

Estágio Profissional Financiado pelo  
-PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO EDUCATIVO PARA PORTUGAL-  
PRODEPIII

# APLICAÇÃO DE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROSCÓPICAS NA CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS

**Estagiário:** Mónica Carla Sousa Eiras Amaral Pombares

**Supervisionado por:** Prof. Dra. Margarida M. S. M. Bastos (FEUP)

**Orientado por:** Eng.º José Manuel B. G. Teixeira (PARALAB)

66(047.3)  
LEQ 2000  
POMm



Estágio Profissional Financiado pelo  
**-PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO EDUCATIVO PARA PORTUGAL-  
PRODEPIII**

# **APLICAÇÃO DE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROSCÓPICAS NA CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS**

**Estagiário:** Mónica Carla Sousa Eiras Amaral Pombares

**Supervisionado por:** Prof. Dra. Margarida M. S. M. Bastos (FEUP)

**Orientado por:** Eng.º José Manuel B. G. Teixeira (PARALAB)

CG (047.3) / LEQ 2000 / POMm

Universidade do Porto Faculdade de Engenharia Biblioteca M
Nº 88312
CDU
23 / 54 / 2007

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial à Professora Doutora Margarida Bastos por todo o apoio que me deu durante este estágio bem como por todos os conhecimentos que me transmitiu.

Desejo ainda expressar o meu agradecimento ao Eng. Manuel Teixeira pela atenção e disponibilidade apresentadas durante este estágio, bem como pela ajuda prestada com tudo o que envolveu aparelhos como o IV ou UV.

Por fim agradeço ainda todas as outras pessoas que de alguma forma me apoiaram durante este estágio que por serem muitas seria moroso aqui apresentar.

A todos muito obrigada.

## RESUMO

Este relatório resulta de um estágio que decorreu durante a fase inicial de instalação dos laboratórios das novas instalações da Faculdade de Engenharia. Neste trabalho apresenta-se a caracterização de compostos, da *Blumea balsamifera* D.C. e *Apollonias barbujana* utilizando essencialmente os métodos espectroscópicos: a Ressonância Magnética Nuclear, Ultravioleta e Infravermelho. O estudo teve como início a obtenção de registos das várias amostras. Após análise dos vários registos, a confirmação das estruturas foi efectuada por comparação dos dados obtidos com os apresentados na literatura para esses mesmos compostos. O resultado final foi a identificação de quatro compostos:

- (2R,3R)-3,5,2'-Triidroxi-7,4' dimetoxiflavona (1),
- 3, 5, 3', Triidroxi - 7, 4' - dimetoxiflavona (Ombuina) (2),
- 5,3 - Diidroxi - 7, 3', 4' - trimetoxiflavona (3),

todos eles identificados em amostras de *B. balsamifera* e o composta 4 de *A. Barbujana*, cuj identificação ficou por confirmar neste estágio.

## ABREVIATURAS

CC	Cromatografia em Coluna
CCF	Cromatografia em camada fina
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
DEPT	“Distortionless Enhancement by Polarization Transfer”
DMSO – d <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado
EM	Espectrometria de Massa
Fig.	Figura
IV	Infravermelho
MeOH	Metanol
pág.	Página
ppm	Partes por milhão
RMN de <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Protão
RMN de <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
RMN de 1H	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze com desacoplamento de banda larga por ruído modulador (“Broad Band Decoupling”)
UV	Ultravioleta
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
$\delta$	Deslocamento Químico em ppm
<i>s</i>	Singuleto
<i>sl</i>	Singuleto largo
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo dupleto
$\lambda$	Comprimento de onda em nanómetros

## **INDICE**

<b>1. Objectivos</b>	<b>1</b>
<b>2. Introdução</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Produtos Naturais: da Planta aos seus Constituintes</b>	<b>2</b>
<b>2.2. Métodos Espectroscópicos</b>	<b>5</b>
<b>2.2.1. Ressonância Magnética Nuclear</b>	<b>5</b>
<b>2.2.2. Infravermelho</b>	<b>5</b>
<b>2.2.3. Ultravioleta</b>	<b>6</b>
<b>2.3. <i>Blumea balsamifera</i> e <i>Appolonias barbujana</i></b>	<b>6</b>
<b>3. Trabalhos realizados durante o Estágio</b>	<b>8</b>
<b>4. Resultados e Discussão</b>	<b>9</b>
<b>4.1. Parte A: Caracterização dos constituintes de <i>Blumea balsamifera</i></b>	<b>10</b>
<b>4.2. Parte B: Caracterização dos constituintes de <i>Appolonias barbujana</i></b>	<b>20</b>
<b>5. Parte Experimental</b>	<b>25</b>
<b>5.1. Instrumentos e Material Utilizado</b>	<b>25</b>
<b>5.2. Obtenção dos espectros</b>	<b>26</b>
<b>Conclusão</b>	<b>29</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>30</b>
<b>Anexo 1 (MestreC)</b>	<b>A</b>
<b>Anexo 2 (Espectros RMN)</b>	<b>B</b>
<b>Anexo 3 (Espectros IV)</b>	<b>C</b>
<b>Anexo 4 (Espectros UV)</b>	<b>D</b>
<b>Anexo 5 (Artigo CHEMPOR)</b>	<b>E</b>

## 1. OBJECTIVOS

Este estágio tinha como objectivos a utilização de técnicas cromatográficas variadas e espectroscópicas (Ressonância Magnética Nuclear, Infravermelho e Ultravioleta), na purificação e caracterização de compostos provenientes de extractos de plantas, nomeadamente *Blumea balsamifera* e *Appolonias barbujana*.



## 2. INTRODUÇÃO

### 2.1. PRODUTOS NATURAIS: DA PLANTA AOS SEUS CONSTITUINTES (METABOLITOS SECUNDÁRIOS)

As plantas são tratadas no sentido de se extrair, separar, isolar e identificar os princípios activos responsáveis pelos efeitos biológicos. Com a crescente sofisticação da tecnologia os fitoquímicos intensificaram a investigação dos extractos de plantas usando técnicas de alta resolução e separação o que permitiu identificar muitos compostos já isolados anteriormente. Além disso, verificaram que muitas espécies de plantas nunca tinham sido pesquisadas química e biologicamente sendo, por isso, uma potencial fonte de compostos comercialmente importantes.

O estudo químico de uma planta exige um enorme estudo prévio que antecede a escolha da planta a analisar. Uma vez escolhida a planta há uma série de procedimentos que não devem ser esquecidos. Na Fig. 1 apresenta-se em esquema uma sequência das etapas envolvidas no estudo químico de uma planta.

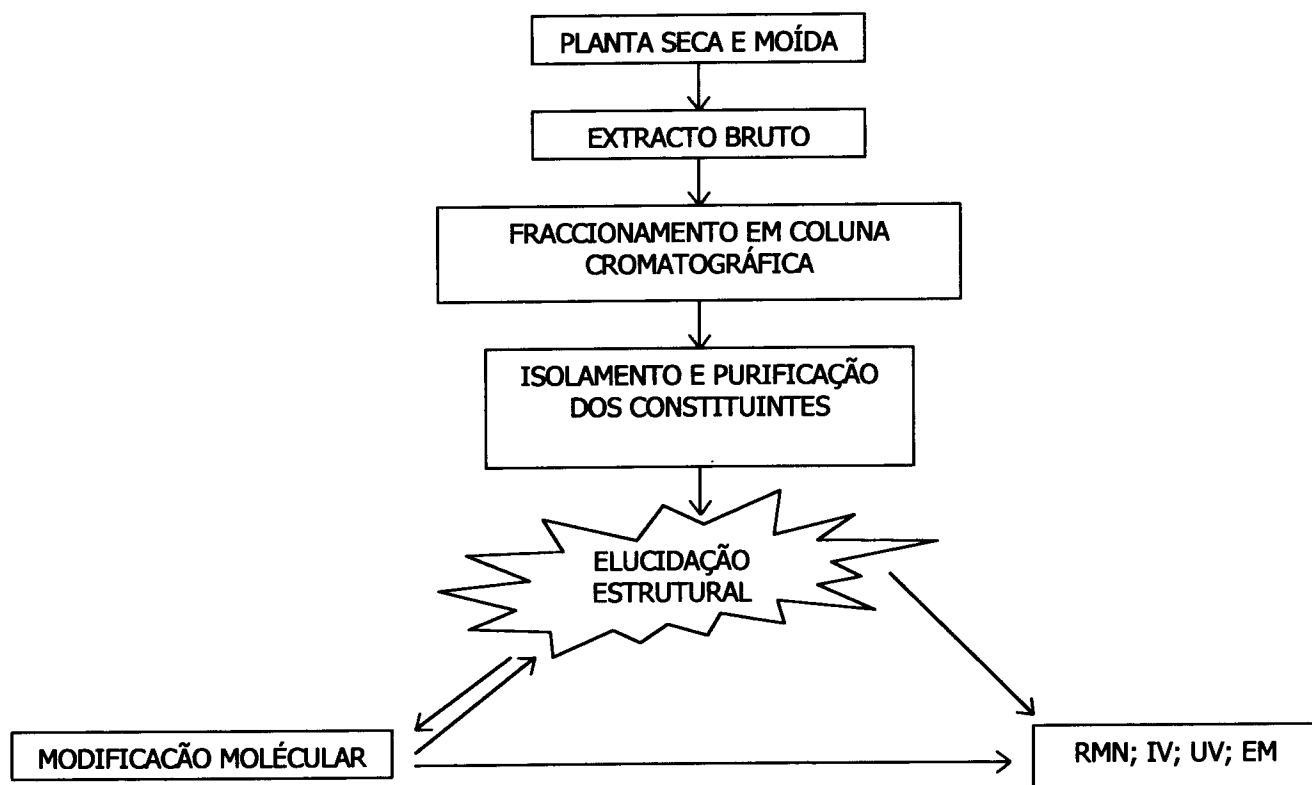


Fig.1 – Sequência das etapas envolvidas no estudo químico de uma planta.

Tudo começa com a colheita, secagem e moagem da planta. No entanto estes procedimentos seguem regras e não podem ser feitos aleatoriamente sob risco de

arruinar toda a pesquisa posterior. As plantas devem ser colhidas no seu ambiente natural, no estado nativo; devem ser observadas as influências dos ciclos lunares, o horário do dia e estações do ano, para que seja cuidadosamente seleccionada a altura da sua colheita. A recolha de uma determinada espécie deve fazer-se com a ajuda de um botânico, pois este além de classificar o material guardará uma amostra testemunha para futuras comprovações [1].

