88). Observou-se ainda uma banda em 1730 cm^{-1}, correspondente à ligação C=0 de ácido carboxílico (89).

Os espectros de UV em metanol, em metanol adicionado de cloreto de alumínio e de cloreto de alumínio e ácido clorídrico sugeriram a presença de uma flavona dissubstituida em C-3´ e C-4´, na qual o grupo fenólico em C-5 se encontrava ocupado, já que o terceiro espectro não evidenciou alteração na localização das bandas de absorção (91, 92 ,94). O registo do espectro em metanol, após adição de acetato de sódio, também não mostrou deslocamento batocrómico na banda II, facto indicativo de que o grupo fenólico em C-7 se encontrava ocupado (93) (Fig. 30, pag. 59) (Quadro 5).

Quadro 5 : Características no UV do composto 4

Solvente e Reagentes	**Máximos de Absorção** λ, nm		
MeOH	341,0	266,0	252,5
MeOH+$AlCl_3$	342,5	270,0	253,5
MeOH+$AlCl_3$+HCl	341,0	276,0	266,0
MeOH+NaOAc	333,0	266,0	

A substituição do grupo fenólico em C-5 foi confirmada por RMN^1H, que revelou estar igualmente ocupado o grupo fenólico em C-3´. O espectro de RMN^1H do composto em análise impuro, (Fig. 31, pag.60), estudado comparativamente com o espectro da diosmina, indicou claramente o desaparecimento dos picos correspondentes

aos protões fenólicos referidos, que na diosmina aparecem sob a forma de singuletos a δ13,2 (OH em C-5) e δ 9,5 (OH em C-3'). O espectro mostrou ainda, para além dos sinais atribuíveis à diosmina um singuleto a δ 4,83, cuja integração revela ser devido a 4 protões metilénicos do grupo carboximetílico (98,99).

Em face do que se tem vindo a referir admitiu-se que o composto pudesse corresponder ao derivado dicarboximetilado da diosmina (IV).

A análise do espectro de RMN^{13}C (Fig.32, pag.61) veio reforçar esta hipótese, já que, para além dos sinais atribuíveis à diosmina (Quafro 6, pag.56) mostrou mais quatro sinais a δ 170,02, 169,67, 65,79 e 64,95. Destes sinais, os picos a campo mais baixo de δ (170,02 e 169,67) podem corresponder a carbonos carboxílicos (103), enquanto os picos a campo mais alto (65,79 e 64,95) são atribuíveis a carbonos de grupos -O$\underline{C}$H$_2$- (104).

O espectro de massa FAB de iões positivos (Fig.33,pag.62) mostrou um ião molecular com o valor esperado $[M+H]^+$ = 725, não havendo sinal de maior massa molecular. É ainda de referir um pico a m/e. 417, $[416+H]^+$,correspondente à aglicona do composto. Este pico, desde que resultante da fragmentação do ião molecular, justifica a estrutura do composto.

O espectro de MIKES, CA do ião $[M+H]^+$= 725 (Fig.34, pag.63) permitiu confirmar esta fragmentação, revelando a existência de um fragmento de m/e 579, correspondente à perda de 146 u.m.a., (FH_2^+) e outro de m/e 417, resultante de nova perda de 162 u.m.a. (Fig.35, pag. 64). Este último corresponde à aglicona protonada do composto(QH_2^+) (Fig.36).

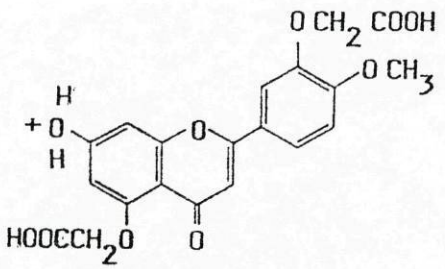


Fig.36

Quadro 6: Comparação de dados de RMN ^{13}C da diosmina e do composto 4

Atomo de Carbono	DIOSMINA δ(ppm) DMSO	COMPOSTO 4 δ(ppm) DMSO
C2	162,80	160,78
C3	103,78	106,50
C4	181,90	176,01
C5	161,26	160,28
C6	99,60	99,07
C7	164,20	161,10
C8	94,80	96,62
C9	156,95	158,60
C10	105,50	109,06
C-1′	122,90	122,88
C-2′	113,09	112,65
C-3′	146,90	147,19
C-4′	151,15	151,69
C-5′	112,34	112,20
C-6′	119,04	118,18
C-1″	99,90	99,61
C-2″	72,97	72,93
C-3″	76,29	76,17
C-4″	70,87	70,63
C-5″	75,54	75,44
C-6″	66,78	68,19
C-1‴	100,52	100,31
C-2‴	70,35	70,24
C-3‴	69,80	69,64
C-4‴	72,13	71,90
C-5‴	68,27	69,31
C-6‴	17,86	17,65
$-OCH_3$	56,30	55,66
$-OCH_2-$		64,95 e 65,79
-COOH		196,67 e 170,02

O espectro revela ainda a existência de um pico a m/e 359, (Fig.37,pag.65), resultante do anterior por perda de 58 u.m.a., para o qual deverão contribuir os dois fragmentos isómeros apresentados na Fig. 38.

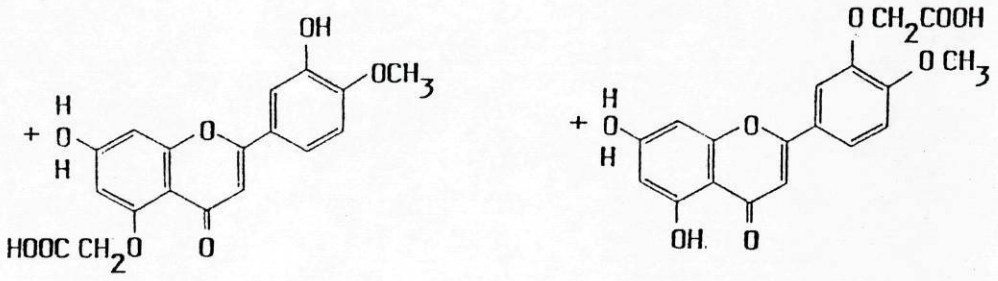
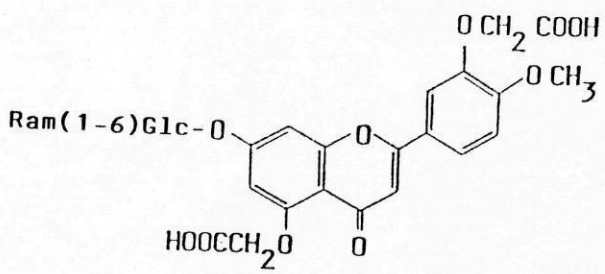


Fig.38

A informação obtida com os espectros de massa FAB e MIKES, CA confirmam para o composto em análise a fórmula molecular $C_{32}H_{36}O_{19}$ e a estrutura prevista pelos restantes métodos de análise estrutural (Fig.39).

A elucidação estrutural deste derivado hidrossolúvel da diosmina foi apresentada no XI Congresso da Sociedade Portuguesa de Química (59).



7-O-Ramnoglucosil-5,3´-bis(carboximetoxi)-4´-metoxiflavona (IV)

Fig.39

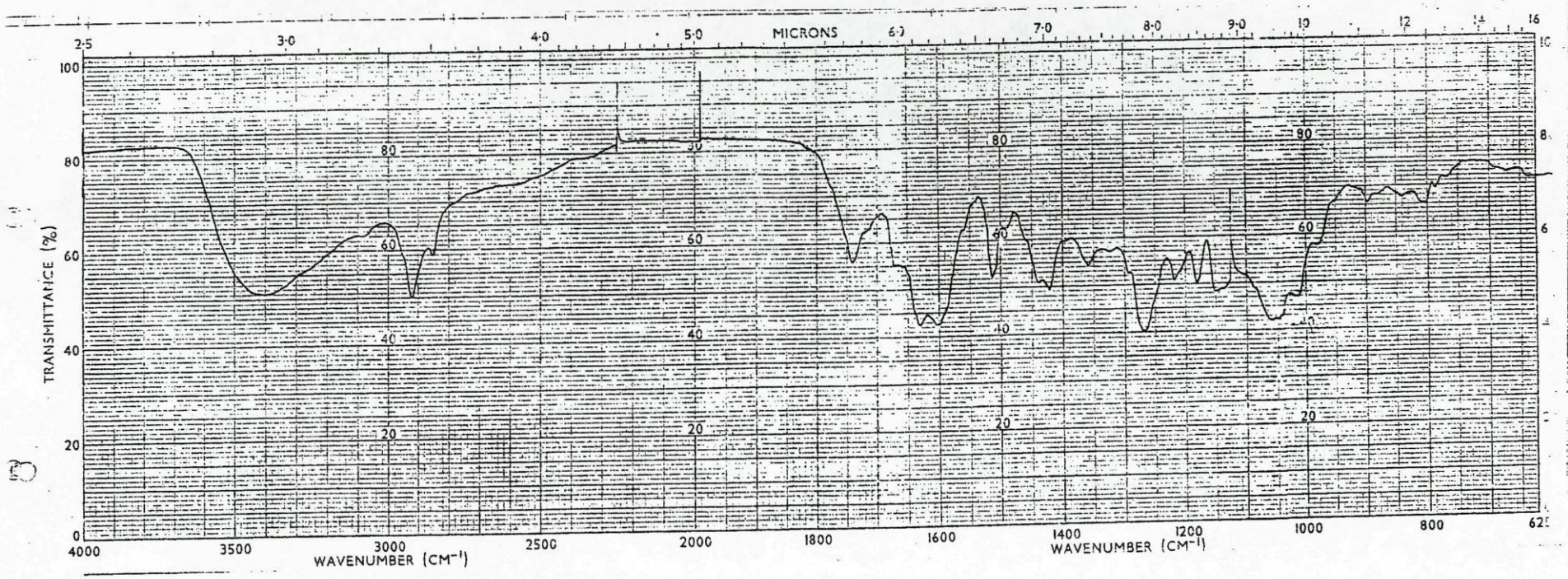
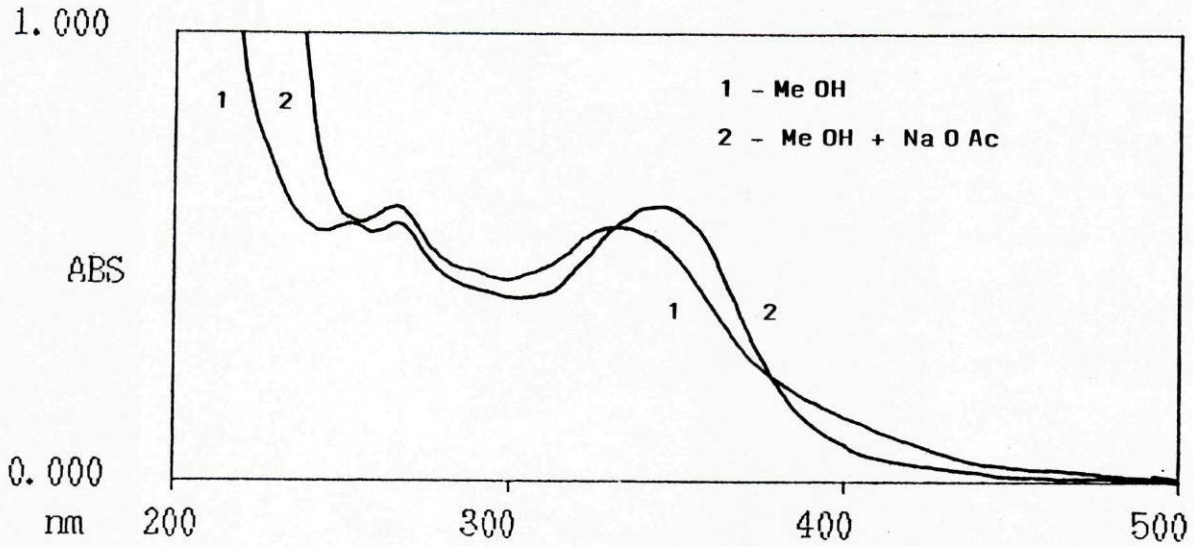


Fig. 29 - Espectro no IV do composto 4



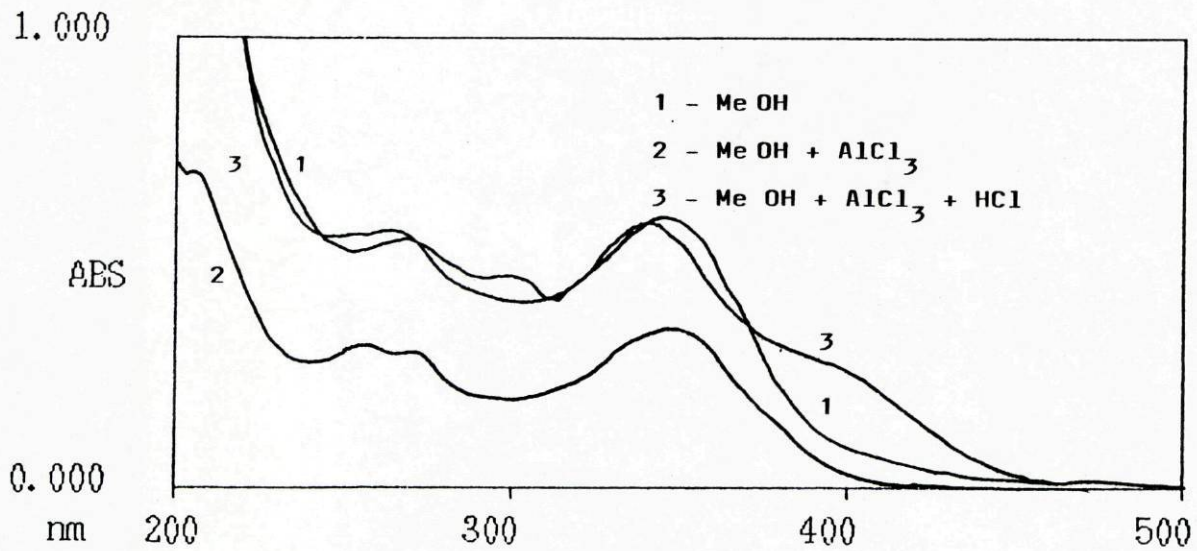


Fig. 30 - Espectros no UV do composto 4

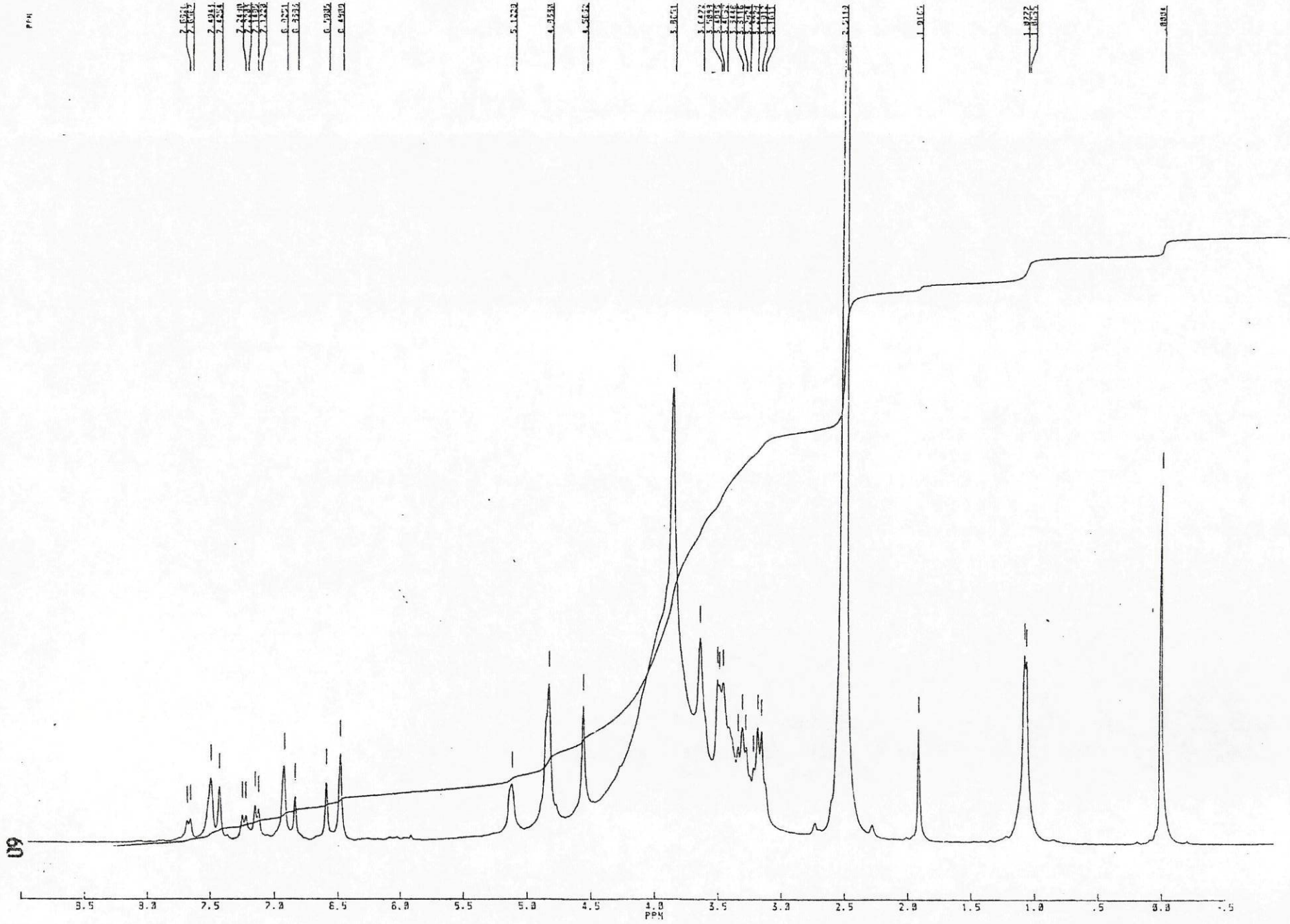


Fig. 31 - Espectro de RMN ^{1}H do composto 4

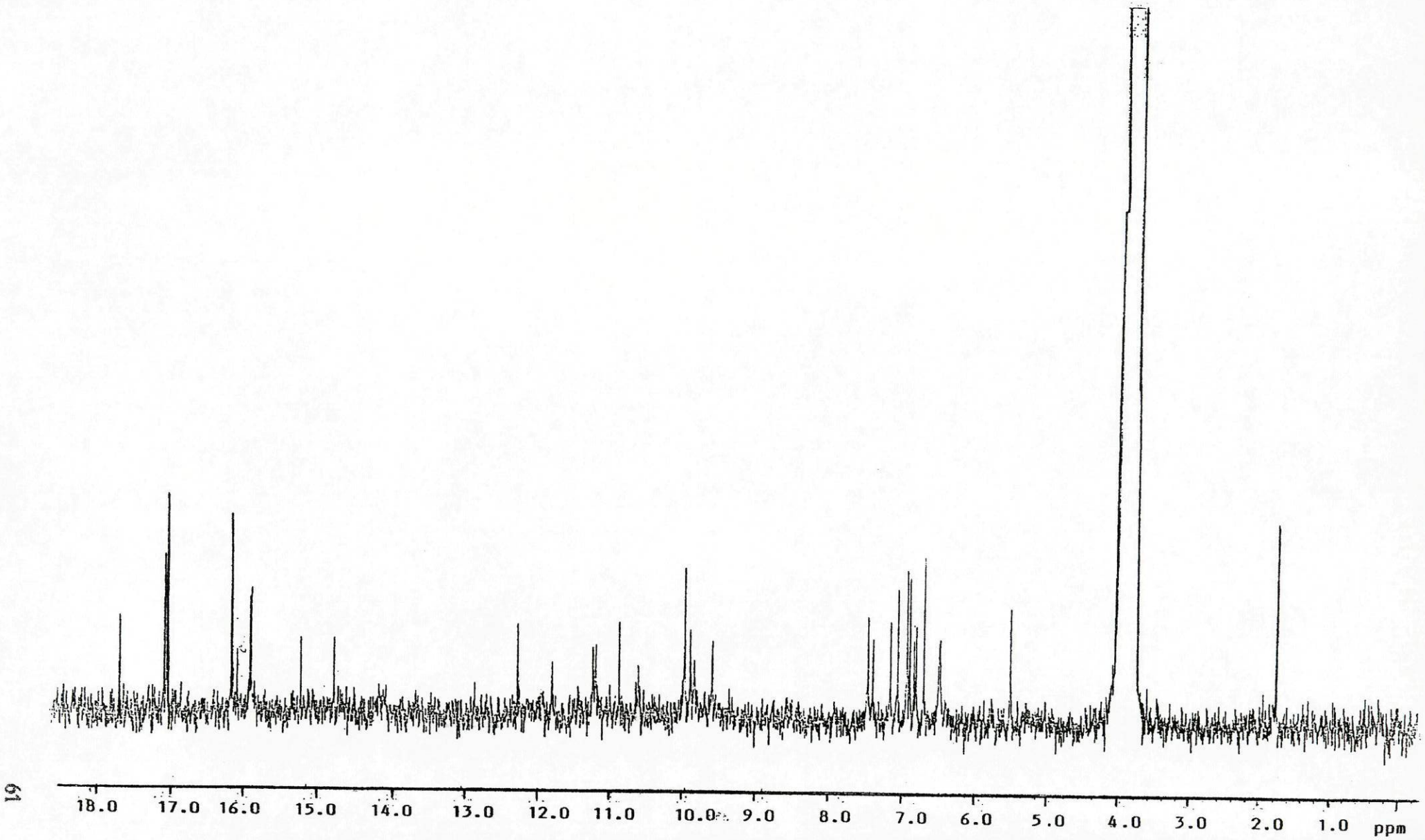


Fig. 32 - Espectro de RMN ^{13}C do composto 4

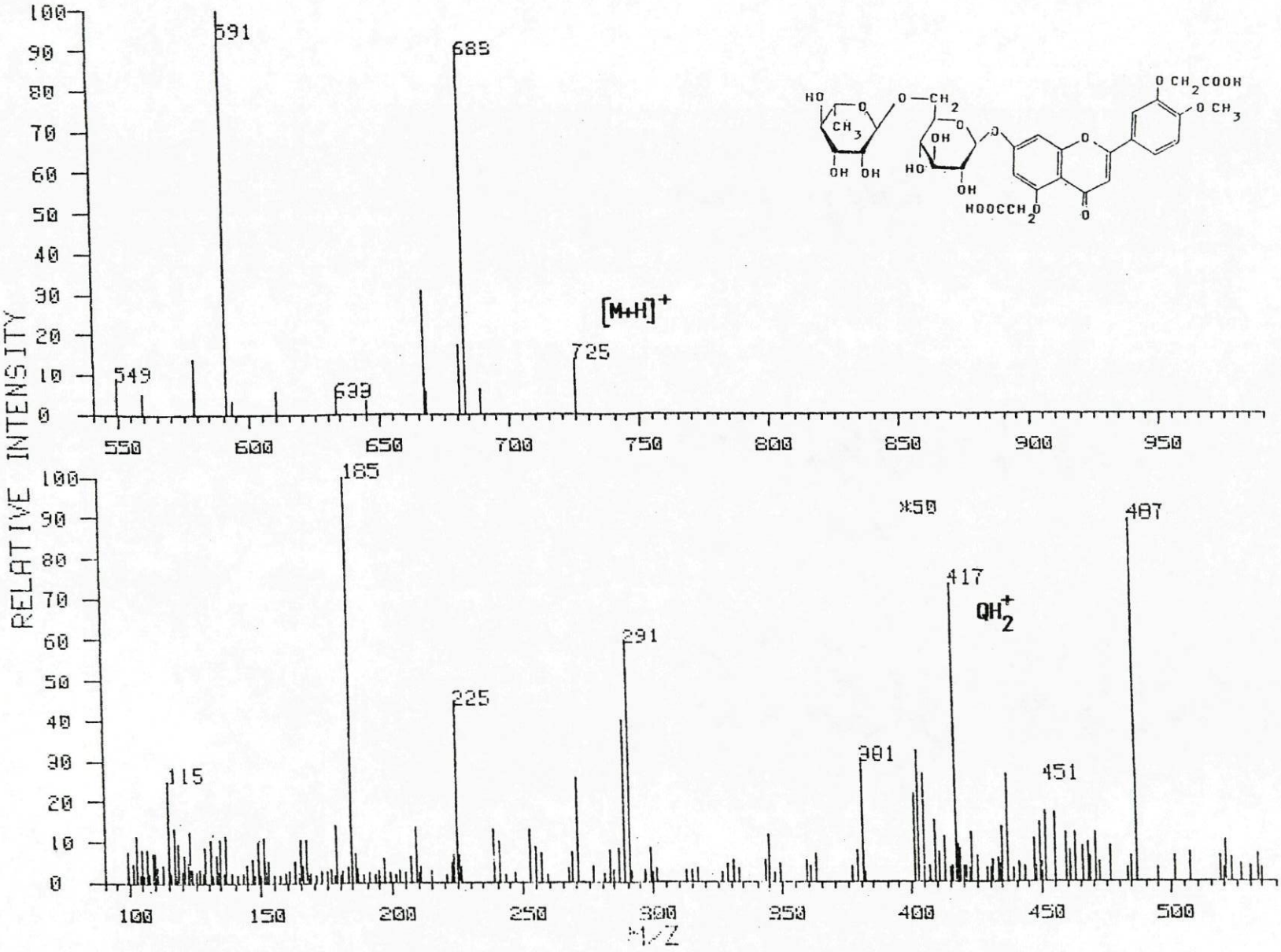


Fig.33 - Espectro de massa FAB de iões positivos do composto 4

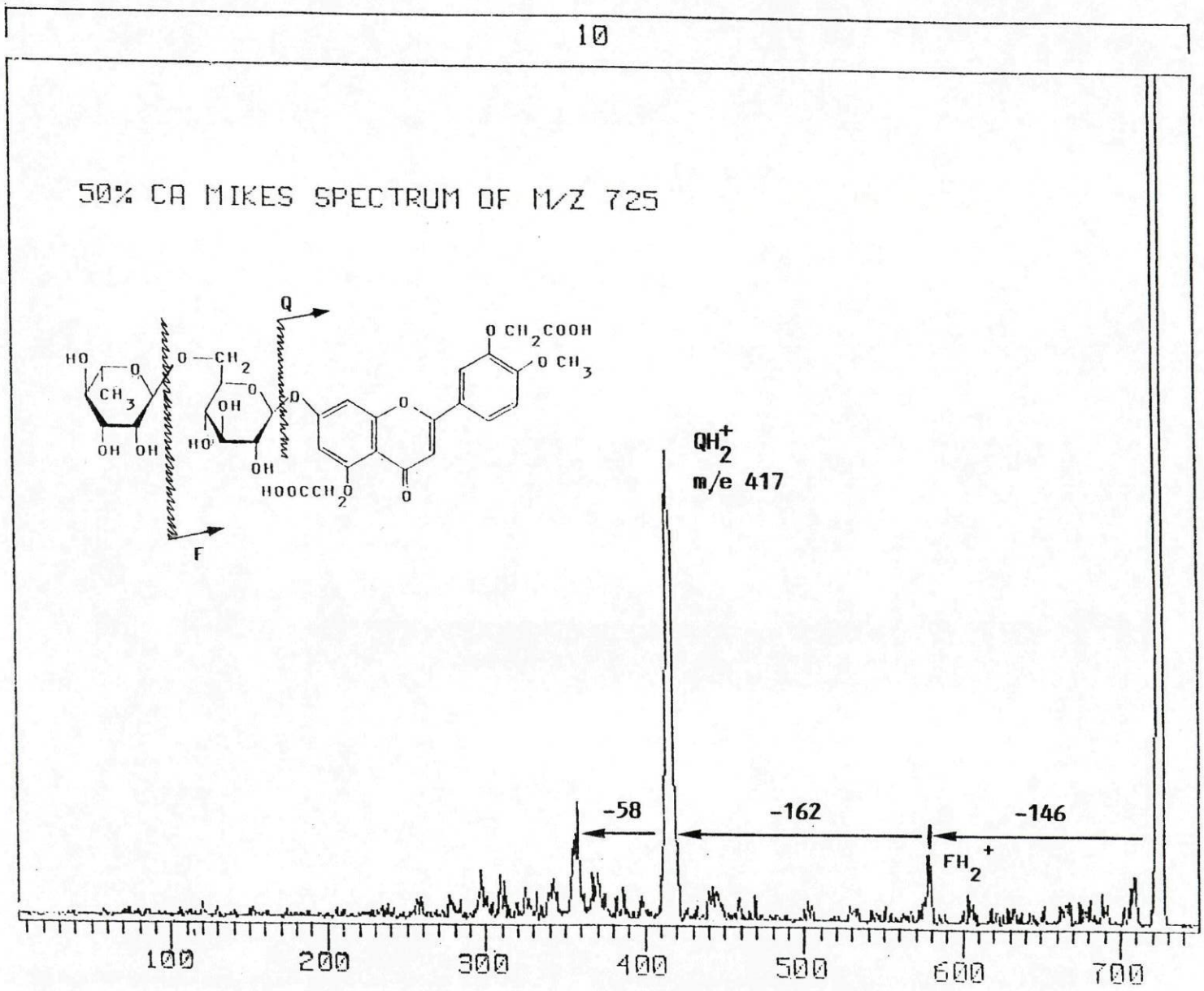


Fig. 34 - Espectro MIKES,CA do ião $[M+H]^+$, de m/e 725, referente ao composto 4

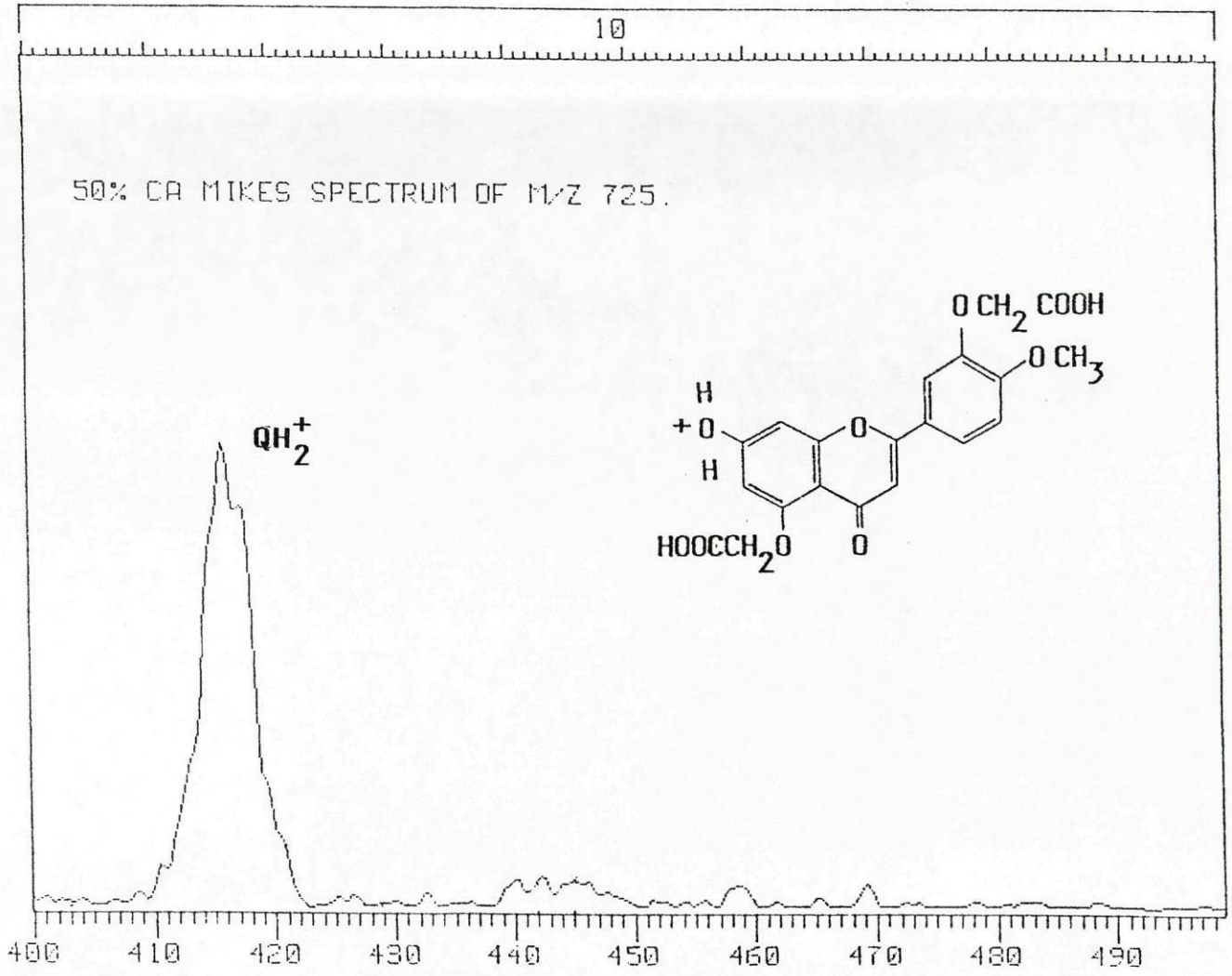


Fig. 35 - Zona do espectro MIKES,CA,do ião $[M+H]^+$ de m/e 725, referente ao composto 4

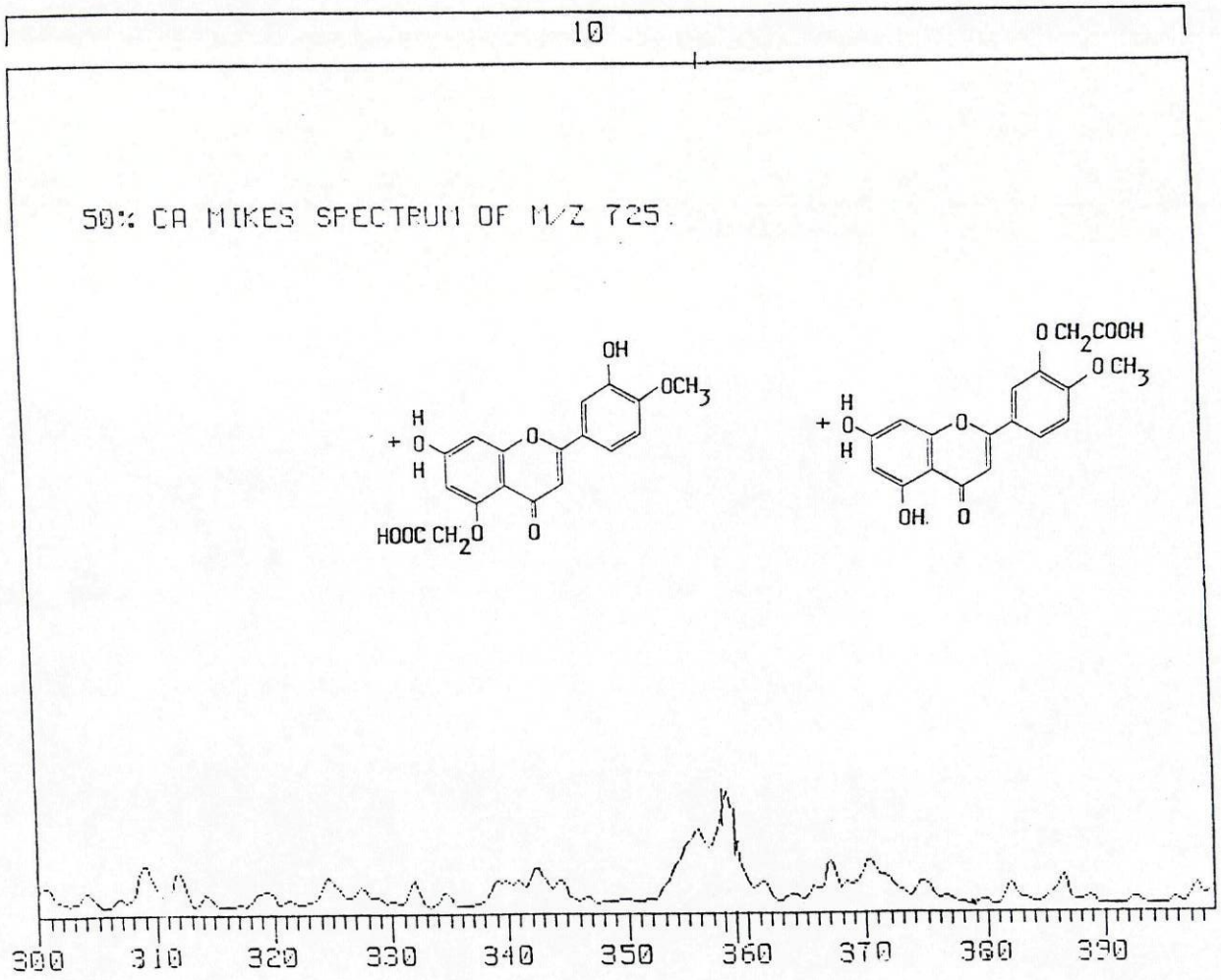


Fig. 37 - Zona do espectro MIKES,CA,do ião $[M+H]^+$ de m/e 725, referente ao composto 4

2.1.5. Determinação da percentagem relativa dos derivados formados nas diferentes experiências

Depois de identificados os constituintes flavónicos resultantes de carboximetilação da diosmina, recorreu-se à HPLC para determinar a percentagem relativa de cada derivado no produto bruto.

Nesta análise utilizou-se para a detecção o comprimento de onda de 254 nm, valor para o qual ambos os derivados apresentam o mesmo valor de log ϵ(3,90).

Os cromatogramas, correspondestes ao DCM resultante das Exp. 2 e 6, (Fig.40,41, pag.67, 68) traduzem as situações mais favoráveis verificadas no estudo da carboximetilação, enquanto o cromatograma correspondente ao DCM resultante da Exp. 10, (Fig. 42, pag.69) mostra uma das situações em que o produto bruto é constituído por menor percentagem de derivados carboximetilados.

O derivado monocarboximetilado em C-3´ foi em todas as experiências o composto que se formou em maior quantidade (50, 81% - 86,71%), enquanto o derivado dicarboximetilado não representou, em qualquer experiência, mais do que 12,34% do produto bruto (Quadro 7).

Quadro 7: Dados comparativos de HPLC relativos às Exp. 2,6 e 10

Composto	% de áreas		
	Exp. 2	Exp.6	Exp.10
Derivado monocarboximetilado em C-3´	86,71	80,87	50,81
Derivado dicarboximetilado	4,91	12,34	11,02
Total:	(91,62)	(93,21)	(61,83)

HED SEP

FILE 1. METHOD 0. RUN 25 INDEX 25

PEAK#	AREA%	RT	AREA BC	
1	0.392	2.08	690	62
2	2.446	2.56	4301	63
3	2.282	4.94	4013	62
4	3.263	5.61	5738	62
5	4.907	6.23	8629	63
6	86.71	15.65	152477	61
TOTAL	100.		175848	

Fig. 40 - Cromatograma (HPLC) referente à análise quantitativa dos constituintes do DCM resultante da Exp. 2

HED SEP

FILE 1. METHOD 0. RUN 27 INDEX 27

PEAK#	AREA%	RT	AREA BC
1	0.305	2.05	842 61
2	0.121	2.53	334 62
3	0.102	2.76	282 63
4	5.605	4.92	15469 62
5	12.343	6.15	34065 63
6	0.65	10.66	1795 61
7	80.873	15.56	223193 61
TOTAL	100.		275980

Fig. 41 - Cromatograma (HPLC) referente à análise quantitativa dos constituintes do DCM resultante da Exp. 6

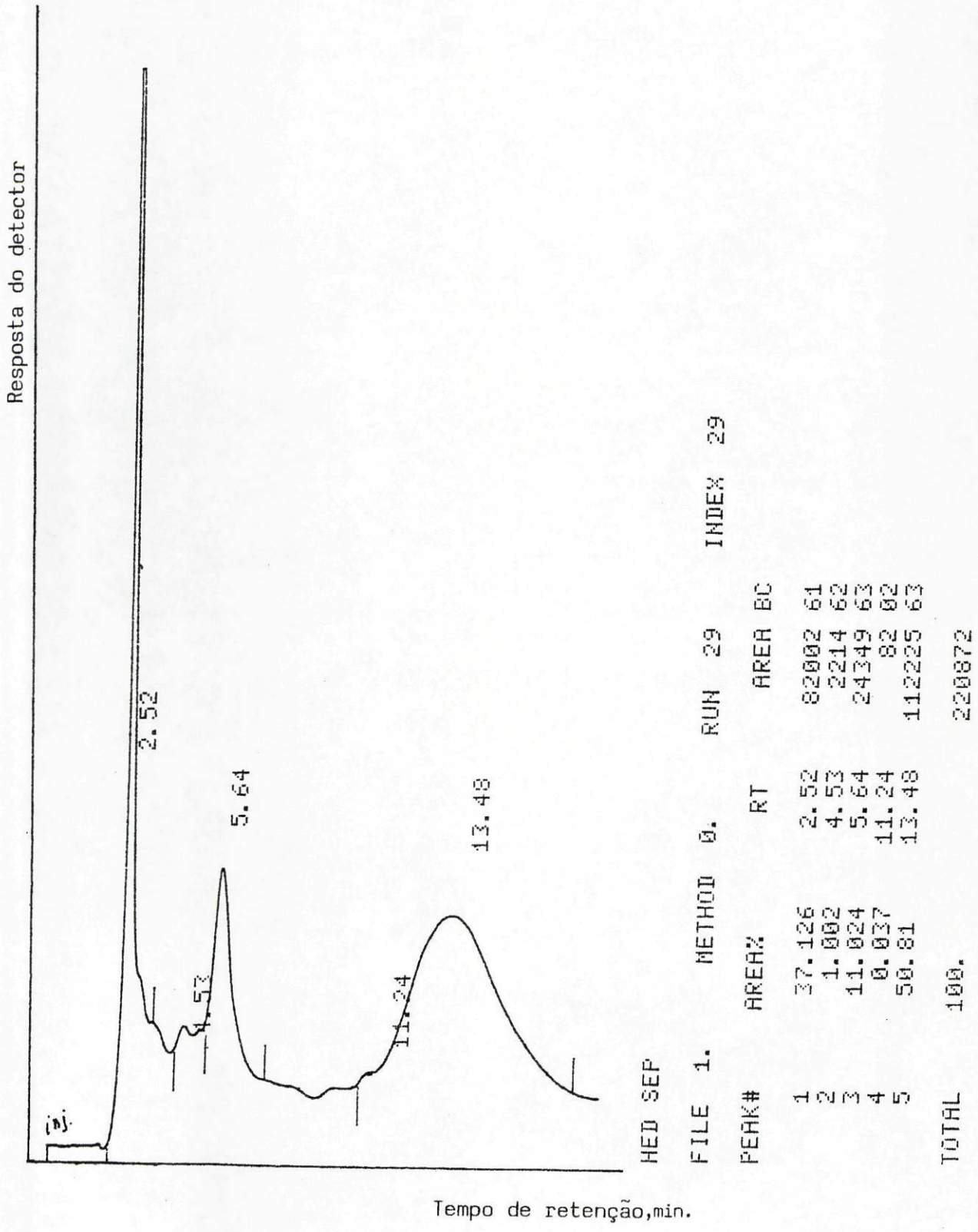


Fig. 42 - Cromatograma (HPLC) referente à análise quantitativa dos constituintes do DCM resultante da Exp. 10

2.1.6. Hidrólise dos derivados monocarboximetilado em C-3′ e dicarboximetilado da diosmina e caracterização da aglíconas resultantes

O método geral de hidrólise ácida para O-glicosilflavonóides (124) que foi inicialmente ensaiado para o derivado monocarboximetilado, mostrou-se inconveniente, pois, a par da rotura da ligação glicosídica, verificou-se a esterificação da função ácida existente na molécula. Este facto pôde ser observado por espectrometria de massa (E M), utilizando como técnica de ionização o impacto electrónico (I E) (Fig 43, pag.71).

Além do ião molecular (M^{+} 372), os fragmentos a m/e 329 e m/e 313 são claramente indicativos de que, naquelas condições reaccionais, o metanol esterifica, pelo menos em parte, a função ácido (125) (Esquema 3, pag.72). Para este composto (VIII), cuja função éster identificámos pela reacção com a hidroxilamina (126) não houve oportunidade de fazer outros ensaios (Fig.44).

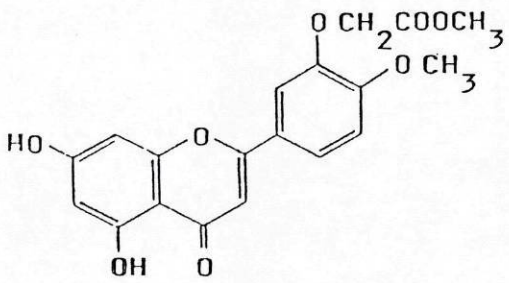


Fig.44

A hidrólise completa dos heterósidos foi conseguida submetendo os compostos a um aquecimento com HCl a 20%, a 125-130°C, durante 50 minutos (Parte experimental). Estas condições foram estabelecidas após realização de vários ensaios, com controlo da reacção por cromatografia em camada fina.