A secagem é um processo termodinâmico por meio do qual ocorre a redução do teor de humidade em materiais biológicos. Na natureza este processo tem início quando as sementes e, ou, grãos atingem o ponto de maturação fisiológica, ocasião em que estes se desvinculam de “planta mãe”.

A moagem, longe de ser uma operação simples, constitui um laborioso processo industrial que requer o emprego de grande número de máquinas complicadas. Divide-se em múltiplas operações, que em conjunto abrangem a limpeza e a moagem, a peneiração e classificação.

Os métodos de extracção dependem fundamentalmente dos objectivos do estudo da planta. Sem entrar em detalhes experimentais, que podem ser encontrados em qualquer manual de laboratório ou noutras fontes bibliográficas, podemos agrupar os métodos de extracção em [1]:

- i. "percloração" em frio ou a quente (a digestão em alguns casos acelera o processo),
- ii. extracção contínua (Soxhlet),
- iii. destilação por arraste de vapor.

Os solventes para extracção podem ser soluções diluídas de ácidos ou bases, quando se deseja a acidez ou basicidade das moléculas, como por exemplo no caso de alcalóides. Mais frequentemente, usa-se a extracção com solventes orgânicos de baixo ponto de ebulição (acetato de etilo, etanol) e de baixa reactividade [1].

Dos métodos mais usados, tanto para a separação como para a purificação de extractos e finalmente dos compostos, a cromatografia tem um lugar prioritário.

A identificação das estruturas moleculares de produtos naturais pode constituir uma meta por si só ou ser uma etapa para trabalhos posteriores. A análise cristalográfica por raio X é o meio mais directo para determinar estruturas, incluindo a configuração absoluta. Ainda que esta técnica se use com certa frequência, devido à crescente comercialização de aparelhos automáticos, a sua aplicação na área dos produtos naturais é limitada pois é necessário dispor de cristais perfeitos de compostos puros. Os métodos espectroscópicos, especialmente ressonância magnética nuclear (RMN), infravermelho (IV), ultravioleta e visível (UV /VIS) e espectrometria de massa (EM) são de uso mais comum neste campo, tendo sido todos usados, à excepção da espectrometria de massa,

para a identificação dos compostos isolados. Frequentemente para auxiliar a elucidação estrutural são preparados derivados das moléculas em causa. Esses derivados são também analisados pelos mesmos métodos espectroscópicos e as alterações introduzidas nos dados relativamente aos compostos originais, permitem retirar informações importantes, contribuindo para a sua identificação / caracterização.

A classificação dos compostos presentes nas plantas pode fazer-se de acordo com a sua estrutura, sua biossíntese, fonte de produção e sua actividade biológica. Em todos estes casos é inevitável a sobreposição. Aparentemente, o critério mais acertado é aquele que usa a biossíntese como denominador comum, o qual no seu esquema básico engloba a formação de metabolitos primários e secundários (Fig. 2).

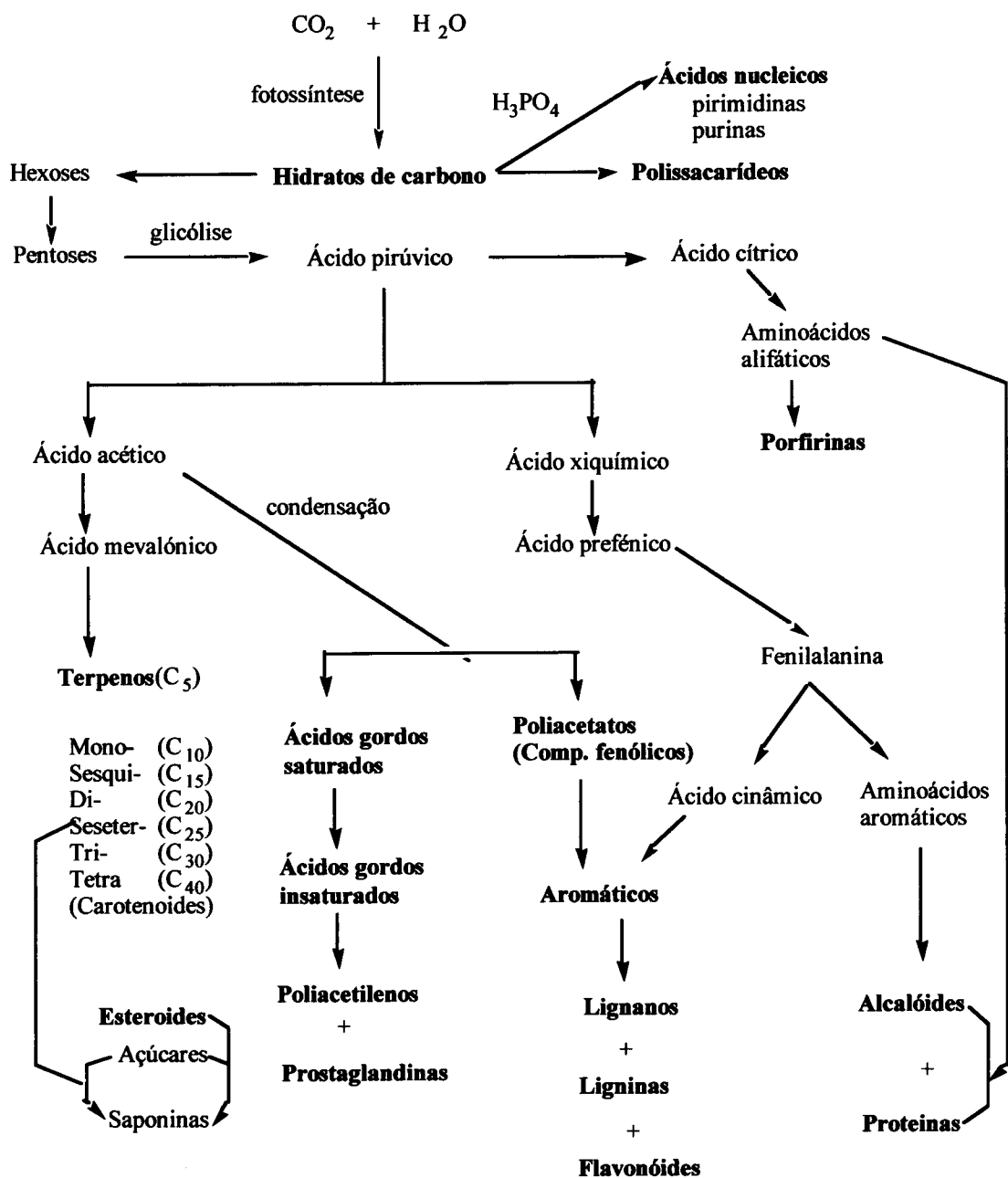


Fig. 2 – Esquema geral de biossíntese de metabolitos [1].

## 2.2. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

Métodos espectroscópicos como os indicados, têm diferentes fundamentos, e como consequência, oferecem dados complementares e frequentemente contundentes acerca de estrutura molecular. Além disso, requerem pequenas quantidades de amostra (cerca de 15 mg é em geral suficiente para efectuar vários espectros em equipamentos convencionais), em comparação com os métodos químicos. Os métodos espectroscópicos servem não só para elucidar estruturalmente, com também para analisar misturas, o que orientará os trabalhos de separação e purificação de compostos. Ainda que a espectrometria de massa seja amplamente usada em combinação com cromatografia gasosa, é necessário dispor de padrões correspondentes e como tal não foi usado neste trabalho.

### 2.2.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

O método baseia-se na absorção de energia por troca do spin nuclear dos átomos submetidos a um campo magnético externo. A análise do espectro de RMN oferece evidências bastante explícitas sobre as características dos núcleos que formam uma dada molécula, sendo os mais frequentemente analisados o  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ , em que os dois primeiros são utilizados, por rotina na caracterização de substâncias. Os deslocamentos químicos dos sinais de RMN do  $^1\text{H}$  (0-20 ppm) e do  $^{13}\text{C}$  (0-200 ppm) dão informação acerca da natureza dos hidrogénios (alifáticos, aromáticos, olefínicos, directamente ligados a heteroátomos, etc.) e dos carbonos (em ligações duplas, aromáticos, carbonílicos, oxigenados, etc.). Pela integração do sinal e pelo acoplamento spin-spin (multiplicidade do sinal e magnitude da constante de acoplamento) que se observa no espectro de prótons, deduz-se o número de hidrogénios e o modo como se distribuem na molécula, enquanto o número de sinais presentes no espectro de carbono (registado pela técnica de desacoplamento do ruído de prótons –BB–) indica o número de carbonos presentes na estrutura e a multiplicidade observada na técnica do DEPT mostra o número de átomos de hidrogénio ligados ao carbono responsável pelo sinal. As técnicas bidimensionais oferecem informação estrutural muito mais directa e apresentam enormes vantagens quando se trata de estruturas novas pouco relacionadas com as já conhecidas [2].

### 2.2.2. INFRAVERMELHO (IV)

Neste método as banda observadas nos espectros de infravermelho ( $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ ), relacionam-se com a mudança de estados vibracionais e rotacionais das ligações presentes na molécula. A posição e intensidade das bandas correspondentes a um grupo

funcional, que geralmente aparecem distribuídas em várias zonas mais ou menos constantes do espectro, são muito pouco afectadas pelo resto da molécula, pelo que a análise do espectro oferece informação sobre os grupos funcionais, tal como –OH, –NH, –CO, etc., bem como do carácter alifático e/ou aromático da molécula [2].

### 2.2.3. ULTRAVIOLETA -VISÍVEL (UV/VIS)

Este método analisa as transições electrónicas, isto é, a transição de um electrão desde o estado fundamental a um estado excitado. A absorção de energia requerida para estas transições provém de radiações na região do ultravioleta (190-380 nm) e na região do visível (380-700 nm). É um espectro que apresenta normalmente poucas bandas, sendo o  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\log \epsilon$ ) de cada banda, característico de um determinado tipo de transição electrónica [2].

### 2.3. *Blumea balsamifera* e *apponias barbuiana*

A *Blumea balsamifera* D.C. é uma planta da família Compositae que tem sido amplamente investigada por possuir uma grande variedade de compostos que se notabilizam pelas suas propriedades biológicas. Esta família além da *Blumea*, engloba muitos outros géneros e espécies. Preparações desta planta têm sido usadas, na Medicina Tradicional Chinesa como um carminativo, estimulante fraco, vermífugo, abortivo e no tratamento tópico de úlceras sépticas [3, 4].

O género *Blumea* contém um grande número de substâncias pertencentes a diversas classes de metabolitos secundários, nomeadamente: óleos essenciais, hidrocarbonetos alifáticos, monoterpénos, sesquiterpénos, triterpénos, esteróides, derivado do álcool coniferílico, alguns derivados do poliacetileno e do tiofeno, lactonas sesquiterpénicas, algumas cumarinas, flavonas, diidroflavonas e outros flavonóides [3-20]. Dentro desta grande variedade de metabolitos secundários possíveis de se encontrarem em *B. balsamifera* destacam-se os **flavonóides** que devido às suas propriedades biológicas [21, 24] têm potenciais aplicações, nomeadamente no campo da Medicina, na Indústria Alimentar e na Agroquímica [25].

As potenciais aplicações dos flavonóides ao nível da indústria agroalimentar relacionam-se com as actividades antioxidantes e características adoçantes de determinados flavonóides. Relativamente à agroquímica, a potencial utilização relaciona-se com as actividades antimicrobiana e desestimulante alimentar de determinados insectos [25].

Quanto às potenciais aplicações terapêuticas, algumas já se encontram reconhecidas, visto já existirem disponíveis no mercado alguns medicamentos à base de flavonóides e

derivados, utilizados no tratamento de problemas circulatórios (Venorunon®) e no tratamento de lesões hepáticas (Legalon®) [25].

A *Apollonias barbujana*, conhecida por barbusano e também aqui estudada, é uma árvore da espécie da família das Lauráceas. A família das Lauráceas que compreende cerca de 900 espécies na sua quase totalidade tropicais ou subtropicais e distribuídas por 42 géneros é proveniente das ilhas das Canárias e Madeira. É uma árvore de folha persistente que pode ter uma altura entre 10 a 25 metros. Aparece em regiões de altitude de 300 a 600 metros. Muitas plantas desta família foram usadas na medicina tradicional devido a propriedades biológicas diuréticas (*cassytha* spp), analgésicas, antiulcerogénicas, citostáticas, cardiotónicas (*cinnamomum* spp), expectorantes (*laurus* spp) e por efeitos sedativos e carminativos [26].

Das folhas de *A. barbujana* foram identificados vários compostos da família dos lignanos [27] e dos terpenos [28].

### **3. TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O ESTÁGIO**

Este estágio teve como objectivo principal a caracterização de várias substâncias provenientes de extractos de *Blumea balsamifera* e *Appolonias barbujana*. De modo a poder-se elucidar a estrutura dos compostos desenvolveram-se diversos trabalhos a seguir mencionados.

- Familiarização com os métodos espectroscópicos (frequentou disciplina extracurricular de Química Aplicada BI – Métodos Espectroscópicos, do 5º Ano da Licenciatura em Engenharia Química).
- Preparação das amostras para aquisição dos dados de RMN, IV e UV e aquisição dos dados de IV e UV.
- Elaboração de um manual de utilização do programa informático MestreC (versão 2.3) usado para o tratamento dos “dados de RMN” adquiridos no espectrómetro de RMN.
- Interpretação dos vários registos e conjugação da informação obtida, de modo a elucidar a estrutura das várias amostras analisadas.
- Confirmação das estruturas propostas recorrendo à pesquisa de dados existentes de literatura sobre estruturas e sua comparação, quando disponíveis.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma vez isolados os compostos, (Trabalho realizado por Annette Silva e Dra. Margarida Bastos, Anexo 5), fez-se a ressonância magnética nuclear às fracções isoladas. O trabalho desenvolvido neste estágio começa neste ponto.

Cada registo obtido foi tratado com o programa MestreC (Anexo1). Das várias fracções isoladas, nem todas correspondiam a compostos puros e como tal só alguns registos foram passíveis de um bom tratamento. Assim foram estudados apenas os registos que correspondiam a compostos puros ou a amostras de dois compostos, em que um deles fosse maioritário em relação ao outro (proporção aproximada de 1 para 3). Após selecção das amostras a caracterizar obtiveram-se os registos dos seus espectros no IV e UV.

Após interpretação e conjugação de informação obtida foram propostas as seguintes quatro estruturas para as amostras estudadas.

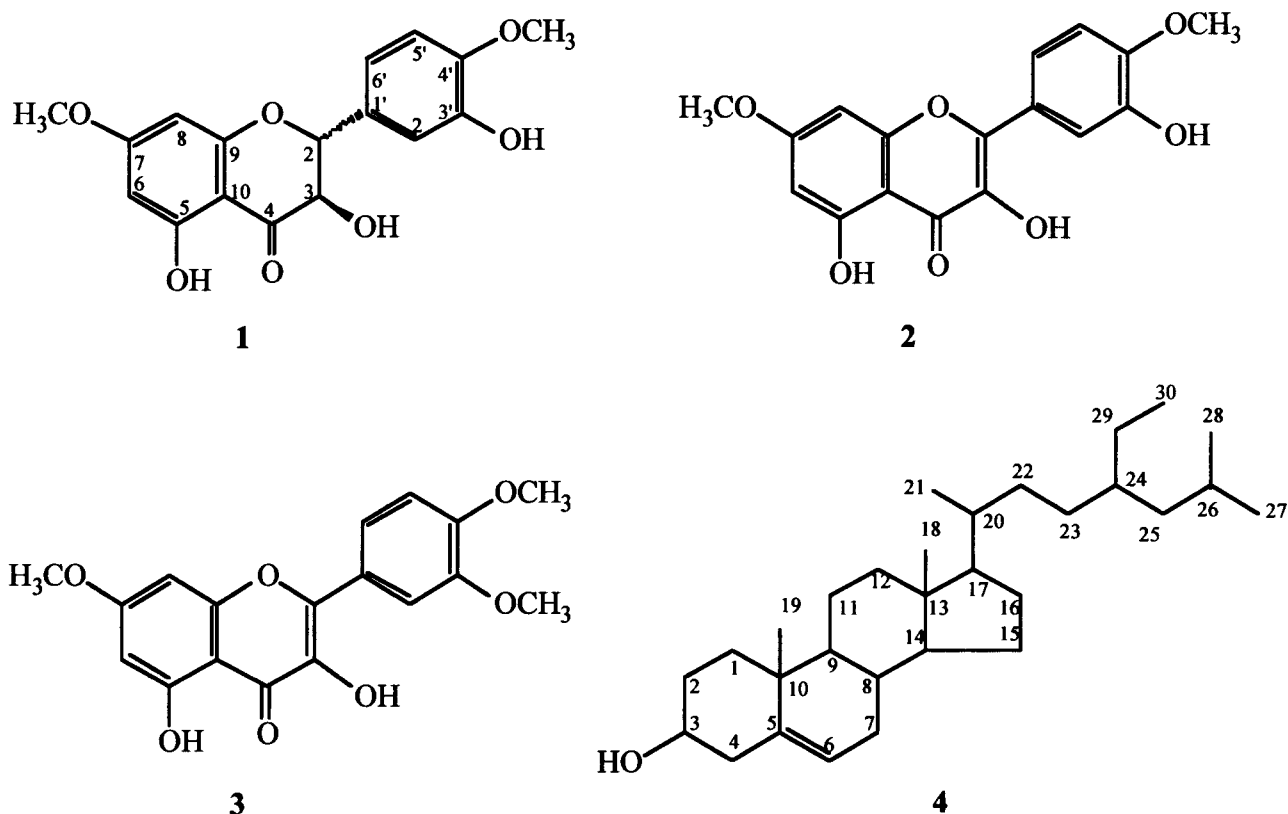


Fig. 3 – Estruturas identificadas ao longo do estágio.

As amostras 1 e 2 correspondem a dois compostos no estado puro provenientes da *Blumea balsamifera* (amostras Bb-102/115 e Bb-64/71 cristais, respectivamente). Os respectivos dados espectrais obtidos são compatíveis com os descritos na literatura. Foi efectuada a caracterização de uma mistura de dois compostos (amostra Bb-64-71), devendo o composto 2 ser o constituinte minoritário, enquanto que o composto maioritário deverá ser representado pela estrutura 3. O composto representado pela estrutura 4 foi identificado de uma amostra pura de *Apollonias barbujana* (Amostra Ap-75).



## 4.1 PARTE A: CARACTERIZAÇÃO DOS CONSTITUINTES DE *Blumea balsamifera*

### 4.1.1 (2R, 3R) – 3,5,2' – Triidroxi – 7,4' – dimetoxiflavona, (1)

O espectro no IV do composto 1 (Anexo 3, pág. C1), permitiu concluir que se estava perante um composto com características aromáticas (banda larga de estiramento de C–C do anel aromático a 1580 e 1464  $\text{cm}^{-1}$ ) possuindo um grupo carbonilo conjugado (banda de estiramento de forte intensidade a 1634  $\text{cm}^{-1}$ ) e grupo(s) hidroxilo(s) (banda larga de estiramento entre 3200 e 3400  $\text{cm}^{-1}$ ).

A natureza fenólica do composto foi evidenciada pelo espectro no UV (Anexo 4, pág. D1) que mostra um deslocamento batocrômico de banda de absorção a 324 nm para 348 nm, após a adição de uma solução metanólica de NaOH.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Fig. 5b, pág. 11) sugeria que o composto deveria possuir 17 átomos de carbono. Revela claramente a existência de um carbono carbonílico ( $\delta 195,917$ ) e dois núcleos benzênicos: doze sinais de carbonos aromáticos entre  $\delta 170$  e  $\delta 94$ . Adicionalmente é possível detectar a presença de dois carbonos metoxílicos ( $\delta 55,026$  e  $\delta 55,831$ ) e de outros dois carbonos oxigenados ( $\delta 83,224$  e  $\delta 72,335$ ).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Fig. 5<sup>a</sup>, pág. 11 apresentava-se concordante com o do RMN  $^{13}\text{C}$ ; presença de hidrogénios aromáticos (vários sinais entre  $\delta 7,20$  e  $\delta 6,00$ ) integrando para cinco hidrogénios e de dois grupos metoxilos (2 x  $\text{OCH}_3$ ) apresentando-se como dois singuletos a  $\delta 3,922$  e  $\delta 3,817$ , integrando cada um deles para três hidrogénios.

Os outros sinais integram todos para um hidrogénio, permitindo deduzir a presença de dezasseis hidrogénios.

A existência de dois anéis aromáticos (2  $\text{C}_6$ ) conjuntamente com um unidade de três carbonos ( $\text{C}_3$ ), o qual inclui um carbono carbonílico, é compatível com uma estrutura Flavónica (com esqueleto geral  $\text{C}_6 - \text{C}_3 - \text{C}_6$ ). A presença de dois dupletos acoplados ( $J \cong 12$  Hz) a  $\delta 4,546$  e  $\delta 4,997$  sugerem a presença de um derivado diidroflavonol. O valor de 12 Hz para constante de acoplamento indica um arranjo trans-axial entre o H-2 e o H-3, como demonstra a Fig. 4.