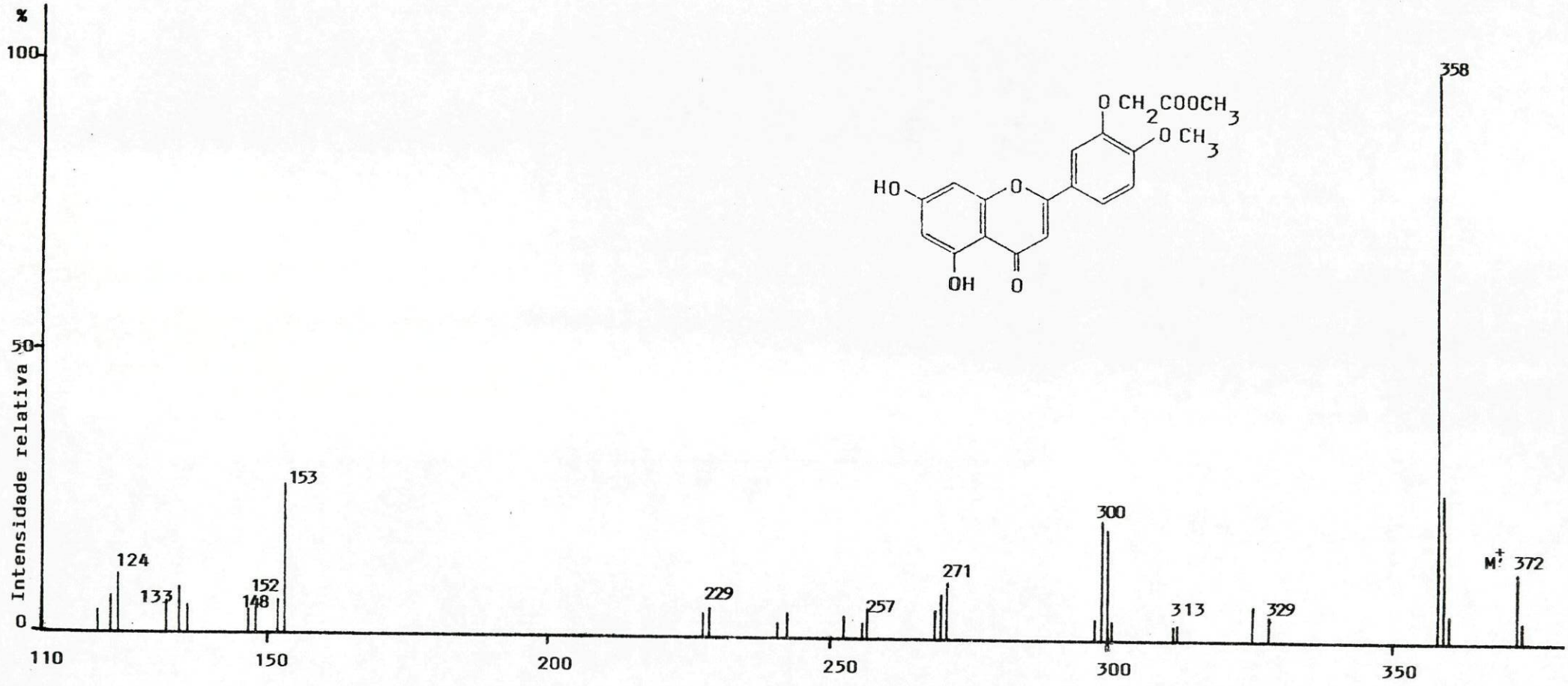
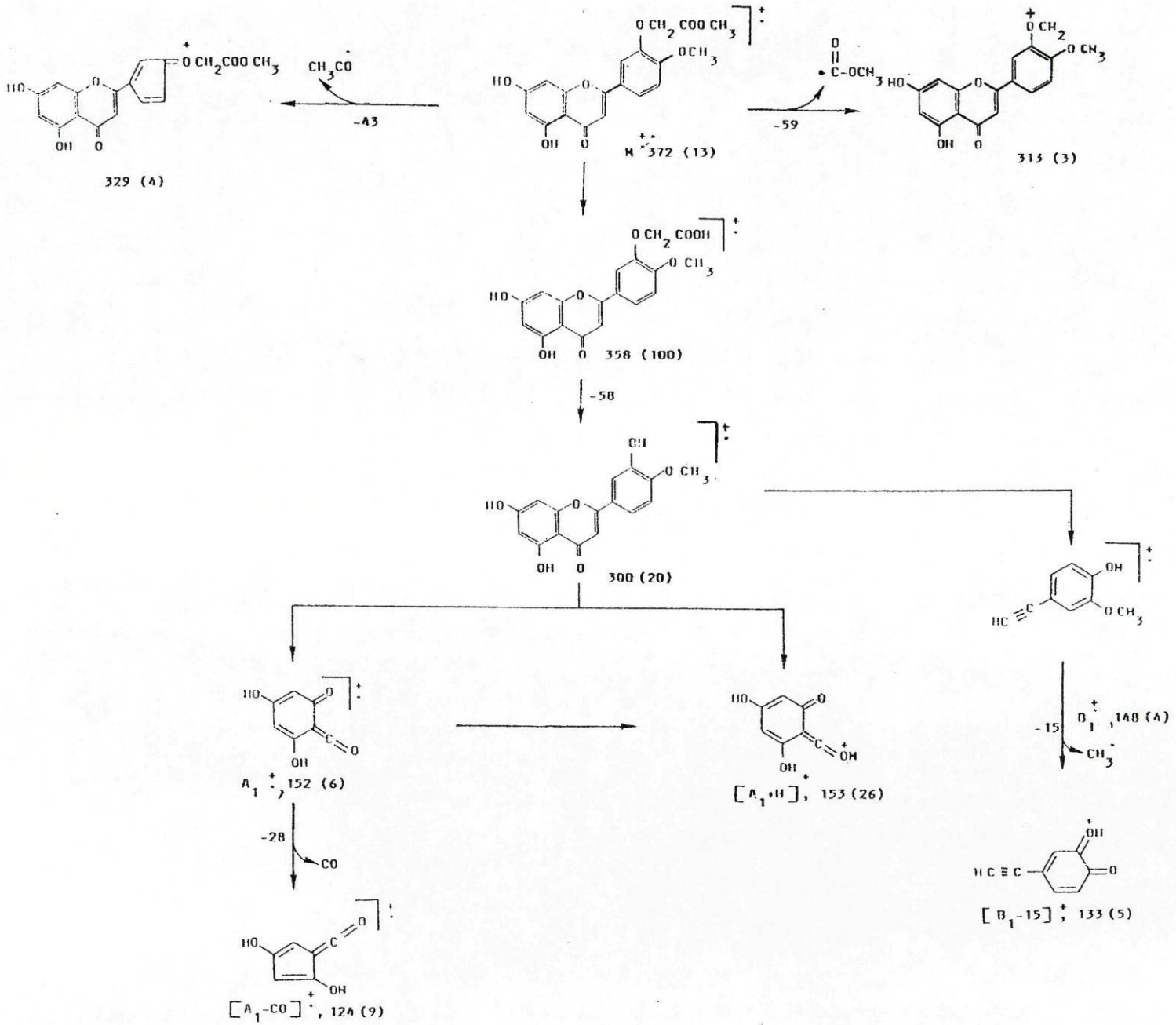


Fig. 43 : Espectro de massa (IE) do composto VIII

(Picos de intensidade relativa superior a 3%)



Esquema 3 - Hipótese interpretativa da fragmentação do composto VIII

AGLICONA RESULTANTE DA HIDROLISE DO DERIVADO MONOCARBOXI-METILADO EM C-3' (IX)

O espectro de IV do composto cristalizado (Fig.45,pag.78) mostrou bandas de estiramento de ligação C=C (anel aromático) em 1610, 1590, 1570 e 1550 cm^{-1}, e em 2930 cm^{-1} uma banda de estiramento de ligação C-H. Mostrou ainda em 1655 cm^{-1} uma banda típica de ligação C=0 do esqueleto flavónico de 5,7 di-hidroxiflavona, em 1165 cm^{-1} uma banda característica do anel benzénico 5-7 dissubstituído, e em 1730 cm^{-1} uma banda de estiramento de ligação C=0 de ácido carboxílico (88,89).

Os espectros de UV em metanol adicionado de cloreto de alumínio e em metanol adicionado de cloreto de alumínio e ácido clorídrico, mostraram-se característicos de uma 5-hidroxiflavona, evidenciando um deslocamento batocrómico da banda I (em MeOH) para a banda Ia (em MeOH+$AlCl_3$+HCl) de 40.0 nm (94). O registo do espectro em metanol antes e após adição de acetato de sódio mostrou um deslocamento de 269,5 para 278,0 nm. Este deslocamento de 8,5 nm é indicativo da existência de um grupo fenólico livre em C-7 (93) (Fig.46, pag.79)(Quadro 8).

Quadro 8 :Absorção no UV do composto **IX**

Solvente e Reagentes	**Máximos de Absorção** λ, nm				
MeOH	342,5		269,5		242,5
MeOH+$AlCl_3$	377,0	352,5	296,0(i)	279,0	260,0
MeOH+$AlCl_3$+HCl	382,5	347,5	294,0(i)	280,0	258,0
MeOH+NaOAc	362,0	311,0		278,0	

(i) - inflexão

Este facto, associado ao resultado obtido em TLC em placa de celulose e usando como fase móvel solução de acido acético a 30% (diminuição do Rf do composto em análise cromatografado comparativamente com o composto inicial), fez admitir ter sido conseguida a hidrólise do composto. Esta hipótese foi confirmada pela análise do espectro de RMN^{1}H que mostrou, para além do desaparecimento dos sinais atribuíveis aos protões dos açúcares, o aparecimento de um singuleto a δ 10,78, referente ao protão do grupo fenólico em C-7. Neste espectro (Fig 47,pag. 80) pode ainda observar-se um singuleto a δ 12,87, correspondente ao grupo fenólico em C-5, um singuleto a δ 3,88 originado por 3 protões correspondente aos protões do grupo-OCH_3 em C-4´ e os restantes sinais referentes aos protões do núcleo flavónico (96). O espectro não mostrou qualquer sinal correspondente ao protão fenólico em C-3´, mas um singuleto a campo mais alto (δ 4,83), atribuível aos protões metilénicos do grupo carboximetilo (98,99)

O espectro de RMN^{13}C (Fig 48, pg.81)confirma o desaparecimento dos sinais atribuíveis aos carbonos dos açúcares e comparado com o espectro da diosmetina (101) (Quadro 9, pag.75) mostrou mais dois sinais a δ 169,84 e δ 64,89. Destes sinais, o primeiro (δ 169,84) é atibuível a um carbono carboxílico (103), enquanto o segundo (δ 64,89) pode resultar do carbono do grupo O-$\underline{C}H_2$- (104).

Quadro 9: Comparação de dados de RMN^{13}C da diosmetina e do composto IX

Atomo de Carbono	Diosmetina δ(ppm) (DMSO)	Composto IX .δ(ppm) (DMSO)
C-2	163,60	162,89
C-3	104,00	103,71
C-4	181,80	181,64
C-5	161,70	161,27
C-6	99,00	98,76
C-7	164,40	164,03
C-8	94,00	93,91
C-9	157,09	157,18
C-10	103,70	103,71
C-1′	123,30	122,55
C-2′	113,10	112,08
C-3′	146,90	147,19
C-4′	151,20	152,05
C-5′	112,10	110,65
C-6′	118,70	120,36
-OCH3	55,80	55,75
-OCH2		64,89
-COOH		169,84

Prosseguiu se a análise do composto por espectrometria de massa (IE).

As flavonas foram dos primeiros flavonóides a ser analisados por espectrometria de massa (IE) A sua fragmentação por IE ocorre fundamentalmente por dois mecanismos, correspondendo o mecanismo I a uma clivagem retro- Diels-Alder (Fig 49) (127).

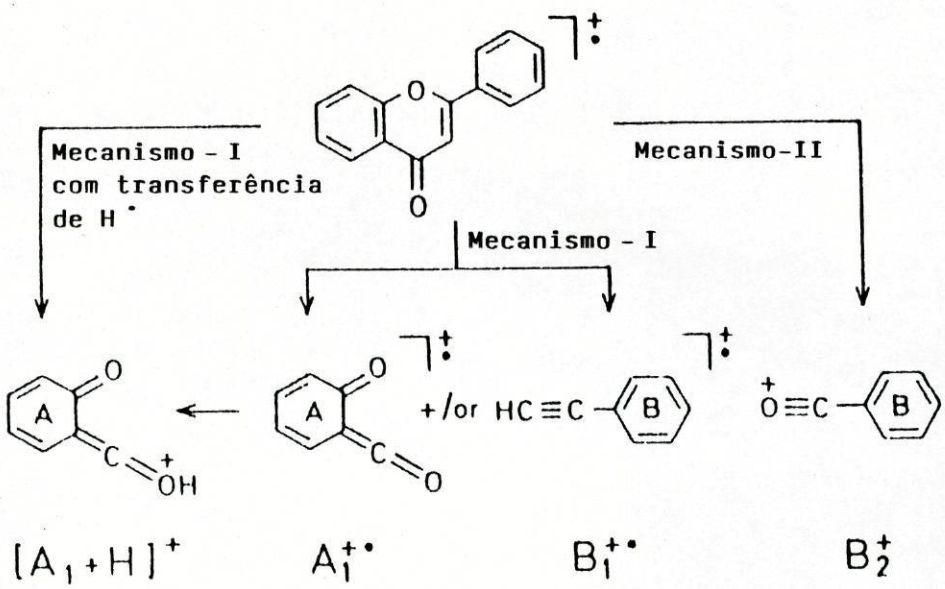


Fig.49

O espectro de massa (IE) do composto em estudo (Fig.50,pag.82) mostrou um íão molecular ($M^{+\cdot}$) a m/e 358,correspondente à fórmula de estrutura esperada. A análise do espectro mostrou , entre outros , os picos a m/e 314 e m/e 206, que justificam a substituição no anel B (Esquema 4,pag .83). O pico a m/e 314 corresponde a uma perda de CO_2, enquanto o pico a m/e 206 corresponde a uma fragmentação do esqueleto flavónico pelo processo I (retro-Diels-Alder) (Fig 51).

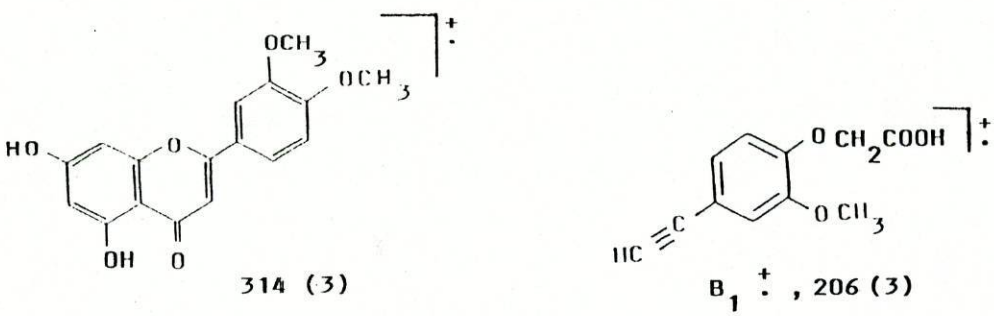


Fig. 51

Os resultados obtidos levaram a atribuir ao composto em análise a estrutura que se apresenta na Fig 52.

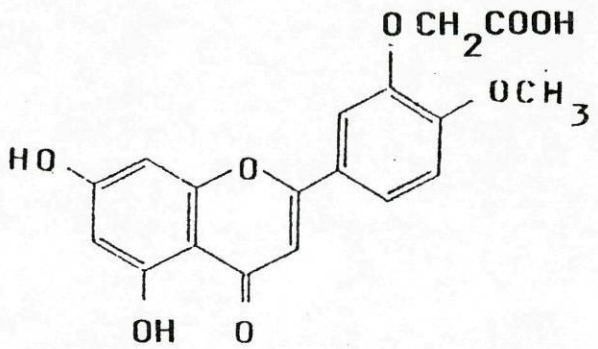


Fig.52

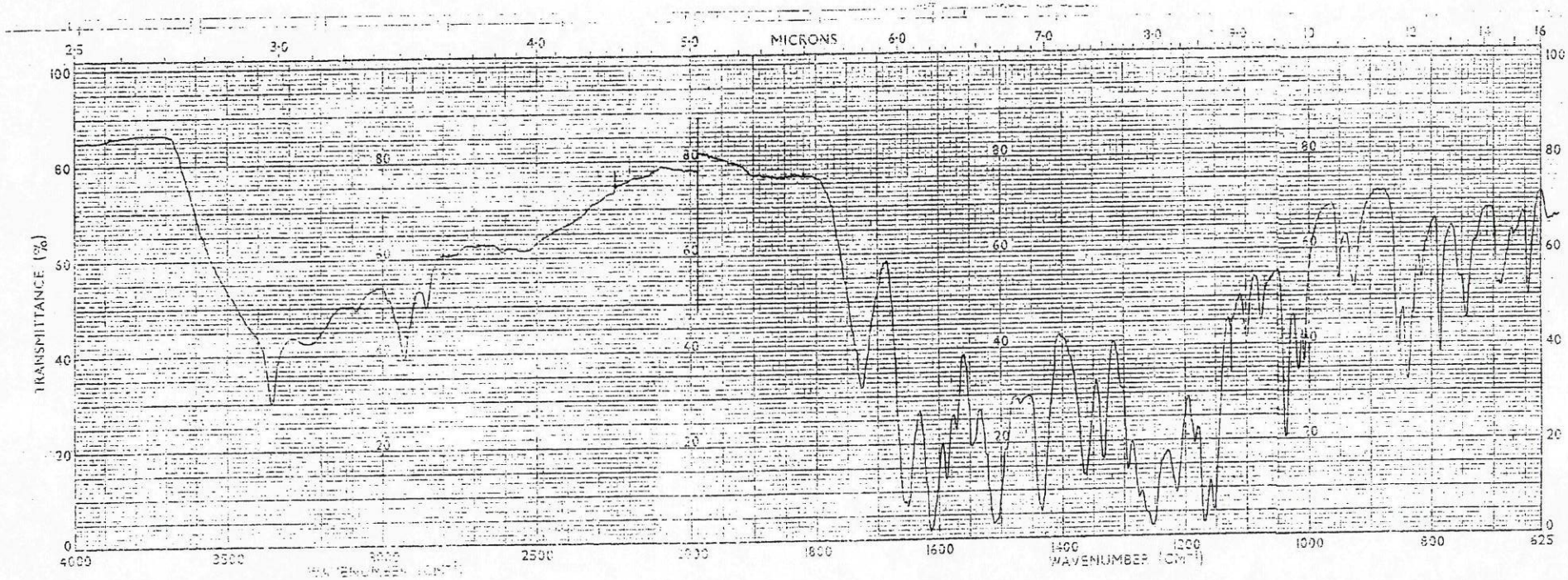
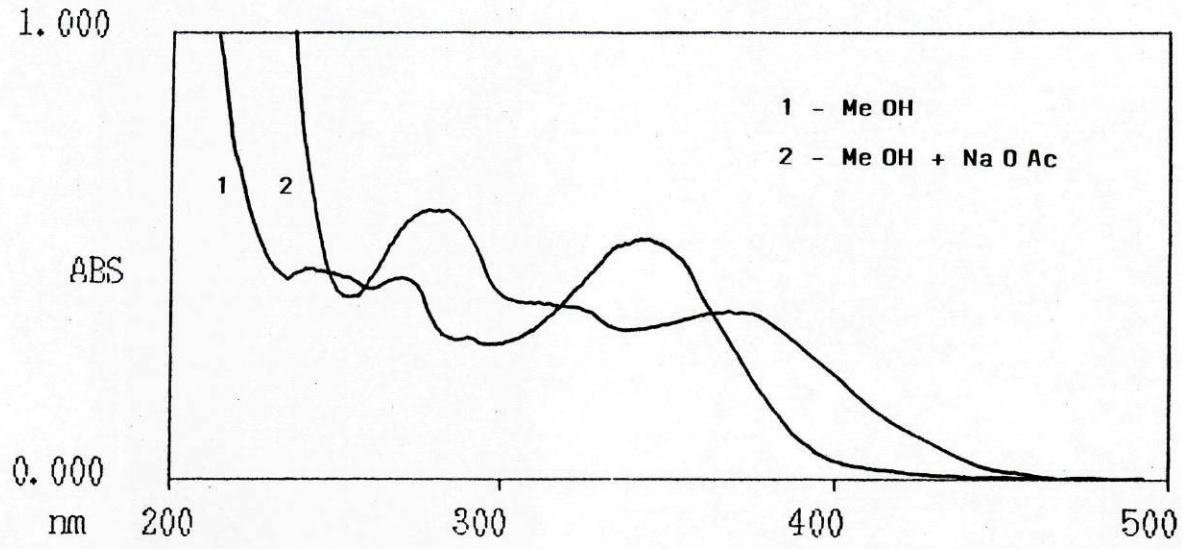


Fig. 45 - Espectro no IV do composto IX



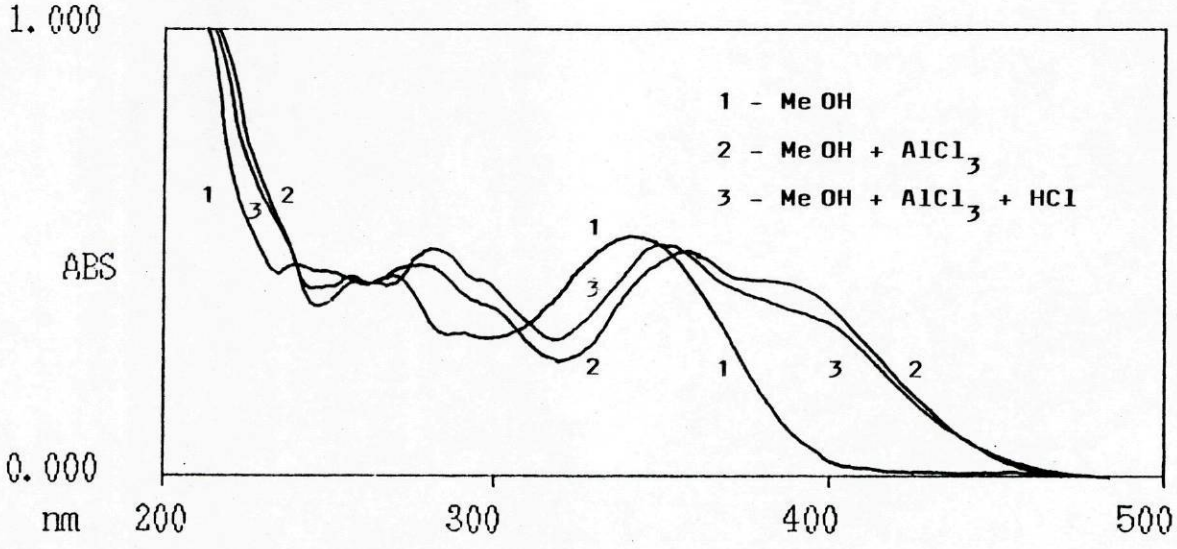


Fig. 46 - Espectros no UV do composto IX

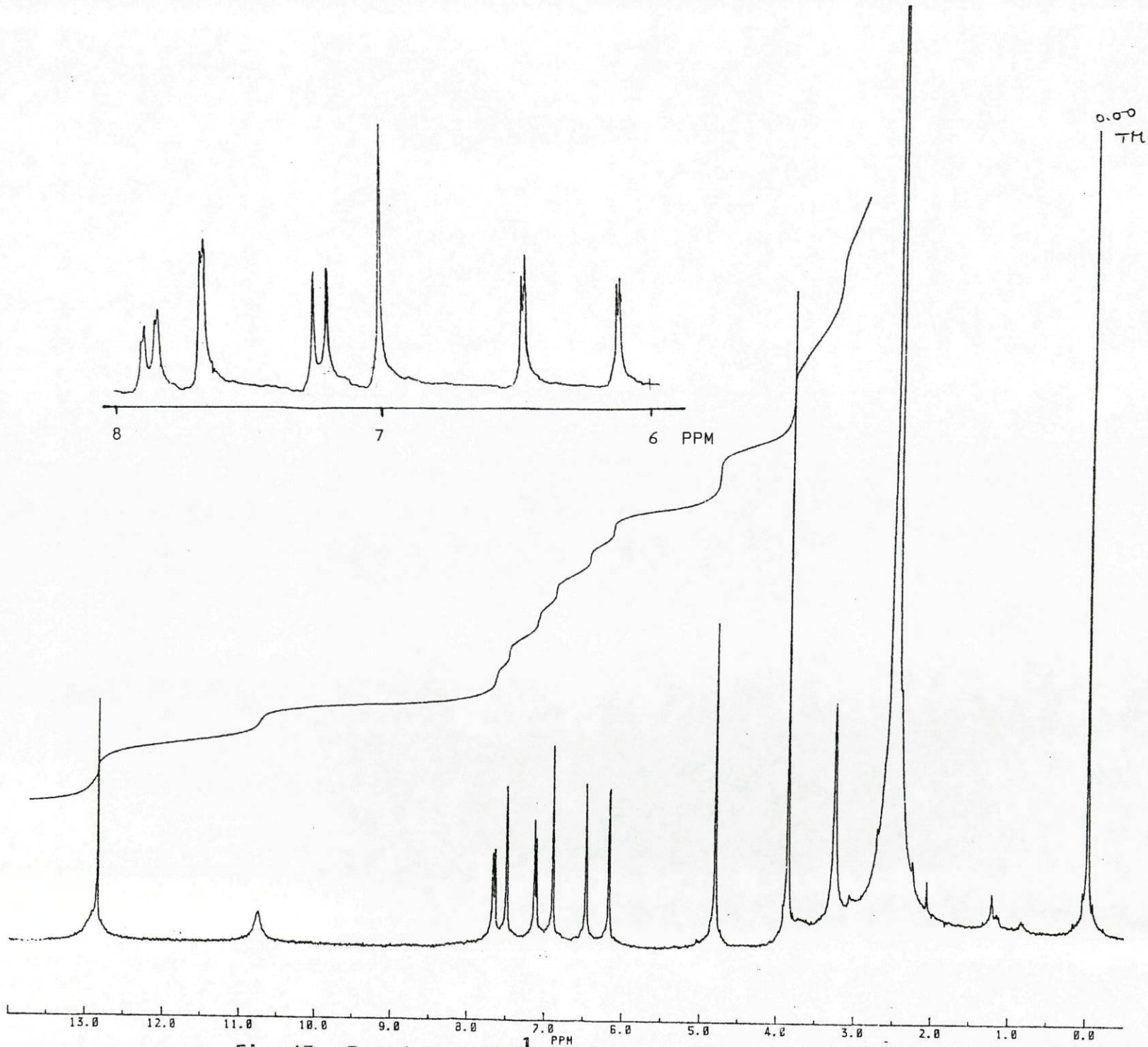


Fig. 47 - Espectro de RMN ^{1}H do composto IX

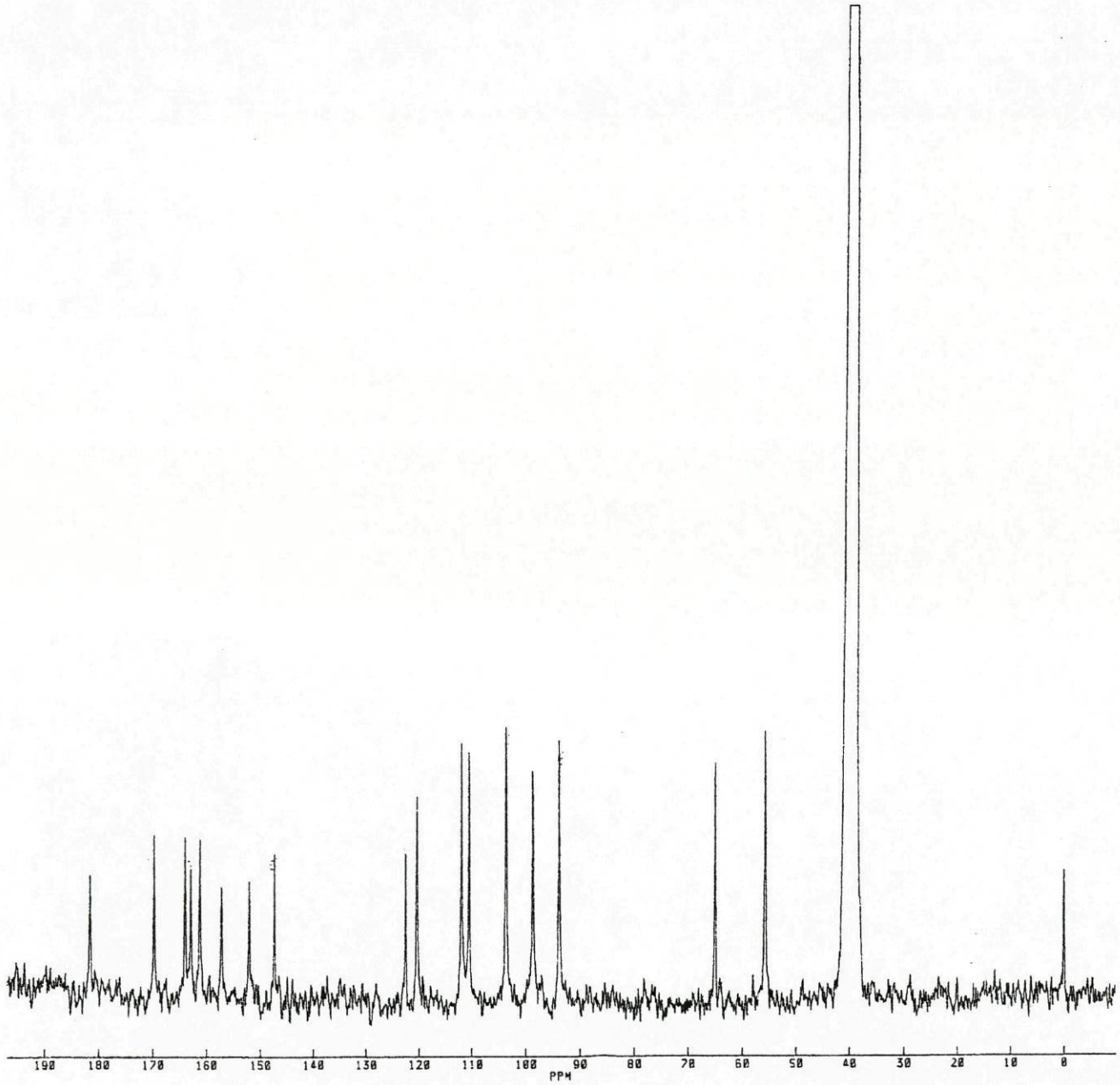


Fig. 48 - Espectro de RMN ^{13}C do composto IX

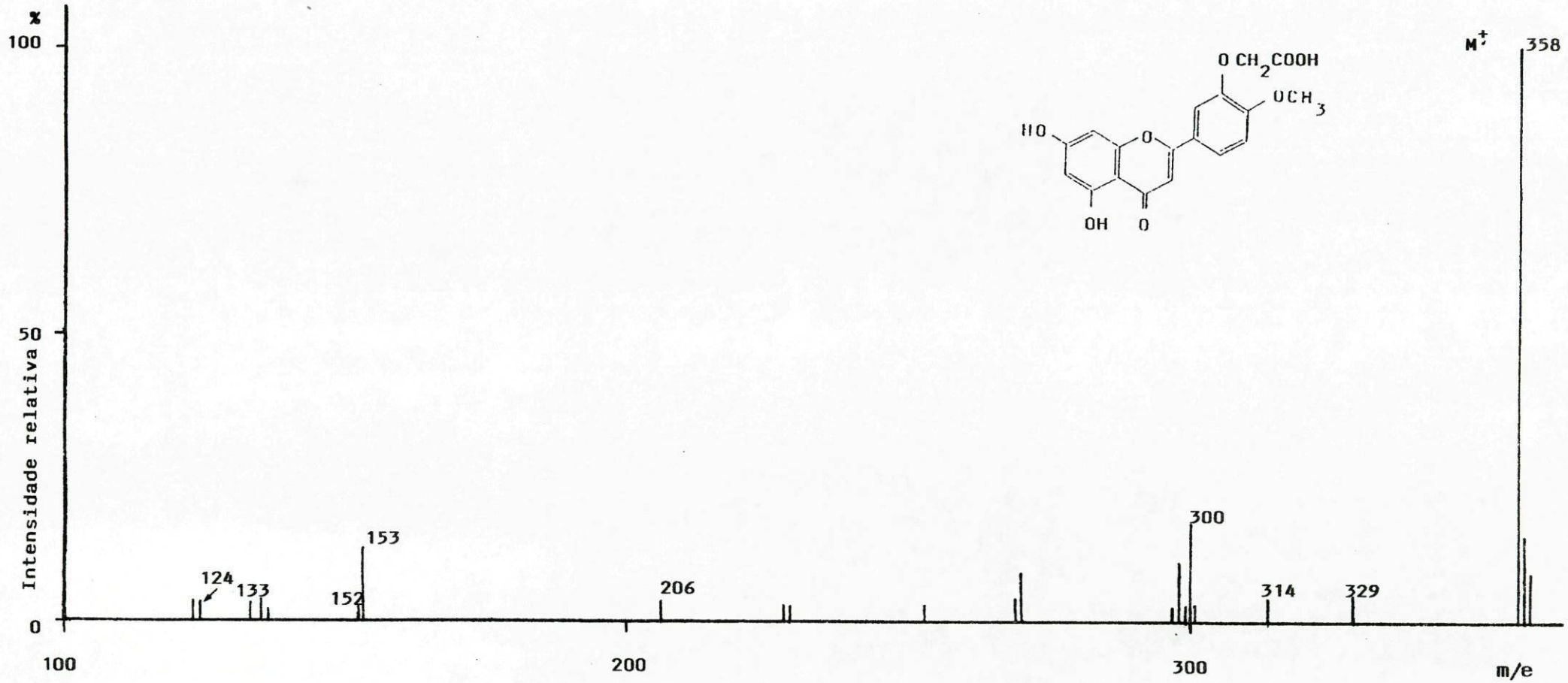
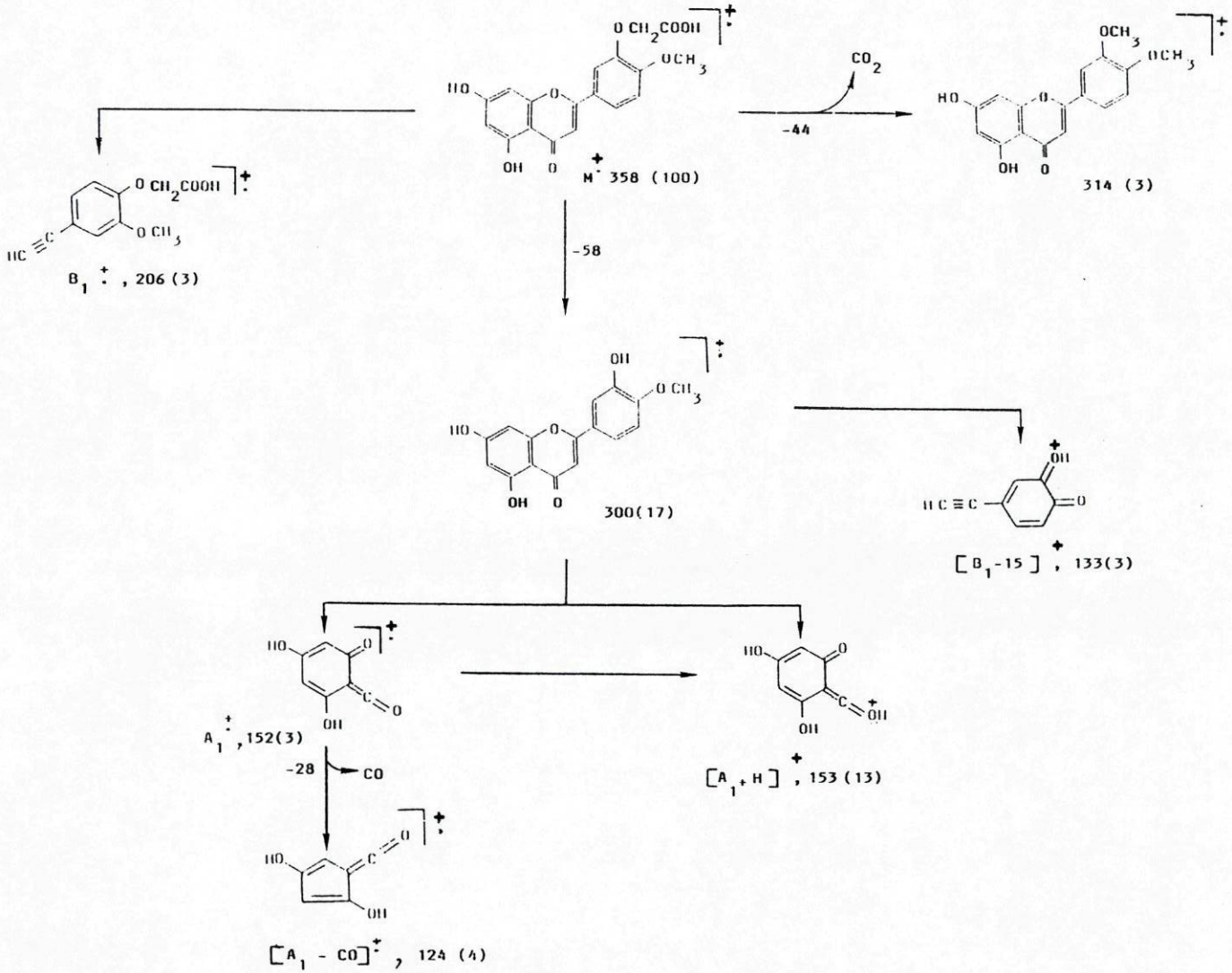


Fig. 50 : Espectro de massa (IE) do composto IX

(Picos de intensidade relativa superior a 3%)



Esquema 4 - Hipótese interpretativa de fragmentação do composto IX

AGLICONA RESULTANTE DA HIDROLISE DO DERIVADO DICARBOXIMETILADO (X)

O espectro de UV em metanol mostrou-se característico de uma flavona dissubstituida em C-3´e C-4´ (91-92). Após adição de acetato de sódio, o novo espectro mostrou um deslocamento batocrómico na banda II, de 8 nm, indicativo da existência de um grupo fenólico livre, em C-7. (93) O espectro em metanol adicionado de cloreto de alumínio e ácido clorídrico não evidenciou alteração significativa na localização das bandas de absorção, o que levou a inferir que o grupo fenólico em C-5 se encontrava ocupado (94), (Fig.53, pag.87),(Quadro 10).

Este facto foi confirmado pela observação do espectro de IV do composto recristalizado (Fig.54,pag.88) que, além do desaparecimento da banda atribuível aos grupos OH alcoólicos, mostrou uma banda a 1630 cm^{-1}, característica da ligação C=0 de 7-hidroxiflavonas (88). O espectro mostrou ainda uma banda forte a 1730 cm^{-1}, característica da ligação C=0 de ácido carboxílico (89).

Quadro 10: Absorção no UV do composto X

Solvente e Reagentes	**Máximos de Absorção** λ,nm		
MeOH	341,5	270,0	255,0
MeOH+$AlCl_3$	352,0	279,0	260,0
MeOH+$AlCl_3$+HCl	348,0	281,0	257,5
MeOH+NaOAc	358,0	313,5	278,0

A análise estrutural do composto foi continuada com a observação do espectro de massa (IE). Este espectro, apesar de apresentar um pico molecular muito pouco intenso, o que é característico de poliácidos (128), mostrou numerosos picos elucidativos da estrutura do composto (Fig.55,pag 89) (Esquema 5,pag.90)

Os iões de m/e 373 (perda de $CH_3C\dot{O}$) e m/e 372 (perda de CO_2), são claramente indicativos da substituição no núcleo flavónico. Para este último pico poderão contribuir as duas estruturas isómeras que se apresentam na Fig. 56.

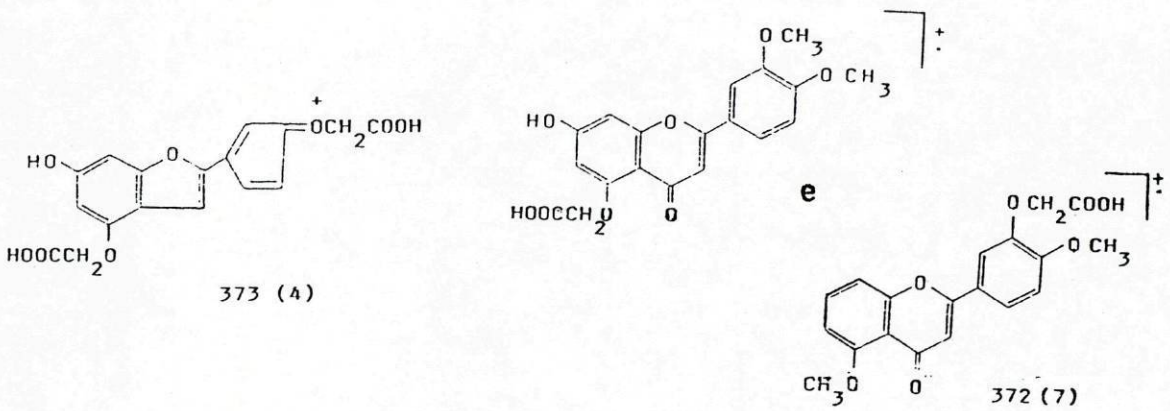


Fig.56

A partir do ião molecular ($M^{+\cdot}$ 416), a perda de 58 u.m.a. origina um pico a m/e 358, que é o pico base. A partir deste verifica-se uma quebra típica de ácido carboxílico (129), correspondendo a uma perda de CO_2H (m/e 313), e uma perda de CO_2 (m/e 314). Além destas fragmentações há ainda a assinalar as clivagens características do núcleo flavónico com formação dos iões $A_1^{+\cdot}$, $[A_1+H]^+$, $A_1^{+\cdot} - CO$, $B_1^{+\cdot}$ e $B_1^{+\cdot} - CH_3^{\cdot}$ (127)

Em face do exposto pôde atribuir-se ao composto em análise a seguinte estrutura.(Fig.57).

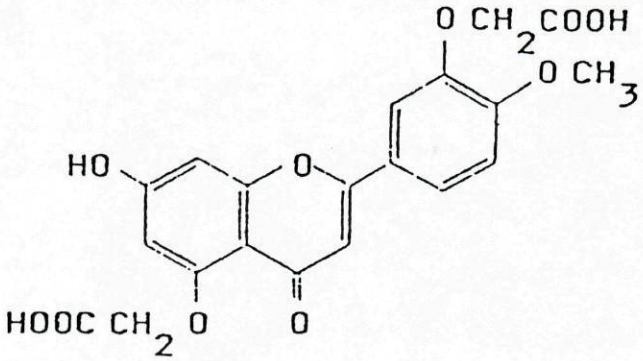
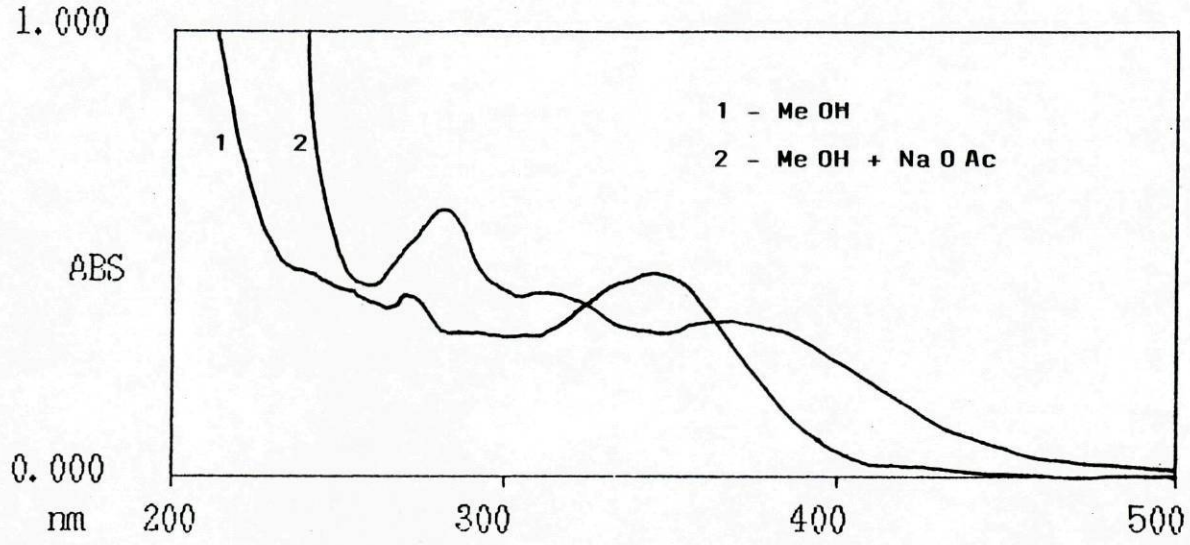


Fig.57



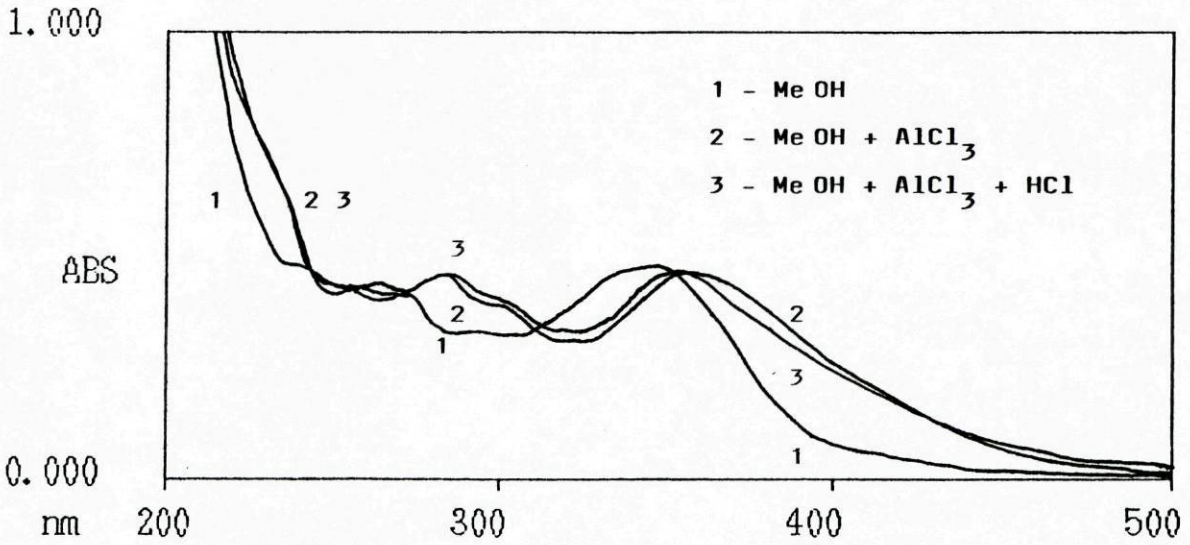


Fig. 53 - Espectros no UV do composto X

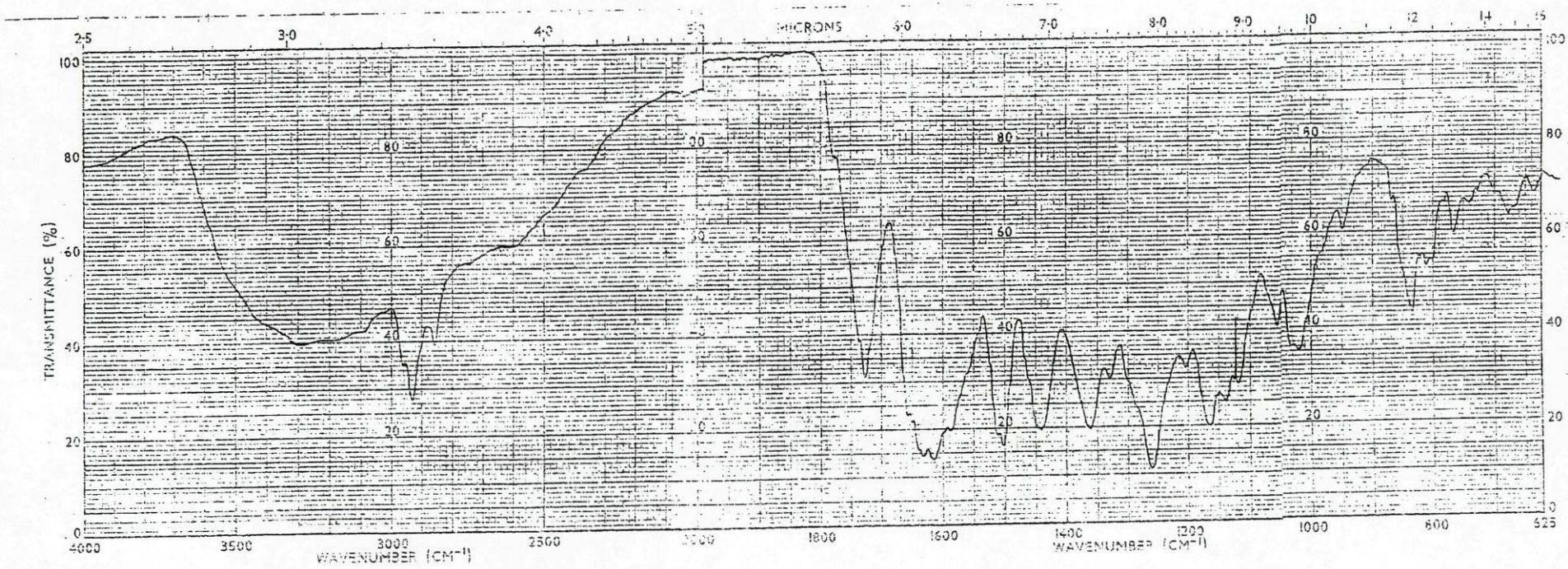


Fig. 54 - Espectro no IV do composto X

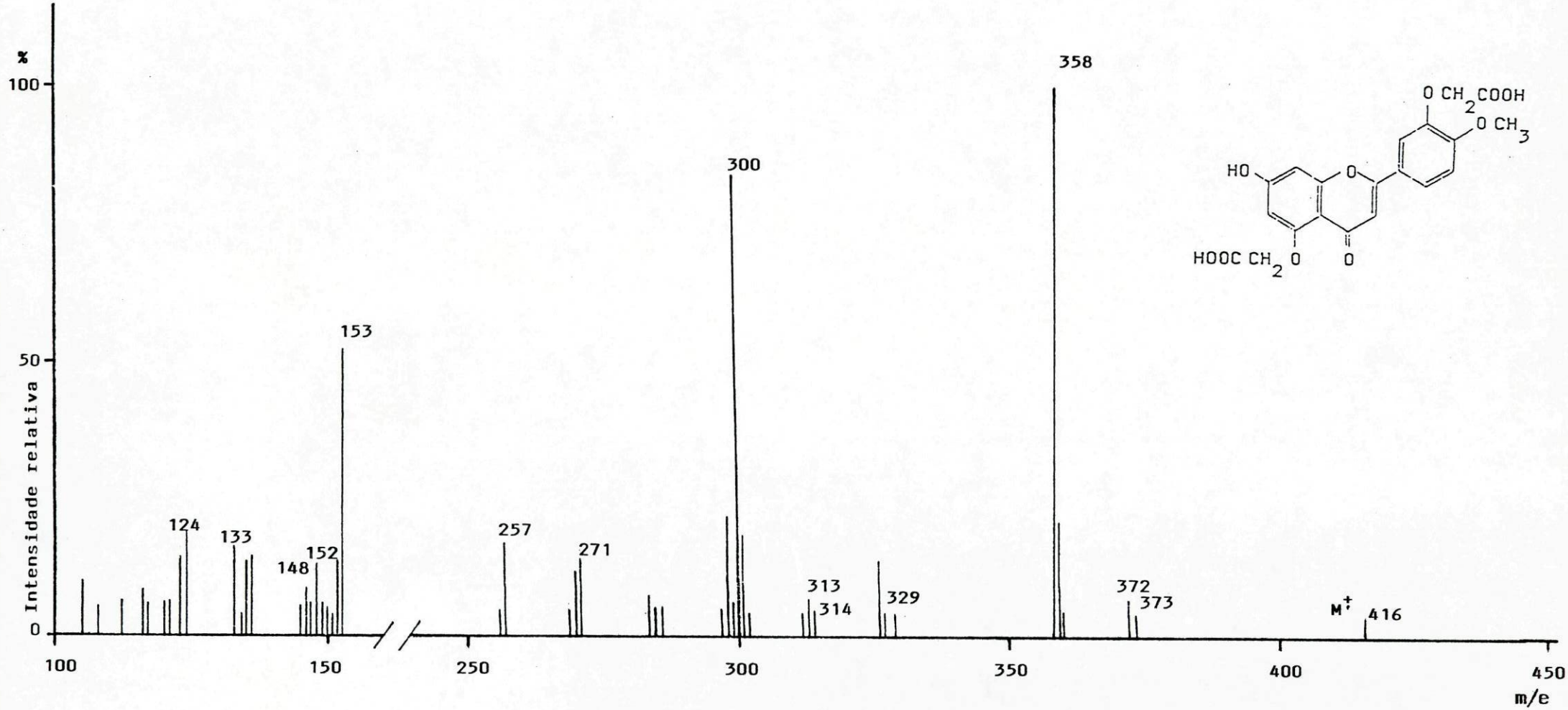
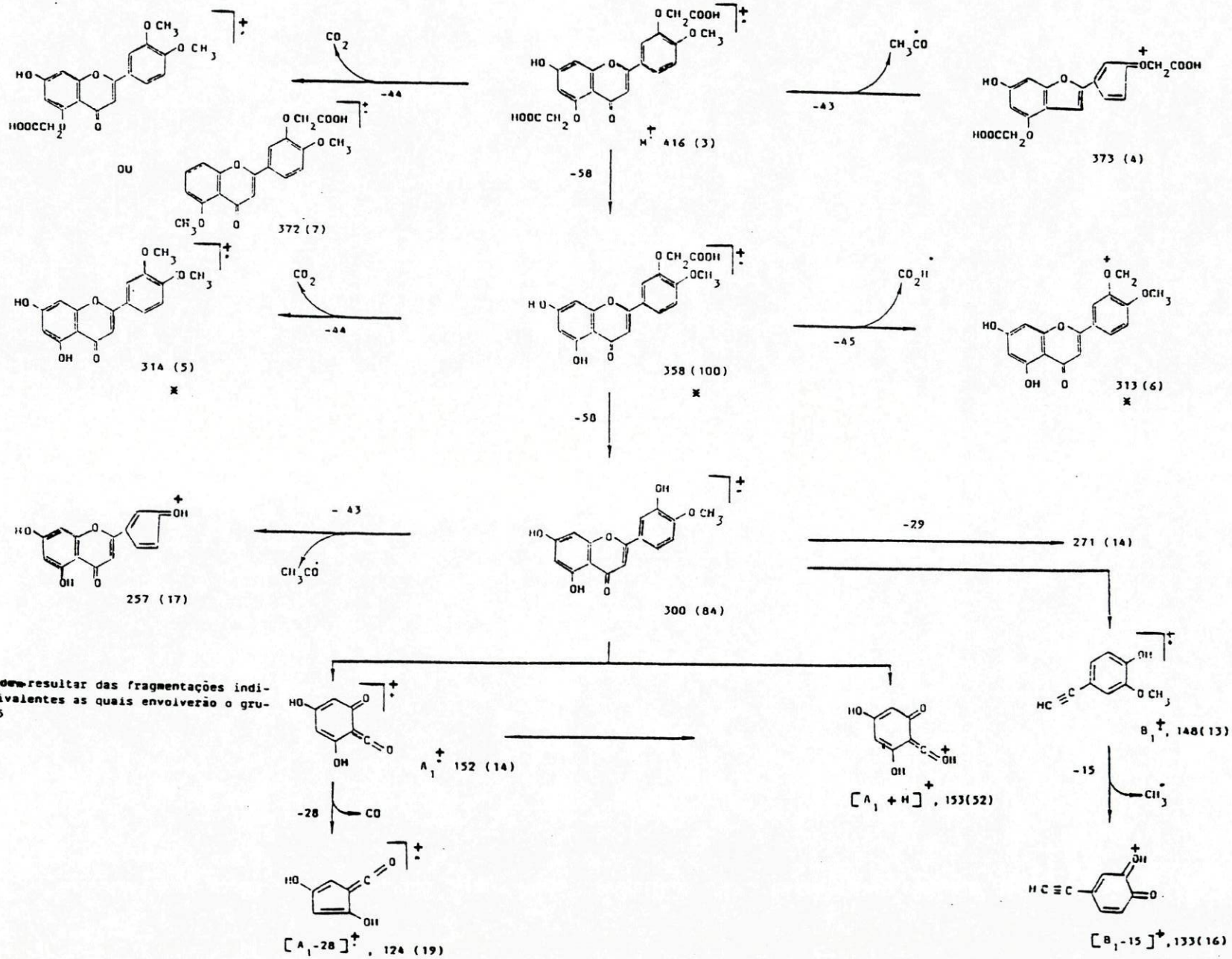


Fig. 55 : Espectro de massa (IE) do composto X

(Picos de intensidade relativa superior a 3 %)



Os picos de m/e assinalados podem resultar das fragmentações indicadas ou de fragmentações equivalentes as quais envolverão o grupo substituinte da posição C-5

Esquema 5 - Hipótese interpretativa da fragmentação do composto X

2.2. 2-HIDROXIETILAÇÃO DA DIOSMINA

2.2.1. Estudo das condições de reacção

Foi novamente tendo como base uma transformação descrita para a rutina (60) que se estudou a 2-hidroxietilação da diosmina.

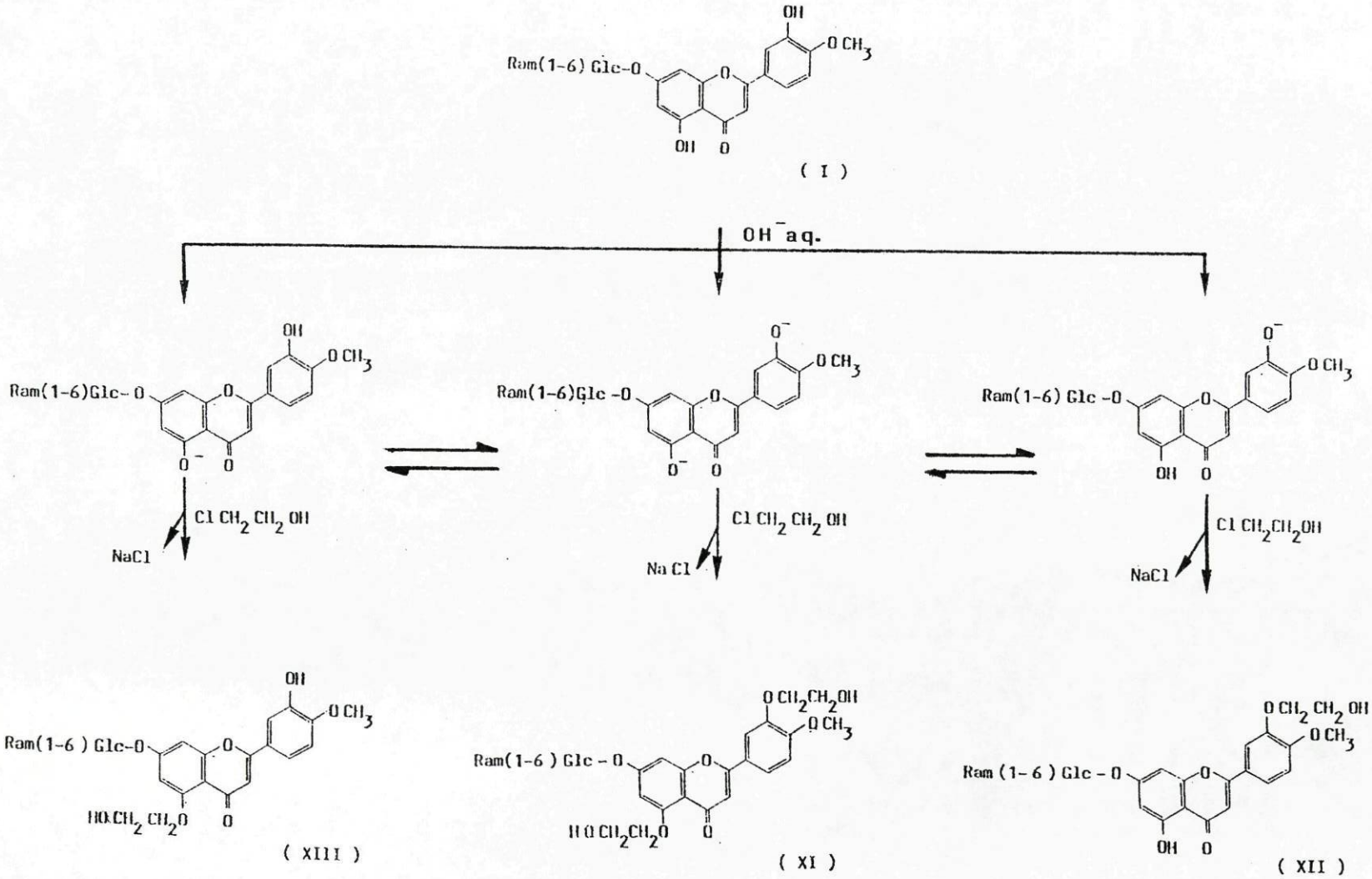
A 2-hidroxietilação das funções fenólicas da diosmina pode fornecer teoricamente três compostos: o derivado mono (2-hidroxietilado) em C-3'(XII), o derivado mono (2-hidroxietilado) em C-5 (XIII) e o derivado 2-hidroxietilado em C-5 e C-3' (XI). (Esquema 6,pag.92).

Entretanto, em face do que já foi referido àcerca da reactividade dos grupos fenólicos da diosmina (66) e dos resultados obtidos no estudo da carboximetilação deste flavonóide, admitiu-se, desde logo, a hipótese de não se isolar o derivado 2-hidroxietilado em C-5. Tal não aconteceu, porém, como se verá, uma vez que foi possível isolar e caracterizar os três derivados acima referidos.

A diosmina, depois de transformada no seu sal sódico, foi posta a reagir com o 2-cloroetanol, aquecendo-se a mistura durante um período de 5-8 horas. Esta solução foi submetida a um tratamento semelhante ao utilizado para a obtenção do produto bruto no caso da carboximetilação (Esquema 2, pag.14). O resíduo obtido, agora designado por DHE, forneceu a massa do produto bruto resultante da 2-hidroxietilação da diosmina.

Com base num raciocínio semelhante ao referido para a obtenção dos derivados carboximetilados, pag.15 alíneas a) e b), e em face da experiência obtida com aqueles compostos, iniciou-se o estudo da 2-hidroxietilação da diosmina trabalhando com uma quantidade estequiométrica de 2-cloroetanol relativamente à diosmina sódica para a reacção nos dois grupos fenólicos. Seguidamente, tentou-se melhorar as condições reaccionais por modificação do pH da solução inicial e variação da quantidade de 2-cloroetanol.

As experiências realizadas encontram-se resumidas no Quadro 11, pag. 93.


Ram(1-6) Glc-O
OH
O CH3
OH O
(I)
OH⁻ aq.
Ram(1-6)Glc-O
O⁻
NaCl
Cl CH2 CH2 OH
HO CH2 CH2 O
(XIII)
(XI)
(XII)

ESQUEMA 6

Exp. nº / Condições de reacção	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Diosmina g (mol)	2,20 (0,0036)								
NaOH g (mol)	0,5 (0,013)	0,6 (0,015)	0,6 (0,015)	0,6 (0,015)	0,6 (0,015)	0,6 (0,015)	0,8 (0,020)	0,6 (0,015)	0,6 (0,015)
pH	12,1	12,3	12,3	12,3	12,3	12,3	12,6	12,3	12,3
$ClCH_2CH_2OH$ ml(mol)	0,5 (0,0075)	0,5 (0,0075)	0,6 (0,0089)	0,7 (0,0104)	0,8 (0,0119)	1,0 (0,0149)	0,5 (0,0075)	0,7 (0,0104)	0,7 (0,0104)
pH	11,9	12,2	12,1	12,0	11,9	11,7	12,5	12,0	12,0
Temperatura (º C)	60-63	60-63	60-63	60-63	60-63	60-63	60-63	70-73	80-83
Tempo de aquecimento (horas)	8	6,5	6	5	5	8	5	5	5
R_1 (g)	0,13	-	-	-	-	0,24	-	-	-
DHC (g)	1,70	1,92	2,01	2,17	1,98	1,54	2,31	2,28	2,25

QUADRO 11 - Condições reaccionais usadas nas diferentes experiências referentes à 2-hidroxietilação da diosmina

A análise deste Quadro 11 mostra que:

a) a reacção completa da diosmina com 2-cloroetanol na proporção estequiométrica 1: 2, (relativamente à diosmina dissódica) foi conseguida a pH=12,2 (Exp. 21) ;

b) para o mesmo pH inicial da solução da diosmina (pH=12,3), ao ser aumentada a quantidade de 2-cloroetanol (Exp. 22,23, 24 e 25), observou-se:

- diminuição do tempo de reacção e aumento da massa de DHE (Exp. 22 e 23), tendo-se obtido o melhor resultado a pH=12,0, com um excesso de 0,003 mol (39,6%) de 2-cloroetanol (Exp. 23)

- diminuição da massa do produto bruto nas Exp. 24 e 25, realizadas a pH<12,0

- diosmina por reagir, (R1), ao ser utilizado um excesso de 100% de 2-cloroetanol (Exp.25). Nesta experiência, o pH da mistura reaccional, ao baixar para 11,7, não permitiu que a diosmina se mantivesse na forma sódica para poder reagir totalmente.

c) na Exp. 26, realizada em meio mais alcalino e fazendo a diosmina sódica reagir com 2-cloroetanol na proporção de 1:2 (pH=12.5), foi conseguida a maior massa de produto bruto e um dos menores tempos de reacção;

d) a Exp. 23 foi repetida a temperaturas superiores (70-73^{o}C e 80-83^{o}C), sem que tenha sido observado aumento do DHE ou diminuição do tempo de reacção (Exp. 27 e 28).

2.2.2. Análise do produto bruto resultante das diferentes experiências

O estudo analítico do produto bruto resultante das diferentes experiências foi feito em TLC, utilizando vários adsorventes e diferentes fases móveis. O sistema que conduziu a uma melhor separação era constituído por placas de celulose desenvolvidas em solução aquosa de ácido acético a 30% (v/v).

A revelação dos cromatogramas, utilizando luz UV (366 nm) antes e depois de submeter a placa à acção de vapores de amónia ou de a pulverizar com solução metanólica de cloreto de alumínio a 5% (71,72,73), mostrou a existência de duas manchas para o DHE correspondente à Exp. 26 (Quadro 12), e três manchas para o DHE obtido nas restantes experiências (Quadro 13).

Quadro 12: Características cromatográficas das manchas **a** e **b** referentes ao DHE resultante da Exp.26

Mancha	Detecção			Rf	
	UV366nm	Vap. de amónia (UV 366nm)	$AlCl_3$ (UV 366nm)	(a)	(b)
a	azul fluorescente	amarela fluorescente	azul fluorescente	0,76	0,70
b	castanha escura	amarela	amarela fluorescente	0,51	0,58

Rf (a): em placa de celulose desenvolvida em ácido acético: água (30:70)

Rf (b): em placa de celulose desenvolvida em ácido acético: água (50:50)

Quadro 13: Características cromatográficas das manchas **a**, **ax** e **b** referentes ao DHE resultante de qualquer das restantes experiências

Mancha	Detecção			Rf	
	UV(366nm)	Vap. amónia (UV366nm)	$AlCl_3$ (UV366nm)	(a)	(b)
a	azul fluorescente	amarela fluorescente	azul fluorescente	0,77	0,73
ax	azul-clara fluorescente	amarela fluorescente	azul-clara fluorescente	0,68	0,66
b	castanha escura	amarela	amarela fluorescente	0,52	0,57

Rf (a): em placa de celulose desenvolvida em ácido acético: água (30:70)

Rf (b): em placa de celulose desenvolvida em ácido acético: água (50:50)

Os resultados obtidos mostraram que o DHE referente à Exp. 26 possuía uma composição diferente da dos restantes. Este produto bruto deveria conter um componente flavónico com um grupo fenólico livre em C-5 (mancha **b**), e outro com um grupo fenólico em C-5 ocupado (mancha **a**), enquanto que o produto bruto resultante das restantes experiências mostrava mais uma mancha (mancha **ax**), a qual poderia ser atribuida a outro composto também com um grupo fenólico em C-5 ocupado (73).

2.2.3. Separação e purificação dos constituintes flavónicos

Dadas as dificuldades sentidas na separação dos derivados carboximetilados, decidiu-se recorrer, desde logo, à HPLC em fase reversa. Para fase móvel ensaiou-se uma mistura de metanol, água e ácido acético em diferentes proporções, apenas mantendo fixa a percentagem de ácido acético (2%).

Pelo estudo analítico do produto bruto resultante de cada experiência confirmou-se que para o DHE correspondente à Exp.26 se obtinham apenas dois picos cromatográficos (pico **A** e pico **B**) (Fig.58,pag.98), enquanto que para os (DHE) correspondentes às restantes experiências se obtinha um terceiro pico (**AX**), situado entre os dois picos principais. Exemplifica-se com os cromatogramas referentes às Exp. 20 e 23 (Fig. 59 e 60, pag.98 e 99).

Iniciou-se a HPLC preparativa com uma fase móvel igual à utilizada em HPLC analítico, constituída por metanol:água:ácido acético (60:38:2), tendo-se obtido, isolada, a fracção correspondente ao pico **B**, o mais intenso, e comum a todas as experiências (Fig.61, 62, pag.100 e 101).

Esta fracção, depois de analizada por HPLC, mostrou não se encontrar suficientemente pura, tendo sido recromatografada nas mesmas condições cromatográficas, até se obter um só pico (Fig. 63 e 64, pag. 102).

A fracção correspondente ao pico **A**, igualmente comum a todas as experiências, não foi obtida suficientemente pura, tendo sido necessário recromatografá-la em coluna semi-preparativa, variando a composição percentual da fase móvel. Depois de se terem optimizado as condições de análise na coluna semi-preparativa, foi conseguida uma boa separação dos picos **A** e **AX** usando, como fase móvel, metanol: água: ácido acético (50:58:2) (Fig.65, pag.103).

Todas as fracções recolhidas foram tratadas de molde a eliminar a fase móvel e os compostos resultantes recromatografados até se obter um só pico em HPLC (Fig.66 e 67, pag.104).

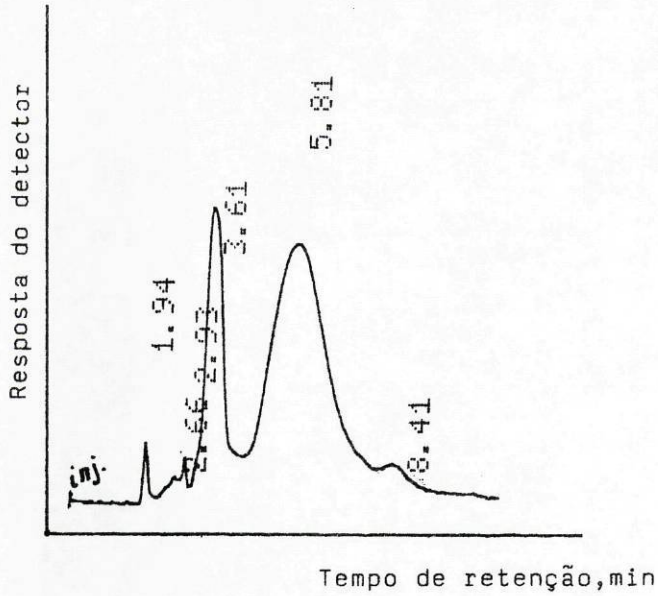


Fig. 58 - Cromatograma (HPLC) referente ao DHE resultante da Exp. 26

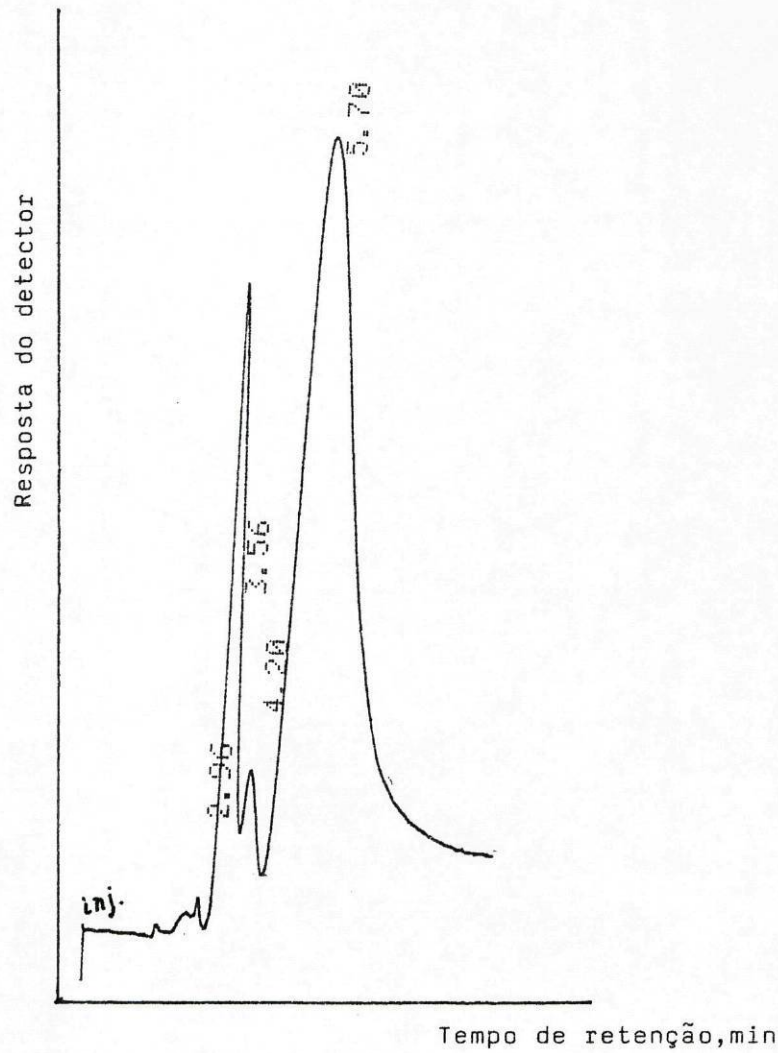


Fig. 59 - Cromatograma (HPLC) referente ao DHE resultante da Exp. 20

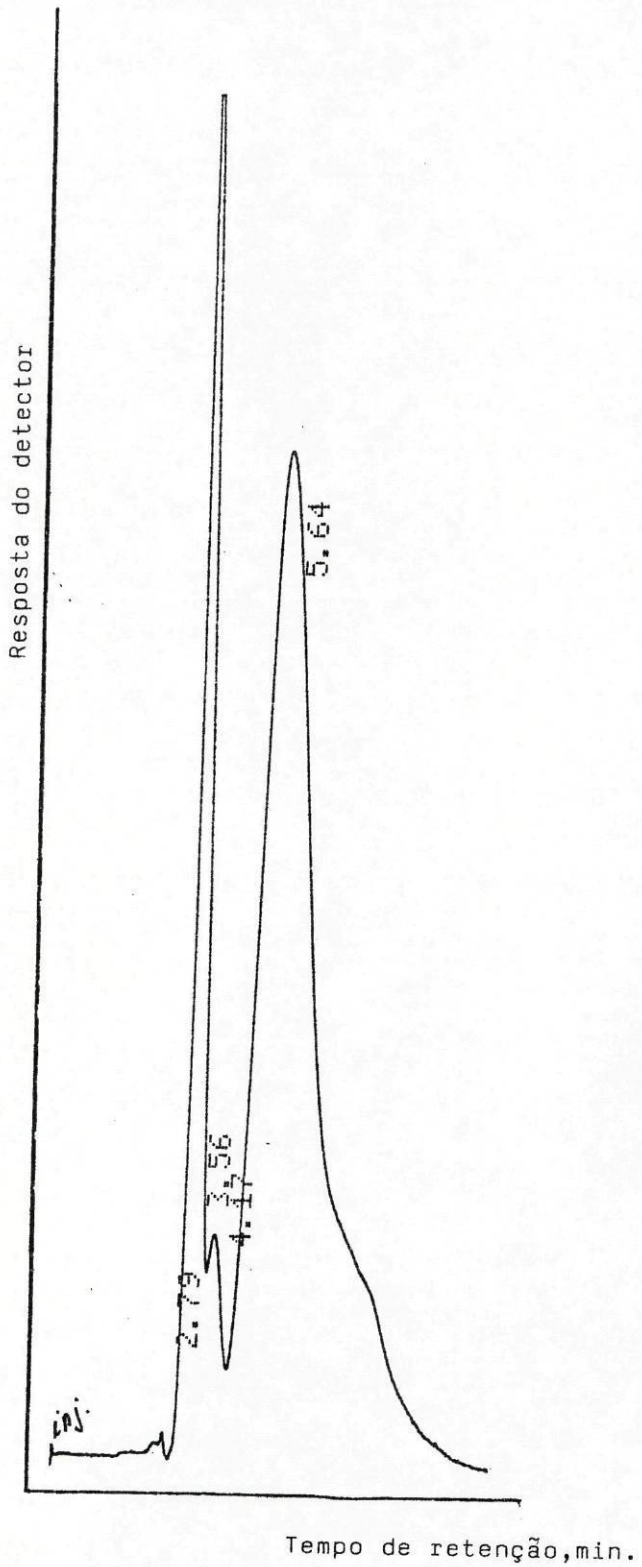


Fig. 60 - Cromatograma (HPLC) referente ao DHE resultante da Exp. 23

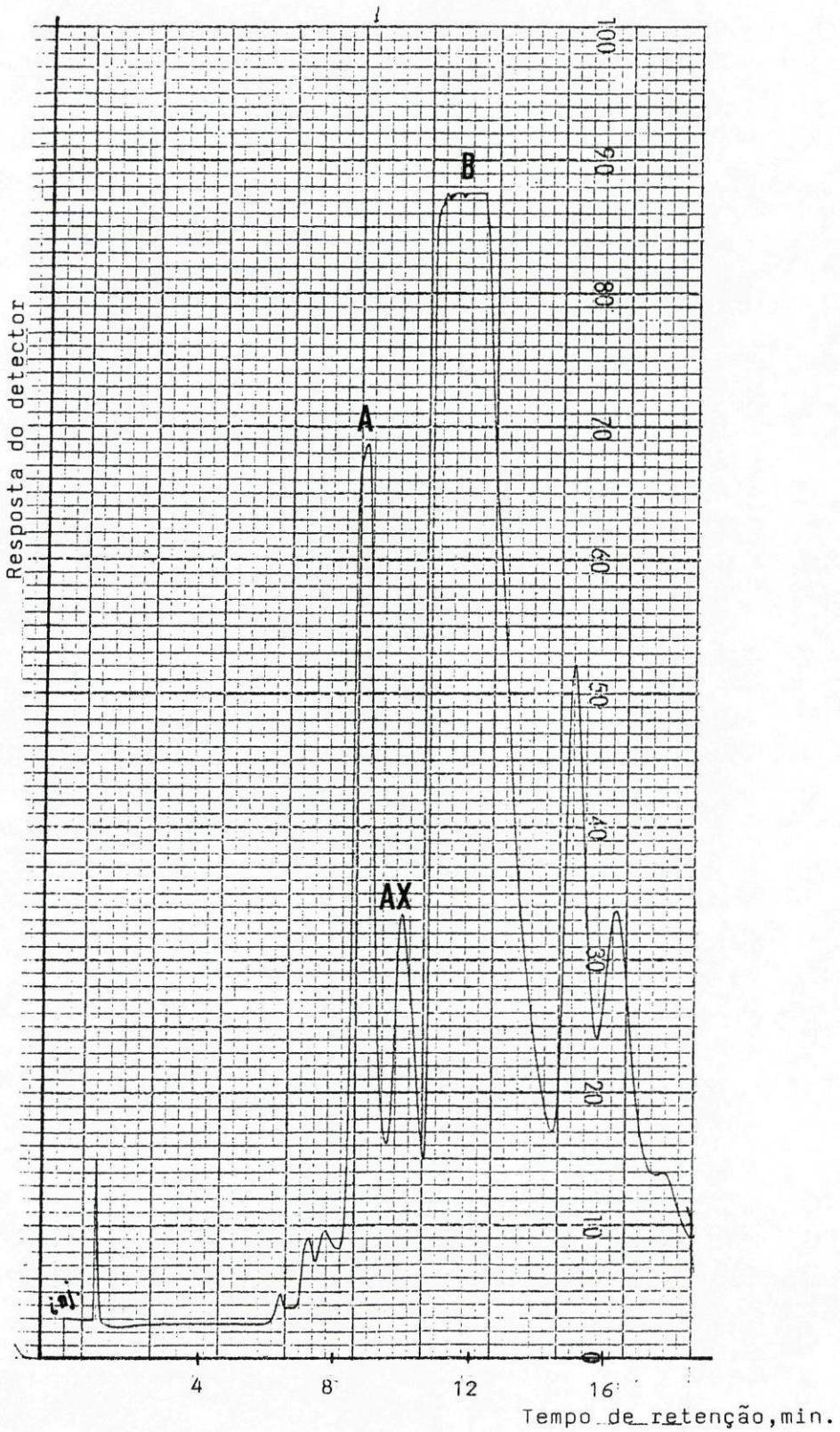


Fig. 61 - Cromatograma (HPLC) referente à separação de 25 mg (0,5 ml de sol. a 50 mg/ml) de DHE resultante da Exp. 23

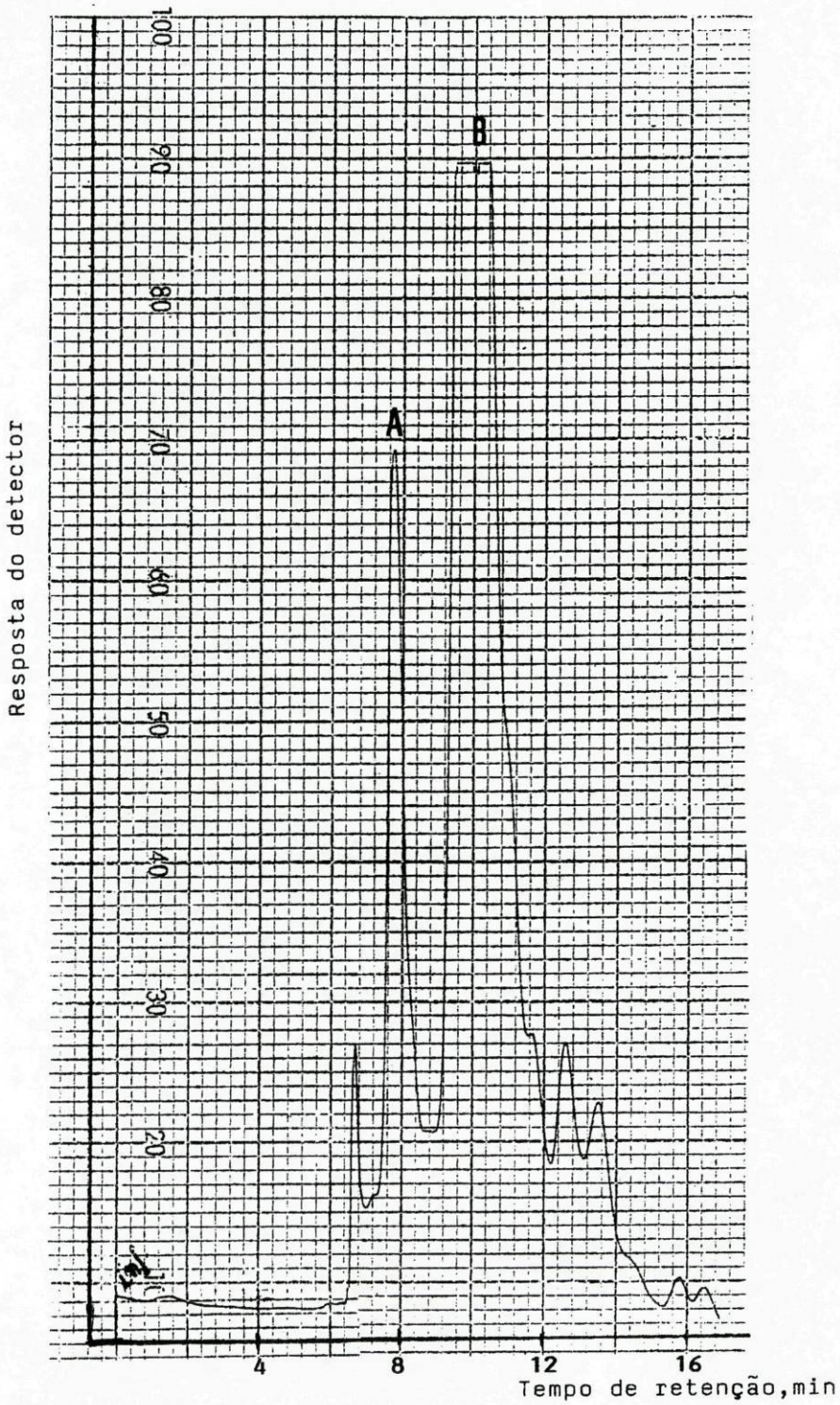


Fig. 62 - Cromatograma (HPLC) referente à separação de 25 mg (0,5 de sol. a 50 mg/ml)de DHE resultante da Exp. 26

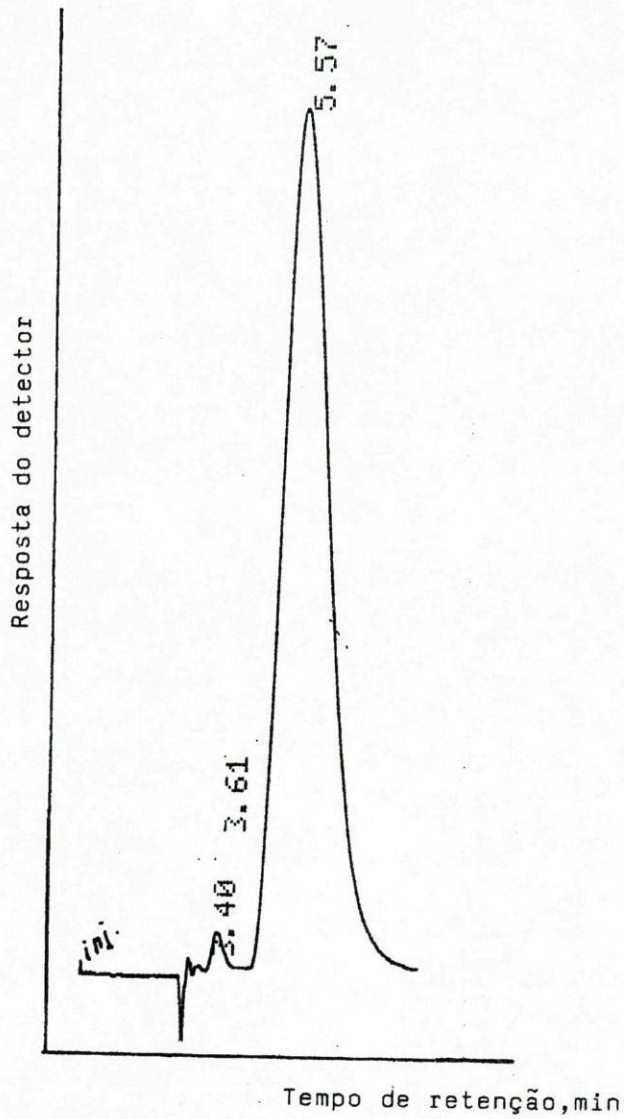


Fig. 63 - Cromatograma (HPLC) referente ao composto B,impuro

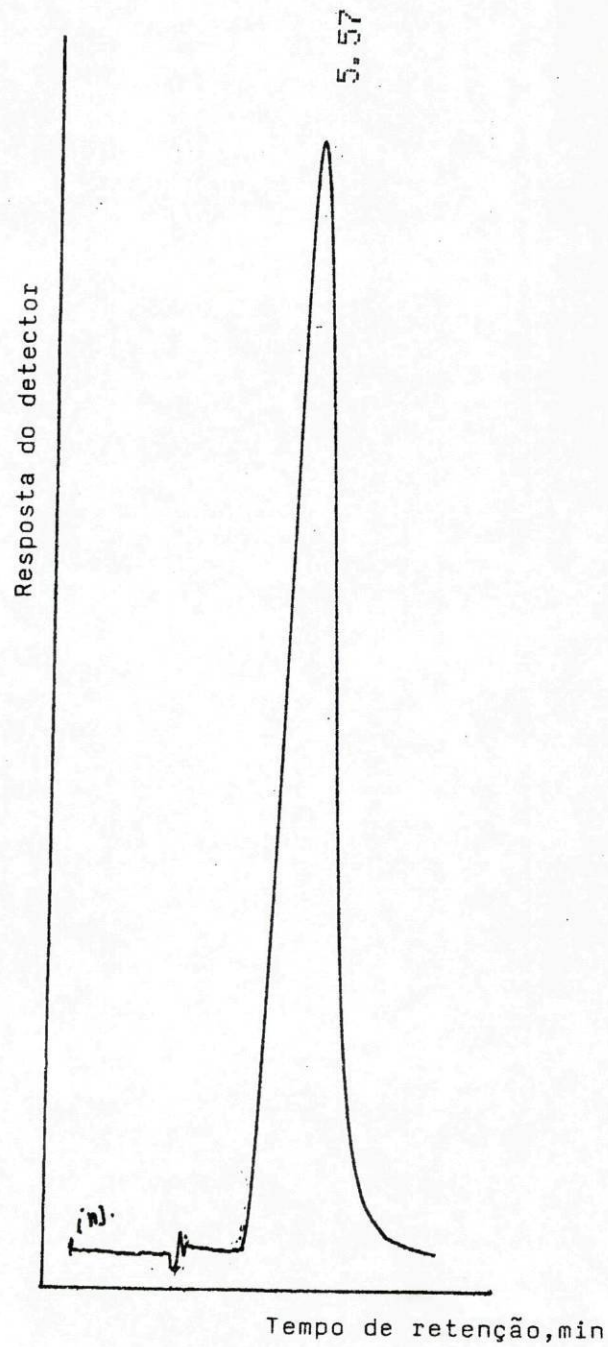


Fig. 64 - Cromatograma (HPLC) referente ao compsto B,isolado

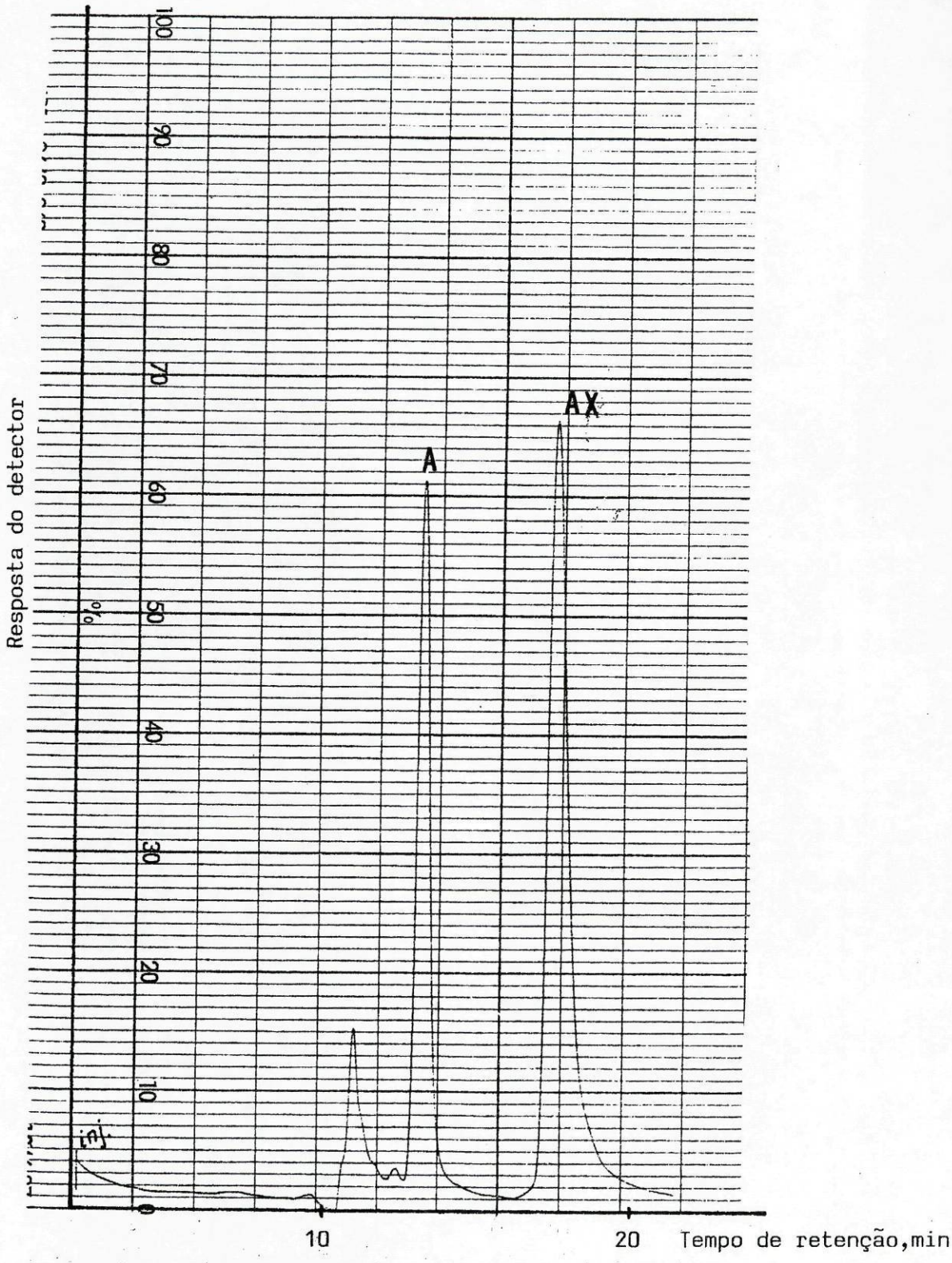


Fig. 65 - Cromatograma (HPLC) referente à análise de 25 µl de DHE correspondente à Exp. 20