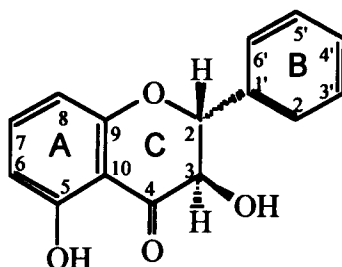
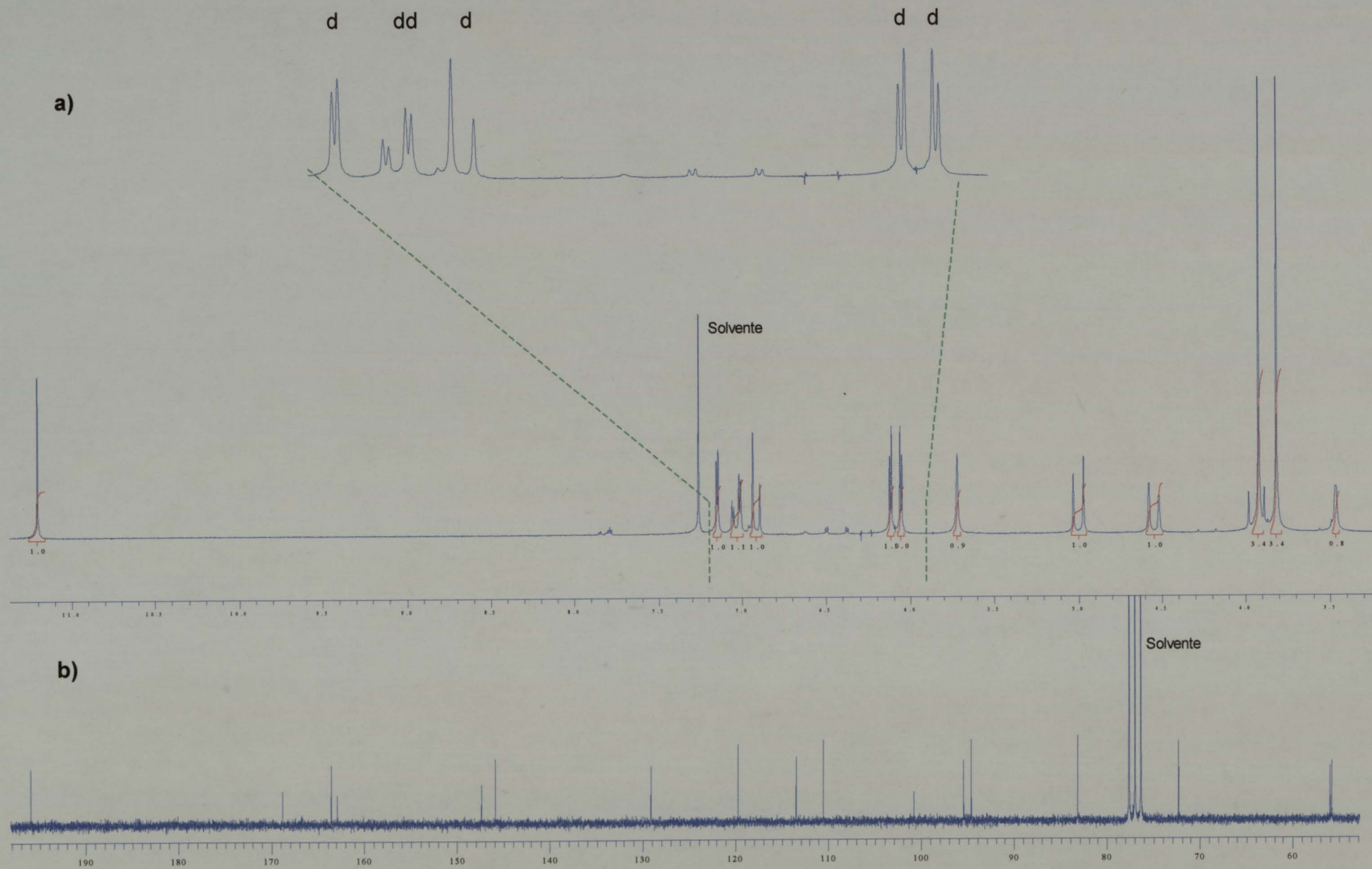


Fig. 4 – Estrutura com um arranjo trans – axial entre o H-2 e o H-3.



11/31 Fig.5 – Espectros de RMN do composto 1 obtidos em clorofórmio deuterado a)  $^1\text{H}$  RMN e respectiva ampliação b)  $^{13}\text{C}$  RMN

A análise da expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  na região aromática (Fig.5a , pág.11), revela que esses cinco prótons aparecem como um duplo duplete (*dd*) e quatro dupletos (*d*). A presença de um duplo duplete ( $J = 8 \text{ Hz}$  e  $J = 2 \text{ Hz}$ ) a  $\delta 7,03$  implica a existência de dois dupletos no mesmo anel aromático, um com uma constante de acoplamento de  $8 \text{ Hz}$  ( $\delta 6,915$ ) e outro com uma constante de acoplamento de  $2 \text{ Hz}$  ( $\delta 6,504$ ,  $\delta 6,117$  ou  $\delta 7,147$ ). Estes resultados permitem deduzir o padrão de substituição dos dois anéis aromáticos como sendo o representado na figura 6.

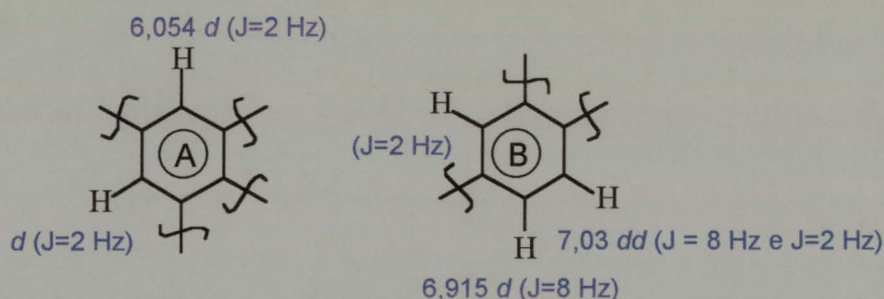


Fig. 6 – Padrão de substituição nos anéis aromáticos para o composto 1.

O sinal a  $\delta 11,203$  s é característico de um hidrogênio hidroxílico bastante desprotegido. A presença de um grupo carbonilo em posição *orto* relativamente a um OH fenólico justifica esse elevado valor de deslocamento químico atribuído ao OH-5 (Fig. 4, pág.10).

Os dois singletos largos a  $\delta 3,463$  e  $\delta 5,719$  correspondem a dois grupos hidroxilos sendo típicos de OH-3 e OH-fenólico, respectivamente.

Os dois metoxilos poderiam estar ambos localizados no anel B ou um no anel A e outro no anel B. Os dados apresentados por este composto eram compatíveis com um padrão de substituição 3-hidroxi-4 metoxifenilo para o anel B, devendo o outro metoxilo estar localizado em C-8, como se apresenta na figura 7.

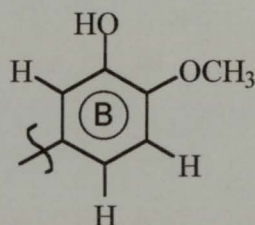
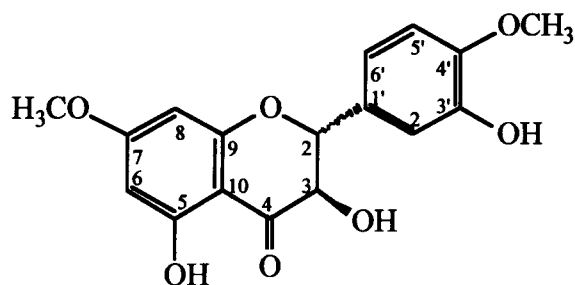


Fig. 7 – Representação da localização do grupo metoxilo no anel B.

O composto 1 deveria ser representado pela estrutura definida na figura 8.



1

Fig. 8 – Estrutura do composto 1.

Os dados espectrais do composto 1 estão concordantes com os descritos na literatura para o (2R, 3R)-7, 7'-dimetoxi-3, 5, 2'-trihidroflavona [3]. Na tabela 1 apresentam-se os dados obtidos para o composto 1 e os apresentados na literatura. As pequenas diferenças observadas nos dados devem-se ao facto de terem sido obtidos em solventes diferentes e equipamentos com diferentes resoluções.

Tabela 1 – Dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do composto 1.

H	$\delta_{\text{H}}$ $\text{CDCl}_3$ $\otimes$	$\delta_{\text{H}}$ DMSO [3] $\oplus$	C	$\delta_{\text{C}}$ $\text{CDCl}_3$ $\otimes$
2	4.997 <i>d</i> ( $J=12$ Hz)	5.09 <i>d</i> ( $J=12$ Hz)	2	83.224
3	4.546 <i>d</i> ( $J=12$ Hz)	4.55 <i>d</i> ( $J=12$ Hz)	3	72.335
6	6.054 <i>d</i> ( $J=2$ Hz)	6.10 <i>m</i>	4	195.917
8	6.117 <i>d</i> ( $J=2$ Hz)	6.10 <i>m</i>	5	163.596
2'	7.147 <i>d</i> ( $J=2$ Hz)	6.95 <i>m</i>	6	95.490
5'	6.915 <i>d</i> ( $J=8$ Hz)	6.95 <i>m</i>	7	168.815
6'	7.03 <i>dd</i> ( $J=8$ and 2 Hz)	6.95 <i>m</i>	8	94.664
OH-3	3.463 <i>sl</i>		9	162.908
OH-5	11.203 <i>s</i>		10	100.808
OH-3'	5.719 <i>sl</i>		1'	129.162
OCH <sub>3</sub>	3.817 <i>s</i>	3.79 <i>s</i>	2'	113.520
OCH <sub>3</sub>	3.922 <i>s</i>	3.79 <i>s</i>	3'	145.907
			4'	147.408
			5'	110.568
			6'	119.727
			OCH <sub>3</sub>	56.026
			OCH <sub>3</sub>	55.831

$\otimes$  - 200 e 50 MHz

$\oplus$  - 60 MHz

#### 4.1.2 3,5,3' Triidroxi – 7,4' – dimetoxiflavona, Ombuina (2)

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do composto apresentavam várias semelhanças com os respectivos espectros do composto 1, devendo por isso ter uma estrutura do tipo flavonóide. No entanto não deveria ser uma Flavonona mas uma Flavona como apresenta a Fig.9.