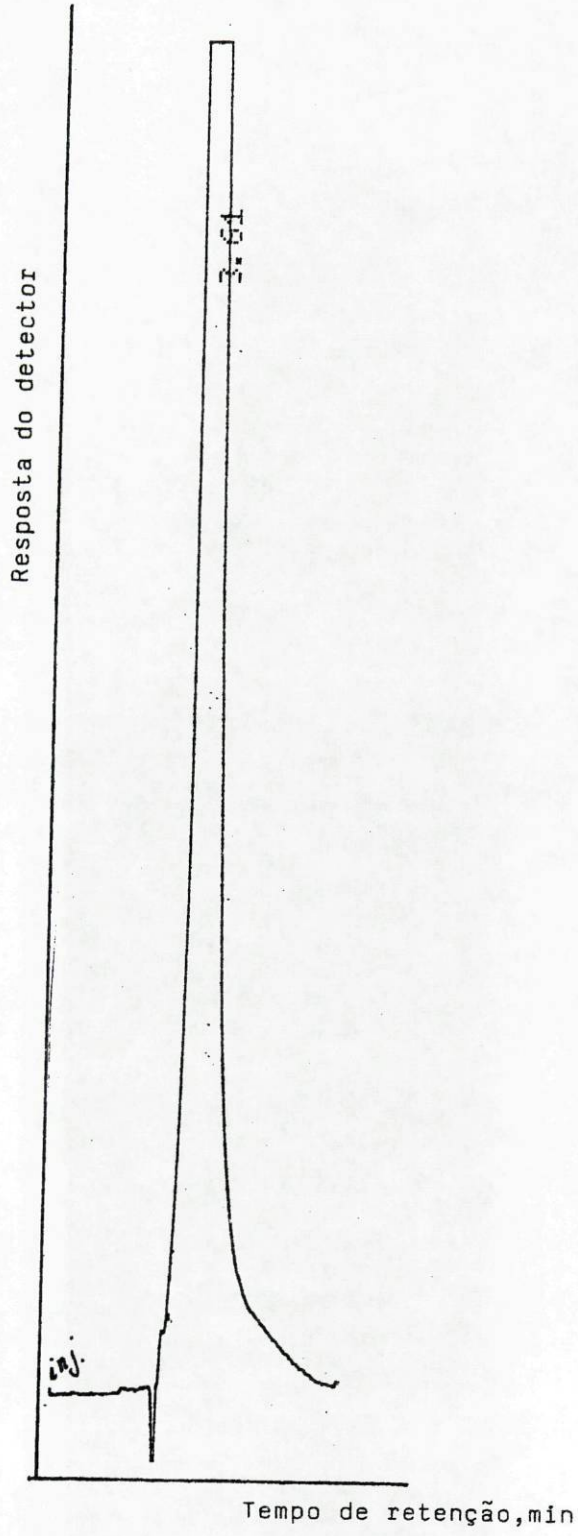


Fig. 66 - Cromatograma (HPLC) referente ao composto A,isolado

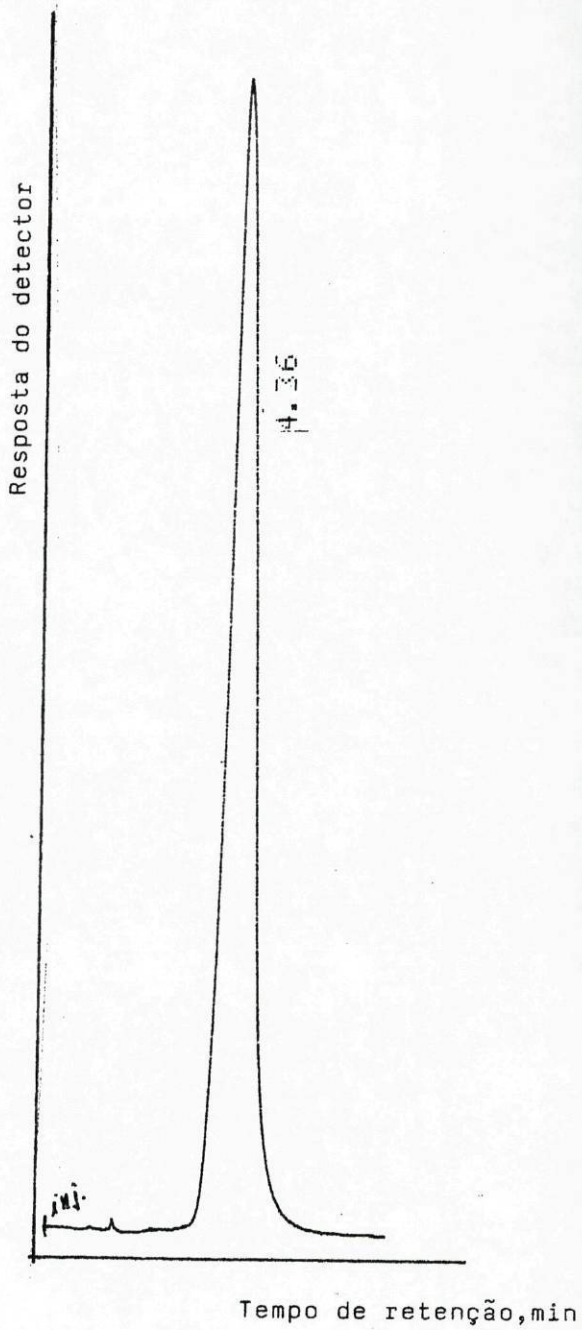


Fig. 67 - Cromatograma (HPLC) referente ao composto AX, isolado

2.2.4. Elucidação estrutural dos compostos flavónicos separados

A análise estrutural dos compostos isolados foi realizada por UV, IV, RMN^{1}H e RMN^{13}C e confirmada, após hidrólise ácida, por caracterização das respectivas agliconas (UV, IV, RMN^{1}H, RMN^{13}C e ME) e açúcares (GC e / ou TLC).

COMPOSTO A

O espectro de UV em metanol evidenciou a presença de uma flavona dissubstituida em C -3´e C-4´ com bandas de absorção máxima em 366,0, 265,5 e 243,0 nm. O registo do espectro em metanol, após adição de acetato de sódio, não mostrou deslocamento batocrómico da banda II, facto indicativo de que o grupo fenólico em C-7 se encontrava ocupado. O espectro em metanol adicionado de cloreto de alumínio e em metanol adicionado de cloreto de alumínio e ácido clorídrico não evidenciou alteração significativa na localização das bandas de absorção.

Estes factos levaram a admitir que o composto em estudo mantinha a ligação glicosídica em C-7, e que o grupo fenólico em C-5 se encontrava ocupado (91-94) (Fig.68, pag.112) (Quadro 14, pag.106).

Quadro 14 : Absorção no UV do composto **A**

Solvente e Reagentes	**Máximos de Absorção** λ,nm		
MeOH	336,0	265,5	243,0
MeOH+ $AlCl_3$	337,5	265,0	241,5
MeOH+$AlCl_3$+HCl	340,5	266,0	241,0
MeOH+NaOAc	333,0	263,5	

Pelo estudo do espectro de RMN^{1}H pôde confirmar-se que além do grupo fenólico em C-5 também o grupo fenólico em C-3´se encontrava ocupado, pois o espectro não mostrou qualquer sinal atribuível a estes protões. Na realidade, o espectro de RMN^{1}H,(Fig. 69,pag.113), apesar de obtido em más condições de resolução do aparelho, mostrou claramente que não existia qualquer sinal atribuível a protões fenólicos, tendo revelado, para além dos sinais referentes à diosmina, mais um sinal a δ 4,12. A localização deste sinal , apesar de mal resolvido , levou a admitir a hipótese de ser referente aos protões do(s) grupo(s) -O$\underline{C}H_2$ $\underline{C}H_2$ OH (130, 131).

Esta hipótese foi reforçada pelo estudo do espectro de RMN^{13}C (Fig 70 e 70a, pag.114 e 115). De facto, o espectro deste composto, quando comparado com o da diosmina (Quadro 15, pag.107), mostrou mais quatro picos atribuíveis aos carbonos dos dois grupos -O$\underline{C}H_2$ $\underline{C}H_2$ OH. Conseguida a expansão da escala entre os valores de δ 55,75 e 75,48, o estudo do espectro levou a atribuir os valores δ 59,67 e 59,42 aos carbonos do grupo -O$\underline{C}H_2$, e os valores a campo mais baixo (δ 71,62 e 70,83) aos carbonos ligados ao grupo hidroxílico -$\underline{C}H_2$OH (104,132).

Quadro 15: Comparação de dados de RMN ^{13}C da diosmina e do composto **A**

Atomo de Carbono	**Diosmina** δ(ppm) DMSO	**Composto A** δ(ppm) DMSO
C-2	162,80	160,38
C-3	103,78	107,06
C-4	181,90	181,46
C-5	161,26	159,90
C-6	99,60	98,71
C-7	164,20	161,06
C-8	94,80	96,94
C-9	156,95	158,71
C-10	105,50	109,62
C-1'	122,90	123,04
C-2'	113,09	112,14
C-3'	146,90	148,44
C-4'	151,15	151,97
C-5'	112,34	110,48
C-6'	119,04	119,70
C-1''	99,90	99,32
C-2''	72,97	73,88
C-3''	76,29	81,92
C-4''	70,87	70,59
C-5''	75,54	75,48
C-6''	66,78	66,03
C-1'''	100,52	100,44
C-2'''	70,35	70,44
C-3'''	69,80	69,63
C-4'''	72,13	72,04
C-5'''	68,27	68,40
C-6'''	17,86	17,84
$-OCH_3$	56,30	55,76
$-OCH_2-$		59,68 e 59,42
$-CH_2OH$		71,62 e 70,84

Pelo que foi exposto até aqui admitiu-se ter sido isolado o derivado 2-hidroxietilado em C-5 e C-3'da diosmina (XI).

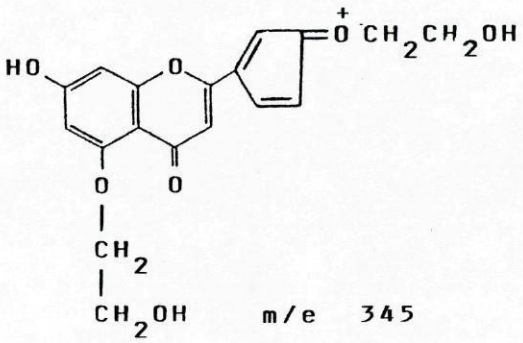
A fim de se confirmar esta hipótese, o composto em análise foi submetido a uma hidrólise ácida (Parte experimental). Desta hidrólise, controlada por TLC, além da fracção aquosa contendo a parte glicosídica, resultou um resíduo que cromatografado paralelamente com o composto inicial em vários sistemas cromatográficos mostrou um valor de Rf que permitiu deduzir estar-se em presença de um composto menos polar. Este resíduo (AH), depois de recristalizado de metanol, mostrou uma pureza suficiente para permitir a sua identificação.

O seu espectro de UV em metanol mostrou-se praticamente paralelo ao espectro do composto de partida. Após adição de acetato de sódio, o novo espectro de UV mostrou um deslocamento batocrómico na banda II de 265,5 para 273,5 nm (Fig.71, pag.116). (Quadro 16). Este deslocamento de 8 nm, indicativo de existência de um grupo fenólico livre em C-7 , permitiu admitir ter havido quebra de ligação glicosídica em C-7, (93) facto já sugerido pela diminuição do Rf do composto em análise, em placa de celulose, e usando como fase móvel solução aquosa de ácido acético (133).

Quadro 16: Absorção no UV do composto **AH**

Solvente e Reagentes	**Máximos de Absorção** λ, nm		
MeOH	336,5	265,5	241,5
MeOH+$AlCl_3$	337,0	265,5	241,0
MeOH+$AlCl_3$+HCl	337,5	265,0	242,0
MeOH+NaOAc	335,5	313,0	273,5

O espectro de massa (IE) da aglícona em estudo (Fig 72,pag.117) (Esquema 7, pag.118) mostrou um pico correspondente ao ião molecular $M^{+\cdot}$ 388 muito pouco intenso e um pico a m/e 31 que confirma a existência de uma função "álcool primário" (134). Evidenciou ainda um pico metaestável (M^*) a m/e 262, que justifica o pico a m/e 300 a partir do pico a m/e 344 (135). Os picos a m/e 345 e m/e 359, correspondentes, respectivamente, a uma eliminação de CH_3CO e CHO, são bem elucidativos da presença, em C-5 e C-3, de um grupo $-OCH_2CH_2OH$ (Fig. 73).



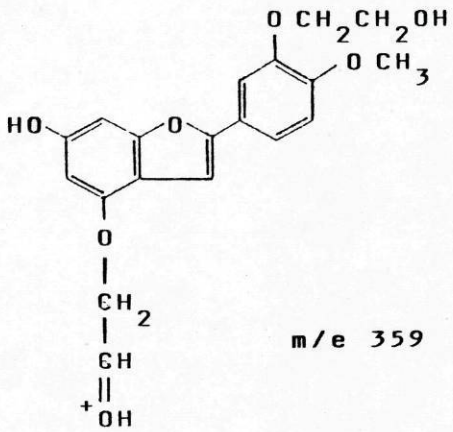


Fig.73

O mesmo acontece com os picos a m/e 370 e m/e 357, que justificam esta mesma substituição no núcleo flavónico. Para cada um destes picos podem contribuir as estruturas isómeras que se representam na figura seguinte (Fig.74).

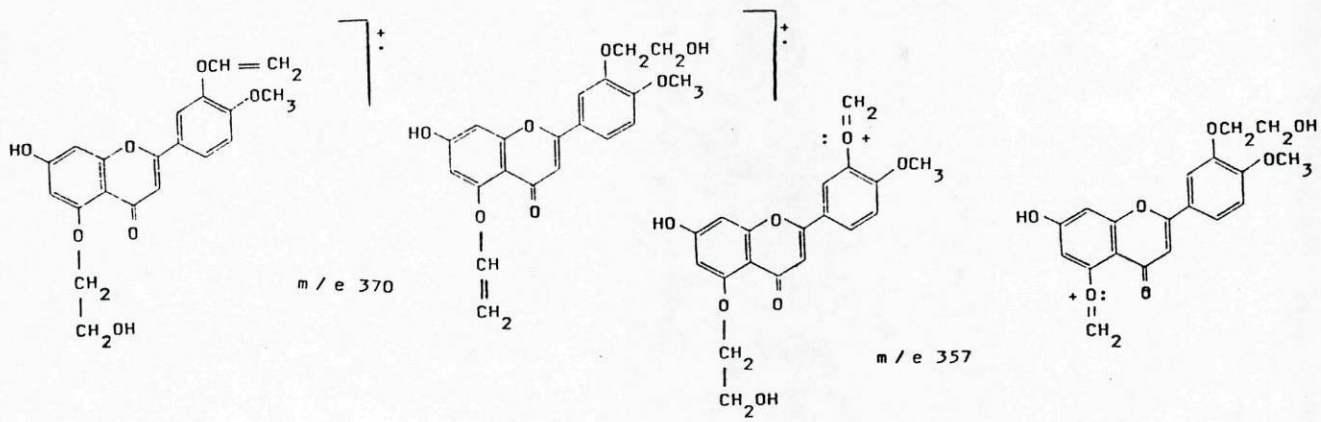


Fig.74

Os factos acabados de expôr levaram a atribuir à aglícona do composto em análise a estrutura (XIV) (Fig.75).

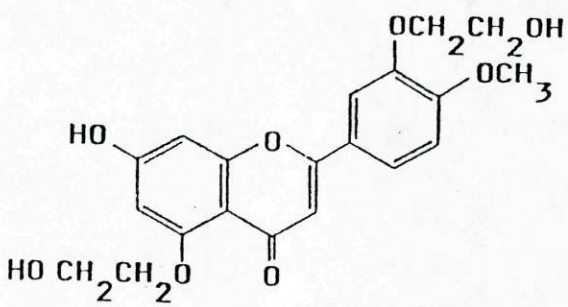


Fig.75

Para a caracterização dos constituintes da fracção glicosídica da molécula recorreu-se à cromatografia em fase gasosa(CG).

A solução aquosa-ácida resultante da hidrólise, depois de passada por uma coluna de poliamida (136) foi liofilizada e o resíduo obtido tratado de modo a transformar os açúcares presentes nos respectivos éteres trimetilsilílicos (137). Os derivados obtidos foram cromatografados nas condições referidas por Markham (138) e os seus tempos de retenção comparados com os dos éteres trimetilsilílicos obtidos, nas mesmas condições, com amostras autênticas de glucose e ramnose.

Injectando separadamente 0,1µl da amostra em estudo e de cada um dos padrões, obtiveram-se os cromatogramas que se mostram nas Fig. 76, 77 e 78 (pag.119 e 120) respectivamente com a solução em ensaio, com a glucose, e com a ramnose.

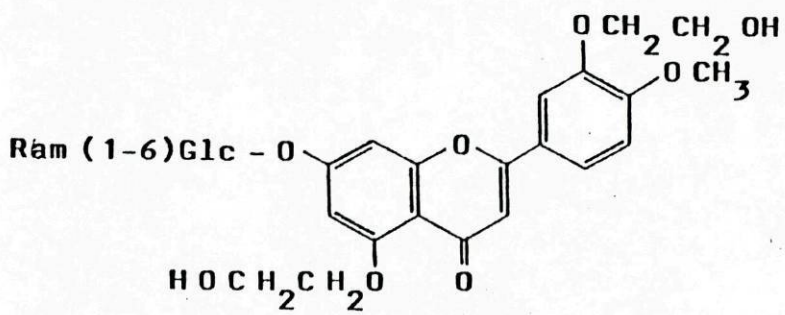
Os dois picos observados para cada açúcar correspondem às formas α e β, as quais coexistem nas amostras (139,140).

Injectando, nas mesmas condições experimentais, 0,1µl de solução de uma mistura em partes iguais de amostra e de substâncias de referência (glucose+ramnose) obteve-se o cromatograma que se mostra na Fig. 79 (pag. 121). Neste cromatograma verificou-se um aumento da área dos picos pelo facto de a amostra ter sido enriquecida nos seus constituintes (ramnose e glucose) quando se lhe adicionaram os padrões.

Em face dos resultados obtidos, pudemos concluir que durante o processo de hidroxietilação não foi afectada a parte glicosídica da molécula da diosmina.

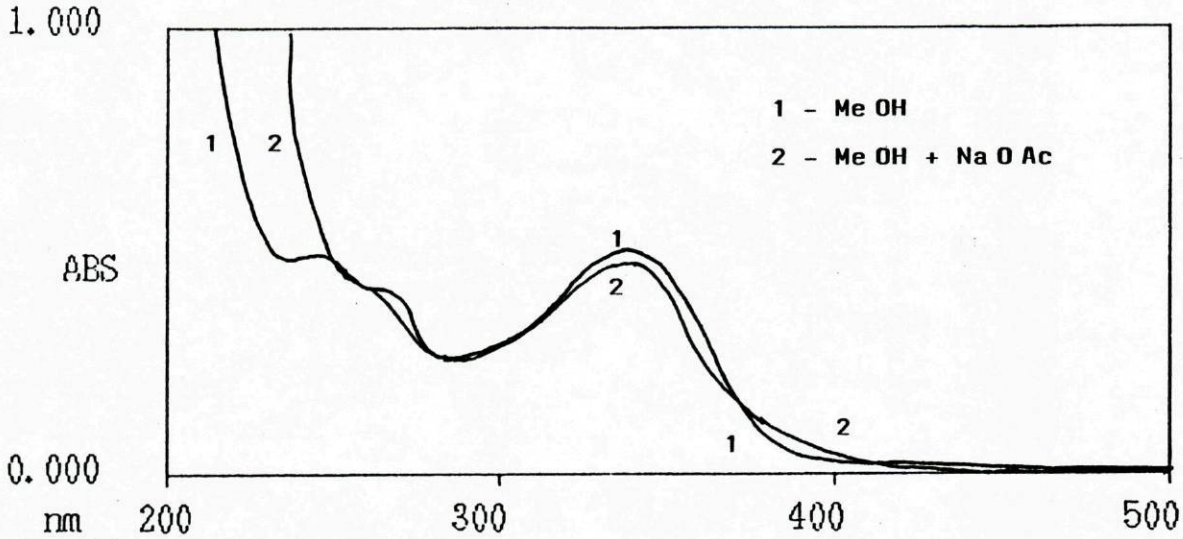
Em resumo:

O estudo realizado para o composto **A**, correspondente ao pico **A** , permitiu concluir que este composto que se mostrou muito solúvel em água era um heterósido derivado da diosmina com dois grupos -OCH_2CH_2OH, ligados um em C-3´ e o outro em C-5. (Fig.80).



7-O-Ramnoglucosil-5,3´-bis (2-hidroxietoxi)-4´-metoxiflavona (XI)

Fig. 80



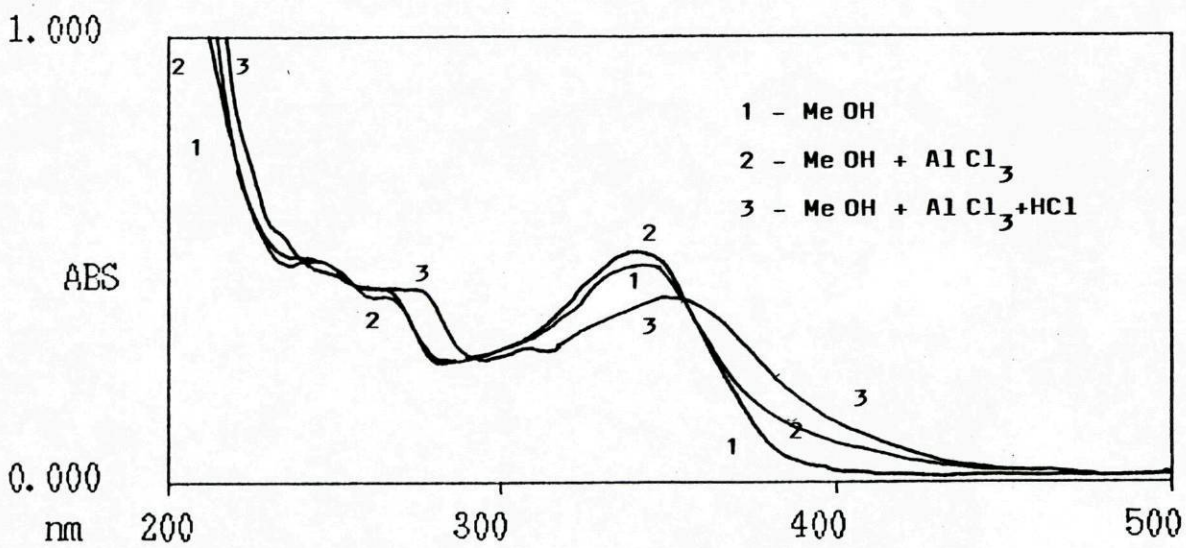


Fig. 68 - Espectros no UV do composto A

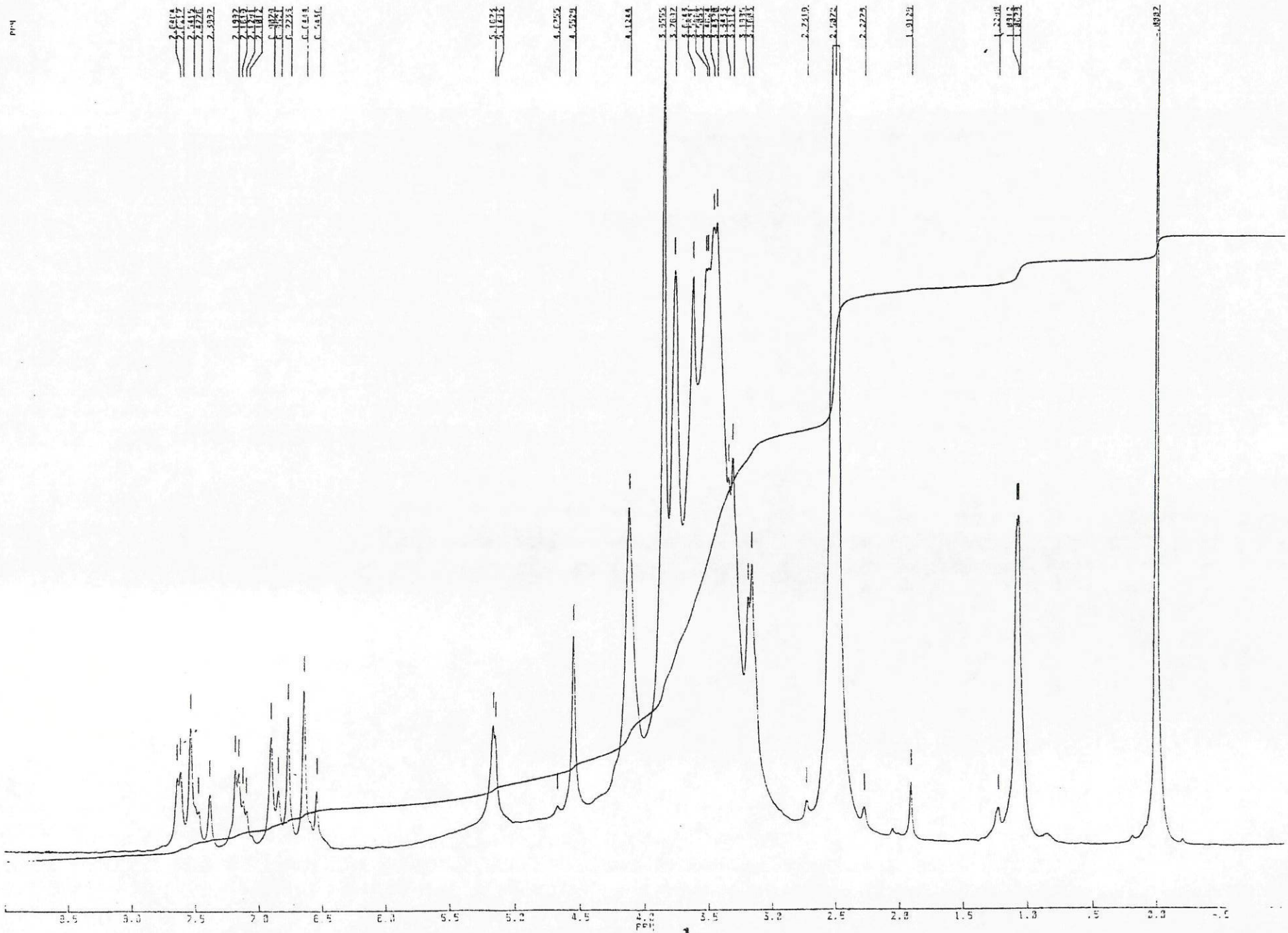


Fig. - 69 - Espectro de RMN ^{1}H do composto A

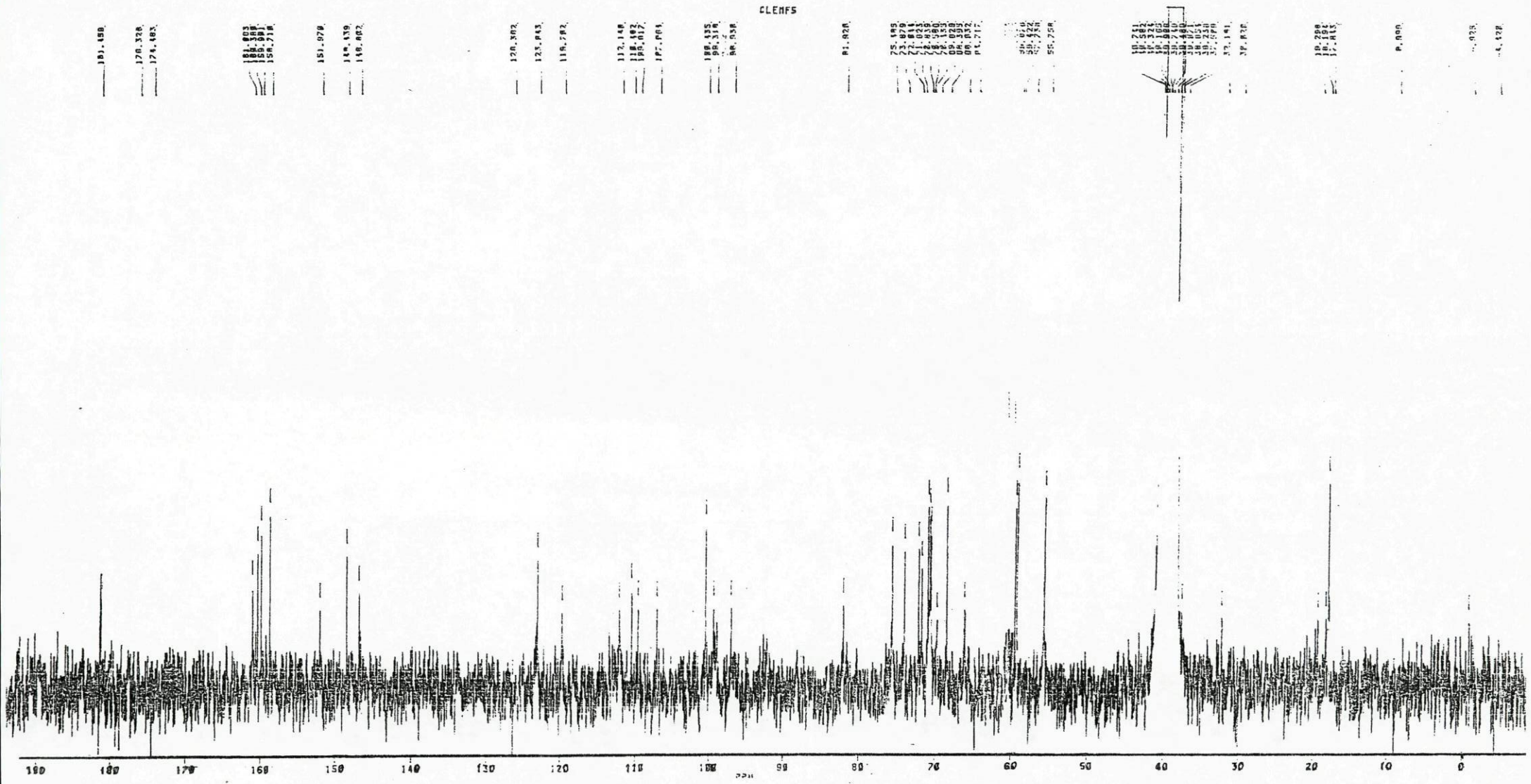


Fig. 70 - Espectro de RMN ^{13}C do composto A

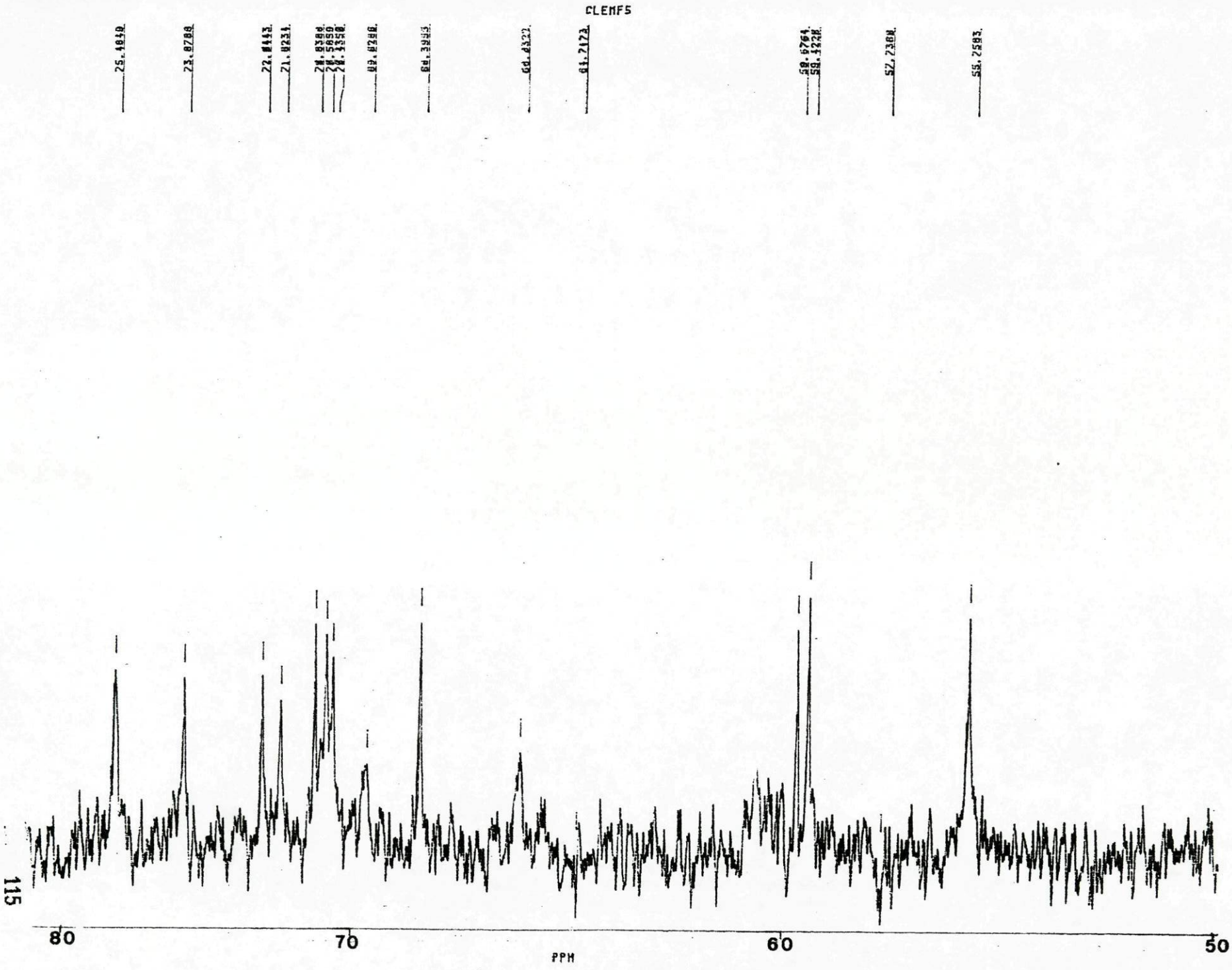
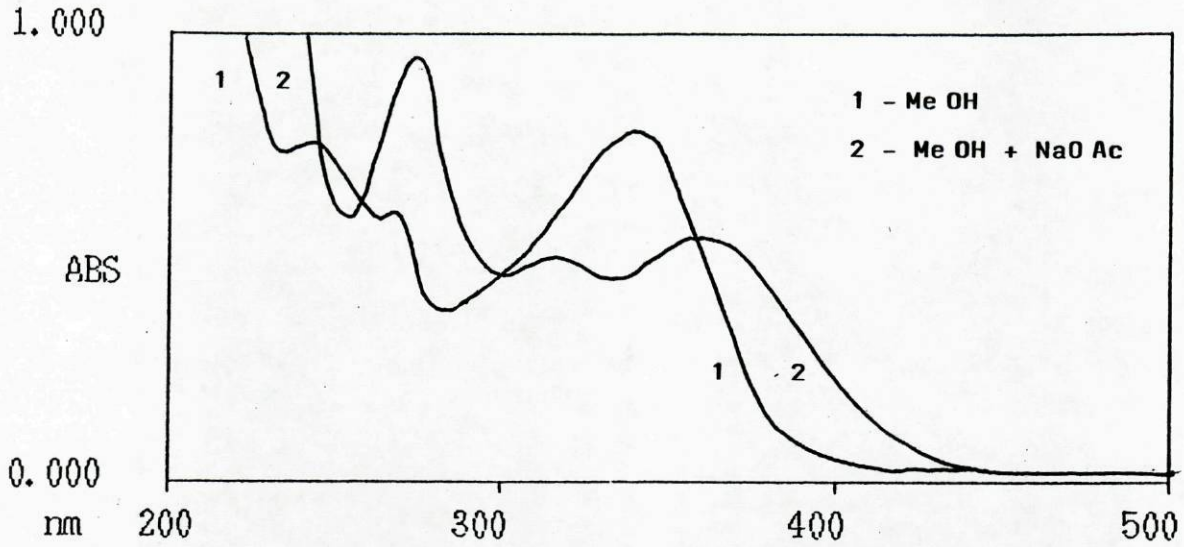


Fig. 70a - Espectro de RMN ^{13}C do composto A (Expansão da zona 50-80 PPM)



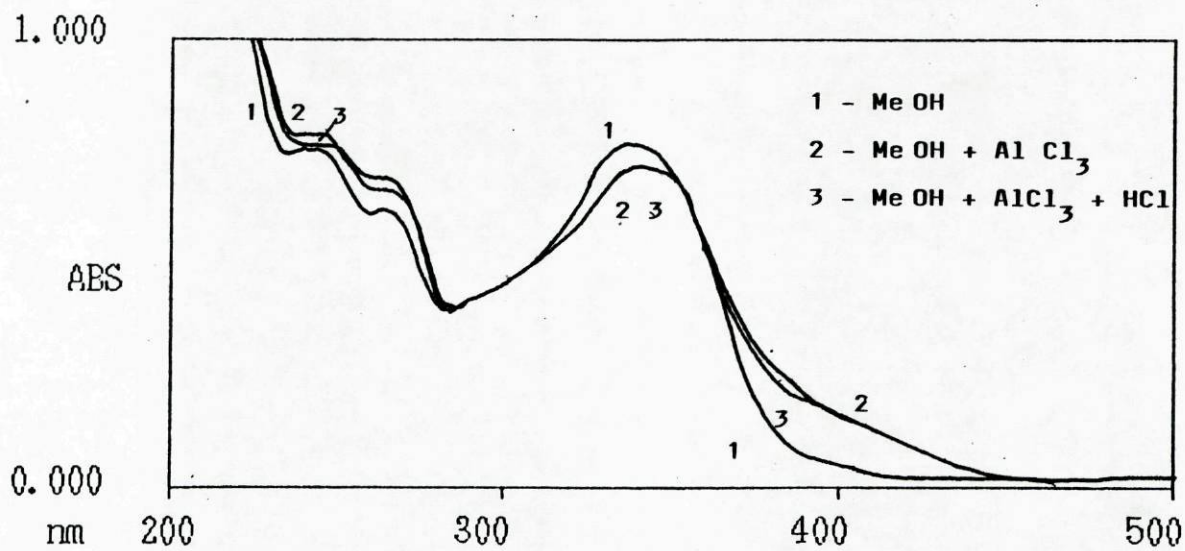


Fig. 71 - Espectros no UV do composto AH

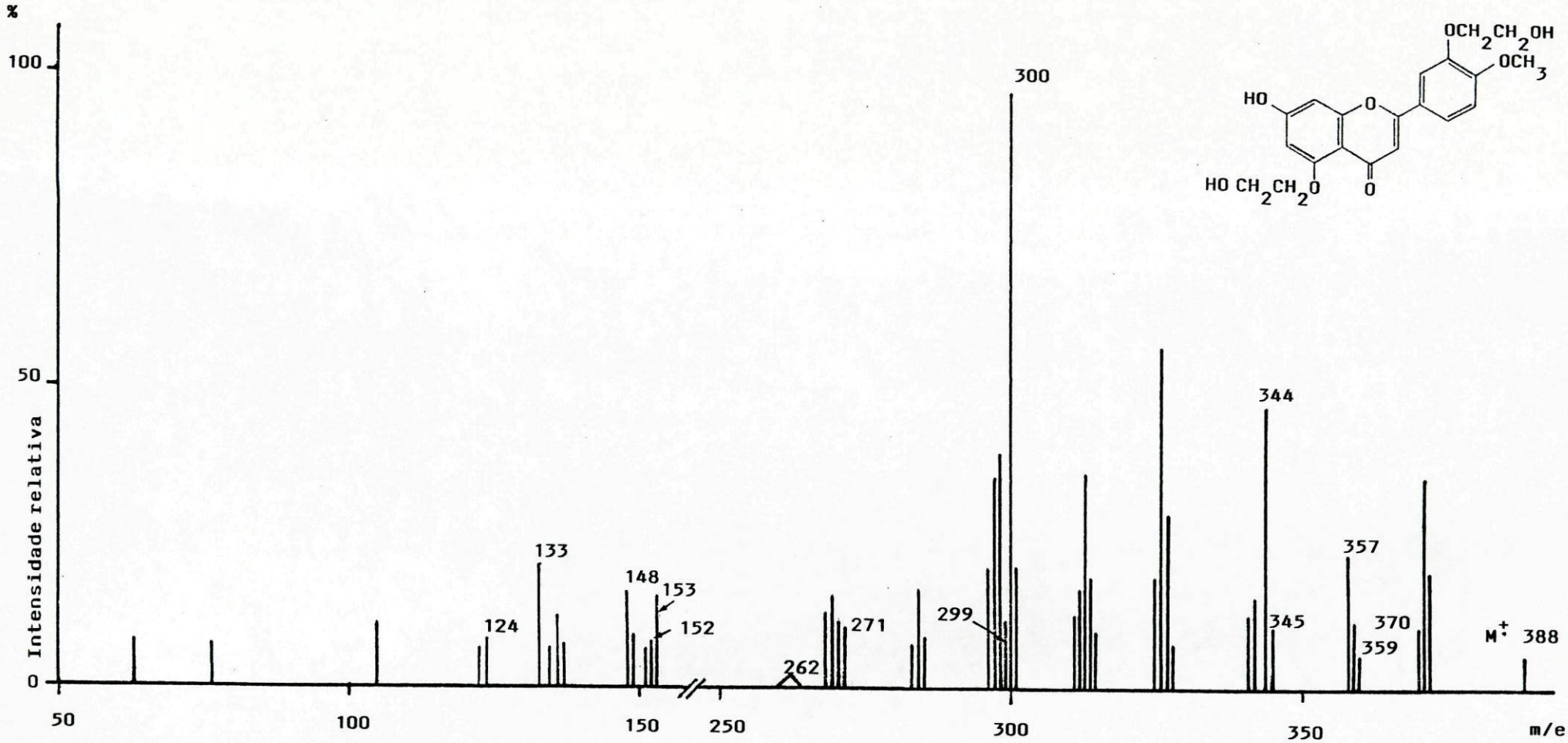
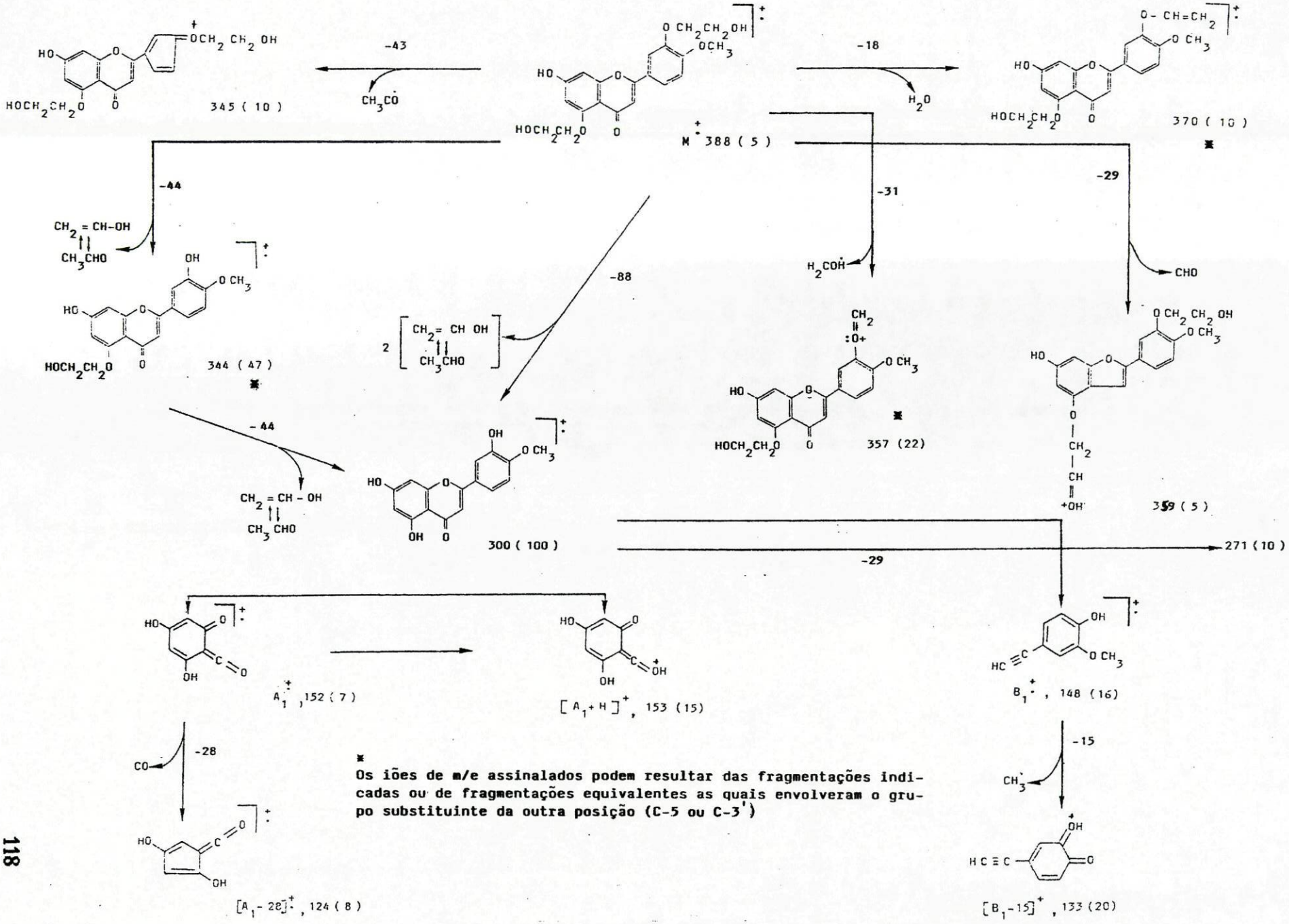


Fig. 72 : Espectro de massa (IE) do composto AH

(Picos de intensidade relativa superior a 5 %)



Os iões de m/e assinalados podem resultar das fragmentações indicadas ou de fragmentações equivalentes as quais envolveram o grupo substituinte da outra posição (C-5 ou C-3')

Esquema 7 - Hipótese interpretativa de fragmentação do composto AH

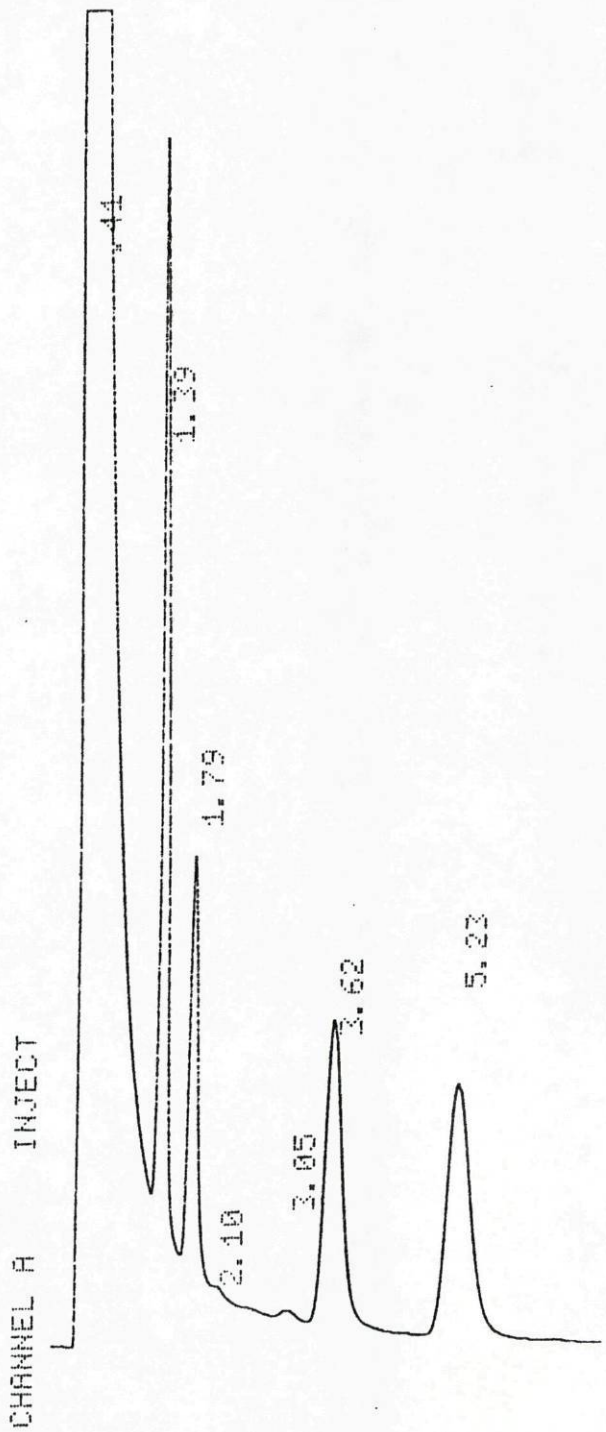


Fig. 76 - Cromatograma (CG) referente a 0,1µl da solução em ensaio.

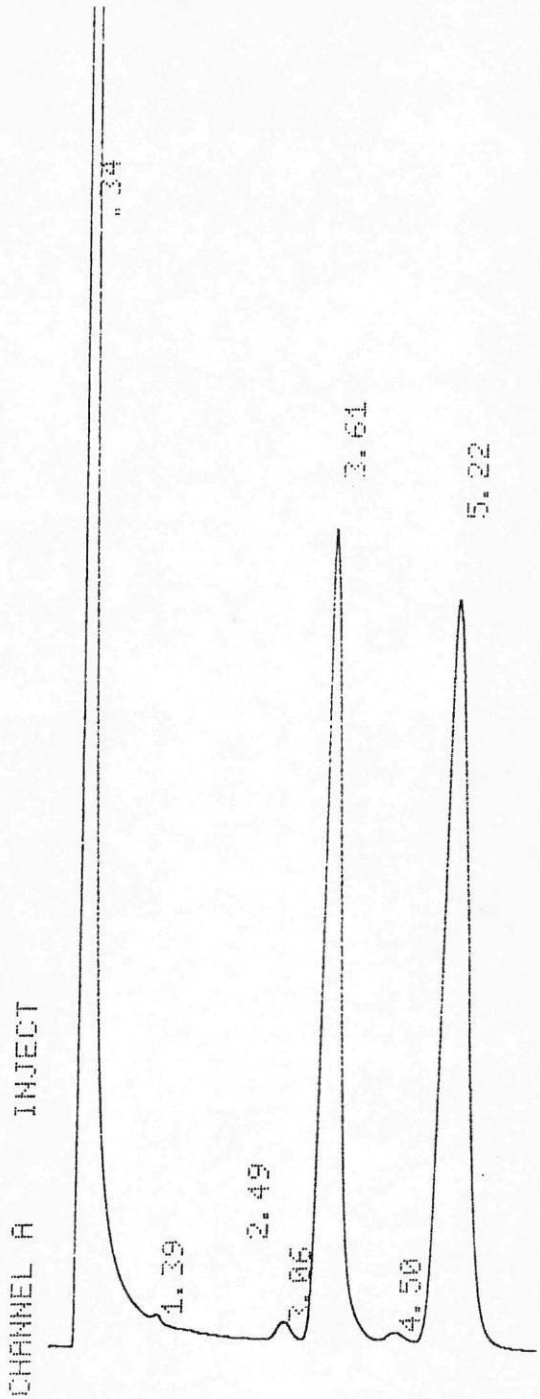


Fig. 77 - Cromatograma (CG) referente a 0,1µl de glucose trimetilsililada .

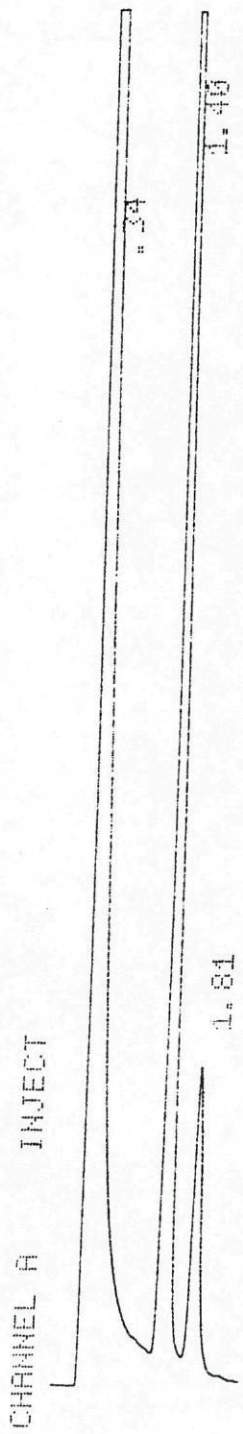


Fig. 78 - Cromatograma (CG) referente a 0,1µl de ramnose trimetilsi - lilada.

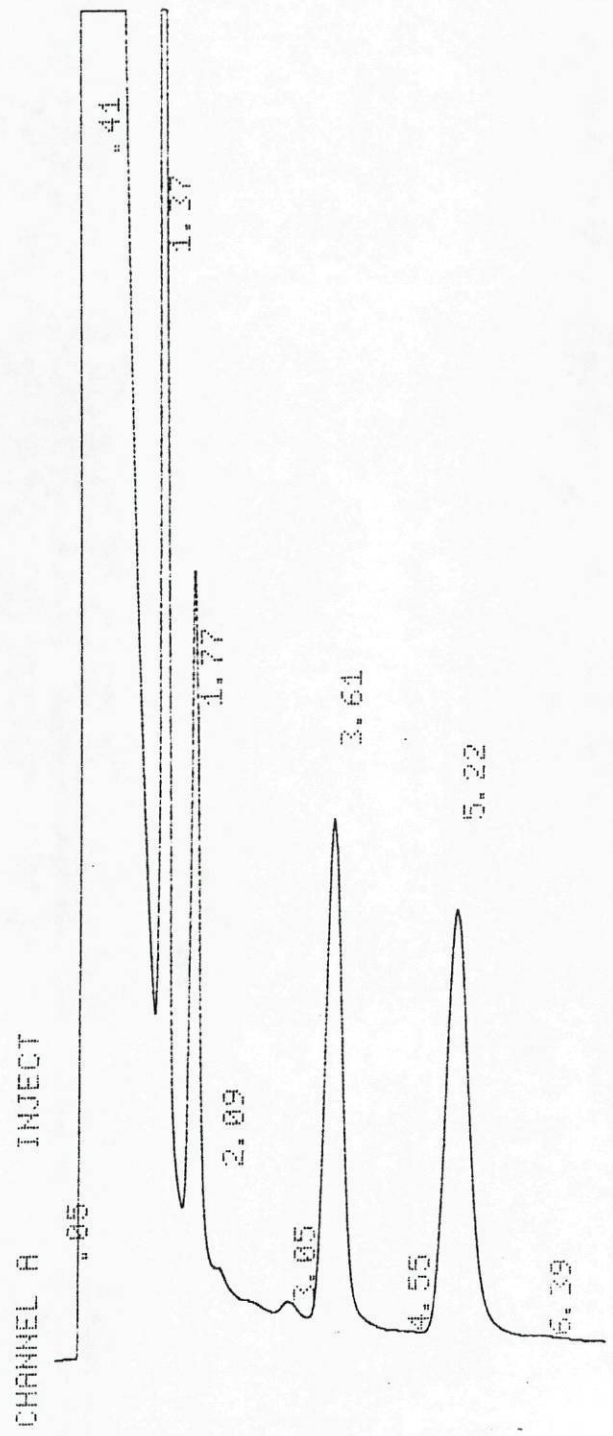


Fig. 79 - Cromatograma (CG) referente a 0,1µl de uma mistura em partes iguais de solução em ensaio e padrões.

COMPOSTO **B**

O espectro de IV, (Fig.81,pag.130), revelou a presença de bandas características do núcleo flavónico e por comparação com o espectro de IV da diosmina (23) permitiu esperar-se uma semelhança estrutural entre estas substâncias.

O espectro de UV em metanol mostrou-se característico de uma estrutura flavónica dissubstituída em C-3´e C-4´ (91,92). O registo do espectro em metanol, após adição de acetato de sódio, não mostrou deslocamento batocrómico na banda II, facto que levou a admitir que o grupo fenólico em C-7 se encontrava ocupado (93). O espectro em metanol adicionado de cloreto de alumínio e em metanol adicionado de cloreto de alumínio e ácido clorídrico mostraram-se típicos de uma 5-hidroxiflavona, evidenciando quatro bandas de absorção deslocadas batocromicamente em relação à sua posição original. O deslocamento batocrómico da banda I (em MeOH) para a banda Ia (em MeOH+$AlCl_3$+HCl) de 42,5 nm, foi indicativo da presença de um grupo fenólico livre em C-5 (94) (Fig.82,pag.131) (Quadro 17).

Quadro 17: Absorção no UV do composto **B**

Solvente e Reagentes	**Máximos de Absorção** λ, nm				
MeOH	342,0		270,0		251,5
MeOH+$AlCl_3$	386,5	358,5	296,5(i)	275,5	265,5
MeOH+$AlCl_3$+HCl	384,5	352,5	296,5(i)	277,5	264,0
MeOH+NaOAc	339,0			271,5	

(i) - inflexão

A análise do espectro do RMN^{1}H (Fig 83,pag.132) mostrou, para além dos sinais atribuíveis à diosmina, a presença de mais um multipleto centrado a δ 4,1, que integra quatro protões, não se verificando, entretanto, qualquer sinal correspondente ao grupo fenólico em C-3', que na diosmina aparece sob a forma de um singuleto a δ 9,5.

Baseados nestes dados pôde inferir-se que o grupo fenólico em C-3'estava ocupado e que o multipleto poderia corresponder aos quatro protões metilénicos do grupo-OCH_2CH_2OH ligado em C-3' (130,131).

O estudo do espectro de RMN^{13}C (Fig.84 e 84a, pag. 133 e 134) também contribuiu para esta dedução, visto que quando comparado com o espectro da diosmina mostrou mais dois sinais a δ 59,48 e δ 70,65, atribuíveis aos carbonos do grupo - $O\underline{C}H_2\underline{C}H_2OH$. O valor δ 59,48 é atribuível ao carbono do grupo - $O\underline{C}H_2$ e o valor a campo mais baixo (δ 70,65) ao carbono do grupo - $\underline{C}H_2OH$ (104,132). (Quadro 18,pag. 124).

Quadro 18: Comparação de dados de RMN ^{13}C da diosmina e do composto B

Atomo de Carbono	Diosmina δ(ppm) DMSO	Composto B δ(ppm) DMSO
C2	162,80	162,86
C3	103,78	104,00
C4	181,90	181,99
C5	161,26	161,09
C6	99,60	99,42
C7	164,20	163,83
C8	94,80	94,92
C9	156,95	157,71
C10	105,50	105,37
C-1'	122,90	122,65
C-2'	113,09	112,01
C-3'	146,90	147,76
C-4'	151,15	152,39
C-5'	112,34	110,71
C-6'	119,04	120,22
C-1''	99,90	99,86
C-2''	72,97	73,02
C-3''	76,29	76,20
C-4''	70,87	70,46
C-5''	75,54	75,58
C-6''	66,78	66,01
C-1'''	100,52	100,45
C-2'''	70,35	70,25
C-3'''	69,80	69,53
C-4'''	72,13	71,97
C-5'''	68,27	68,23
C-6'''	17,86	17,71
$-OCH_3$	56,30	55,65
$-OCH_2-$		59,48
$-CH_2OH$		70,65

Os resultados até agora descritos levaram a admitir para o composto **B** a estrutura (XII) correspondente ao derivado mono(2-hidroxietilado) em C-3', a qual foi confirmada pela caracterização dos produtos de hidrólise ácida do composto.

A hidrólise total do composto **B**, controlada por TLC, foi conseguida por aquecimento, a 130°C durante 50 minutos, de uma solução do composto em HCl a 20% (Parte experimental). Desta hidrólise, para além da fracção aquosa, onde foram identificados os açúcares ramnose e glucose , resultou um resíduo insolúvel que foi separado. Este resíduo, (BH), depois de lavado com água para eliminar vestígios de ácido, foi recristalizado de metanol.

O espectro de IV do composto recristalisado (Fig.85, pag.135) mostrou as bandas características do núcleo flavónico, entre as quais, em 1165 cm^{-1}, uma banda de anel benzénico 5,7 dissubstituído (88)

Os seus espectros de UV em metanol adicionado de cloreto de alumínio e em metanol adicionado de cloreto de alumínio e ácido clorídrico evidenciaram as características já referidas para o composto de partida, isto é, bandas de absorção deslocadas batocromicamente em relação à sua posição original. O deslocamento batocrómicoda banda **I** (MeOH) para a banda **Ia** (em MeOH+$AlCl_3$+HCl) de 41,5 nm, indicou que o grupo fenólico em C-5 se encontrava livre (94). O registo do espectro em metanol, antes e após adição de acetato de sódio, mostrou um deslocamento batocrómico de 270,5 para 278,5 nm indicativo da existência de um grupo fenólico livre em C-7 livre (93) (Fig 86, pag.136) (Quadro 19, pag.126).

Quadro 19 : Absorção no UV do composto **BH**

Solvente e Reagentes	**Máximos de Absorção** λ, nm				
MeOH	341,5		270,5		243,5
MeOH+$AlCl_3$	385,5	357,5	296,0(i)	277,5	262,5
MeOH+$AlCl_3$+HCl	383,0	352,5	294,0(i)	279,5	260,5
MeOH+NaOAc	366,0	314,0	278,5		

(i) - inflexão

A análise do espectro de RMN^{1}H do composto **BH** (Fig.87,pag.137), confirmou ter havido hidrólise, pois além de não mostrar os sinais atribuíveis aos protões dos açúcares, ainda permitiu observar um singuleto a δ 10,91, atribuível ao protão do grupo fenólico em C-7. Este espectro, comparado com o espectro de RMN^{1}H da aglícona da diosmina, diosmetina, (Fig.87a, pag.138) revelou todos os sinais referentes a este composto excepto o singuleto referente ao protão fenólico em C-3´, e ainda um multipleto entre δ 4,09 e δ 4,14 . Este multipleto, que integra para quatro protões, pôde ser atribuído aos 4 protões metilénicos do grupo -OCH_2CH_2OH (130,131).

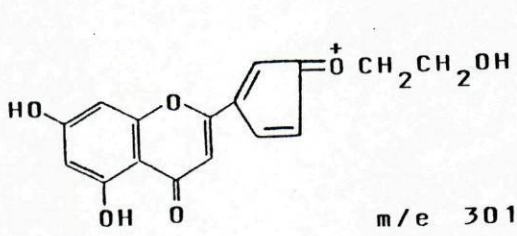
O espectro de RMN^{13}C (Fig.88, pag.139) confirmou a inexistência de sinais atribuíveis aos carbonos dos açúcares e comparado com o espectro da diosmetina (101) (Quadro 20, pag.127) mostrou mais dois sinais a δ 59,53 e δ 70,65, atribuíveis aos carbonos do grupo -OCH_2CH_2OH (104,132). Estes dois sinais aparecem a valores de δ muito próximos dos obtidos no espectro de RMN^{13}C do heterósido em estudo.

Quadro 20 : Comparação de dados de RMN^{13}C da diosmetina e do composto **BH**

Atomo de Carbono	**Diosmetina** δ (ppm) DSMO	**Composto BH** δ (ppm) DSMO
C-2	163,60	163,24
C-3	104,00	103,77
C-4	181,80	181,63
C-5	161,70	161,34
C-6	99,00	98,78
C-7	164,40	164,08
C-8	94,00	93,97
C-9	157,09	157,28
C-10	103,70	103,77
C-1′	123,30	122,93
C-2′	113,10	112,09
C-3′	146,90	148,41
C-4′	151,20	152,42
C-5′	112,10	111,17
C-6′	118,70	120,09
$-OCH_3$	55,80	55,70
$-OCH_2-$		59,53
$-CH_2OH$		70,65

Pelo espectro de massa (IE) (Fig.89,pag.140) pôde verificar-se que a massa molecular do composto ($M^{+\cdot}$ 344) é compatível com a estrutura prevista.

Os iões de m/e 301 e m/e 326 confirmaram a substituição no núcleo flavónico (Fig 90).



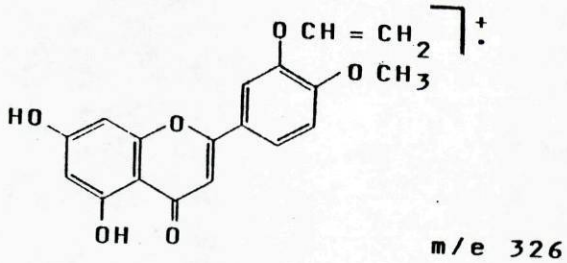


Fig.90

O pico base (m/e 300) corresponde a uma decomposição do $M^{+\cdot}$ (m/e 344), como se pode deduzir pela presença de um M* de m/e 262. As restantes fragmentações (Esquema 8, pag.141) estão de acordo com os esquemas previstos para a fragmentação do núcleo das flavonas (127).

Em face do que até aqui foi exposto foi atribuida à aglícona do composto em análise a estrutura (XV) (Fig 91).

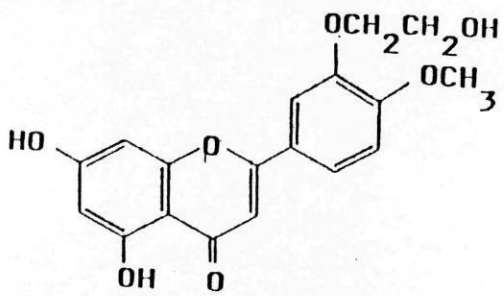


Fig.91

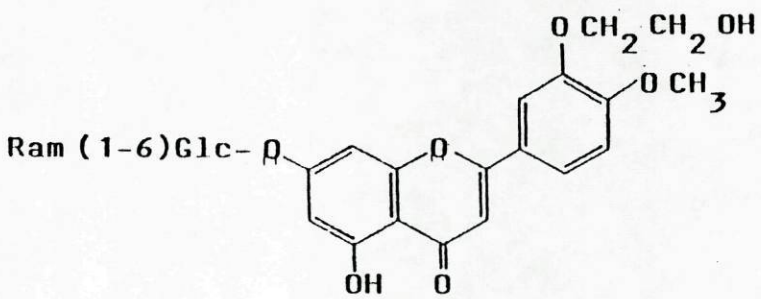
A identificação dos constituintes da fracção aquosa-ácida resultante da hidrólise foi conseguida por cromatografia em fase gasosa.

Pelos resultados obtidos, semelhantes aos descritos na página 110, pôde

concluir-se que os açúcares presentes eram a glucose e a ramnose.

Conclusão:

O composto em análise, referente ao pico B, corresponde ao derivado mono-(2-hidroxietilado) em C-3´da diosmina (XII) (Fig.92). Este composto mostrou-se facilmente solúvel em água solúvel em metanol e praticamente insolúvel em éter, clorofórmio e acetona.



7-O-Ramnoglucosil-5-hidroxi-3´-(2-hidroxietoxi)-4´-metoxiflavona (XII)

Fig.92

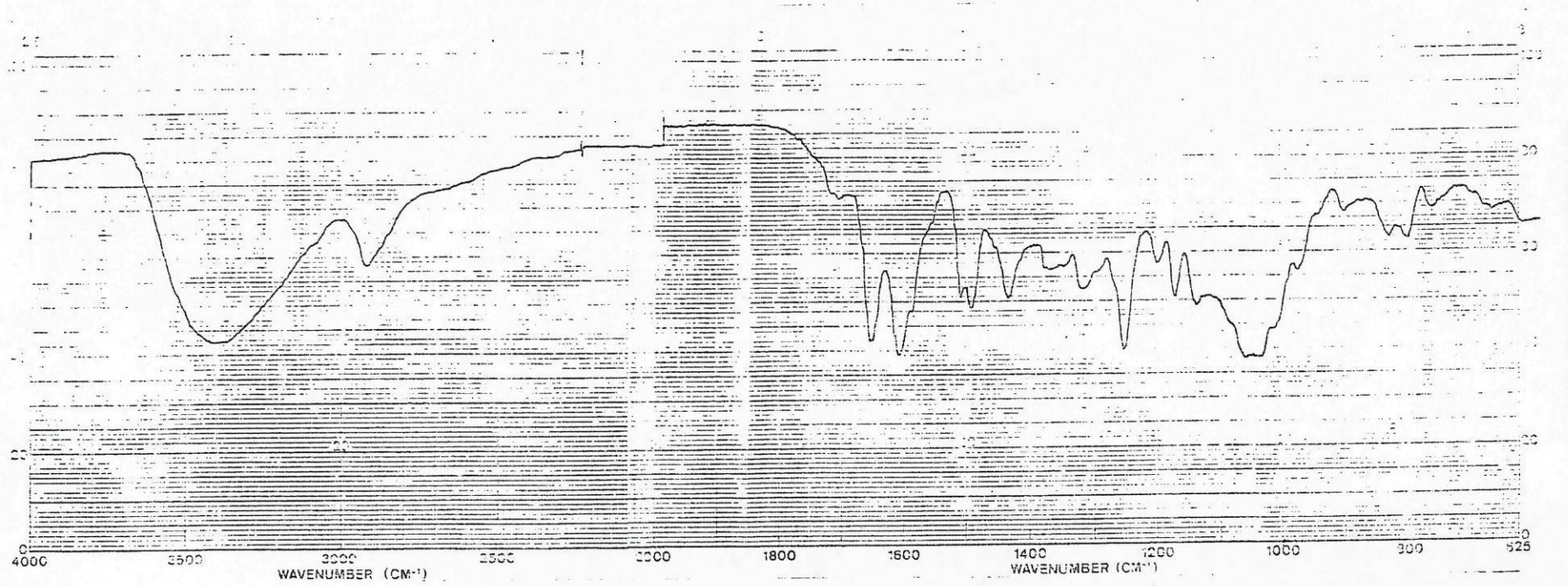
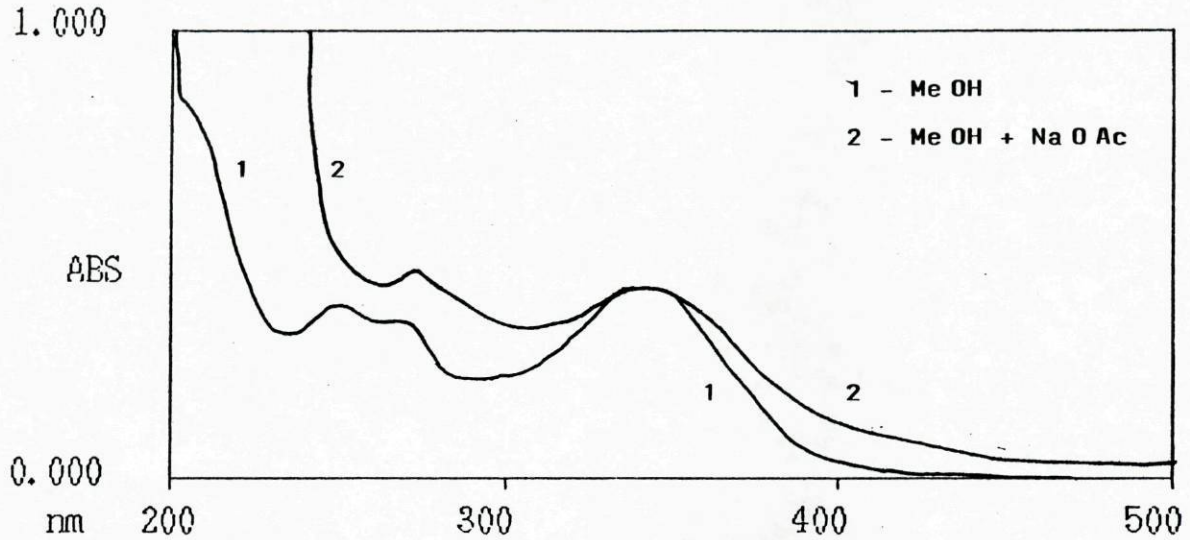


Fig. 81 - Espectro no IV do composto B



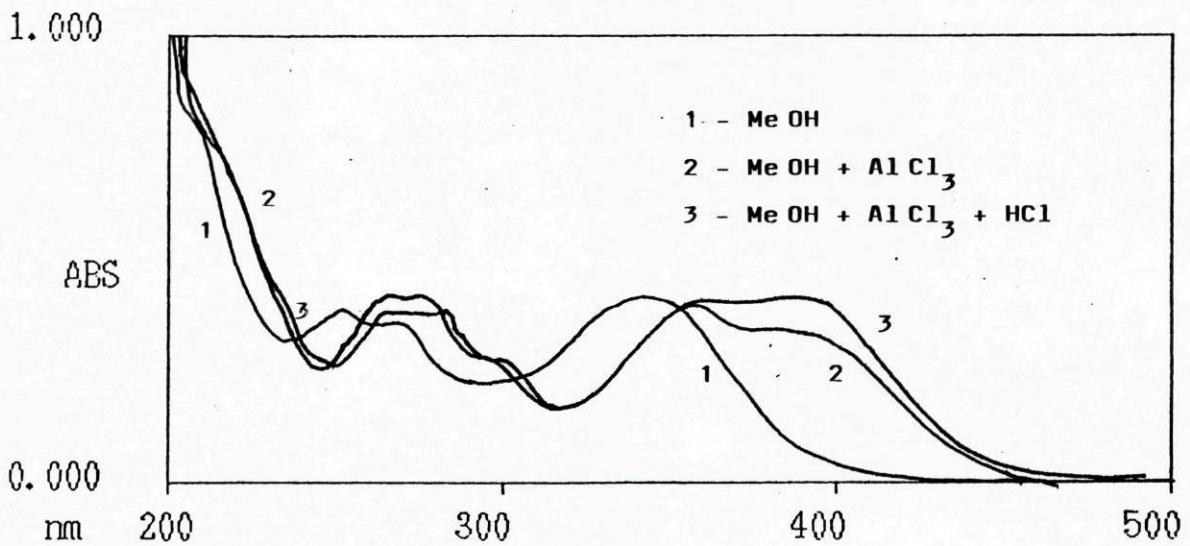


Fig. 82 - Espectros no UV do composto B

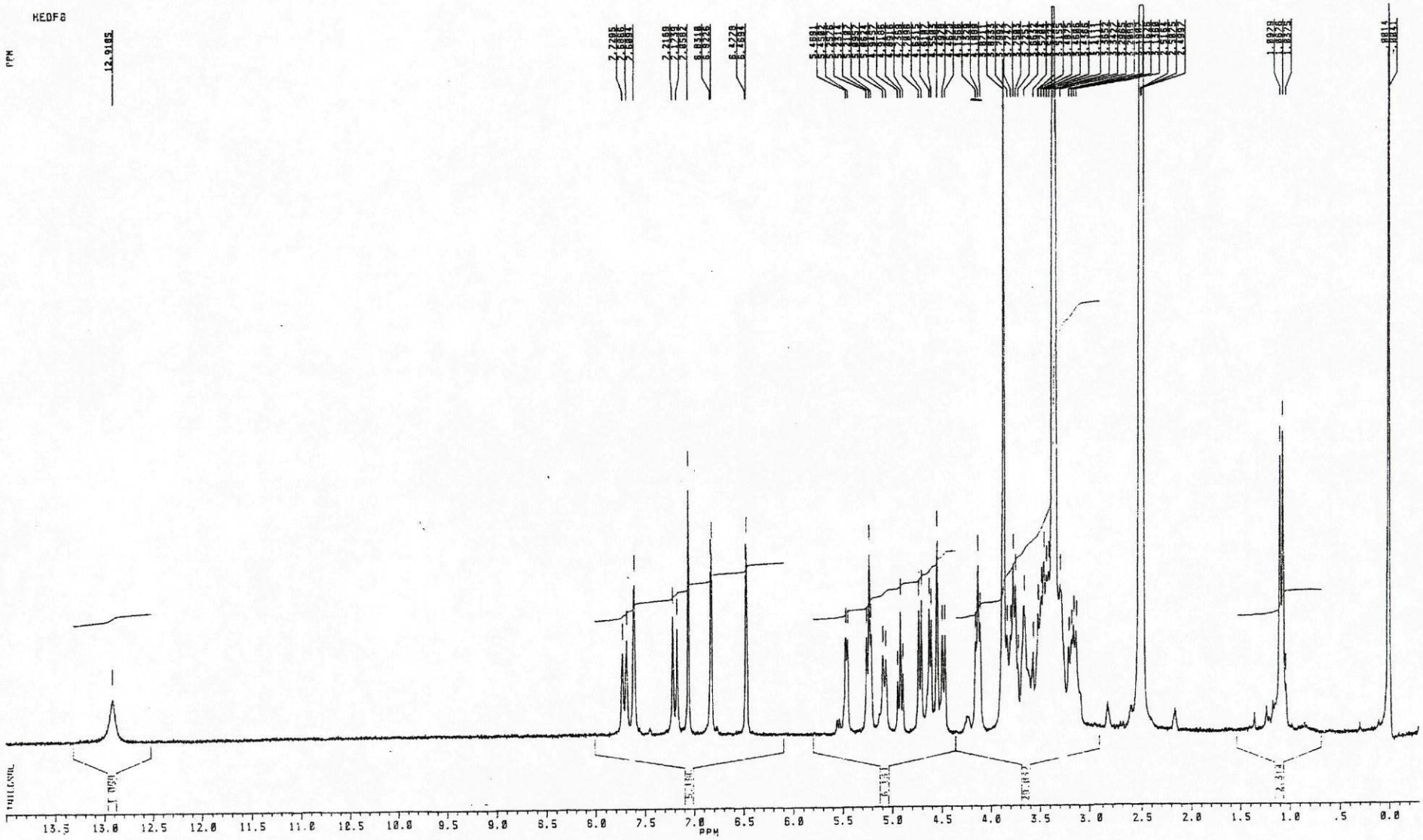


Fig. 83 - Espectro de RMN ^{1}H do composto B

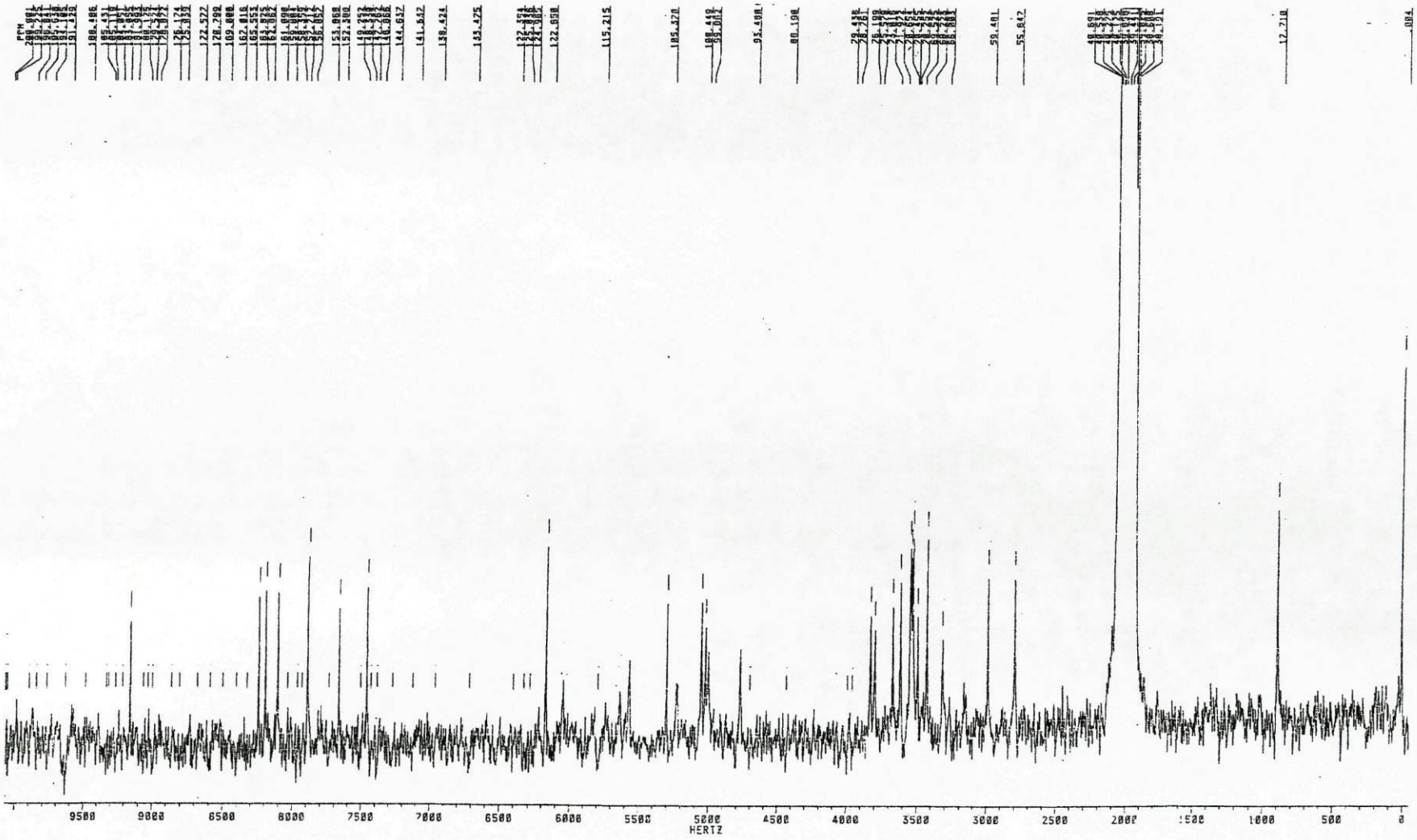


Fig. 84 - Espectro de RMN ^{13}C do composto B

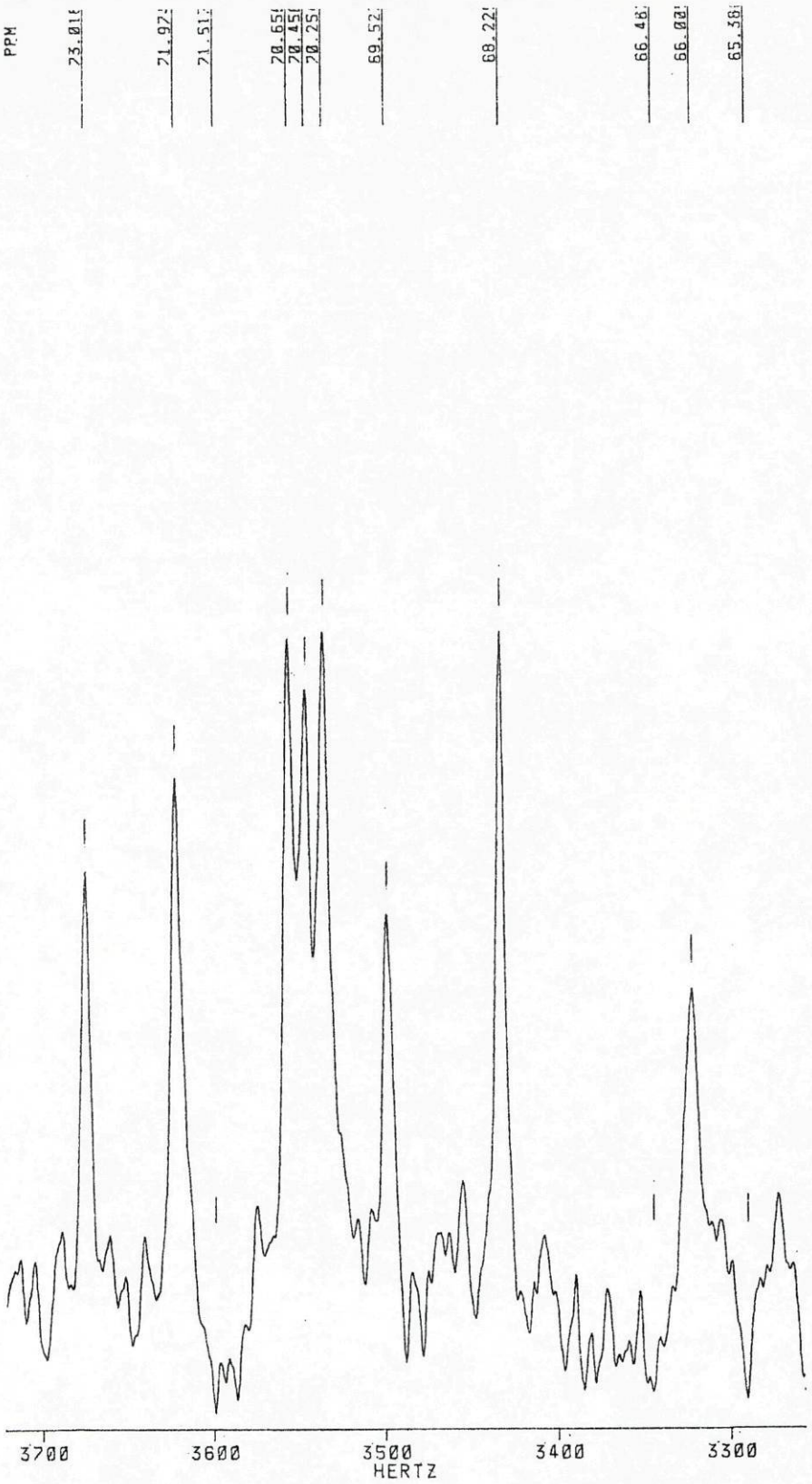


Fig. 84a - Espectro de RMN ^{13}C do composto B.
Expansão da zona de 65-75 PPM

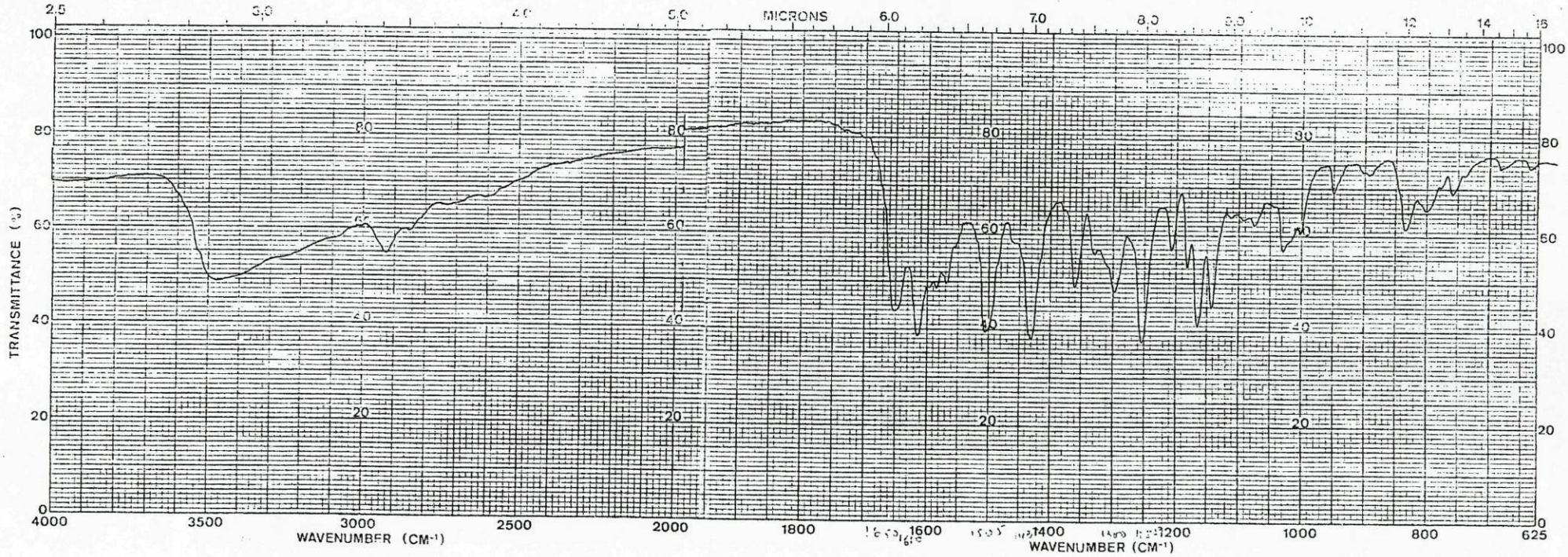
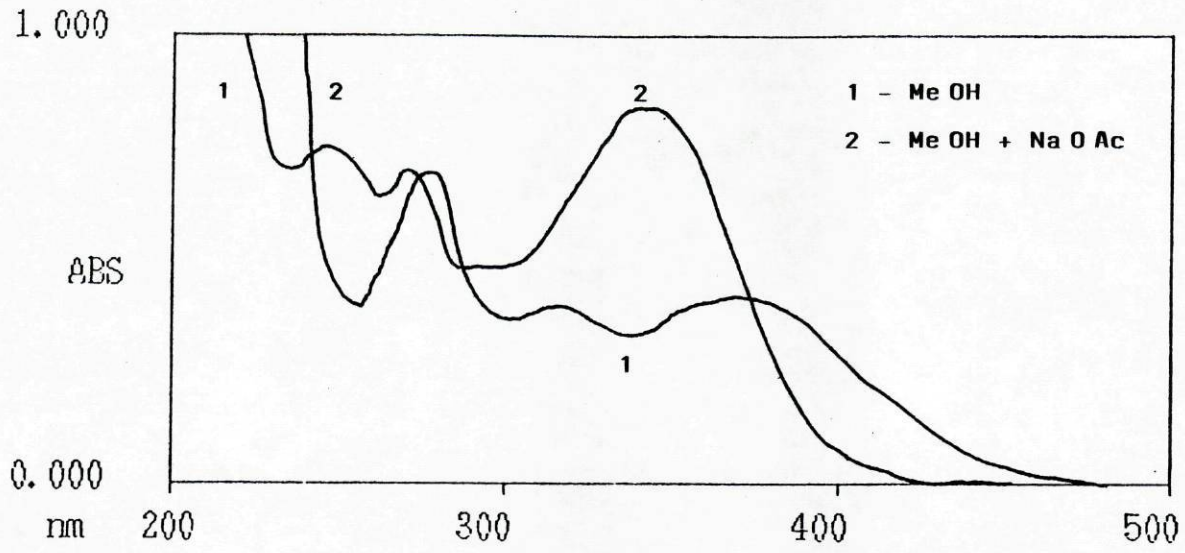