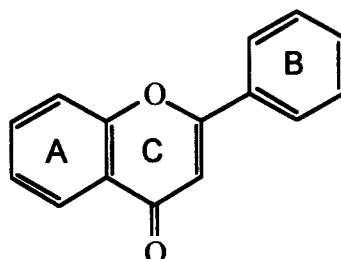


Fig. 9 – Estrutura genérica de uma flavona.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Fig. 11, pág. 15 e Tabela 2, pág. 16), adicionalmente ao carbono carbonílico ( $\delta 176,029$ ) e aos dois carbonos metoxílicos ( $\delta 55,968$  e  $\delta 55,563$ ) apareciam 14 carbonos entre  $\delta 165$  e  $\delta 90$ , devendo ser doze aromáticos e dois de uma dupla ligação.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (figura 11, página 15 e tabela 2, página 16) eram evidentes as presenças de cinco hidrogénios aromáticos (entre  $\delta 6,0$  e  $\delta 7,7$ ), dois grupos metoxilos ( $\delta 3,861$  e  $\delta 3,850$ ) e três grupos hidroxilos ( $\delta 12,448$ ,  $\delta 9,600$  e  $\delta 9,348$ ). Adicionalmente, verificava-se a ausência de dois dupletos a  $\delta 4,907$  e  $\delta 4,546$ , atribuídos no composto 1 a H-2 e H-3, respectivamente. Tal facto comprovava que o composto 2 era derivado de uma flavona e não de uma flavonona, como o composto 1.

O padrão de substituição do composto 2 deveria ser também semelhante ao apresentado pelo composto 1: 5-hidroxi-7-metoxifenilo (Anel A) e 3'-hidroxi-4'-metoxifenilo (Anel B). O singuleto a  $\delta 12,448$  é característico de grupo OH-5, devendo o singuleto largo a  $\delta 9,600$  ser atribuído ao grupo OH-3'. O terceiro grupo hidroxilo ( $\delta 9,348$ , s) deverá ser atribuído ao OH-3.

O composto 2 deveria ser representado pela estrutura evidenciada na Fig. 10.

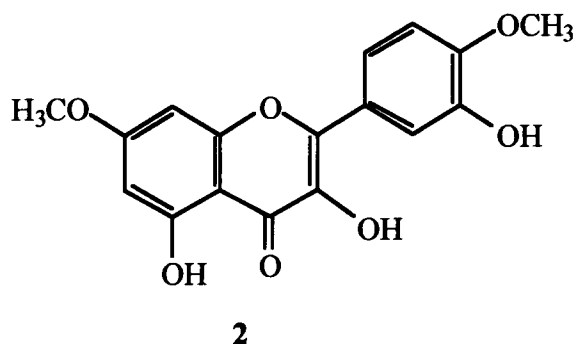


Fig. 10 – Estrutura do composto 2.



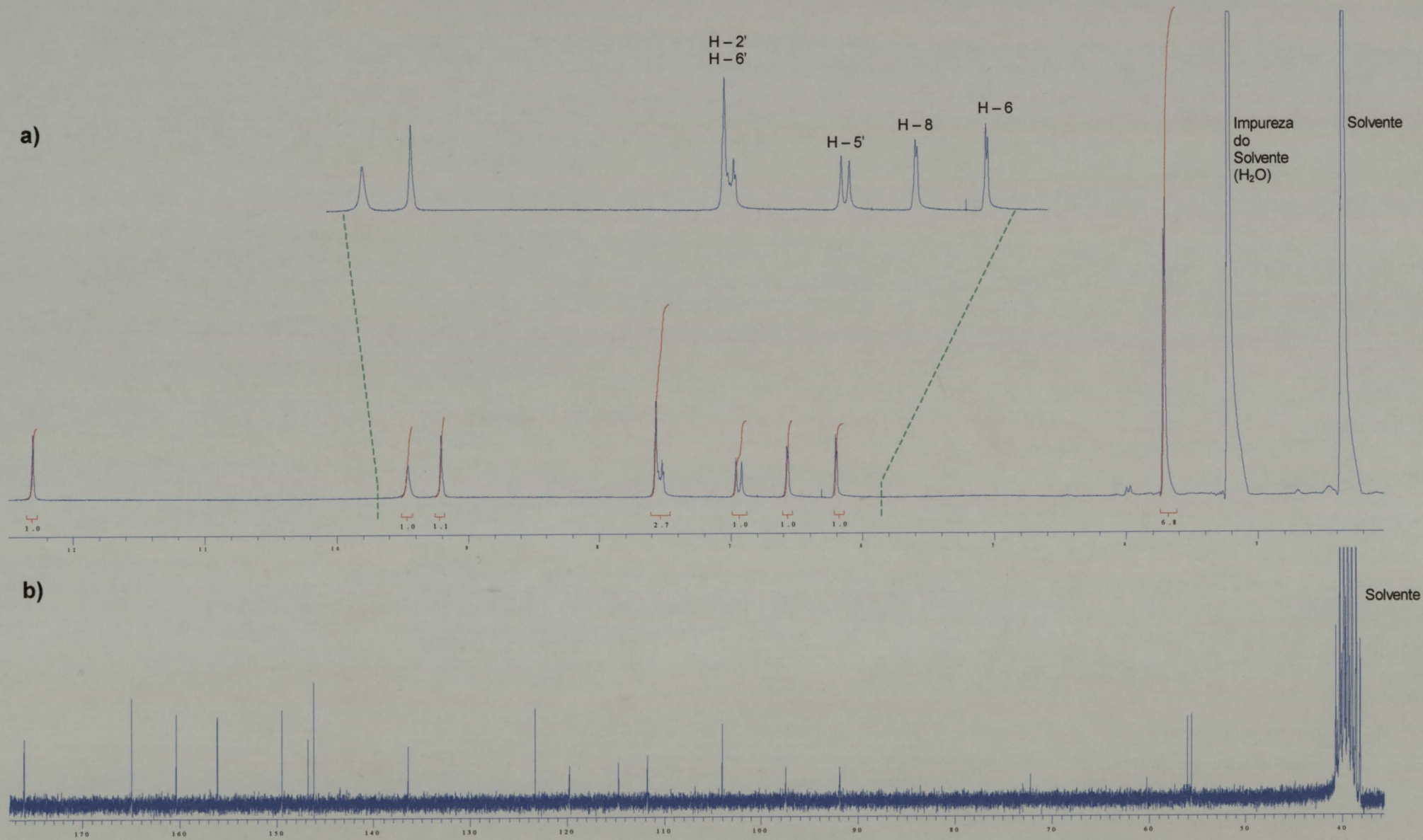


Fig.11 – Espectros RMN do Composto 2 obtidos em dimetilsulfoxido deuterado a)  $^1\text{H}$  RMN e respectiva ampliação b)  $^{13}\text{C}$  RMN

Os dados espectrais de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto **2** estão concordantes com os descritos na literatura para a ombuina [29]. Na tabela 2 apresenta-se a comparação dos dados espectrais dos compostos **1** e **2** e onde se pode verificar a identidade entre o composto **2** e a Ombuina.

**Tabela 2** – Dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do composto **1** do composto **2** e da literatura.

1				2		
H	$\delta_{\text{H}} \text{CDCl}_3$	$\delta_{\text{H}} \text{DMSO}$ [3]	C	$\delta_{\text{C}} \text{CDCl}_3$	$\delta_{\text{C}} \text{DMSO}$	$\delta_{\text{C}} \text{DMSO}$ [29]
2	4.997 <i>d</i> ( $J=12$ Hz)	5.09	2	83.224	146.704	146.7
3	4.546 <i>d</i> ( $J=12$ Hz)	4.55	3	72.335	136.385	136.4
6	6.054 <i>d</i> ( $J=2$ Hz)	6.10	4	195.917	176.029	176.0
8	6.117 <i>d</i> ( $J=2$ Hz)	6.10	5	163.596	160.312	160.4
2'	7.147 <i>d</i> ( $J=2$ Hz)	6.95	6	95.490	97.438	97.4
5'	6.915 <i>d</i> ( $J=8$ Hz)	6.95	7	168.815	164.915	164.9
6'	7.03 <i>dd</i> ( $J=8$ and 2 Hz)	6.95	8	94.664	91.876	91.8
3-OH	3.463 <i>sl</i>		9	162.908	156.064	156.0
5-OH	11.203 <i>s</i>		10	100.808	103.983	104.0
3'-OH	5.719 <i>sl</i>		1'	129.162	123.258	123.4
-OCH <sub>3</sub>	3.817 <i>s</i>	3.79	2'	113.520	114.676	114.8
-OCH <sub>3</sub>	3.922 <i>s</i>	3.79	3'	145.907	146.138	146.2
			4'	147.408	149.393	149.4
			5'	110.568	111.701	111.7
			6'	119.727	119.747	119.8
			OCH <sub>3</sub>	56.026	55.968	*
			OCH <sub>3</sub>	55.831	55.563	*
			OCH <sub>3</sub> -3			

\* - não apresentados

A ombuina já foi anteriormente isolada de *Ostrya japonica*, *Cassia laevigata* e *Angelonia grandiflora* [30].

#### 4.1.3 5,3,4' Triidroxi – 7,3' – dimetoxiflavona: ombuina (2) e 5,3 – Diidroxi – 7, 3', 4' - trimetoxiflavona

O espectro da amostra evidenciava a presença de duas bandas de estiramento característico de grupo hidroxilo entre 3200 e 3500  $\text{cm}^{-1}$ , uma banda de estiramento de forte intensidade de grupo carbonilo conjugado a 1657  $\text{cm}^{-1}$  e bandas de estiramento de grupo C=C de anel aromático a 1619, 1588 e 1509  $\text{cm}^{-1}$  (Anexo C, pág.C2).

A presença de grupo hidroxilo fenólico foi evidenciada pelo espectro no UV que apresentava um deslocamento batocrômico da banda de absorção a 357 nm para 410 nm, após adição de uma solução metanólica de NaOH.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra (Fig. 12, pág. 18) sugeria a presença de uma mistura de dois compostos. Era evidente a presença de dois grupos de sinais ao longo de todo o espectro: um grupo de sinais de área de sensivelmente 0,4 e outro de área 1, como era possível observar para os sinais a  $\delta 12,650$  (0,4 por 1H) e  $\delta 11,721$  (1 por  $^1\text{H}$ ).