Fig. 85 - Espectro no IV do composto BH



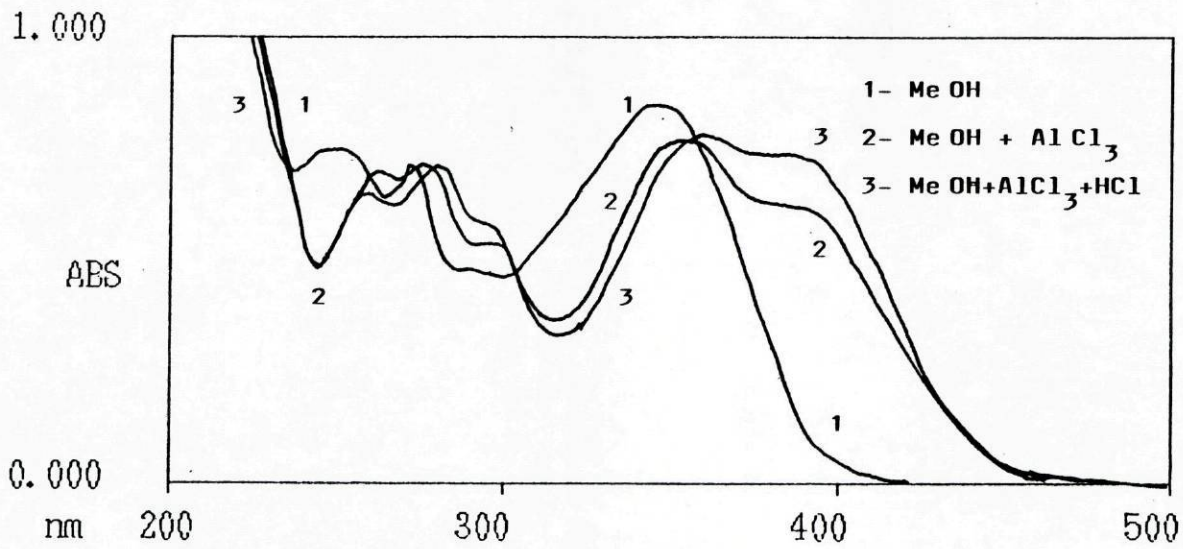


Fig. 86 - Espectros no UV do composto BH

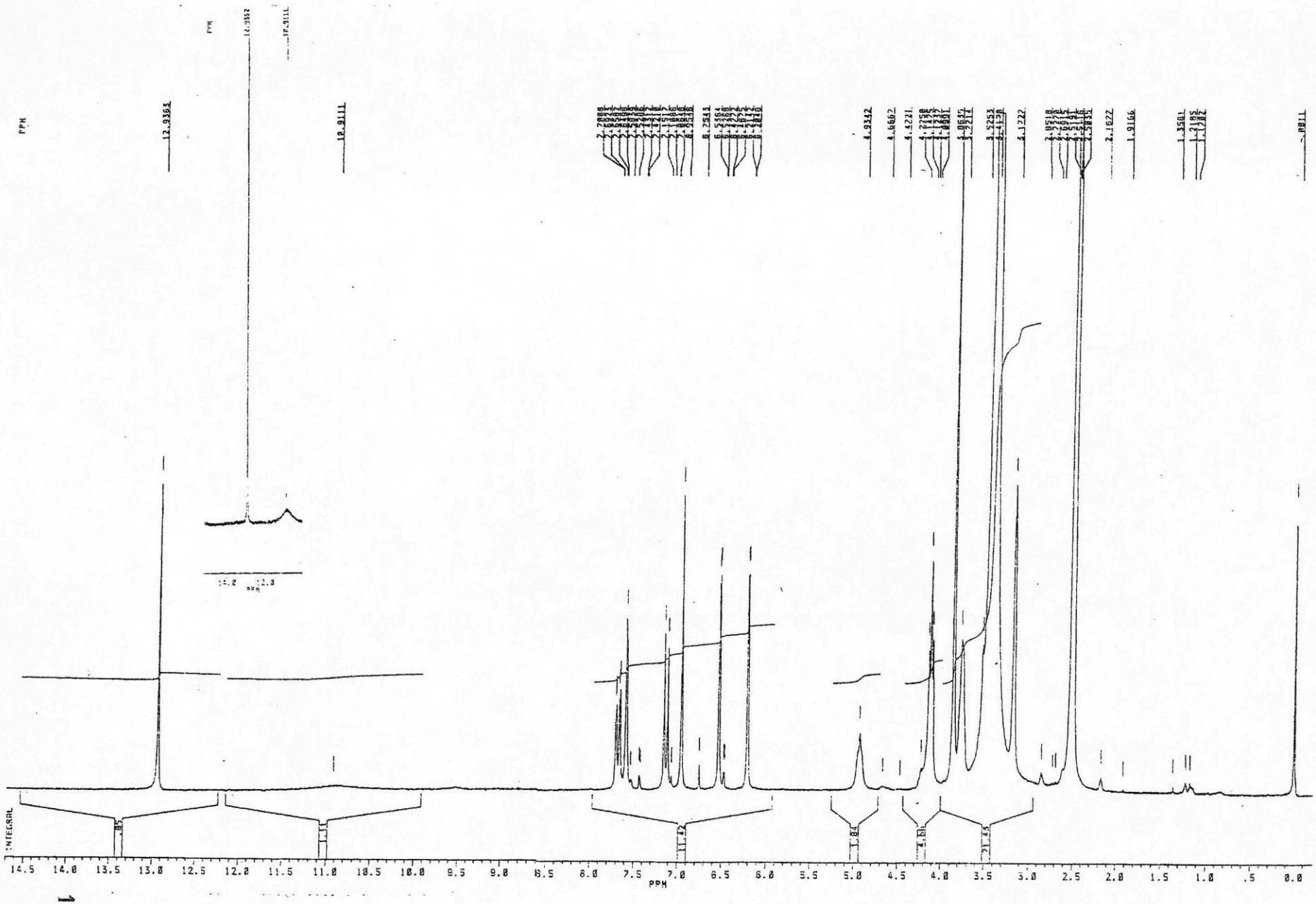


Fig. 87 - Espectro de RMN ^{1}H do composto BH

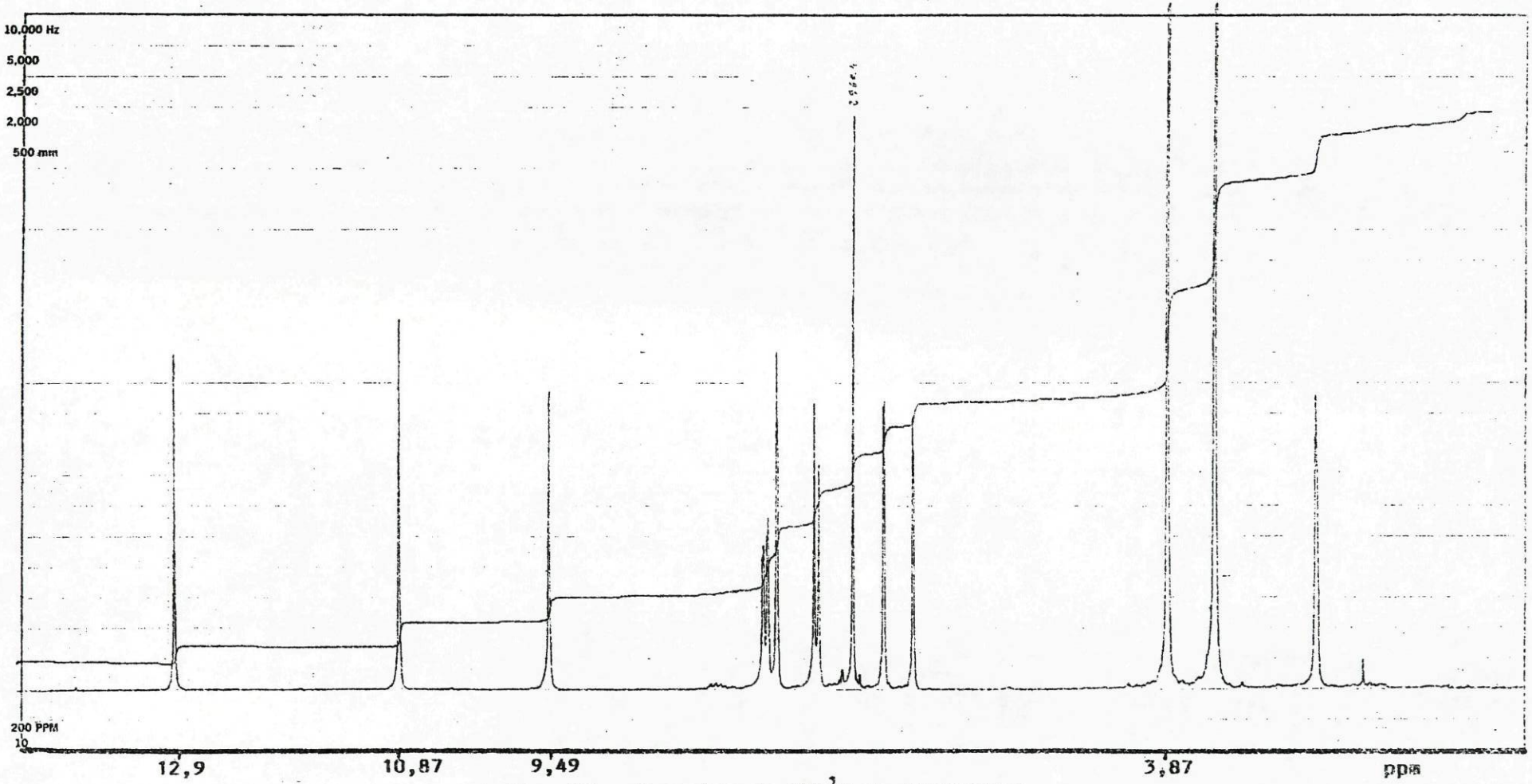


Fig. 87 a - Espectro de RMN ^{1}H da diosmetina

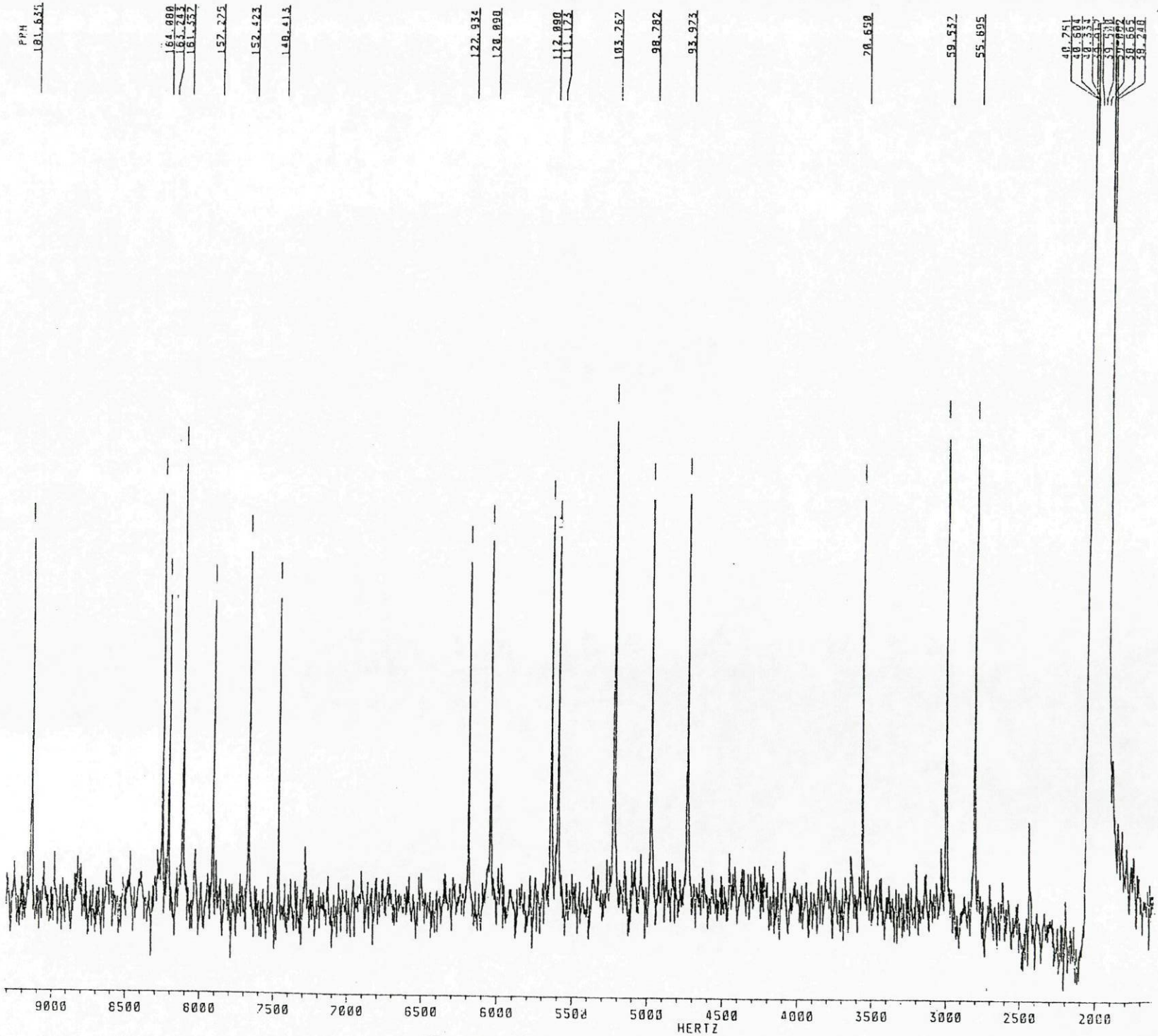


Fig. 88 - Espectro de RMN ^{13}C do composto BH

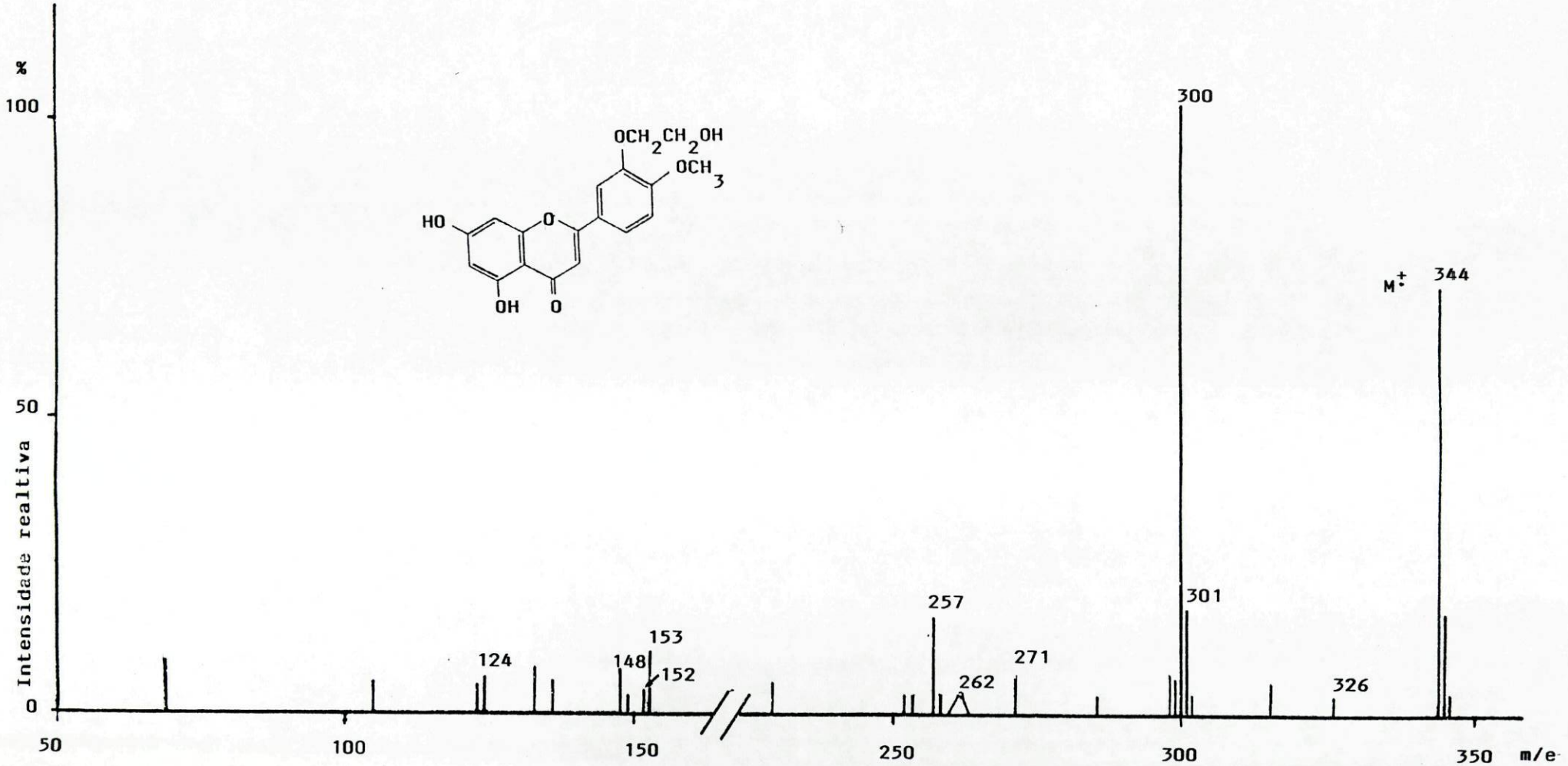
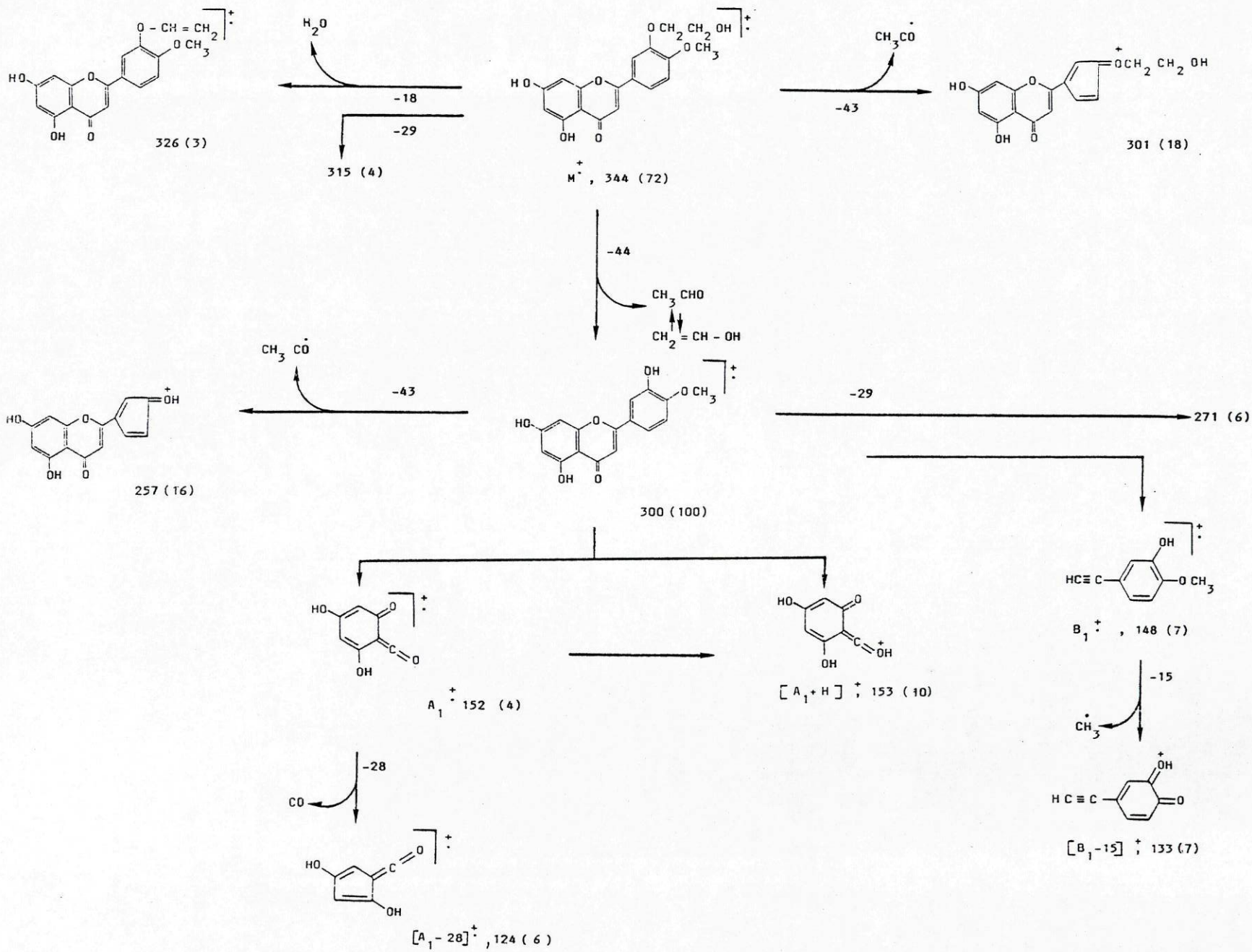


Fig.89 : Espectro de massa (IE) do composto BH

(Picos de intensidade relativa superior a 3%)



Esquema 8 - Hipótese interpretativa de fragmentação do composto BH

COMPOSTO **AX**

Oespectro de UV em metanol pôs em evidência a natureza flavónica do composto. O registo dos espectros em metanol, após a utilização dos reagentes de deslocamento já referidos para os compostos **A** e **B**, levaram a admitir que os grupos fenólicos em C-5 e C-7 se encontravam ocupados (91-94) (Fig. 93,pag 146) (Quadro 21).

Quadro 21: Absorção no UV do composto **AX**

Solvente e Reagentes	**Máximos de Absorção** λ,nm		
MeOH	336,0	265,5	255,5
MeOH+$AlCl_3$	337,5	266,0	258,0
MeOH+$AlCl_3$+HCl	337,0	266,0	258,0
MeOH+NaOAc	337,0	265,5	255,0

(i) - inflexão

Esta dedução pôde ser confirmada pela análise do espectro de RMN^{1}H (Fig.94,pag.147), que não mostrou qualquer sinal atribuível ao protão fenólico em C-5, que na diosmina aparece sob a forma de um singuleto a δ 13,2.

A análise do espectro de RMN^{1}H na zona de campo mais baixo e a comparação do mesmo com os espectros de RMN^{1}H da diosmina e dos compostos **A** e **B** (Quadro 22) evidenciou a presença de um singuleto a δ 9,44, o qual integra um protão, indicativo de que o grupo fenólico em C-3′ se encontrava livre.

Quadro 22: Comparação de dados de RMN^{1}H da diosmina e dos compostos **A, AX** e **B**

^{1}H	**Diosmina** δ (ppm) DMSO	**Composto A** δ(ppm) DMSO	**Composto AX** δ(ppm) DMSO	**Composto B** δ(ppm) DMSO
OH em C-5	13,20	—	—	12,91
OH em C-7	—	—	—	—
OH em C-3′	9,49	—	9,44	—

Com base nos dados até agora descritos deduziu-se que o composto em estudo deveria corresponder ao derivado mono(2-hidroxietilado) em C-5 (XIII), isómero do derivado mono(2-hidroxietilado) em C-3′ (XII), correspondente ao composto **B** . Este composto só não foi isolado na Exp.26.

Para confirmar a estrutura proposta, submeteu-se o composto a uma hidrólise ácida nas condições já descritas. A aglicona (**AXH**), depois de extraída do meio reaccional com acetato de etilo (133), foi recristalizada de metanol e analisada.

O seu espectro de RMN^{1}H (Fig 95, pag.148), comparado com o espectro da diosmetina, revela a ausência do singuleto referente ao protão fenólico em C-5 e mostra mais um multipleto entre δ 4,02 e δ 4,14, referente a 4 protões, o que confirma a existência de um grupo -O$\underline{CH_2}\underline{CH_2}$OH na sua molécula. (130,131).

Em face dos resultados até agora descritos e comparando os valores de δ dos protões fenólicos da diosmetina com os valores encontrados para a aglicona do composto **B** (**BH**) e para o composto em estudo (**AXH**) (Quadro 23), pôde concluir-se

que o grupo - OCH_2CH_2OH se encontra ligado em C-5.

Quadro 23: Comparação de dados de RMN^{1}H da diosmetina e dos compostos **BH** e **AXH**

^1H	**Diosmetina** δ (ppm) DMSO	**Composto AXH** δ(ppm) DMSO	**Composto BH** δ(ppm) DMSO
OH em C-5	12,90	—	12,94
OH em C-7	10,89	10,79	10,88
OH em C-3′	9,47	9,45	—

A espectrometria de massa (IE), (Fig.96, pag.149), (Esquema 9, pag.150), não permitiu, como se esperava, distinguir esta aglícona da aglícona do composto **B**. As fragmentações observadas no espectro de massa de ambos os compostos seguem caminhos muito semelhantes. Como o grupo - OCH_2CH_2OH ocupa posições diferentes na molécula, podia, em princípio, esperar-se obter picos $A_1^{+\cdot}$ e $B_1^{+\cdot}$ inteiramente distintos (141). Tal não aconteceu, possivelmente devido à labilidade do grupo - CH_2CH_2OH, que desaparece facilmente sem permitir ser observado nas fragmentações do núcleo. Em ambos os compostos o ião molecular perde CH_2=CHOH (decomposição confirmada por um M* a m/e 262), para dar um ião de m/e 300, e perde CH_3CO para dar novo ião de m/e 301. A clivagem característica do núcleo flavónico é observada nos dois compostos, originando iões $A_1^{+\cdot}$, $B_1^{+\cdot}$ e fragmentos destes iões. Em ambos os casos o $M^{+\cdot}$ é bastante abundante (72% do pico base para o composto **BH**; pico base no composto **AXH**). Para os dois compostos, como aliás para a aglícona do derivado dissubstituído, verificou-se uma perda de 29 u.m.a. a partir do ião de m/e 300, que deve corresponder a uma perda sequencial de H˙ e CO. Esta fragmentação que

já se observara para as agliconas dos derivados carboximetilados, tem vindo a ser estudada por Guidugli e col. (143,144).

Em face do exposto, pôde concluir-se que a aglícona do composto em análise, (XVI), de massa molecular 344 ($C_{18}H_{16}O_7$), apresenta um grupo $-OCH_2CH_2OH$ que o espectro de RMN^{1}H mostrou estar ligado em C-5 (Fig.97).

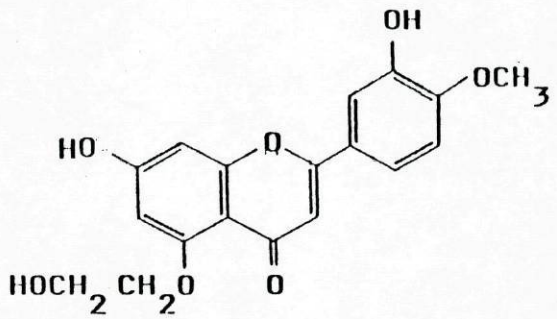
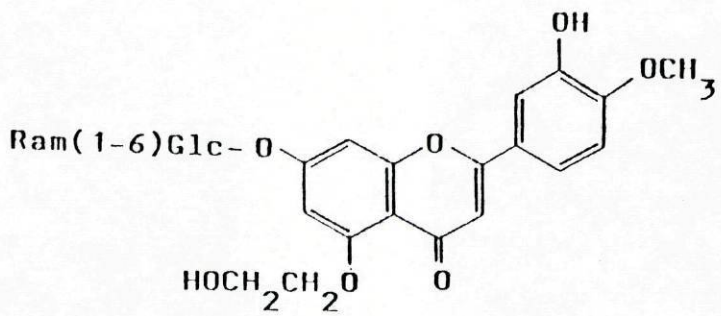


Fig. 97

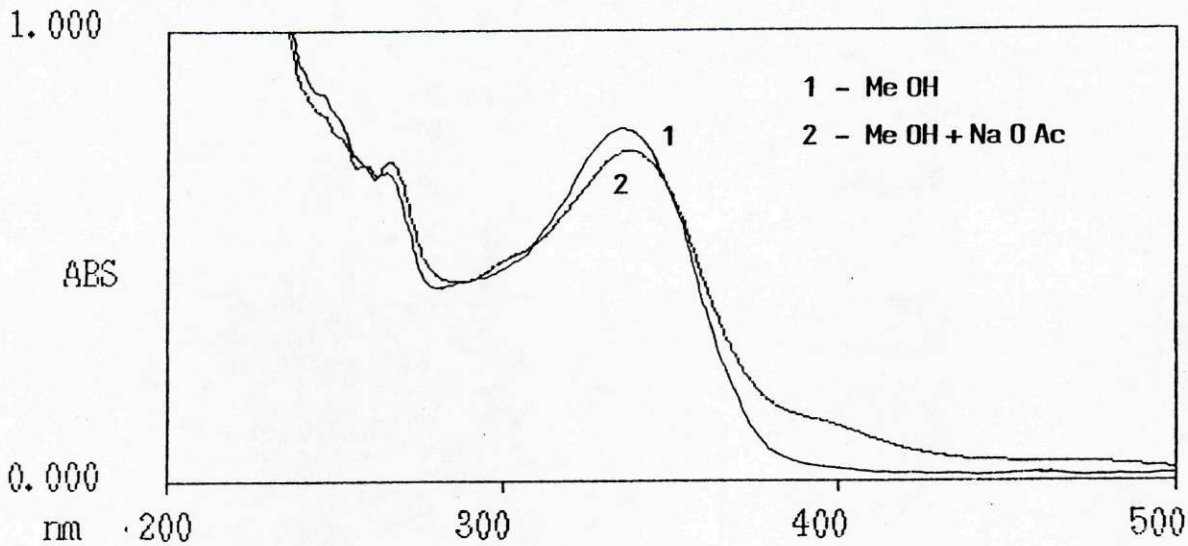
A identificação dos constituintes da fracção aquosa-ácida resultante da hidrólise foi realizada por TLC, comparando o comportamento cromatográfico da amostra em estudo com amostras autênticas de glucose e ramnose (145), tendo os resultados obtidos levado a concluir que os açúcares presentes na amostra eram aqueles dois compostos.

Em face do exposto, concluiu-se que o composto em análise, (composto **AX**), o qual se mostrou facilmente solúvel em água e solúvel em metanol, corresponde ao derivado mono (2-hidroxietilado) em C-5 da diosmina e apresenta a estrutura indicada na Fig.98.



7-O-Ramnoglucosil-5 (2-hidroxietoxi)-3´-hidroxi-4´-metoxiflavona (XIII)