A análise de expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  no registo entre  $\delta 4,0$  e  $\delta 3,8$  (região dos grupos metoxilos,  $\text{OCH}_3$ ) mostrava a presença de dois grupos de singletos de integrações distintas:

- para o composto maioritário, assinalam-se os sinais a  $\delta 3,890$  (área de integração 3) e  $\delta 3,983$  (área de integração 6), correspondendo a um e dois grupos  $\text{OCH}_3$ , respectivamente.
- enquanto que para o composto minoritário, os sinais a  $\delta 3,878$  (área de integração 1) e  $\delta 3,852$  (área de integração 1), correspondem a um grupo metoxilo cada.

A razão das áreas dos sinais dos grupos metoxilo e dos sinais da  $\delta 12,650$  e  $\delta 11,721$ , estão concordantes, permitindo concluir pela presença de uma mistura de dois compostos na proporção 70:30, aproximadamente.

Uma análise pormenorizada ao registo permitiu concluir pela presença de compostos de esqueleto carbonado semelhante ao composto 2, isto é, deveriam ser derivados da Flavona. A análise de expansão de espectro de RMN de  $^1\text{H}$  na região aromática entre  $\delta 7,9$  e  $\delta 6,3$  permitiu concluir pela presença de vários hidrogénios aromáticos apresentando o mesmo padrão de substituição para os dois compostos e igual ao encontrado no composto 2. Os 5H aromáticos de área 1,0 ( três dupletos de  $J = 2$  Hz, um duplete de  $J = 8$  Hz e um duplo duplete de  $J = 8$  e  $2$  Hz) são atribuídos ao composto maioritário. Os quatro dupletos ( $J = 2$  Hz, entre  $\delta 6,35$  e  $\delta 6,55$ ) agrupados dois a dois pela sua área foram atribuídos aos H-6 e H-8, dos compostos maioritário e minoritário.



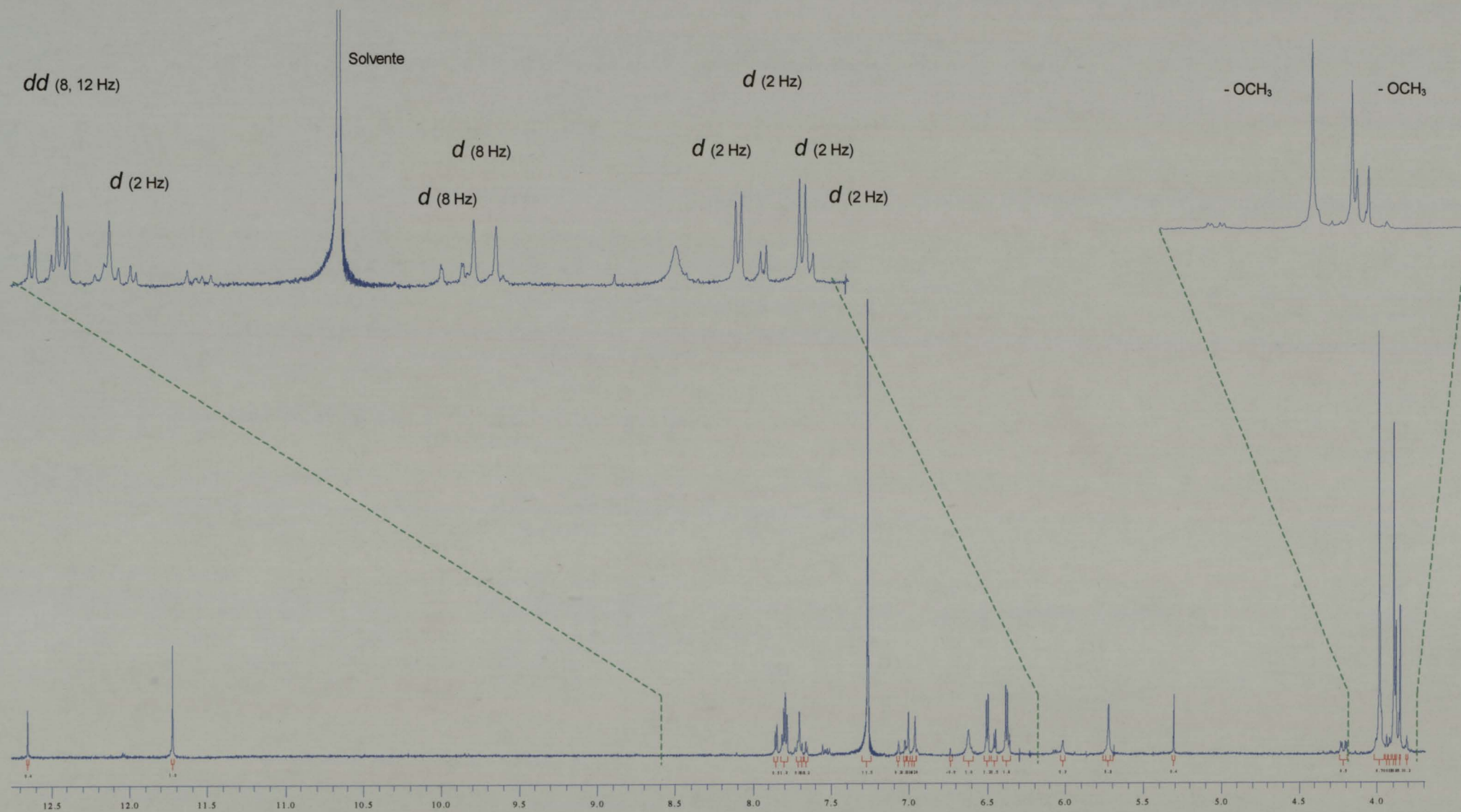


Fig.12 – Espectro RMN da mistura encontrada na amostra Bb 64/71 em clorofórmio deuterado  $^1H$  RMN e respectiva ampliação

Os valores de deslocamento químico destes prótons (H-6 e H-8) eram concordantes com uma substituição 5-hidroxi-7-metoxifenilo, para o anel A, como foi apresentado para os compostos 1 e 2. Os restantes dois metoxilos do composto maioritário deverão ser os substituintes do anel B (3', 4'-dimetoxifenilo), enquanto que o composto minoritário deveria ter um padrão de substituição 3'-hidroxi-4'-metoxifenilo para o mesmo anel.

A mistura representada pela amostra Bb 64/71, deveria ser constituída pelos compostos representados na figura 13.

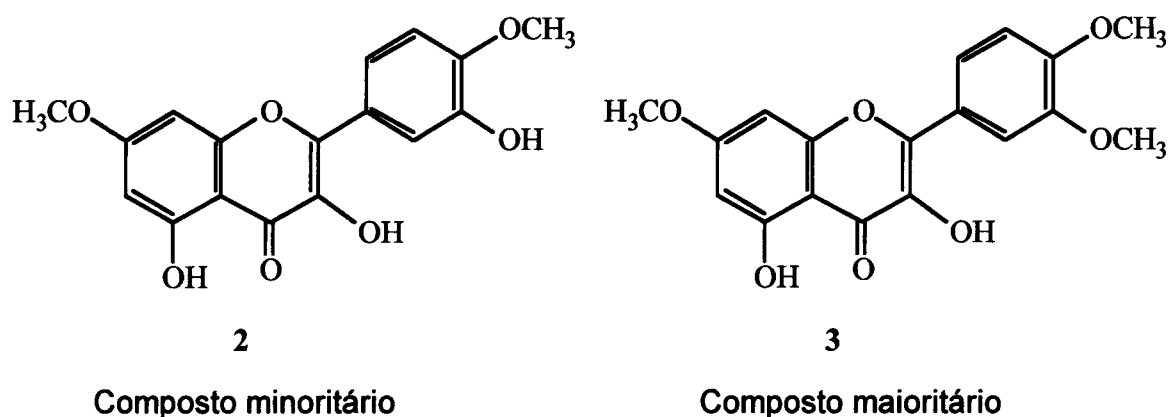


Fig. 13 – Representação dos compostos presentes na mistura, Bb64-71.

O composto minoritário desta mistura corresponde ao composto 2, identificado previamente de uma amostra pura (Bb 64/71 Cristais). A diferença nos valores do deslocamento químico de RMN de  $^1\text{H}$  observados para o composto 2 nas duas amostras deve-se ao facto de os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  terem sido obtidos em solventes diferentes.

Os dados do composto maioritário são compatíveis com a estrutura 3.

Este composto já foi descrito em várias plantas do género *Alnus*, *Bétula*, *Ostrya* e *Aesculus* [30].

## 4.2 PARTE B: CARACTERIZAÇÃO DOS CONSTITUINTES DE *Apollonias barbuiana*

### 4.2.1 Composto 4

O espectro no IV do composto 4 (Anexo 3, pág. 3), evidenciava uma banda larga de absorção de estiramento característico do grupo hidroxilo entre 3200 e 3400  $\text{cm}^{-1}$  e várias bandas de estiramento de ligação C – H em carbonos saturados entre 2960 e 2840  $\text{cm}^{-1}$ . O composto seria essencialmente alifático, sendo evidente a ausência de quaisquer bandas atribuídas aos anéis aromáticos, como observado nos compostos 1 e 2.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Fig. 15, pág. 21), apresentava-se como um aglomerado de sinais localizados maioritariamente entre  $\delta$  2,5 e  $\delta$  0,5, e verificava-se a ausência de sinais entre  $\delta$  6,0 e  $\delta$  8,0, confirmando a natureza alifática do composto. A informação estrutural retirada a partir deste espectro era limitada. Foi necessário recorrer aos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  nas suas várias técnicas (BB e DEPT), para poder caracterizar o composto 4.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  BB (Fig. 16, pág. 22), mostrava a presença de 30 átomos de carbono. A análise aos valores de deslocamento químico desses carbonos detectou a existência de uma dupla ligação C–C ( $\delta$  140,71 e  $\delta$  121,70), e um átomo de carbono directamente ligado a um grupo hidroxilo, C–OH ( $\delta$  71,75), concordante com a informação retirada do espectro no IV.

Informações adicionais relativamente ao tipo de átomos de carbono ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}$ , C quaternário) foram obtidos através dos registos de RMN de  $^{13}\text{C}$  pelas técnicas de DEPT ( $135^\circ$  e  $90^\circ$ ). O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPT  $90^\circ$  (Fig. 16, pág. 22), apresentando apenas os sinais de átomos de carbono directamente ligados a um átomo de hidrogénio ( $-\text{CH}$ ), mostrou a presença de 9 CH na estrutura do composto 4. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPT  $135^\circ$  (Fig. 16 b, pág. 22) apresentava na totalidade 27 sinais. Este registo não apresenta os sinais dos átomos de carbono quaternários, (não directamente ligados a átomos de hidrogénio) e apresenta como sinais negativos os  $-\text{CH}_2$  (9  $\text{CH}_2$ ) e positivos ( $-\text{CH}_3$  e  $-\text{CH}$ ). A conjugação do número de sinais observados nos vários espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  permitiu concluir que adicionalmente aos 9 CH, 3 C quaternários e 12  $\text{CH}_2$ , a estrutura do composto 4 incluía 6  $\text{CH}_3$ . O panorama apresentado pelos registos de RMN de  $^{13}\text{C}$  sugeriam a presença de uma estrutura do tipo esteróide, possuindo o núcleo do ciclo pentanoperidrofenantreno com uma cadeia lateral perfazendo a totalidade de 30 carbonos.

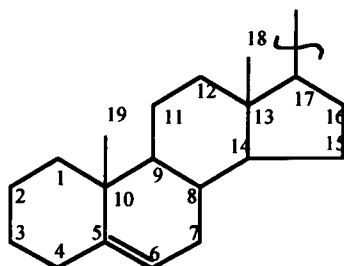


Fig. 14 – Estrutura genérica de um esteróide

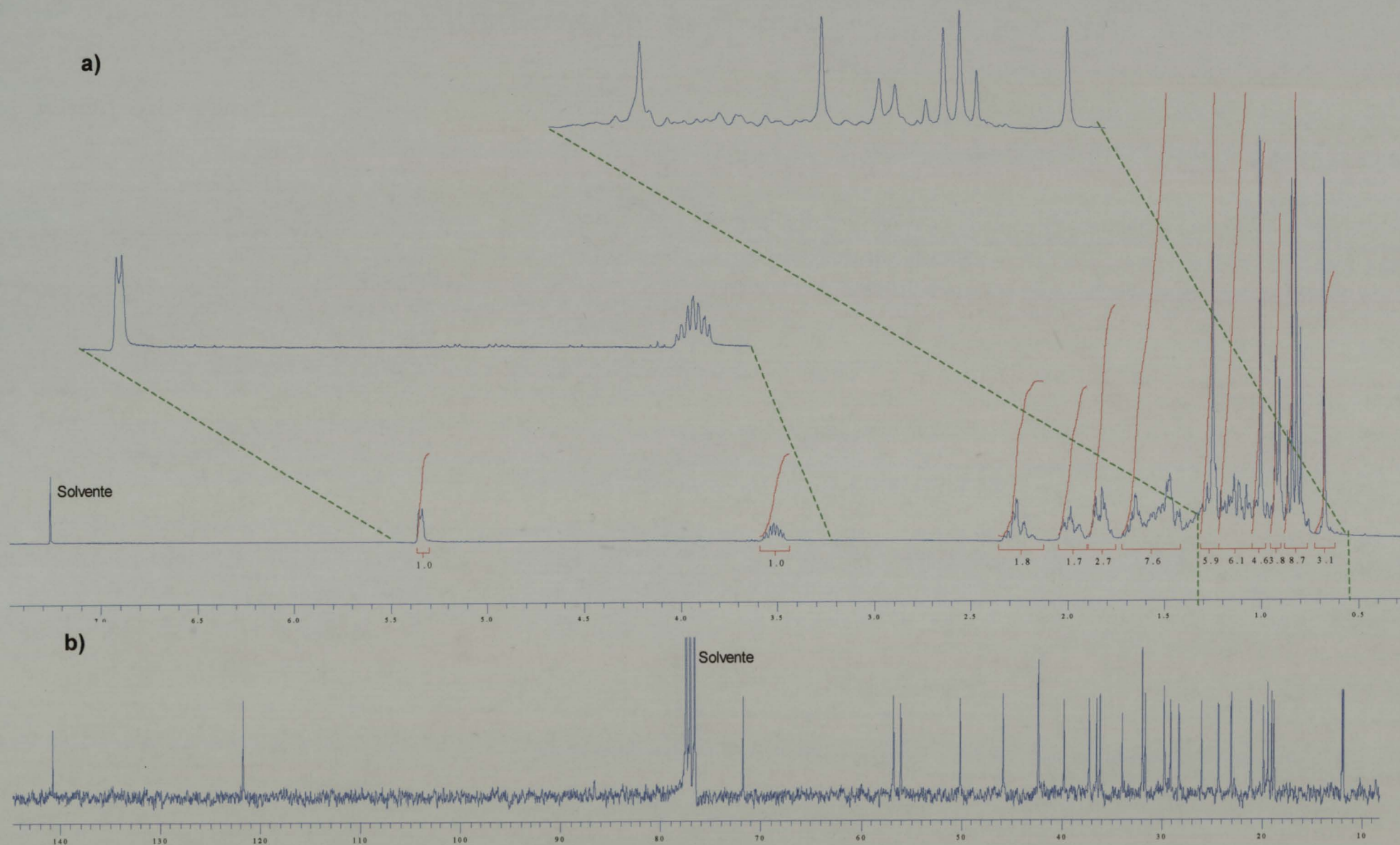


Fig.15 – Espectros RMN da composto **4** obtidos mistura em clorofórmio deuterado **a)**  $^1\text{H}$  RMN e respectiva ampliação **b)**  $^{13}\text{C}$  RMN.



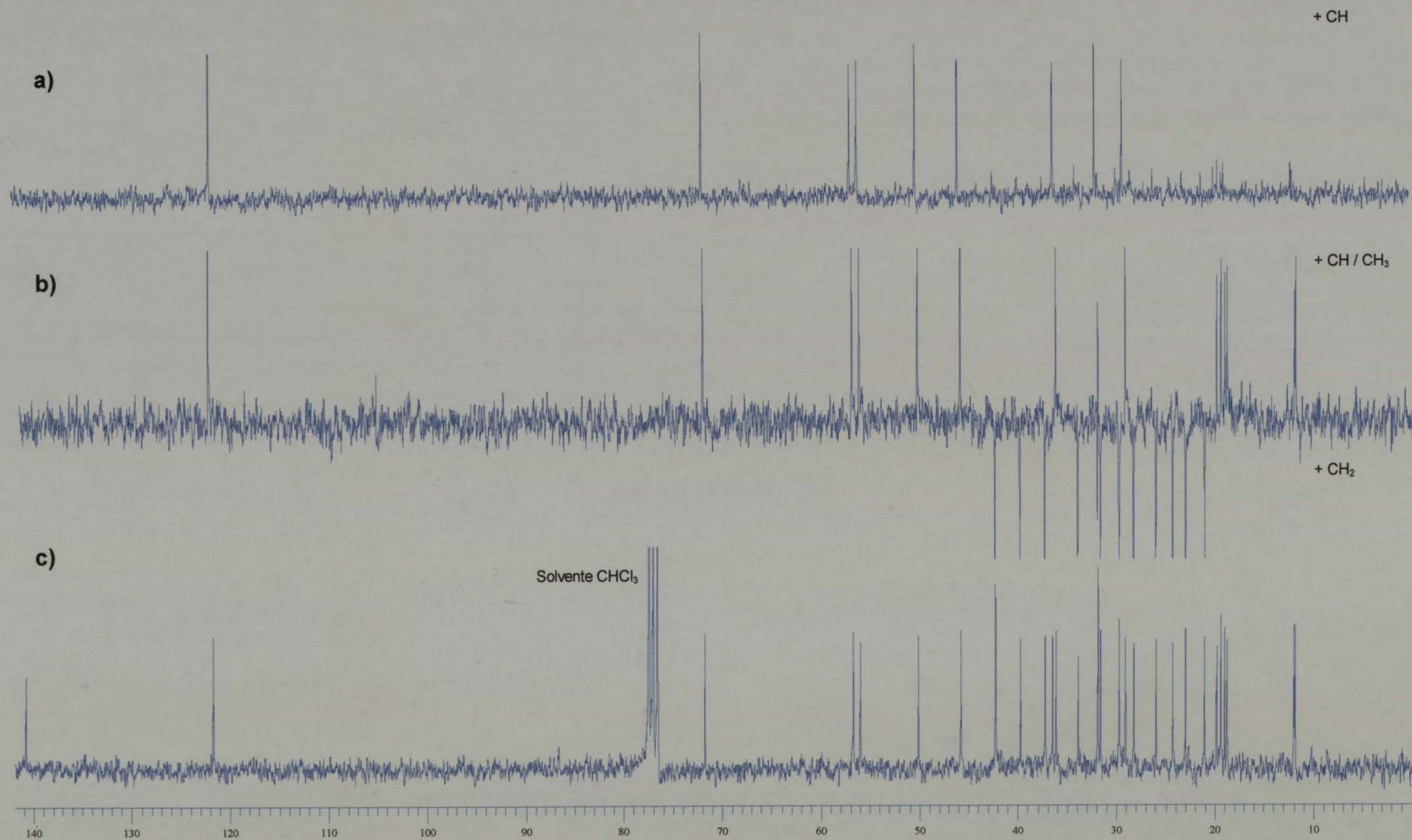


Fig16 – Espectros RMN de <sup>13</sup>C do composto 4 em CDCl<sub>3</sub> a) DEPT 90° b) DEPT 135° c) BB

Este núcleo deveria incluir ainda um grupo hidroxilo e uma dupla ligação.

Os dados espectrais do composto 4 apresentavam uma elevada concordância com o composto 5 ( $\beta$ -sitosterol) representado na figura 17.

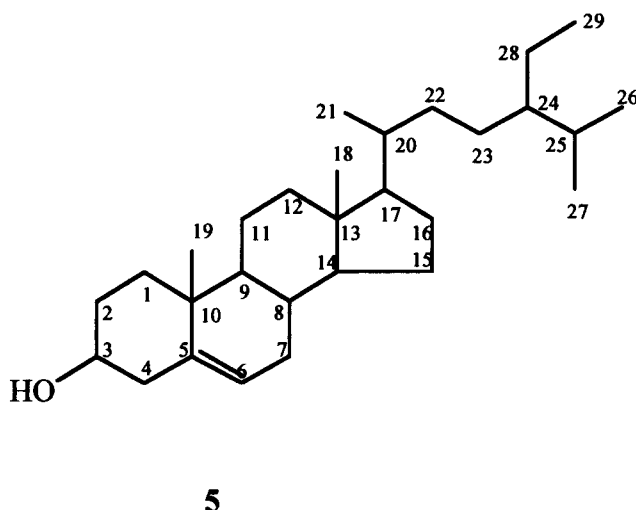


Fig. 17 – Estrutura do  $\beta$ -sitosterol (composto 5) [31]

A comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  para o composto 4 e 5 apresentam-se na tabela 3.

Tabela 3 – Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto 4 do composto 5 da literatura [31].