Fig.98



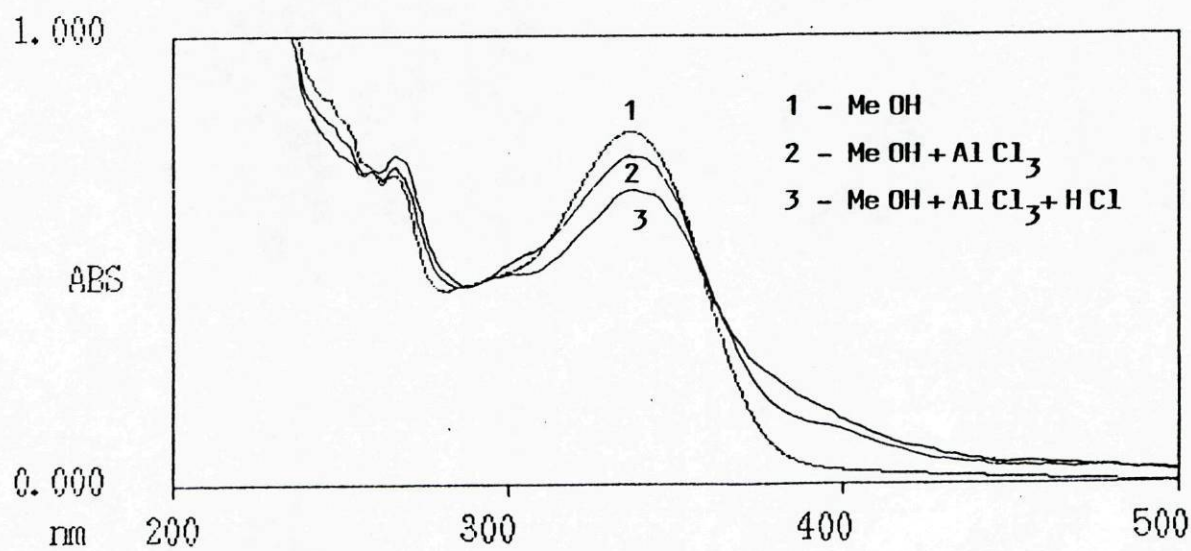


Fig. 93 - Espectros no UV do composto AX

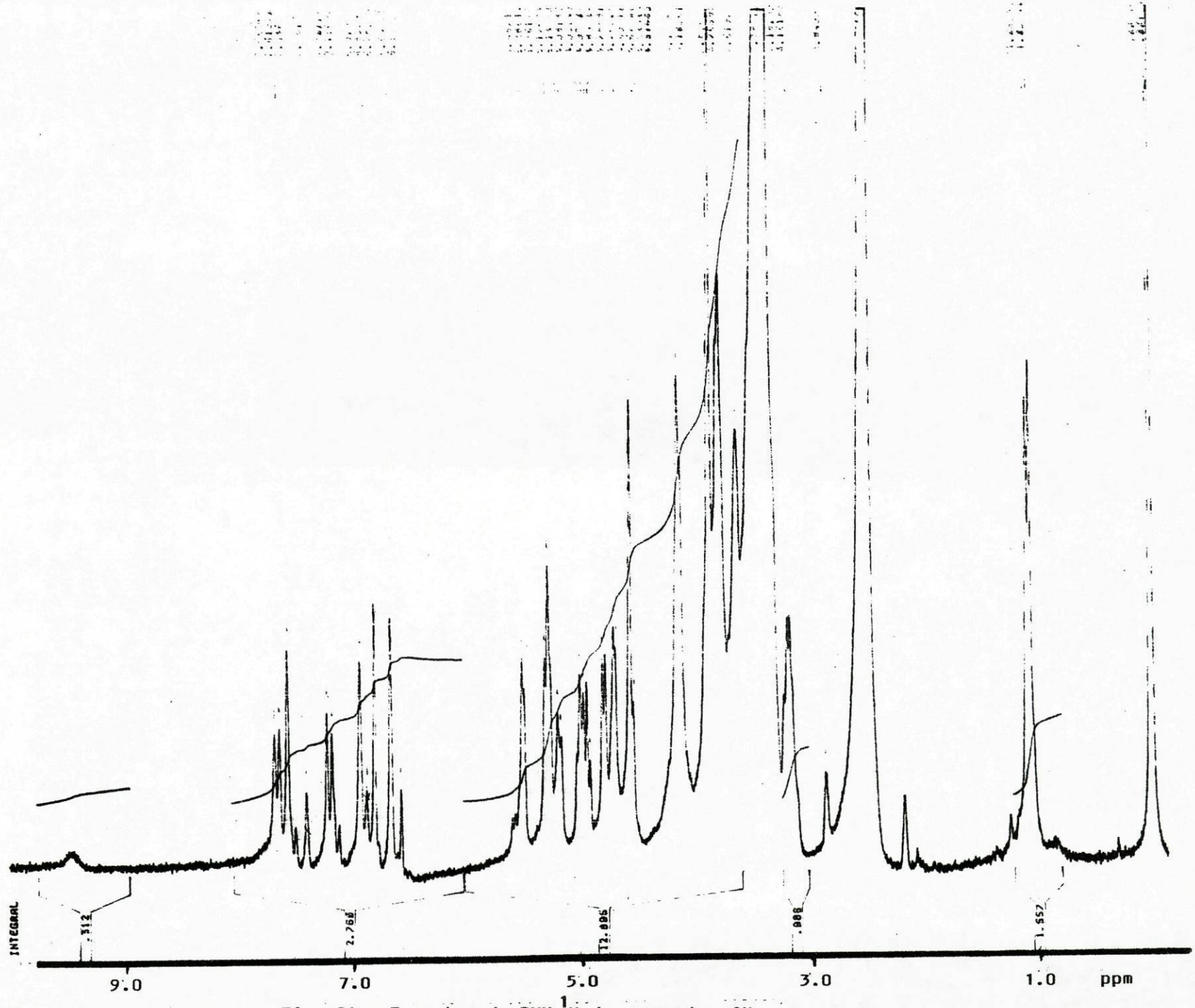


Fig. 94 - Espectro de RMN ^{1}H do composto AX

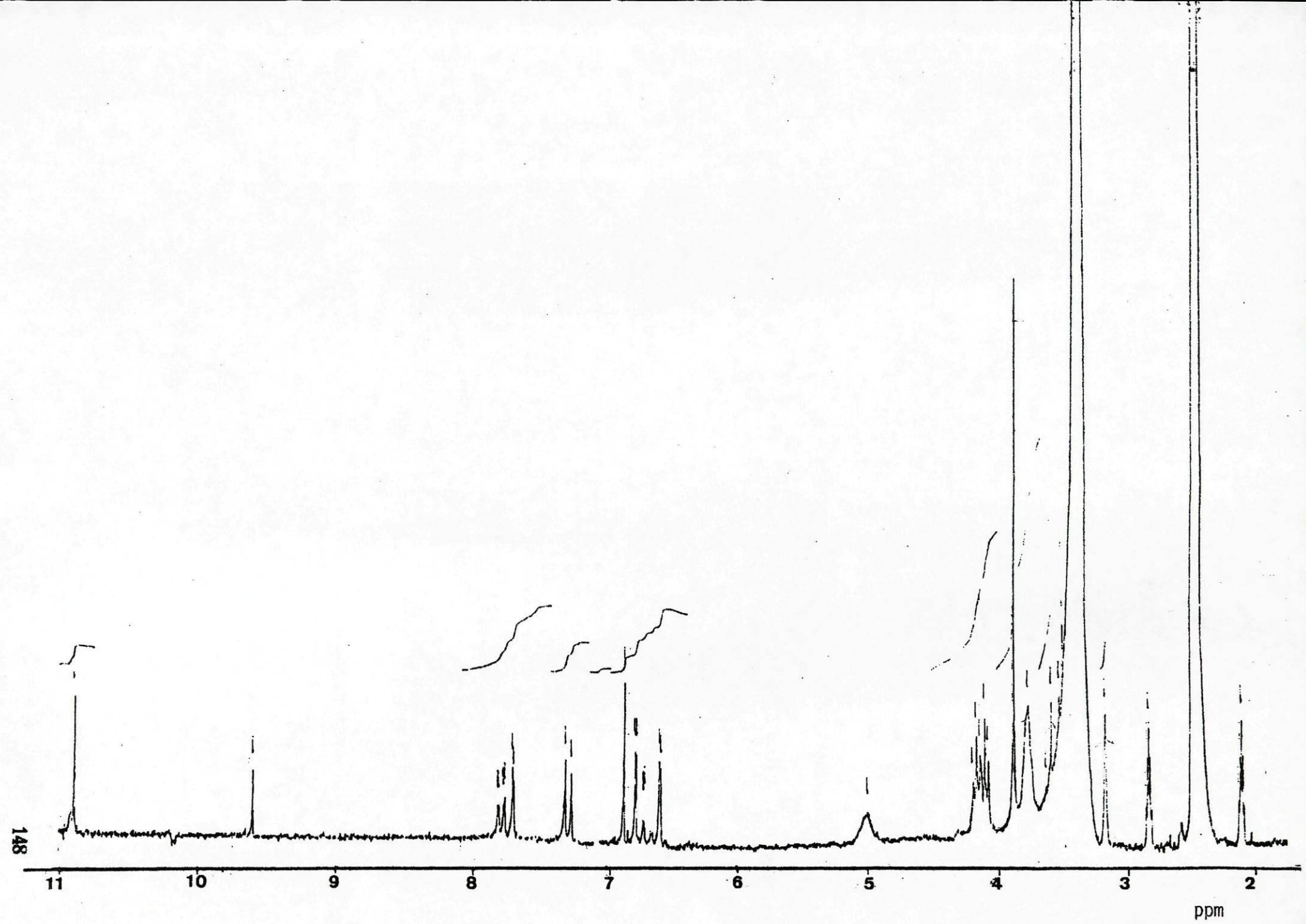


Fig. 95 - Espectro de RMN ^{1}H do composto AXH

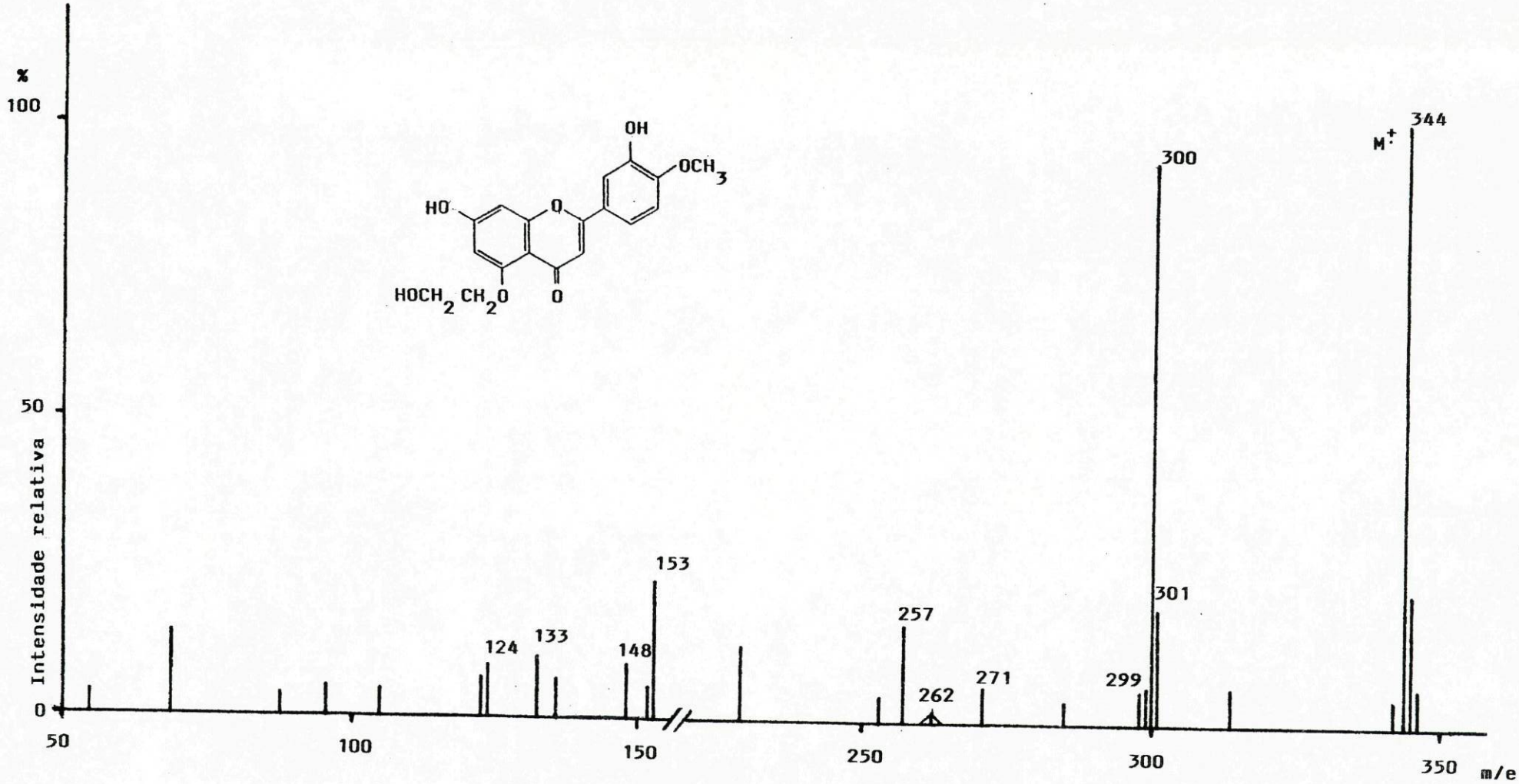
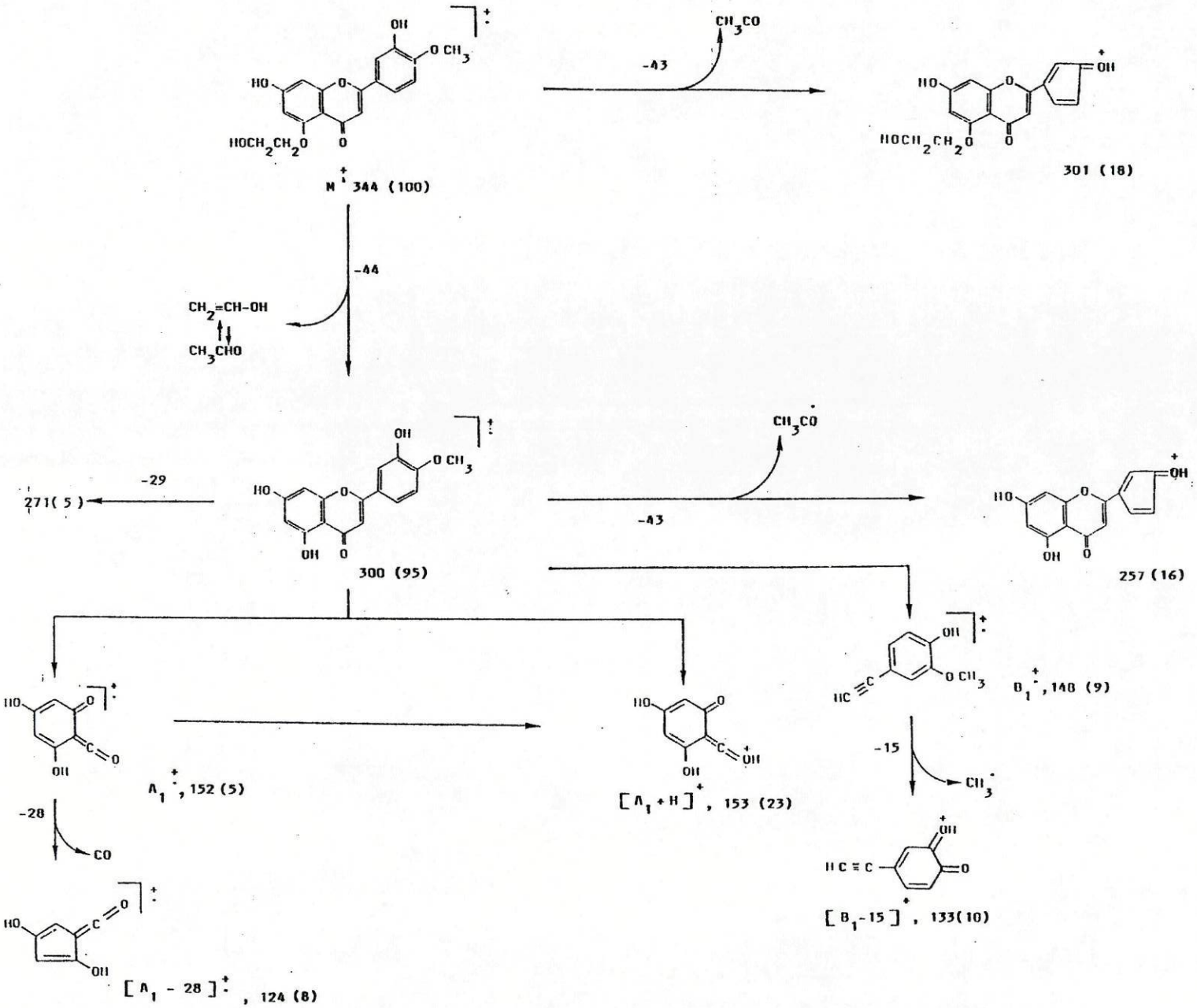


Fig. 96: Espectro de massa (IE) do composto AXH

(Picos de intensidade relativa superior a 3 %)



Esquema 9 - Hipótese de fragmentação do composto AXH

2. 2. 5. Determinação da percentagem relativa dos derivados formados nas diferentes experiências

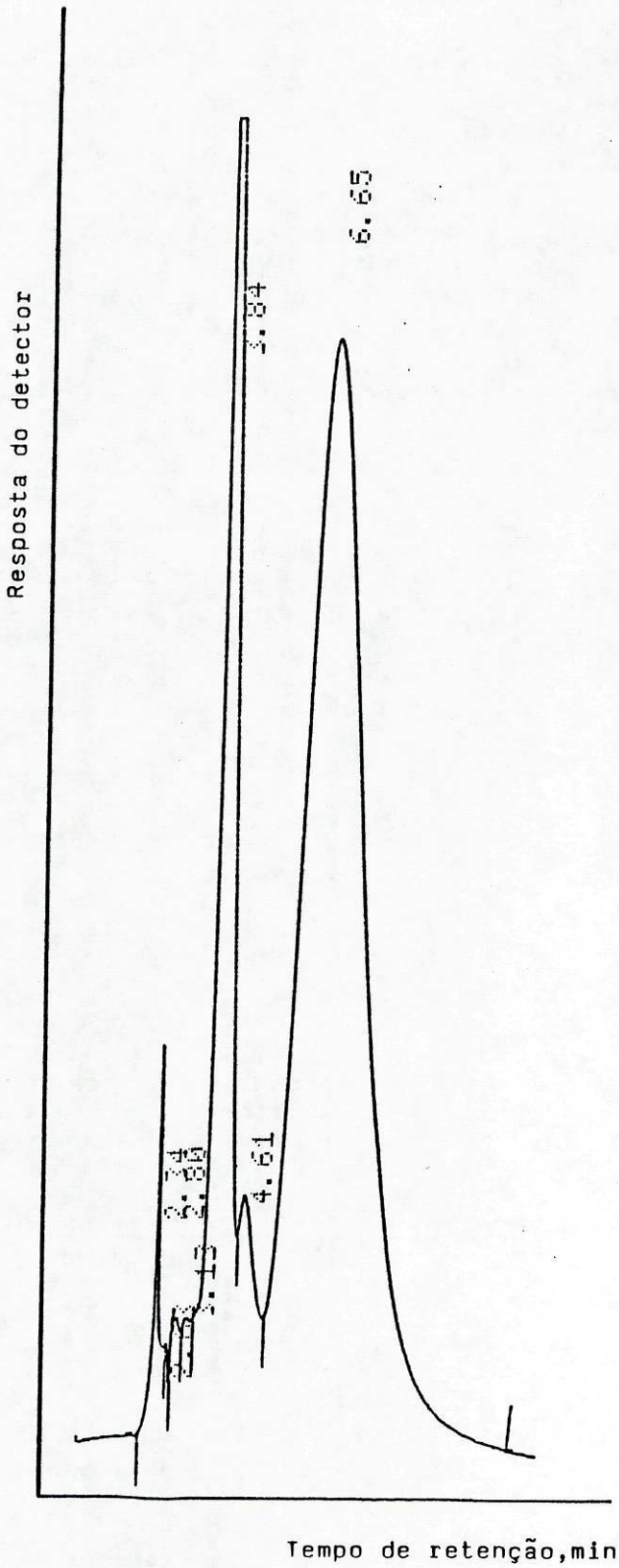
Recorreu-se à HPLC para determinar as percentagens dos diferentes derivados existentes no produto bruto obtido em cada experiência.

O Quadro 24, mostra o resultado obtido nas Exp. 20, 23 e 26 (Fig.99,100,101, pag.152,153,154), usando para a detecção o comprimento de onda de 254 nm, onde os três derivados apresentam valores próximos de log ξ (A: 4,0; AX: 4,0; B: 4,2).

Quadro 24: Comparação de dados de HPLC relativos às experiências 20, 23 e 26

Composto	% de Areas		
	Exp. 20	Exp.23	Exp.26
Derivado mono(2-hidroxietilado) em C-5	0,876	1,38	—
Derivado mono(2-hidroxietilado) em C-3′	73,584	76,65	69,83
Derivado 2-hidroxietilado em C-5 e C-3′	23,974	21,975	26,24
Total:	(98,434)	(100)	(96,07)

A análise do quadro mostra que nas três experiências o produto bruto é constituido maioritáriamente pelo derivado mono(2-hidroxietilado) em C-3′, enquanto que o mono (2-hidroxietilado) em C-5, conforme se previa , é o composto que existe em menor quantidade, não se chegando a formar na Exp.26.



FILE 1. METHOD 0. RUN 21 INDEX 21

PEAK#	AREA%	RT	AREA BC
1	1.076	2.34	4102 62
2	0.071	2.63	269 62
3	0.348	2.8	1328 62
4	0.071	3.13	272 62
5	23.974	3.84	91388 62
6	0.876	4.61	3341 62
7	73.584	6.65	280503 63
TOTAL	100.		381203

Fig. 99 - Cromatograma (HPLC) referente à análise quantitativa dos constituintes do HED resultante da Exp. 20

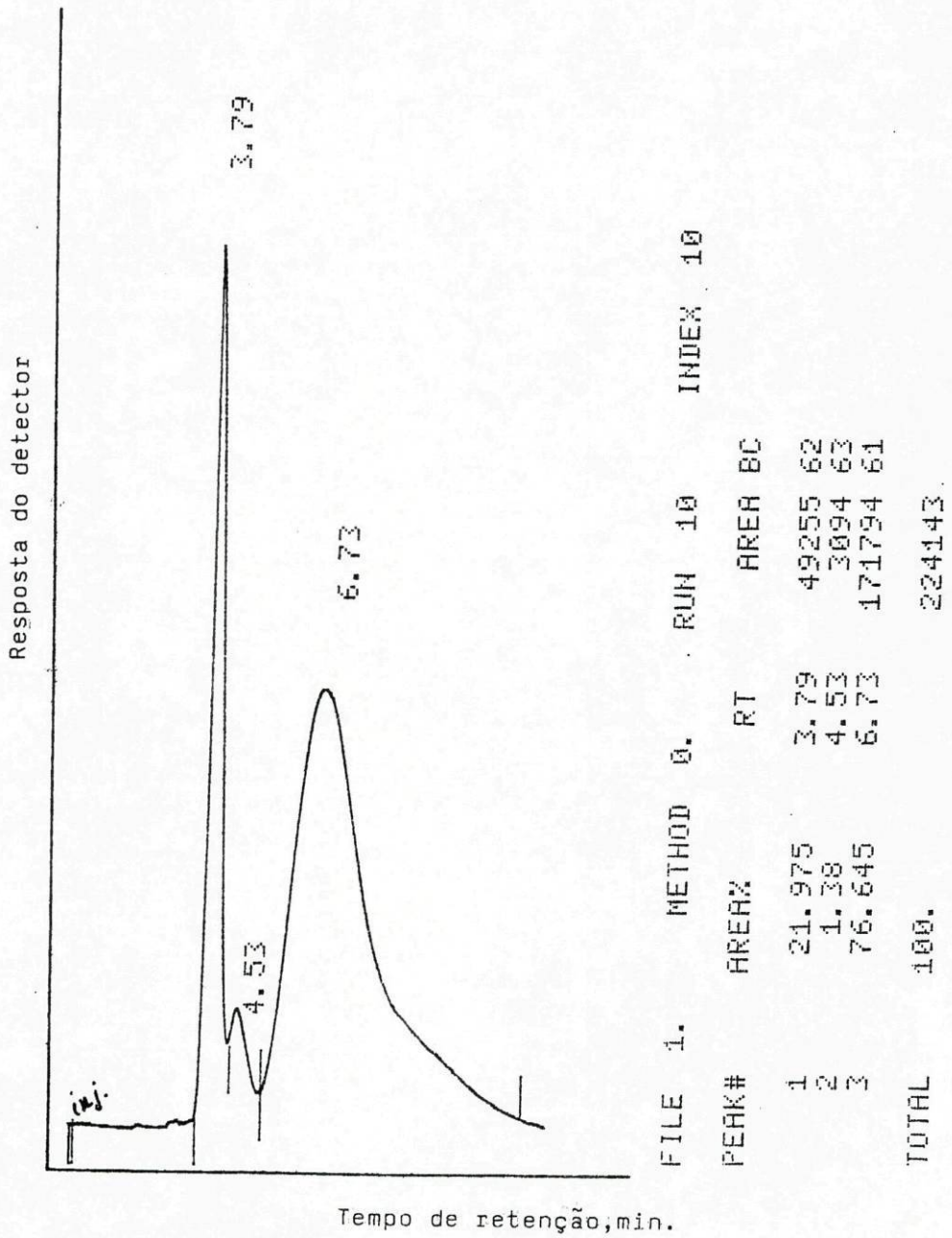
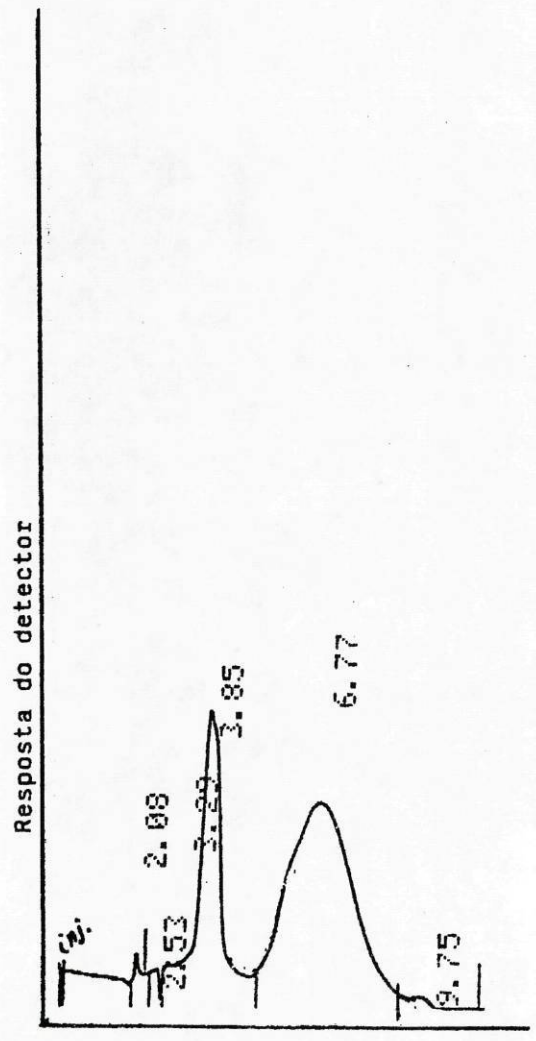


Fig. 100 - Cromatograma (HPLC) referente à análise quantitativa dos constituintes do HED resultante da Exp. 23 .



FILE 1. METHOD 0. RUN 22 INDEX 22

PEAK#	AREA%	RT	AREA BC
1	0.57	2.08	463 61
2	0.899	2.53	731 62
3	1.534	3.29	1247 02
4	26.24	3.85	21329 62
5	69.831	6.77	56761 62
6	0.925	9.75	752 63
TOTAL	100.		81283

Fig. 101 - Cromatograma (HPLC) referente à análise quantitativa dos constituintes do HED resultante da Exp. 26 .

2.3. ESTERIFICAÇÃO DA DIOSMINA PELA ACÇÃO DO ÁCIDO CLOROSSULFONICO

A síntese de sulfatos de flavonóides tornou-se indispensável para a obtenção de amostras com a finalidade de serem comparadas com produtos naturais ou usados como substractos e padrões em estudos enzimáticos.

Na preparação destes derivados têm sido utilizados diversos métodos, entre os quais se conta o que usa o ácido sulfâmico, que foi o escolhido para a obtenção de amostras de diosmetina mono e dissulfato (em C-3′ e C-7), com o objectivo de as comparar com compostos naturais isolados. (146 e 147).

Embora com objectivo diferente dos referidos, decidiu-se ensaiar a esterificação da diosmina pela acção do ácido clorossulfónico a fim de transformar os grupos fenólicos dos carbonos C-5 e C-3′ nos grupos -OSO_3H.

O ácido clorossulfónico foi utilizado por Cavallini e Mazzucchi, que com ele obtiveram, a partir de duas cumarinas simples, uma mono e outra *orto*-di-hidroxilada, os respectivos ésteres mono e dissulfúricos. Com a transformação referida aqueles autores conseguiram atingir o objectivo pretendido, que era tornar hidrossolúveis os compostos iniciais (62).

2.3.1. Estudo das condições de reacção

A semelhança do que foi feito no estudo da carboximetilação e da 2-hidroxietilação, iniciou-se o estudo da esterificação da diosmina por acção do ácido clorossulfónico fazendo reagir esta, depois de transformada no seu sal sódico, com quantidade estequiométrica de ácido clorossulfónico (1 mol de diosmina sódica: 2 mol de ácido clorossulfónico).

Em face das características do ácido clorossulfónico (148), houve que manter o balão com a solução de diosmina sódica mergulhado em gêlo picado e adicionar o ácido clorossulfónico gota a gota, a fim de minorar a reacção violenta daquele com a água. A mistura foi colocada em banho de silicone a 60-63^{o}C, com agitação e refluxo.

Ao fim de 30 minutos já era nítido o resíduo formado, pois o pH do meio reaccional baixou demasiado, e em consequência dessa variação de pH a diosmina presente insolubilizou-se.

Depois de se adicionar solução de hidróxido de sódio até pH=12, voltou a submeter-se a mistura ao aquecimento referido anteriormente. Esta solução (S), depois de arrefecida, foi acidificada e o resíduo formado (R1) separado por filtração.

Ao pretender-se concentrar a solução resultante (S1), verificou-se que tal não era possível pelo processo habitual, em virtude da baixa volatilidade do ácido clorossulfónico, obtendo-se um resíduo pastoso. Deste facto inferiu-se que um processo de ladear esta dificuldade, embora comprometendo o rendimento da reacção, era trabalhar com uma quantidade de ácido clorossulfónico inferior à estequiométrica.

Neste sentido, fez-se reagir a diosmina (2,00g ; 0,0033 mol) solubilizada em solução de hidróxido de sódio, com ácido clorossulfónico (.0,3 ml ; 0,0045 mol), ficando o meio reaccional com pH=12.

Após acidificação da solução S, apesar de se obter um resíduo considerável, que foi separado (R1), foi possível concentrar à secura a solução resultante (S1),tendo-se obtido um resíduo acastanhado (R2). Este resíduo foi submetido a um tratamento semelhante ao referido para a obtenção dos derivados carboximetilados (Esquema 2,pag.14). O resíduo final obtido, designado por DS , mostrou-se completamente solúvel em água.

Esta experiência, Exp.30, foi repetida a temperaturas diferentes, 70-73^{o}C e 80-83^{o}C, (Exp.31 e 32),tendo-se obtido à temperatura de 70-73^{o}C uma diminuição de R1 e um ligeiro aumento da massa de DS (Quadro 25, pag.157).

Quadro 25 : Condições reaccionais usadas nas diferentes experiências

Exp. nº / Condições Reaccionais	30	31	32
Diosmina g(mol)	2,0 (0,0033)	2,0 (0,0033)	2,0 (0,0033)
NaOH g(mol)	0,8 (0,02)	0,8 (0,02)	0,8 (0,02)
$ClSO_3H$ ml(mol)	0,3 (0,0045)	0,3 (0,0045)	0,3 (0,0045)
pH	12	12	12
Temperatura (ºC)	60-63	70-73	80-83
Tempo de Aquecimento (horas)	8	8	8
R1 (g)	0,61	0,40	0,52
DS (g)	0,81	0,92	0,69

2.3.2. Estudo analítico do produto bruto resultante das diferentes experiências

O produto bruto resultante da esterificação da diosmina pelo ácido clorossulfónico foi analisado por TLC em placa de celulose, tendo mostrado duas manchas com grande mobilidade em água. As manchas obtidas apresentavam forma de

lança, característica de flavonóides contendo na sua estrutura um ou mais grupos $-OSO_3^-$ (146).

O Quadro 26 mostra os resultados obtidos em placa de celulose usando como fase móvel a água e uma solução de ácido acético a 50%

Quadro 26 : Dados de Rf e mobilidade electroforética referentes às manchas **a** e **b**

Mancha	Rf		Detecção		Mobilidade electroforetica*
	Agua	Acido acético a 50%	UV366nm	$AlCl_3$ (UV366nm)	
a	0,90	0,75	azul fluorescente	azul fluorescente	1,8
b	0,81	0,61	castanha escura	amarela fluorescente	0,8

* Relativa ao 3-sulfato de quercetina
Em papel watman 3 mm; HCOOH a 3%: AcOH a 8% (1 :1), pH=2,2; 120 min a 400 V

A electroforese em papel (149), realizada nas condições descritas por Williams e Harborne (150), mostrou duas manchas que se moviam em direcção ao ânodo com mobilidades diferentes. As mobilidades, relativamente ao 3-sulfato de quercetina, são de 0,8 e 1,8 (Quadro 26).

Os resultados expostos levaram a admitir a existência, no produto bruto, de um derivado com um grupo $-OSO_3H$ em C-3′ e outro com este grupo simultâneamente em C-3′ e C-5 . (Fig.102).

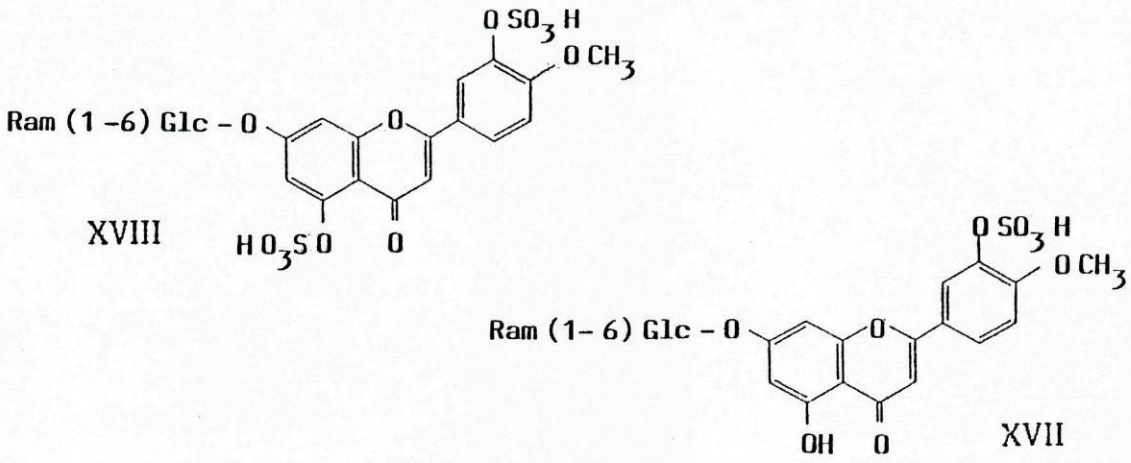


Fig. 102

O derivado monossubstituído em C-3´(XVII) seria o responsável pela mancha **b** (TLC), que mostrou uma côr castanha mudando para amarela fluorescente após pulverização com $AlCl_3$, facto característico de flavonas 5-hidroxiladas (73) e corresponderia à mancha com menor mobilidade electroforética. O derivado dissubstituído (XVIII), logicamente mais polar em virtude da presença dos dois grupos $-OSO_3H$, corresponderia à mancha **a** (TLC) e seria responsável pela mancha com maior mobilidade electroforética(151).

A separação destes compostos está a ser feita por HPLC, em fase reversa, utilizando uma coluna RP-18 e como fase móvel uma mistura de metanol, água e ácido acético.

Infelizmente até à data não foi possivel obter qualquer dos derivados suficientemente puros para serem caracterizados. No entanto, tudo leva a crer que seja possível a purificação e posterior caracterização destes heterósidos por espectrometria de massa (FAB), processo que tem vindo a mostrar-se muito útil na determinação estrutural de flavonas contendo na sua estrutura grupos $-OSO_3^-$ (146,152).

CONCLUSÕES

3. CONCLUSÕES

As conclusões mais importantes a tirar do que se expôs, são as seguintes:

1. A introdução na molécula da diosmina dos grupos funcionais - CH_2CH_2OH, - CH_2COOH e - SO_3H nas posições C-3´ e /ou C-5 permite transformá-la em derivados hidrossolúveis.

2.

a) - Nas condições experimentais ensaiadas para a carboximetilação da diosmina (Exp. 1 - 14) não se forma o derivado monocarboximetilado em C-5, obtendo-se unicamente os derivados monocarboximetilado em C-3´ e dicarboximetilado.

b) - O derivado monocarboximetilado em C-3´ é o composto que se forma em maior quantidade, sendo as condições ensaiadas na Exp. 2 as mais favoráveis para a sua formação.

c) - O derivado dicarboximetilado obtém-se em maior percentagem nas condições descritas na Exp. 6, sendo também nestas condições que se obtém um produto bruto com maior percentagem de derivados.

3.

a) - A 2-hidroxietilação da diosmina pode levar à formação de dois ou de três derivados, conforme as condições reaccionais usadas.

Nas condições experimentais adoptadas, (Exp. 20-28), apenas em meio mais alcalino (pH=12,5), à temperatura de 60-63^{o}C e usando quantidade estequiométrica de 2-cloroetanol, (Exp. 26), não se forma o derivado mono(2-hidroxietilado) em C-5. Em todas as outras condições ensaiadas formam-se sempre os três derivados, embora em proporções diferentes.

b) - O derivado mono (2-hidroxietilado) em C-3´ é o composto que se forma em maior quantidade, seguido do derivado 2-hidroxietilado em C-5 e C-3´. O derivado mono (2-hidroxietilado) em C-5 ou não se forma (Exp. 26) ou forma-se em quantidade muito pequena (cerca de 1 %).

c) - A Exp. 26 foi a que reuniu as condições mais favoráveis para a formação do derivado dissubstituído.

d) - Nas condições descritas para a Exp. 23 foi obtido um produto bruto constituído exclusivamente por derivados 2-hidroxietilados.

4 - O estudo já efectuado para a esterificação da diosmina pelo ácido clorossulfónico leva a admitir que nas condições reaccionais ensaiadas (Exp. 30-32) apenas se verifica a substituição em C-3´ ou simultâneamente em C-3´e C-5.

5 - A cromatografia líquida de alta pressão, em fase reversa, revelou ser uma técnica eficaz para a separação dos compostos obtidos. Uma montagem HPLC -EM (FAB) constituiria, quanto a nós, o método mais directo para a análise de misturas deste tipo de compostos.

PARTE EXPERIMENTAL

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. METODOS EXPERIMENTAIS E ESPECIFICAÇÃO DOS MATERIAIS E INSTRUMENTOS UTILIZADOS

a) Os pontos de fusão, não corrigidos, foram determinados em bloco de Köffler.

b) Os solventes foram evaporados com auxílio de pressão reduzida e a temperatura inferior a 50°C, usando um evaporador rotativo "Buchi R 110

c) As pesagens foram efectuadas em balança Mettler AE 163.

d) A determinação de pH foi feita utilizando um aparelho Bibby SMP_1

e) Os espectros de IV foram registados com as substâncias dispersas em brometo de potássio na concentração de 1% e utilizando um espectrofotómetro Perkin-Elmer, modelo 257.

f) Os espectros de UV foram registados em espectrofotómetro Hitachi modelo U-2000.

Os reagentes de deslocamento usados, foram obtidos de acordo com a técnica descrita por Markham (153)

g) Para a obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear foram usados os seguintes aparelhos:

- Espectrómetro Brücker FT, tipo AC 200, de 200 MHz para RMN^{1}H e 50,3 MHz para RMN^{13}C;
- Espectrómetro Variam XL-200, de 200 MHz para RMN^{1}H e 50,3 MHz para RMN^{13}C
- Espectrómetro Brücker CP-300, de 300 MHz para RMN^{1}H e 75,5 MHz para RMN^{13}C

Foi usado como solvente o dimetilsulfóxido hexadeuterado e como referência interna o tetrametilsilano. Os deslocamentos químicos foram registados em unidades δ e as constantes de acoplamento em Hz.

h)

-Os espectros de massa com ionização por impacto electrónico a 70 eV foram obtidos em espectrómetro Hitachi Perkin-Elmer, modelo RMU-6M

-Os espectros de massa com ionização por bombardeamento por átomos rápidos foram obtidos usando um espectrómetro de massa Kratos MS-50 de três sectores EBE. A fonte FAB usada foi uma fonte padrão equipada com um canhão Ion Tech, que permite disparar átomos de árgon com a energia de 7 K eV. As amostras foram dissolvidas em glicerol.

-Os espectros de colisão MIKES, CA foram obtidos usando o espectrofotómetro referido anteriormente, por varrimento da voltagem do segundo sector eléctrico.

Foi usado o hélio como gás-alvo na câmara de colisão situada entre o sector magnético e o segundo sector eléctrico, sendo introduzido gás até se obter uma atenuação da intensidade do sinal da ordem dos 50%. Os dados foram processados com um sistema de dados DS-55 com "software" feito no Midwest Center for Mass Spectrometry.

-Para a obtenção de alguns espectros de massa FAB foi ainda usado um espectrómetro de massa VG 12-250 do Physico-Chemical Measurements Unit (PCMV). A substância em análise foi dissolvida em glicerol e bombardeada por átomos de xenon acelerados.

i)

-Para a cromatogradia em camada fina com carácter analítico e/ ou preparativo foram usados como adsorventes Kielselgel 60 HF_{254}, Art. 7739 da Merck e celulose microcristalina Avicel (R), Art. 2330 da Merck.

Foi feita uma suspensão em água e distribuída em camada sobre placas de vidro por meio de espalhador "Quickfit". A espessura das camadas foi de 0,25 mm.

Na cromatografia com carácter analítico foram também utilizadas placas pré-revestidas Kieselgel 60 F_{254}, com 0,2 mm de espessura, Art. 5554 Merck; placas de celulose com 0,1 mm de espessura, Art. 5552 da Merck; e placas de poliamida com 0,15

mm de espessura, Art. 5555 da Merck.

-Para a cromatografia em coluna o adsorvente utilizado foi a celulose microcristalina, Art. 2331 da Merck.

- Na cromatografia em fase gasosa utilizou-se um cromatrógrafo Perkin-Elmer, modelo 990, com detector FID e adaptado de um registador Perkin-Elmer modelo 561. Foi usado como gás vector o azoto.

-Os cromatogramas de HPLC foram obtidos nos seguintes aparelhos:

-Cromatógrafo Perkin-Elmer série 3B, equipado com duas bombas e programador de solvente, detector de UV Perkin - Elmer modelo LC - 75 de comprimento de onda variável, registador Perkin-Elmer, modelo 561 e integrador Varian , modelo 4270.

-Sistema de HPLC modular isocrático Gilson: Bomba modelo 302, módulo manométrico modelo 802 C ,válvula de injecção Rheodyne modelo 7125: detector UV-VIS modelo HM/Holocrome, cabeça analítica 5 SC, cabeça preparativa tipo 50 SC, registador potenciométrico Gilson

-A fase móvel foi filtrada por filtros Scheleicher & Schuell (0,2 µm) e desgasificada por ulta-sons a 50/60 Hz num aparelho Astrasons, 13 HT, durante 30 minutos.

As amostras foram previamente filtradas por filtros Millipore (0,45µm).

Nas determinações cromatográficas realizadas por HPLC , não se procedeu à correcção dos tempos de retenção e na determinação da percentagem relativa dos componentes das misturas não se usaram factores de resposta nem de calibração, fazendo corresponder a área total dos picos a 100%.

j) Para a liofilização utilisou-se um liofilizador Multi-Dry FTS Systems, Inc.

l) Na electroforese foi usada uma tina de electroforese Gelman Sciences.

m) Os solventes usados foram produtos analiticamente puros ou para síntese da firma Merck e os utilizados para HPLC foram produtos para "cromatografia (Lichrosolv)". Os espectro no U V foram obtidos a partir de soluções feitas em metanol para espectroscopia, Art. 6002 da Merck.
A água desionisada usada tinha uma resistividade superior a 18 $M\Omega$.

n) A diosmina utilizada foi diosmina de síntese cedida gentilmente pelos Laboratórios VITÓRIA.
Os reagentes utilizados foram produtos analiticamente puros (ou para síntese) da firma Merck.

o) A resina permutadora de aniões e catiões usada, foi a ELGACAN C114.

4.2. OBTENÇÃO DOS DERIVADOS CARBOXIMETILADOS DA DIOSMINA (Exp. 6)

Em balão de colo esmerilado fez-se reagir a diosmina (5,00 g ; 0,0082 mol) com 150 ml de hidróxido de sódio a 20% (3 g ; 0,075 mol). À solução obtida adicionou-se, gota a gota, com agitação, 18 ml de uma solução de 10 g de $ClCH_2COOH$ e 10 g de Na_2CO_3 em H_2O, até perfazer 50 ml (pH=12,2).

A reacção foi conduzida com agitação e aquecimento sob refluxo em banho de silicone (80-83°C). O aquecimento foi mantido até não se observar formação de precipitado após acidificação da solução (este ensaio foi realizado de 30 em 30 minutos, em tubo de ensaio, com 1 gota da solução adicionada de 1 ml de HCl a 50%). Depois de arrefecida à temperatura ambiente, a mistura foi acidificada com HCl a 50% até pH=1,2. Após concentração sob pressão reduzida, o resíduo obtido foi transferido para cadinho filtrante. Este resíduo foi submetido a uma extracção repetida com metanol e controlada por TLC. À solução metanólica resultante da extracção adicionou-se éter etílico em excesso e a suspensão formada foi deixada em repouso no frigorífico durante 24 horas. A suspensão foi filtrada por cadinho filtrante com auxílio do vazio e o resíduo obtido, depois de lavado com éter, foi seco com uma corrente de ar quente e, seguidamente, em estufa, a 37°C.

Obtiveram-se 3,5 g de um sólido de côr amarela-clara.

4.2.1. Estudo analítico do produto bruto formado (DMC)

O produto bruto formado mostrou-se muito solúvel em água, solúvel em metanol, facilmente solúvel em metanol:água (9,5:0,5), praticamente insolúvel no clorofórmio, éter e acetona.

Cromatografia de adsorção em camada fina

No Quadro 27 indicam-se alguns dos sistemas cromatográficos usados neste estudo

Quadro 27: Sistemas cromatográficos e reveladores usados

Sistema Cromatográfico	Adsorvente	Fase móvel	Reveladores
SC1	Celulose	Ácido acético:água (50:50)	U.V.(366 nm) Sol metanólica de $AlCl_3$ a 5%
SC2	Celulose	Ácido acético:água (30:70)	U.V.(366nm) Sol metanólica de $AlCl_3$ a 5%
SC3	Gele de Sílica HF254	Acetato de etilo: álcool abeoluto: metanol:isopropanol: butanol: água: ácido fórmico (80:19:13:15:20:20:9)	U.V(254nm)
SC4	Gele de Sílica HF254	Acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: água (100:11:11:27)	U.V.(254 nm) Sol de $FeCl_3$ a 2,5%
SC5	Gele de Sílica HF254	Clorofórmio: acetona: ácido fórmico (75:16,5:8,5)	U.V.(254 nm) Sol de $FeCl_3$ a 2,5%
SC6	Celulose	n-Butanol: ácido acético: água (6:1:2)	U.V. (366 nm) Sol metanólica de $AlCl_3$ a 5%
SC7	Celulose	Água	U.V(366 nm) Sol metanólica de $AlCl_3$ a 5%

Cromatografia líquida de alta pressão

As amostras foram dissolvidas numa mistura de metanol e água (9,5:0,5) e filtradas. As análises foram efectuadas com eluição isocrática à temperatura ambiente.

Coluna: Alltech RP-18 (10µm) - 240x4,6 mm

Solventes: metanol

água

ácido acético

Detecção: 254 nm

Volume de injecção: 10 µl (soluções a cerca de 1 mg/ml)

Velocidade do papel do registador e integrador: 5 mm/min

No Quadro 28 indicam-se as condições analíticas referentes aos cromatogramas que se mostram nas Fig. 4,5,6,7,8,11 e 12 (pag. 25 - 29 e 32)

Quadro 28

Cromatograma	Condições cromatográficas		
	Fase móvel (metanol:água: ác.acético)	Fluxo (ml/min)	Sensibilidade (AUFS)
Fig. 4	45:53:2	1,0	0,04
Fig. 5	45:53:2	1,0	0,04
Fig. 6	45:53 :2	1,0	0,04
Fig. 7	40:58:2	1,2	0,04
Fig. 8	40:58:2	1,4	0,04
Fig. 11	43:55 :2	1,2	0,08
Fig. 12	43:55 :2	1,2	0,08

4.2.2. SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS COMPONENTES FLAVONICOS DA MISTURA DCM

4.2.2.1. Cromatografia de adsorção em camada fina

Cerca de 200 mg de amostra resultante da Exp. 2, depois de dissolvidos em metanol:água (9,5:0,5), foram cromatografados em placa de celulose, usando como fase móvel uma solução de ácido acético a 30% (v/v). Os produtos correspondentes às manchas predominantes foram extraídos da celulose com uma solução de metanol e água (8:2). Após eliminação do solvente foi isolado apenas o derivado monocarboximetilado em C-3'(V) (24,0 mg). Rendimento : 12%.

4.2.2.2. Cromatografia de adsorção em coluna

Em coluna de celulose (30 g) foram cromatografados 200 mg de amostra provenientes da mesma experiência dissolvidos em metanol: água (9,5:0,5), usando, como fase móvel, ácido acético a 30% (v/v) e acompanhando a eluição com luz UV (366 nm). As diferentes fracções recolhidas, depois de evaporado o solvente, foram retomadas por metanol e comparadas por TLC, reunindo-se as que mostraram semelhança de comportamento.

Esta técnica permitiu isolar, o derivado monocarboximetilado em C-3'(V) (67,7 mg). Rendimento: 33,9%.

4.2.2.3. Cromatografia líquida de alta pressão

Preparação da amostra

O produto bruto, em solução saturada em metanol: água (9,5:0,5) foi passado

por uma coluna (2 g) contendo uma mistura de resinas permutadoras de catiões e aniões. A eluição foi realizada com uma solução de metanol e água (8 : 2) e a solução resultante evaporada à secura sob pressão reduzida.

As amostras foram preparadas a 50 mg/ml a partir do resíduo obtido, em solução de metanol:água (9,5 : 0,5) e filtradas.

Condições Cromatográficas

As análises foram efectuadas em coluna RP-18 com eluição isocrática à temperatura ambiente

Condições referentes ao cromatograma representado na Fig. 9 (pag.30)

Coluna: Perkin - Elmer, Preparative -C18 (40 µm) Ser. nº85, ref.0258-3001
Filtro de coluna: Rheodyne 0,5 µm
Fase móvel: MeOH: H_2O: AcOH (40:58:2) pH=3,1
Detecção: 254 nm
Volume de injecção: 2 ml(solução a 50 mg/ml)
Fluxo : 10ml/min
Sensibilidade : 256 AUFS
Velocidade do papel do registador : 10 mm/min

Condições referentes ao cromatograma representado na Fig. 10 (pag.31)

Coluna: Alltech-Econosil C18 (10µ), 250 X 7 mm, ser. nº PO72986-2
Fase móvel: MeOH: H_2O: AcOH (35:63:2)
Detecção : 254 nm
Volume de injecção : 25 µl (solução a 10 mg/ml)
Fluxo : 4 ml/min
Sensibilidade : 0,64 AUFS
Velocidade do papel do registador e integrador: 5 mm / min

A separação realizada com esta coluna foi efectuada nas mesmas condições, apenas modificando o volume de injecção para 2 ml.

Tratamento das fracções recolhidas

As fracções recolhidas foram concentradas até cerca de meio volume com auxílio de pressão reduzida e a uma temperatura inferior a 40°C. Seguidamente, cada fracção foi transferida para um frasco apropriado e congelada a -70°C.

Os frascos contendo as amostra congeladas foram adaptados a um liofilizador (modelo de junção múltipla) com pressão de 20 mm de Hg. Depois de retirada a água, os frascos foram fechados hermeticamente.

Com esta técnica, e partindo de uma amostra resultante da Exp. 2, o rendimento obtido para a separação do derivado monocarboximetilado em C-3´ foi de 39%.

4. 2. 3. Comportamento cromatográfico dos flavonóides isolados

O Quadro 29 mostra o comportamento cromatográfico em TLC dos derivados monocarboximetilado em C-3´ e dicarboximetilado da diosmina, usando três sistemas diferentes (SC_1, SC_2 e SC_7). A composição destes sistemas é indicada no Quadro 27, pag.169)

Quadro 29 : Dados cromatográficos (TLC), dos compostos isolados

Composto	Rf			Detecção		
	SC1	SC2	SC7	UV366nm	Vap. amónia (UV366nm)	$AlCl_3$ (UV366nm)
Derivado monocarboxi-metilado em C-3'	0,60	0,47	0,74	castanha escura	amarela	amarela fluorescente
Derivado dicarboxime-metilado	0,69	0,75	0,89	azul fluorescente	amarela	azul fluorescente

O Quadro 30 indica o tempo de retenção (HPLC) dos heterósidos isolados. Estes valores foram obtidos nas condições cromatográficas descritas para os cromatogramas representados nas Fig. 11 e 12 (Quadro 28 ,pag.170)

Quadro 30: Dados cromatográficos (HPLC) dos compostos isolados

Composto	Tempo de retenção (min)
Derivado dicarboximetilado	5,8
Derivado monocarboximetilado em C-3'	15,5

4.2.4. Características físicas e espectrais dos derivados monocarboximetolado em C-3′ e dicarboximetilado da diosmina

4.2.4.1 7 -O-Ramnoglucosil-5-hidroxi-3′-carboximetoxi-4′-metoxiflavona (V)

F = 198-200°C

UV, λ_{max}^{MeOH} nm: 341,5; 270,0; 253,0 (log ε: 4,0; 3,9 ; 3,9)+$AlCl_3$: 379,5 352,0 ;276,5 ;263,0 ;+$AlCl_3$+HCl:380,0 ;347,5 ;295,0(i); 279,0 ; 261,5.+ NaOAc : 338,0 ; 271,5.

IV, $\tilde{\nu}_{max}^{KBr}$ cm^{-1}: 3400, 2930, 1730, 1655, 1610, 1510, 1500, 1440, 1370, 1320, 1260, 1180, 1150, 1070.

RMN ^1H (200 MHz, DMSO) ;∂12,9 (1H,s,5-OH); 7,68 (1H,dd,J=2,0 e 8,8 ; H-6′); 7,50 (1H, d,J=2,1;,H-2′);7,17 (1H,d,J=8,6,H-5′);6,99(1H,s,H-3); 6,77 (1H,d,J=2,0; H-8);6,46(1H,d,J=2,1; H- 6); 5,08(1H,d, J=7,H-1 da Glc); 4,73(2 H, s,-CH_2-);4,54(1H,s,H-1da Ram);3,86 (3H,s, OCH_3);3,5-5,5 (H de açúcares excepto dois H anoméricos);1,1(3H, d,J=6;CH_3 da Ram).

RMN ^{13}C (75,5 MHz, DMSO), ∂: Quadro 4 ,pag. 36

EM (FAB), m/e (int. rel.): 667 $[M+H]^+$(30), 359 $[(M+H)-146-162]^+$ (80)

4. 2. 4. 2. 7-O-Ramnoglucosil-5,3´-bis (carboximetoxi)-4´-metoxiflavona (IV)

F = 195ºC

UV, λ_{max}^{MeOH} ,nm : 341,0; 266,0; 252,5 (loge:3,9 ;3,9 ;3,9);+$AlCl_3$: 342,5; 270,0; 253,5.; + $AlCl_3$+ HCl: 341,0 ; 276,0 ; 266,0 + NaOAc: 333,0 ; 266,0.

IV, $\bar{\nu}_{max}^{KBr}$ cm^{-1}: 3400, 2920, 2850, 1735, 1630, 1600, 1510, 1430, 1360, 1265, 1180, 1150, 1060.

RMN ^{13}C (50,3 MHz, DMSO), δ : Quadro 6 ,pag.56

EM (FAB), m/e (int.rel.): 725 $[M+H]^+$ (15); 579 $[(M+H)-146]^+$ (15); 417 $[(M+H)-146-162]^+$(73)

4. 2. 5. Determinação da percentagem relativa de derivados obtidos em diferentes experiências.

Os resultados referentes às Exp. 2, 6 e 10 encontram-se reunidos no Quadro 7, pag. 66.

As condições analíticas referentes aos cromatogramas que se mostram nas Fig. 40, 41 e 42 , (pag.67-69) são as seguintes :

Coluna: Alltech RP-18 (10µm) - 240x4,6 mm

Fase móvel : metanol : água: ácido acético (42: 56: 2)

Detecção : 254 nm

Volume de injecção : 4 µl (solução a 1 mg/ml)

Fluxo : 1 ml/min

Sensibilidade : 0,04 AUFS

Velocidade do papel do registador e integrador: 5 mm/min

4. 2. 6. Obtenção e características físicas e espectrais das aglíconas resultantes dos derivados monocarboximetilado em C-3´e dicarboximetilado da diosmina

4. 2. 6. 1. 5,7 - Di-hidroxi - 3´- carboximetoxi- 4´- metoxiflavona (IX)

Dissolveram-se 99,8 mg do derivado monocarximetilado em C-3´em 90 ml de HCl a 50%. A solução foi mantida em banho de silicone (130°C) com agitação e refluxo, durante 50 minutos. A suspenção formada foi filtrada e o resíduo obtido lavado com água até reacção neutra (papel indicador universal). Após eliminação do solvente (liofilização) obtiveram-se 50,7 mg de resíduo que por recristalização de metanol forneceu 30,6 mg de cristais de côr amarela-claro correspondentes à aglícona do composto inicial. Rendimento: 57,1%

F = 275-276°C

UV, λ_{max}^{MeOH} ,nm : 342,5; 269,5; 242,5(log ε: 4,3; 4,1; 4,3); + $AlCl_3$: 377,0; 352,5; 296,0 (i); 279,0; 260,0; +$AlCl_3$+HCl: 382,5; 347,5; 294,0(i); 280,0; 258,0; +NaOAc: 362,0;311,0;278,0

IV, $\tilde{\nu}_{max}^{KBr}$ cm^{-1}: 3360,2930, 2860, 1730, 1650, 1610, 1590, 1570, 1550, 1510, 1435, 1365, 1255, 1170, 1150, 1075, 1040, 840.

RMN ^{1}H (300M Hz, DMSO): δ 12,87(1H,s,5-OH); 10,87 (1H,s,7-OH); 7,69 (1H,dd,J=2 e 8,8; H-6'); 7,53 (1H,d,J=2,1; H-2');7,16 (1H, d,J=8,7; H-5'); 6,93(1H,s,H-3); (1H,d,J=2,1; H-8); 6,20(1H,d,J=2,2; H-6); 4,83, (2H,s,- CH_2-); 3,88(3H,s,OCH_3).

RM $N^{13}C$ (75,5 MHz, DMSO), δ : Quadro 9, pag. 75

EM (IE), m/e (int. rel.): 359[M+1]$^{+\cdot}$ (25), 358 [M$^{+\cdot}$] (100), 329 (4), 314 (4),300 (17), 298 (10), 206 (4), 153 (13), 152 (3), 133(3), 124 (4).

4. 2. 6. 2. 5,3'- Bis (carboximetoxi)- 7- hidroxi - 4'- metoxiflavona (X)

Fez-se reagir 20,1 mg de derivado dicarboximetilado com 25 ml de HCl a 20%. A solução foi mantida em banho de silicone (130°C) a refluxo e com agitação, durante 50 minutos. A mistura, que se mantinha límpida, foi arrefecida em água com gêlo e a massa cristalina formada foi separada por filtração e lavada com água arrefecida até reacção neutra. O resíduo obtido foi dissolvido em água a quente e deixado em repouso no frigorífico durante 24 horas, tendo fornecido 4,9 mg de cristais amarelos-palha. Rendimento: 42,6%

F = 190-192^{o}C

UV, λ_{max}^{MeOH}, nm : 341,5; 270,0; 255,0 (log ε : 4,0; 3,9; 3,9;) ; + $AlCl_3$: 352,0; 279,0; 260,5; +$AlCl_3$+HCl: 348,0; 281,0; 257,5; +NaOAc: 358,0; 313,5; 278,0.

IV, $\bar{\nu}_{max}^{KBr}$, cm^{-1}: 2925, 2860, 1730, 1630, 1610, 1500, 1440, 1360,1330, 1260, 1165, 1060,1020, 835.

EM (IE), m/e (int rel.): 416[$M^{+\cdot}$] (3); 373 (4); 372 (7); 358(100); 329(4); 314 (5); 313 (6);301 (18); 300 (84); 298 (22); 271(14); 257(17); 152(14); 153(52);152(14); 148(13); 133(16); 124(19).

4.3. OBTENÇÃO DOS DERIVADOS 2-HIDROXIETILADOS DA DIOSMINA (Exp. 23)

Dissolveu-se com auxílio de agitação magnética, 2,20 g (0,0036 mol) de diosmina em 30 ml de hidróxido de sódio a 2% (0,015 mol). A solução obtida (pH=12,3) foi adicionada de 0,7 ml (0,0104 mol) de 2-cloroetanol e aquecida com refluxo, em banho de silicone (60-63^{o}C), mantendo a agitação . De 30 em 30 minutos recolheu-se para tubo de ensaio 1 gota da solução à qual se adicionou 1 ml de HCl a 50%. O aquecimento foi mantido até não se observar qualquer turvação neste ensaio.

Terminada a reacção, a solução foi concentrada sob pressão reduzida , tendo-se obtido um resíduo castanho que foi transferido para tubo de centrífuga rolhado. Este resíduo foi extraído com metanol (extracção múltipla), tendo sido o fim da extracção

detectado por TLC. As soluções extractivas, depois de filtradas, foram reunidas e a solução metanólica adicionada de éter etílico em excesso. Após um repouso de 24 horas, no frigorífico, a suspenção obtida foi filtrada por cadinho filtrante com auxílio do vazio e o resíduo lavado com éter e sêco. A secagem foi feita inicialmente com uma corrente de ar quente e depois em estufa a 37°C.

Obtiveram-se 2,17 g de um sólido de côr amarela-clara.

4.3.1. Estudo analítico do produto bruto formado (DHE)

O produto bruto mostrou-se muito solúvel em água, solúvel em metanol, ligeiramente solúvel em etanol, pràticamente insolúvel em clorofórmio, éter e acetona.

Cromatografia em camada delgada

Os sistemas utilizados foram os SC1 e SC2 cuja composição se encontra referida no Quadro 27, pag. 169, e os resultados obtidos encontram-se registados nos Quadros 12 e 13 (pag. 95 e 96).

Cromatografia líquida de alta pressão

As amostras foram dissolvidas numa mistura de metanol e água (9,5: 0,5) e filtradas. As análises foram efectuadas com iluição isocrática à temperatura ambiente.

Condições analíticas referentes aos cromatogramas que se mostram nas Fig. 58, 59, 60, 63, 64, 66 e 67 (pag. 98, 99, 102 e 104):

Coluna: Alltech RP-18 (10µm) - 240x4,6 mm

Fase móvel: MeOH: H_2O: AcOH (60:38:2)

Detecção: 254 nm

Volume de injecção: 3-5 µl(solução a cerca de 1mg/ml)

Fluxo : 1ml/min

Sensibilidade : 0,05 AUFS

Velocidade do papel do registador e do integrador: 5 mm/min

4.3.2. Separação e purificação dos componentes flavónicos da mistura DHE

4.3.2.1 Cromatografia líquida de alta pressão

As amostras foram preparadas a 50 mg/ml em solução de metanol:água (9,5:0,5) e filtradas .

Condições cromatográficas referentes aos cromatogramas apresentados nas Fig. 61 e 62 (pag. 100e 101)

Coluna: Perkin- Elmer - Preparative C18 (40µm) ser. nº38, ref. 0258-3001

Fase móvel: MeOH: H_2O: AcOH (60: 38: 2) pH=3,5

Detecção: 254 nm

Volume de injecção: 0,5 ml (solução a 50 mg/ml)

Fluxo : 10 ml/min

Sensibilidade : 0,1 AUFS

Velocidade do papel do registador e do integrador: 5 mm/min

Condições cromatográficas referentes ao cromatograma que se mostra na Fig. 65, pag. 103.

Coluna: Alltech- Econosil RP-18 (10µm)-250 x 7 mm, ser. nº PO72986-2

Fase móvel: MeOH:H_2O: AcOH (50 :48: 2) pH=3,3

Detecção: 254 nm

Volume de injecção: 25µl
Fluxo : 3 ml/min
Sensibilidade : 0,1 AUFS
Velocidade do papel do registador e do integrador: 5 mm/min

As fracções recolhidas foram submetidas ao tratamento já referido para os derivados carboximetilados Com esta técnica cromatográfica, partindo de 600 mg de uma amostra resultante da Exp.23, foram obtidos: 242 ,0 mg de composto XII (40,3%), 48,6 mg de composto XI (8,1%) e 11,6 mg de composto XIII (1,9%).

4.3.3 Comportamento cromatográfico dos flavonóides isolados

No Quadro 31 descrevem-se os resultados obtidos em placa de celulose e usando como fase móvel uma mistura de ácido acético e água em duas proporções diferentes.

Quadro 31: Características cromatográficas (TLC) dos compostos isolados

Composto	Rf		Detecção	
	* SC1	* SC2	UV366nm	$AlCl_3$ (UV366nm)
Derivado mono(2-hidroxietilado) em C-3'	0,57	0,51	castanha escura	amarela fluorescente
Derivado mono(2-hidroxietilado) em C-5	0,66	0,68	azul-clara fluorescente	azul-clara fluorescente
Derivado 2-hidroxietilado em C-5 e C-3'	0,73	0,77	azul fluorescente	azul fluorescente

*A composição dos sistemas SC1 e SC2 encontra-se referida no Quadro 27, pag.169

O quadro seguinte mostra o tempo de retenção dos diferentes derivados analisados em HPLC.

Quadro 32: Características cromatográficas (HPLC) dos compostos isolados

Composto	**Tempo de retenção (min)**
Derivado mono(2-hidroxietilado) em C-3'	5,57
Derivado mono (2-hidroxietilado) em C-5	4,36
Derivado 2-hidroxietilado em C-5 e C-3'	3,61

* As condições cromatográficas são as referidas em 4.3.1.

4. 3. 4. Características físicas e espectrais dos derivados 2-hidroxietilados da diosmina

4. 3. 4. 1. 7 - O - Ramnoglucosil - 5,3' - bis (2-hidroxietoxi) - 4'- metoxiflavona (XI)

F = 192-194 ^{o}C

UV, λ_{max}^{MeOH} nm : 336,0 ; 265,5(i); 243,0 (log ε: 4,3, 4,2; 4,3); + $AlCl_3$:337,5; 265,0; 241,5; +$AlCl_3$+HCl: 340,5; 266,0; 241,0; +NaOAc : 333,0; 263,5.

RMN^{13}C (50,3 MHz, DMSO) δ: Quadro 15, pag. 107

EM(IE),m/e (int.rel.): 388 [M$^+$](5);372 (18); 371 (34); 370(10); 359(5); 358 (11);357 (22); 345 (10); 344 (47); 327 (28); 326 (56); 325(18); 314(18);313(35); 312(16); 301(20); 300(100); 299(11); 298(39); 297(35); 296(20); 284(16); 271(10); 262(M*); 153 (15); 152(7);148(16); 133(20);124(8).

4.3.4.2 7-O-Ramnoglucosil-5-hidroxi-3′-(2-hidroxietoxi)-4′-metoxiflavona (XII)

F = 158-159°C

UV, λ_{max}^{MeOH}, nm : 342,0; 270,0; 251,5 (logε:4,1;4,0;4,1); + $AlCl_3$: 386,5; 358,5; 296,5(i); 275,5; 265,5;+ $AlCl_3$+HCl: 384,5;352,5;296,5(i);277,5; 264,0;+ NaOAc: 339,0; 271,5.

IV, $\bar{\nu}_{max}^{KBr}$, cm^{-1}: 3400,2920,1650,1610,1495,1435,1320,1255,1170,1140, 1125,1065,835

RMN^{1}H (200 MHz,DMSO): δ12,92(1H,s.5-OH); 7,72(1H, dd, J=1,8 e 8,6, H-6′);7,61(1H,d,J=2,H-2′);7,21(1H,d,J=8,6,H-5′); 7,06 (1H,s,H-3);6,83 (1H,d,J=1,7;H-8); 6,46(1H, d,J=1,7; H-6); 5,06 (1H,d,J=6,7; H-1 da Glc);4,55

(1H,s,H-1 da Ram); 4,16-4,11(4H, m,-CH_2CH_2-); 3,87 (3H,s,OCH_3)3,5 - 5,5 (H de açúcares excepto dois H anoméricos); 1,06 (3H, d,J=6,1; CH_3 da Ram)

RMN ^{13}C (50,3 MHz, DMSO),δ : Quadro 18, pag. 124

4. 3. 4. 3. 7-O-Ramnoglucosil-5-(2-hidroxietoxi)-3´-hidroxi-4´-metoxiflavona (XIII)

F = 160-162 ^{O}C

UV, λ_{max}^{MeOH} ,nm: 336,0; 265,5; 255,5;+$AlCl_3$:337,5;266,0; 258,0;+ $AlCl_3$+HCL: 337,0; 266,0; 258,0; + NaOAc: 337,0; 265,5; 255,0.

RMN ^{1}H(200 MHz,DMSO): δ9,44(1H,s,3´-OH); 7,66(1H,dd, J=2 e 8,6; H-6´); 7,54 (1H, d, J=2, H-2´);7,28 (1H,d,J=8,6; H-5´); 6,98(1H,s,H-3); 6,78(1H,d,J=2,H-8);6,64(1H, d,J=2,H-6);5,17(1H,d,J=6,2;H-1 da Glc); 4,51 (1 H,s,H-1 da Ram); 3,85 (3H, s, OCH_3); 4,13-4,10 (4H,m,-CH_2CH_2-); 3,5 - 5,5(H de açúcares excepto dois H anoméricos); 1,08(3H,d,J=6, CH_3 da Ram).

4. 3. 5. Determinação da percentagem relativa de derivados obtidos em diferentes experiências

No Quadro 24 (pag. 151), mostram-se os resultados obtidos para os DHE referentes às Exp. 20, 23 e 26.

As condições analíticas referentes aos cromatogramas representados nas Fig. 99,100 e 101(pag. 152-154) são as seguintes:

Coluna: Alltech RP-18 (10 µm) 240 x 4,6 mm
Fase móvel: MeOH: H_2O: AcOH (57: 41: 2)
Detecção: 254 nm
Volume de injecção: 4 µl (sol. a 1 mg/ml)
Fluxo: 1 ml/min
Sensibilidade: 0,05 AUFS
Velocidade do papel do registador e do integrador: 5 mm/min

4. 3. 6. Obtenção e características físicas e espectrais das aglíconas resultantes dos derivados 2-hidroxietilados da diosmina.

4. 3. 6. 1. 5, 3´- Bis (2-hidroxietoxi) - 7-hidroxi-4´- metoxiflavona (XIV)

Fez-se reagir 35,40 mg do composto XI com 30 ml de ácido clorídrico a 20%, submetendo a solução obtida a um aquecimento a 125-130°C durante 50 minutos. O arrefecimento da solução foi feito em água com agitação e depois em gêlo, de modo a favorecer a cristalização do composto em solução. Obteve-se uma massa cristalina que foi separada por filtração. Este resíduo, depois de sêco, foi recristalisado da água, tendo-se obtido 10,0 mg de cristais amarelos palha. Rendimento: 50,76%.

F=183-185^{0}C

UV, λ_{max}^{MeOH},nm: 336,5; 265,5; 241,5(logε: 3,76; 3,67; 3,76);+ $AlCl_3$: 337,0; 265,5; 241,0; +$AlCl_3$+HCl: 337,5; 265,0; 242,0; + NaOAc: 335,0; 313,0; 273,5.

EM (IE), m/e (int.rel.): 388 [$M^{+\cdot}$](5); 372(18); 371 (34); 370 (10); 359 (5); 358(11); 357(22); 345(10); 344(47); 327 (28); 326(56); 325(18); 314(18); 313(35),312 (16)301(20);300(100); 299(11); 298(39);297 (35);296(20);284(16); 271(10); 262(M^{*}); 153 (15);152(7); 148(16);133(20); 124(8)

4.3.6.2 5,7 - Di-hidroxi-3´-(2-hidroxietoxi)-4´-metoxiflavona (XV)

Fêz-se reagir 50,80 mg do composto XI com 50 ml de ácido clorídrico a 50%. A reacção foi conduzida com agitação e aquecimento a 125-130^{0}C durante 50 minutos. Após arrefecimento à temperatura ambiente formou-se uma suspensão que foi separada por centrifugação. O resíduo obtido foi lavado com pequenas porções de água arrefecida até reacção neutra (papel indicador universal). O sólido obtido foi seco por sucção com auxílio do vazio e depois em pistola de Abderhalden. Após recristalização de metanol obtiveram-se 13,2 mg de cristais aciculares de côr amarela-palha. Rendimento: 49,3%

F= 218-220^{0}C

UV, λ_{max}^{MeOH} ,nm : 341,5; 270,5; 243,5.(log ε: 4,3;4,3;4,3) $AlCl_3$: 385,5; 357,5; 296,0(i); 277,5; 262,5; +AlCl3+HCl:383,0; 352,5; 294,0(i);279,5;260,5.; +NaOAc: 366,0; 314,0; 278,5.

IV, $\bar{\nu}_{max}^{KBr}$ cm^{-1}: 3475, 2920, 1655, 1610, 1505,1430, 1360, 1300, 1255, 1165, 1140, 1070, 853.

RMN^{1}H (200MHz,DMSO): δ 12,93(1H,s,5-OH);10,91(1H,s,7-OH);7,70 (1H,dd,J=1,7 e 8,6, H-6');7,58(1H,d,J=1,8;H-2');7,15(1H,d,J=8,6; H-5');6,95(1H,s,H-3); 6,53(1H,d,J=1,9;H-8);6,21(1H,d,J=1,9;H-6); 4,15-4,10(4H,m,-CH_2CH_2-);3,86(3H,s,OCH_3)

RMN^{13}C (50,3 MHz, DMSO) δ: Quadro 20, pag. 127

EM (IE), m/e (int.rel.): 345 $[M+1]^{+\cdot}$(16);344$[M^{+}]$(72); 326(3);310(18); 300(100); 299(6); 298(7); 271(6); 262(M*); 257(16); 229(5);153(10);152(4); 148(7); 133 (7);124(6).

4.3.6.3. 5 - (2-Hidroxietoxi) -7,3'-di-hidroxi-4'-metoxiflavona (XVI)

A 15,5 mg de composto XIII adicionou-se 25 ml de ácido clorídrico a 20%, submetendo a solução obtida a um aquecimento a refluxo (125-130^{o}C), com agitação, durante 50 minutos. Após arrefecimento, a solução foi transferida para ampola de

decantação e extraída repetidamente com acetato de etilo. Os extractos orgânicos, reunidos, foram levados à secura e o resíduo obtido, depois de recristalizado de metanol, forneceu 3,2 mg de cristais amarelos.

Rendimento : 39,13 %.

F= 220 - 221°C

RMN ^{1}H (200MHz,DMSO): δ10,76 (1H,s,7-OH);9,45(1H,s,3'-OH);7,63 (1H,dd,J=2 e 8,3; H-6'); 7,53(1H,d,J=2, H-2'); 7,13(1H,d,J=8,6; H-5');6,69(1H,s,H-3);6,61 (1H, d, J=2,0; H-8);6,4 4(1H,d,J=2,1 ;H-6); 4,11-4,02(4H,m,-CH_2CH_2-);3,84(3H,s,OCH_3)

EM (IE), m/e (int. rel.): 345[M+1]$^{+}$ (21); 344 [M^{+}](100);301(18); 300 (95); 299(6);271(5); 262(M*); 257(16); 229 (12); 153(23); 152(5); 148(9); 133(10); 124 (8).

4.3.7. Análise dos açúcares resultantes da hidrólise ácida dos derivados 2-hidroxietilados da diosmina

A solução resultante da hidrólise ácida foi transferida para ampola de decantação e extraída com acetato de etilo. A fase aquosa resultante, depois de transferida para um frasco apropriado, foi congelada a -70°C e liofilizada. O resíduo obtido foi analizado por TLC ou CG por comparação com padrões de glucose e ramnose.

4.3.7.1. Cromatografia em camada fina

No Quadro 33 indicam-se os sistemas cromatográficos e reveladores utilizados na identificação da glucose e ramnose.

Quadro 33:

Sistemas cromatográfico	Adsorvente	Fase móvel	Revelador
SC8	celulose	Piridina: acetato de etilo:ácido acético:água (36:36:7:2)	Ftalato de p-anisidina
SC9	celulose	Butanol:ácido acético:água (3:1:1)	Ftalato de p-anisidina
SC_{10}	sílica	Butanol:ácido acético:água (2:1:1)	Anisaldeído-ácido sulfúrico

4.3.7.2 Cromatografia em fase gasosa

Preparação dos derivados trimetilsililados

Em balão de colo esmerilado dissolveram-se 2 mg de resíduo resultante da liofilização da fase aquosa em 0,8 ml de piridina e 0,4 ml de hexametildissilazano. À solução obtida adicionou-se 0,4 ml de clorotrimetilsilano. Tapou-se o balão e agitou-se durante 30 minutos. A mistura foi então concentrada à secura em evaporador rotativo e o resíduo obtido adicionado de 0,8 ml de heptano. A solução resultante foi utilizada para análise.

Utilizando a mesma técnica foram igualmente preparados os éteres trimetilsilílicos da glucose e da ramnose.

Condições analíticas referentes aos cromatogramas apresentados (Fig.76, 77 e 78, pag. 119,120).

Coluna: OV-1 3%

Temperatura da coluna: 180°C

Temperatura do injector e do detector: 300°C

Gás Vector: N_2, 30 ml/min

Velocidade de registo: 10 mm/min

Sensibilidade: 1 x 64

4.4. OBTENÇÃO DOS ESTERES SULFURICOS DA DIOSMINA (Exp.31)

Fez-se reagir 2,00 g (0,0033 mol) de diosmina com 40 ml (0,02 mol) de hidróxido de sódio a 2%. A solução resultante adicionada de 0,3 ml (0,0045 mol) de ácido clorossulfónico foi submetida a agitação e aquecimento em banho de silicone (70-73°C) durante 8 horas. A mistura depois de arrefecida foi adicionada de ácido clorídrico a 50% até pH=3 - 4 e o resíduo obtido separado por filtração (R1).

O filtrado foi concentrado à secura a pressão reduzida, tendo-se obtido um resíduo castanho escuro , o qual foi transferido para cadinho filtrante, onde foi submetido a uma extracção repetida com metanol, até esgotamento dos seus constituintes flavónicos (controlo por TLC). A solução metanólica resultante da extracção adicionou-se éter etílico em excesso. A suspensão formada, depois de mantida no frigorífico durante 24

horas, foi filtrada por cadinho filtrante com auxílio do vazio e o resíduo obtido, depois de lavado com éter, foi seco com uma corrente de ar quente e seguidamente em estufa, a 37°C.

Obteve-se 0,92 g de um sólido de côr castanha-clara.

4.4.1. Estudo analítico do produto bruto formado

O produto bruto mostrou-se muito solúvel em água, solúvel em metanol, ligeiramente solúvel em etanol, práticamente insolúvel em éter.

Cromatografia em camada e fina

Os sistemas utilizados foram o SC1 e SC7 cuja composição se encontra referida no Quadro 27,pag. 169 e os resultados obtidos encontam-se registados no Quadro 26, pag. 157.

Electroforese em papel:

Condições analíticas:

Suporte: papel Whatman 3 mm

Electrólito: Ácido fórmico a 3%: ácido acético a 8 %: (1:1) pH=2,2

Tempo: . 120 min a 400 V/cm

Os resultados obtidos encontram-se registados no Quadro 26, pag. 158

BIBLIOGRAFIA

Bibliografia

(1) RIBEREAU-GAYON, P: Les Composés Phénoliques des Végéteaux, Dunod, Paris, 1968, pág. 24

(2) RIBEREAU-GAYON, P., op. cit., pág. 7-12

(3) KOSTANECKI. St. V. e TAMBOR, J. : *Berichte*, 28, 2302 (1895)

(4) MARKHAM, K.R.: Techniques of Flavonid Identification, Academic Press, London, 1982, pag. 1-3

(5) McCLURE, J.W.: The Flavonoids (Ed. por Harbonne,J.B., Mabry,T.J. e Mabry,H), Chapman and Hall, London, 1975, cap. 18.

(6) COSTA, A.F.: Farmacognosia, II vol. (2ª edição), Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1978, pág 207-209

(7) RUSZNYAK, St. e SZENT-GYORGYI, A.: *Nature*, 4, 27 (1936)

(8) HAVSTEEN, B.: *Biochemical Pharmacology*, 32 (7), 1141 (1983)

(9) SRIVASTAVA, S.D.: *Drugs of the Future*, 8, 669 (1984)

(10) WANG, Y., HAMBURGER, M., GUEHO, J. e HOSTETTMANN, K.: *Phytochemistry*, 28 (9), 2323 (1989)

(11) HANDA, S. S., SHARMA, A. e CHAKRABORTI, K. K.: *Fitoterapia*, 57 (5), 307 (1986)

(12) ZARAGOZA, I. IGLESIAS, BENEDI, J. e FDEZ-CORBEIRA, P.: *Fitoterapia*, 56 (6), 343 (1985)

(13) BERETZ, A., STIERLE, A., ANTON, R. e CAZENAVE, J.P.: *Biochemical Pharmacology*, 31,(22), 3597 (1981)

(14) FDEZ SERRANILLOS, M.G., ZARAGOZA, F. e ALVAREZ, P.: *An. Real Acad. Farm.*, 49,79, (1983)

(15) The Merck Index, (11ª edição), Merck and Co. Inc., Rahway - U.S.A., 1989, nº3291

(16) OESTERLE, O.A. e WANDER, G.: *Helvetica Chimica Acta*, 8, 519 (1925)

(17) LOVECY, A., ROBINSON, R. e SUGASAWA,S.: *J. of Chemical Society*, 817 (1930)

(18) ARTHUR, H.R., HUI, W.H. e MA, C.N.: *J. of Chemical Society*, 632 (1956)

(19) ARTHUR, H.R., HUI, W.H. e NG. Y.L.: *J. of Chemical Society*, 4007 (1959)

(20) BRIGGS, L. H., CAMBIE, R. C., HOLDGATE, R.H. e SEELYE, R.N.: *J. of Chemical Society*, 1955 (1960)

(21) HOROWITZ, R.M.: *J.of Organic Chemistry*, 21, 1184 (1956)

(22) MILHEIRO, E.: *Rev. de Chimica Pura e Applicada*, 19 (1941)

(23) POLONIA, J. e POLONIA, M.A.: *Anais da Fac. de Farm. do Porto*, 27, 1 (1967)

(24) MILHEIRO, E.: *Portugal Médico*, 7, 261 (1939)

(25) DESNOYERS, P., VIRGITTI, J., RODIER, F. e CLENET, M.: *Thérapie*, 23, 1333 (1968)

(26) BOOTH, A. N., JONES, F.T. e DEEDS, F.: *J. of Biological Chemistry*, 230, 661 (1958)

(27) HENSSER, J. e OSSWALD, W.: *Arch. de Farmacol. y Toxocol.*, 3, 33 (1977)

(28) BALEA, T.: *La Vie Medicale*, 92 (1971)

(29) DELACROIX, P.: *La Vie Medicale*, 48 (1971)

(30) MALINAS, Y. e CHABERT, C.: *Rev. Franç. Gynec.*, 67, (5), 359 (1972)

(31) OUSTRIM J., FAURAN, M.J. e COMMANAY, L.: *Arzneim.- Forsch. Drug Res.*, 27 (2), 1688 (1977)

(32) BOUDET, C. e PEYRIN, L.: *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 283, 312 (1986)

(33) ZEMPLEN, G. e BOGNAR, R.: *Berichte*, 76, 452 (1943)

(33a) LORETTE., N.B., GAGE, T.B. e WENDER, S. H.: *J. Org. Chem.* 16, 930 (1951)

(34) ALHADEFF, M.: *Drugs of Today*, 12 (7), 263 (1976),

(35) VARGAFTIG, B.B.: *Int. Angiol.*, 7 (suplem. ao nº2), 7 (1988)

(36) LAURENT, R,GILLY, R. e FRILEUX,C.: *Int. Angiol.*, 7 (suplem. ao nº2), 39 (1988)

(37) BEHAR, A., LAGRUE, G., COHEN - BOULAKIA, F. e BAILLET, J.: *Int. Angiol.*, 7 (suplem. ao nº2), 35 (1988)

(38) GUILLOT, B., DANDURAND, M. e GUILHOU, J.J.: *Int. Angiol.*, 7 (suplem. ao nº 2), 33 (1988)

(39) MARULLAZ, P.D., AMIEL, M. e BARBE, R. : *Int. Angiol.*, 7 (suplem. ao nº2), 25 (1988)

(40) LACOMBE, C., BUCHERER, C. e LELIEVRE, J.C.: *Int. Angiol.*, 7 (suplem. ao nº2), 21 (1988)

(41) GODFRAIND, T.: *Int. Angiol.*, 7 (suplem. ao nº2),17 (1988)

(42) DI PERRI, T. e ANTERI , A.: *Int. Angiol.*, 7 (suplem. ao nº 2), 11 (1988)

(43) GARNIER, M., PERRET, G., PILARDEAU,P., VAYSSE, J., ROLLAND, Y., UZZAN, B. e VASSY, R.: *Methods Find Exp. Clin.Pharmacol.*, 10 (4), 259 (1988) (CA.: 108: 216137 w)

(44) TAJANA, A., BOCCASANTA, P., MICHELETTO, G. e ORIO, A.: *Minerva Med.*,79 (5),387 (1988)

(45) MARESCAUX, J., MAAMER, M., TRENQUE, T., EVRARD, S., MUTTER, D. e FURDERER, C.: *Phlebologie*, 40 (4), 1043 (1987)

(46) RATTY, A.K. e DAS, N.P.: *Biochem. Med. Metab. Biol.*, 39 (1), 69 (1988) (CA.: 108: 124064 s)

(47) DAMON, M., FLANDRE,O., MICHEL, F. PERDRIX, L., LADRID, C. e CRASTES de PAULET, A. : *Arzneimittelforschung* 37 (10), 1149 (1987)

(48) WITTE, S.: *Thromb. Res.*, 52 (2), 111 (1988) (CA.: 110: 5232 b)

(49) CASLEY-SMITH, J.R.: *Lymphology*, 21 (3), 190 (1988)

(50) LAGRUE, G., BEHAR, A. e MAUREL, A.: *J. Mal. Vasc.*, 14 (3), 231 (1989)

(51) LONCHAMFT, M., GUARDIOLA, B., SICOT, N., BERTRAND, M., PERDRIX, L. e DUHAULT, J.: *Arzneimittelforschung* , 39 (8), 882 (1989) (CA.: 111: 126648 w)

(52) Indice Nacional Terapêutico, 1º semestre, 1990

(53) Vademecum Internacional, (30ª edição) Medicom, S.A. Madrid, 1989

(54) Dictionaire Vidal, Ed. du Vidal, 1989

(55) KOROLKOVAS, A. e BURCKHALTER, J.H.: Química Farmacêutica, Ed. Guanabara Dois S.A., Rio de Janeiro, 1982, pág. 48

(56) POLONIA, M.A., MOURÃO, M.C. e POLONIA, J.: Comunicação ao I Congresso Nacional de Ciências Farmacêuticas, Lisboa, 1982

(57) MOURÃO, M.C.: Comunicação ao I Congresso Hispano-Português de Química Terapêutica, Santiago de Compostela, 1987

(58) MOURÃO, M.C.: Comunicação ao II Congresso Nacional das Ciências Farmacêuticas, Montechoro, 1988

(59) MOURÃO, M.C.: Comunicação ao XI Encontro Nacional da SPQ, Lisboa, 1988

(60) COURBAT, P., FAVRE, J., GUERNE, R. e UHLMANN, G.: *Helv. Chim. Acta,* 49 (3), 132 (1966)

(61) CARL MULLER, Heidelberg, Patente nº 885547 (1953); C.A.: 82:9531b

(62) CAVALLINI, G. e MAZZUCCHI, F.: *Farm. Sci. e Tec.* (Pavia), 3, 297 (1948)

(63) ORJALES, A: Drugs of the Future, 12 (11), 1015 (1987)

(64) UCELAY, M., LABEAGA, L., BERISA, A. INNERARITY, A. e ORJALES, A.: Farmacol. Clin. Y Exp., 4(3), 301 (1987)

(65) PAIVA, M.Q.: Comunicação pessoal, Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

(66) RIBEREAU-GAYON, P., op. cit., pag. 32-35

(67) NECKERS, D.C. e DOYLE, M.P. : Organic Chemistry, Wiley International, New York, 1977, pag.441

(68) The Merck Index, op. cit., Nº4394

(69) HOSTETTMANN, K. e HOSTETTMANN, M. : The Flavonoids -Advances in Research, (Ed. Harborne, J.B. e Mabry T.J.), Chapman and Hall, London, 1982, pag. 1-2

(70) MARKHAM, K.R.: op. cit., pag.31-32

(71) MABRY, T.J., MARKHAM, K.R., THOMAS, M.B.: The Systematic Identification of Flavonoids, Springer-Verlag, Berlin, 1970, pag.12-13

(72) MARKHAM, K.R., op. cit., pag.19

(73) MARKHAM, K.R., op. cit., pag. 24

(74) PASTO, D.J. e JOHNSON, C.R.: Determinación de Estructuras Orgánicas, Reverté, S.A., Barcelona, 1974, pág.416

(75) MABRY, T.J., MARKHAM, K. R., e THOMAS, M.B., op. cit., pag. 17-19

(76) MARKHAM, K.R., op. cit., pag. 29-31

(77) HOSTETTMANN, K. e HOSTETTMANN, M., op. cit., pag. 14

(78) KINGSTON, D.G.: *J. of Natural Products*, 42, (3) 237-260 (1979)

(79) HOSTETTMANN, K., HOSTETTMANN, M., op. cit., pag. 5-10

(80) MARKHAM, K.R., op. cit., pag. 33

(81) YOST, R.W., ETTRE, L.S e CONLON, R.D.: Introduccion a la Cromatografia Líquida Práctica, Perkin-Elmer,1980

(82) JOHNSON, E.L. e STEVENSON, R.: Basic Liquid Chromatography, Varian Associates, Inc., 1978

(83) PRYDE, A. e GILBERT, M.T.: Applications of High Performance Liquid Cromatography, Chapman and Hall, London, 1979

(84) WULF, L.W. e NAGEL, C. W.: *J. of Chromatography*, 116, 271 (1976)

(85) BECKER, H., WILKING, G e HOSTETTMANN, K.: *J. of Cromatography*, 136, 174 (1977)

(86) ADAMOVICS, J. e STERMITZ, F.R.: *J. of Chromatography*, 129, 464 (1976)

(87) NIEMANN, G.J. e KOERSELMAN-KOOY, J.W.: *Planta Medica*, 31, 297 (1977)

(88) RIBEREAU-.GAYON, P., op. cit., pag. 140-141

(89) PASTO, D. J. e JOHNSON, C.R., op. cit. pag. 141

(90) MABRY, T.J., MARKHAM, K.R., THOMAS, M.B.: op. cit, cap. IV, V,VI e VII

(91) MABRY, T.J., MARKHAM, K.R., THOMAS, M.B.,op. cit., pag 41

(92) MABRY, T.J., MARKHAM, K.R., THOMAS, M.B.,op. cit., pag.44

(93) MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R., THOMAS, M.B., op. cit., pag.48

(94) MABRY, T.J., MARKHAM, K.R., THOMAS ,M.B., op. cit., pag. 52-55

(95) GROUILLER, A.: *Bull. Soc. Chim.*, 7, 2405 (1966)

(96) MARKHAM, K.R., op. cit., pag. 72-77

(97) NIETO, J.L. e GUTIERREZ, A.M.: *Spectroscopy Letters*, 19(5), 427 (1986)

(98) SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, G.C. e MORRILL, T.C.: Sepctometric Identification of Organic Conpounds, (4ªed.), John Wiley e Sons, Inc, 1981, pag 223-224

(99) AULT, A. e AULT, M.R.: A Handy and Systematic Catalog of NMR Spectra, University Science Books, Califórnia, 1980, Espectro nº 154

(100) SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, G.C. e MORRIL, T.C., op. cit., pag. 197

(101) MARKHAM, K.R. e CHARI, V.M.: The Flavonoids - Advances in Research, (Ed. Harborne, J.B. e Mabry, T. J.) Chapman and Hall, London 1982, Espectro nº 32

(101a) GRIPENBERG, J.: The Chemistry of Flavonoid Compounds, (Ed. por Geissman, T.A.) Pergamon Press Inc. New York, 1962, pag. 422

(102) MARKHAM, K.R. e CHARI, V.M.: op. cit., Espectro Nº 107

(103) SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, G. C., MORRIL, T. C., op. cit., pag 269

(104) SILVERSTEIN, R. M., BASSLER, G. C., MORRIL, T. C., op. cit., pag. 289

(105) MOURÃO, M.C.: *Rev. Port. de Farmácia,* 37 (4), 3 (1987)

(106) BUSH, K.L. e COOKES, R.G.: *Science*, 218, 247 (1982)

(107) BARBER, M., BORDOLI, R.S. e ELLIOT, G.J.: *Gaz. Chim. Ital,* 114, 305 (1984)

(108) BARBER, M., BORDOLI, R.S., SEDGWICK, R.D. e TYLER, A.N.: *Nature,* 293, 270 (1981)

(109) BARBER, M., BORDOLI, R.S., SEDGWICK, R.D. e TYLER, A.N.: *J. C. S. Chem. Comm.*, 325 (1981)

(110) SURMAN, D.J. e VICKERMAN, J.C.: *J. C. S. Chem. Comm.*, 324 (1981)

(111) BARBER, M., BORDOLI, R.S., ELLIOT, G. J., SEDGWICK, R.D. e TYLER, A.N.: *Analytical Chemistry*, 54 (4), 645 (1982)

(112) WILLIAMS, D. H., BRADLEY, C., BOJESEN, G., SANTIKARN, S. e TAYLOR, L.C.E.: *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 5700 (1981)

(113) RINEHART, K.L.: *Science*, 218, 254 (1982)

(114) CAPRIOLI, R.M., BECKNER, C. F. e SMITH, L.A.: *Biomedical Mass Spectrometry*, 10 (2), 94 (1983)

(115) FRANKS, J. : *Int. J. of Mass Spectrometry and Ion Physics,* 46,343, (1983)

(116) MARTIN, S.A., COSTELLO, C.E. e BLEMANN, K.: *Anal. Chem.*, 54, 2362 (1982)

(117) SAITO, N., TIMBERLAKE, C.F., TUCKNOTT, O.G. e LEWIS. I.A.S. : *Phytochemistry,* 24 (4), 1007 (1983)

(118) DOMON,B. e HOSTETTMAN, K.: *Phytochemistry,* 24 (3), 575 (1985)

(119) PARMAR, V.S., SANDUJA, S.K., JHA, H.N. e KUKLA, A.S.: *Org. Mass. Spect.*, 20 (3), 265 (1985)

(120) CROW, F.W., TOMER, K.B., LOOKER, J.H. e GROSS, M.L. : Analytical Biochemistry, 155, 286 (1986)

(121) ARITOMI, M., KOMORI, T. e KAWASAKI, T. : Phytochemistry, 25 (1), 231 (1986)

(122) COOKS, R.G., BEYNON, J.H., CAPRIOLI, R.M. e LESTER, G.R. : Metastable Ions, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, 1973, pág.43

(123) PRISTA, L. N. e ALVES, A. C. : Técnica Farmacêutica e Farmácia Galénica, II Vol., Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1973, pág. 1201-1206

(124) MARKHAM, K.R., op. cit., pág. 52

(125) SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, G.C. e MORRIL, T.C., op. cit., pág.28

(126) VOGEL, A.I.: Química Orgânica, vol.3., Ao Livro Técnico, S.A., Rio de Janeiro, 1985, pág. 1119

(127) MABRY, T.J. e MARKHAM, K.R. : The Flavonoids (Ed. por Harborne, J.B., Mabry, T.J. e Mabry, H.), Chapman and Hall, London, 1975, pág. 80-82

(128) SEIBL, J. : Espectrometria de Massas, Editorial Alhambra, Madrid, 1973, pág.165

(129) SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, G.C. e MORRIL, T.C., op. cit., pág. 26

(130) SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, G.C. e MORRIL, T.C., op.cit., pág. 203-204

(131) SILVERSTEIN, R.M. e LALONDE, R.T. : *J. of Chemical Education*, 57 (5), 343 (1980)

(132) SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, G.C. e MORRIL, T.C., op. cit., pág. 268

(133) MARKHAM, K. R., op. cit., pág. 53

(134) SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, G.C. e MORRIL, T.C. op. cit., pág.19-20

(135) CALDERON, J. e STUD, M., op. cit., pág. 38-40

(136) MABRY, T.J., MARKHAM, K.R. e THOMAS, M.B. : op. cit., pág.24

(137) MABRY, T.J., MARKHAM, K.R. e THOMAS, M.B. : op.cit., pág. 26

(138) MARKHAM, K.R., op. cit., pág.55

(139) The Merck Index, op. cit., Nº 8171

(140) The Merck Index, op. cit., Nº4353

(141) MARKHAM, K.R., op. cit., pág. 87-89

(142) SANTANA MARQUES, M.G., FERRER CORREIA, A.J. e CAVALERO, J.A.S., Comunicação ao 8º Encontro da S.P.Q., Braga, 1985

(143) GUIDUGLI, F.H., PESTCHANKER, M.J., KAVKA, J. e JOSEPH-NATHAN, P. : *Organic Mass Spectometry*, 19 (10), 502 (1984)

(144) GUIDUGLI, F.H., ARDANAZ, C.E., KAVKA, J., GARIBAY, M.E. e JOSEPH-NATHAN, P.: *Organic Mass Spectrometry*, 21, 117 (1986)

(145) LEWIS, B.A. e SMITH, F. : Thin-Layer Chromatography (2º edição), (Editado por Stahl, E.), Springer-Verlag, Berlin, 1969, pag. 807-34

(146) BARRON, D., VARIN, L., IBRAHIM, R.K., HARBORNE, J.B., WILIAMS, C.A. : *Phytochemistry*, 27 (8) 2375 (1988)

(147) WILLIAMS, C.A., HARBORNE, J.B. e CROSBY, T.S. : *Phytochemistry*, 15, 349 (1976)

(148) The Index Merck, op. cit., Nº 2166

(149) MARKHAM, K.R. op. cit., pág. 32

(150) WILLIAMS, C.A., HARBORNE, J. B. e CLIFFORD, H. T.: *Phytochemistry*, 12, 2417 (1973)

(151) HOSTETTMANN, K., e HOSTETTMANN, M., op. cit., pág. 14

(152) TOMÁS-BARBERAN, F.A., HARBORNE, J.B. e SELF, R.: *Phytochemistry*, 26 (8), 2281 (1987)

(153) MARKHAM, K.R., op. cit. pág. 39-40