5 [31]			4		
C	$\delta_{\text{C}}$	multiplicidade	C	$\delta_{\text{C}}$	multiplicidade
5	140,71	Cq	5	140,704	Cq
6	121,63	CH	6	121,693	CH
3	71,73	CH	3	71,750	CH
14	56,75	CH	14	56,711	CH
17	56,02	CH	17	55,985	CH
9	51,13	CH	9	50,063	CH
24	45,82	CH	24	45,758	CH
13	42,37	Cq	13	42,266	Cq
4	42,20	CH <sub>2</sub>	4	42,241	CH <sub>2</sub>
12	39,79	CH <sub>2</sub>	12	39,719	CH <sub>2</sub>
1	37,33	CH <sub>2</sub>	1	37,204	CH <sub>2</sub>
10	36,43	Cq	10	36,458	Cq
20	36,07	CH	20	36,114	CH
22	33,95	CH <sub>2</sub>	22	33,878	CH <sub>2</sub>
7	31,96	CH <sub>2</sub>	7	31,876	CH <sub>2</sub>
8	31,81	CH	8	31,855	CH
2	31,63	CH <sub>2</sub>	2	31,597	CH <sub>2</sub>
			27	29,696	CH <sub>2</sub>
25	29,15	CH	25	29,064	CH
16	28,25	CH <sub>2</sub>	16	28,226	CH <sub>2</sub>
23	26,10	CH <sub>2</sub>	23	25,964	CH <sub>2</sub>
15	24,15	CH <sub>2</sub>	15	24,272	CH <sub>2</sub>
29	23,13	CH <sub>3</sub>	29	23,003	CH <sub>2</sub>
11	21,09	CH <sub>2</sub>	11	21,042	CH <sub>2</sub>
26	19,77	CH <sub>3</sub>	26	19,809	CH <sub>3</sub>
19	19,46	CH <sub>3</sub>	19	19,376	CH <sub>3</sub>
28	19,21	CH <sub>2</sub>	28	18,991	CH <sub>3</sub>
21	18,68	CH <sub>3</sub>	21	18,747	CH <sub>3</sub>
18	11,84	CH <sub>3</sub>	18	11,952	CH <sub>3</sub>
27	11,04	CH <sub>3</sub>	30	11,829	CH <sub>3</sub>

O composto 4 apresentava mais um átomo de carbono  $-CH_2$  ( $\delta_{29,696}$ ) em relação ao composto 5. Este carbono deveria estar localizado na cadeia lateral, dada a elevada concordância dos valores de deslocamento químico do núcleo do ciclopentanoperidrofeno (C-1 a C-19) nos dois compostos. Os restantes valores de deslocamento químico do composto 4 são compatíveis com a cadeia lateral que se apresenta na figura 18.

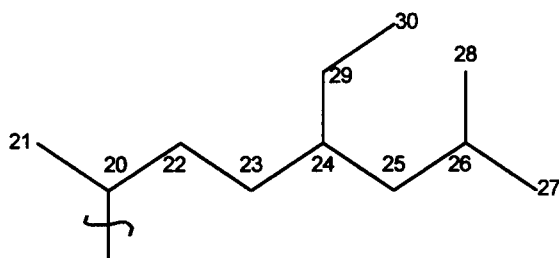


Fig. 18 – Estrutura da cadeia lateral.

Para a caracterização definitiva deste composto dever-se-iam efectuar outros espectros, nomeadamente RMN's bidimensionais e espectro de massa.

## **5. PARTE EXPERIMENTAL**

A espécie *Blumea balsamifera* DC, estudada neste trabalho, foi colhida em 1998 na Tailândia. O extracto clorofórmico foi fornecido pelo Prof. Doutor Anake Kijjoa (Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar). O fraccionamento por cromatografia em coluna e o isolamento e purificação dos constituintes foi realizado por Annette Silva, durante o seu estágio de PRODEP, realizado entre Julho e Dezembro de 1999, sob a supervisão de Prof. Prof. Dra. Margarida Bastos (FEUP) e Eng. José Manuel Teixeira (PARALAB)

A espécie *Apollonias barbujana*, estudada neste trabalho foi colhida na Ilha da Madeira. O extracto foi fornecido pelo Prof. Anake Kijjoa (Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar). O fraccionamento por cromatografia em coluna e o isolamento e purificação dos constituintes foi realizado pela Prof. Dra. Margarida Bastos (FEUP).

### **5.1. INSTRUMENTOS E MATERIAL UTILIZADO**

As amostras de *Blumea balsamifera* e de *Apollonias barbujana* a caracterizar tiveram como designação original Bb-64/71 cristais, Bb-64/71 , Bb-102/115 e Ap-75, respectivamente, e eram provenientes dos procedimentos de extracção, isolamento e purificação anteriormente mencionados.

- As pesagens foram efectuadas em balança METLER AE163
- Os solventes para os registos de UV foram da marca MERCK com grau de pureza “pró – análise”.
- Os solventes para espectros de RMN foram clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) e dimetilsulfóxido ( $\text{DMSO-D}_6$ ), (Uvasol, MERCK) com grau de deuteração superior a 99,0%.
- O material de dispersão para os espectros no IV foi o brometo de potássio (Uvasol, MERCK).
- Os espectros no UV foram registados em aparelho Shimadzu UV/Visível modelo 265.
- Os espectros no IV foram registados em aparelho Bomem modelo MB104.
- Os espectros de RMN foram obtidos em aparelho Bruker Pulse NMR modelo Spectrometer C x P.



## 5.2. OBTENÇÃO DOS ESPECTROS

### 5.2.1. RMN

#### **A – Preparação das amostras de RMN**

Para a obtenção dos registos de RMN foi necessário dispensar uma particular atenção na limpeza dos tubos de RMN e no filtro de algodão utilizado para a filtração da amostra. Os tubos de RMN (diâmetro 0,5 mm) foram lavados com água e detergente (Dextran, MERCK). Após remoção do detergente com água corrente foram passados várias vezes por água destilada, metanol, acetona, diclorometano e por hexano. Foram posteriormente secos a 120° C durante 48 horas.

Após pesagem da amostra em estudo, entre 3 e 10 mg, foi-lhe adicionado 0,5 ml de solvente deuterado. Para dissolver completamente a amostra aqueceu-se ligeiramente e/ou utilizou-se adicionalmente mais 0,5 ml de solvente.

A amostra dissolvida, total ou parcialmente, foi filtrada por filtro de algodão directamente para tubo de RMN.

O filtro de algodão foi preparado do seguinte modo:

- introduziu-se um pouco de algodão hidrófilo numa pipeta de Pasteur e compactou-se com auxílio de outra pipeta;
- lavou-se esse filtro de algodão com vários solventes de diferentes polaridades (hexano, diclorometano, acetona e metanol) para remoção de possíveis impurezas;
- foi seco a 120°C durante vários dias.

#### **B – Aquisição do espectro**

A aquisição dos espectros de RMN foi efectuada num espectrofotómetro da marca BRUCKER Pulse NMR – Modelo Spectrometer CxP (200MHz para  $^1\text{H}$  e 50,3 para  $^{13}\text{C}$ ) sob a forma de FID (Free Indication Decay) de acordo com os programas adequados.

Os espectros de RMN adquiridos variaram quanto ao núcleo analisado e quanto às técnicas. Assim, relativamente ao núcleo  $^1\text{H}$  foi adquirido apenas o espectro normal de RMN de protão trabalhando à frequência de 200 MHz. Para a análise do núcleo  $^{13}\text{C}$  foram adquiridos o espectro normal de  $^{13}\text{C}$ , também designado por RMN de  $^{13}\text{C}$  BB (“Broad Band decoupling”, isto é com desacoplamento de banda larga por ruído modulador) e o espectro de DEPT (“Distortionless Enhancement by Polarization Transfer”) trabalhando à frequência de 50,3 MHz.

A aquisição dos espectros num aparelho de RMN tem de ser efectuada por um técnico especializado, tendo em consideração o elevado custo deste tipo de equipamento. Foi efectuada pela Prof. Prof. Dra. Margarida Bastos no único equipamento existente na

Universidade do Porto, pertencente a cinco grupos desta Universidade, entre eles o Departamento de Engenharia Química da FEUP, mas localizado no Departamento de Química da FCUP.

### **C – Tratamento dos espectros (MestreC)**

O tratamento dos espectros foi feito usando o programa informático MestreC (versão 2.3, disponibilizado no endereço <http://qobruue.usc.es> em Outubro de 2000) desenvolvido para a análise de registos de RMN. Como ainda se encontra em desenvolvimento o seu uso é envolto de um certo trabalho de adaptação e aprendizagem contínuas. No entanto a sua ajuda é preciosa na obtenção de registos, não sendo necessário continuar a utilização do equipamento de RMN após a aquisição dos dados sob a forma de FID. Assim uma vez obtido o espectro FID este é gravado para uma disquete e através deste programa podemos trabalhar a partir de um computador pessoal.

Por não ser muito conhecido não estão disponíveis informações sobre o mesmo, como tal foi desenvolvido um manual durante este estágio para ajudar ao seu uso. Esse manual encontra-se em anexo (Anexo 1).

#### 5.2.2. IV

### **A – Preparação das amostras**

Cerca de 1 mg da amostra em estudo foi misturada homogeneamente com 100mg de brometo de potássio, em almofariz de ágata.

A mistura homogénea foi acondicionada adequadamente no pastilhador, sendo este colocado na prensa. A mistura foi submetida a um aumento lento de pressão, permanecendo durante 30 segundos a uma pressão de 5 toneladas/m<sup>2</sup> e 10 segundos a 10 toneladas/m<sup>2</sup> (confirmar valores no aparelho) Após este período de tempo, foi efectuada a descompressão lenta até se atingir a pressão atmosférica.

### **B – Aquisição dos espectros**

Os espectros no IV das amostras em estudo foram obtidos em disco de Brometo de Potássio em aparelho Bomem modelo MB104.

#### 5.2.3. UV

### **A – Preparação das amostras**

Os espectros no UV das amostras em estudo foram obtidas em solução metanólica. Os registos foram obtidos em soluções cuja absorvância máxima era inferior a 2 unidades.

Preparou-se inicialmente uma solução contendo cerca de 1 mg da amostra em estudo em 25 ml de metanol. Quando necessário efectuaram-se diluições.

### **B – Obtenção dos registos**

Os espectros no UV foram obtidos utilizando um espectrofotómetro Shimadzu modelo 265, usando como célula de referência (branco) o metanol.

## CONCLUSÃO

Este estágio permitiu usar vários aparelhos nomeadamente o RMN, o IV e o UV bem como os programas necessários para analisar os registos, nomeadamente o MestreC para os de RMN. Com estes meios técnicos e com a ajuda de alguns artigos bibliográficos, foi possível chegar às estruturas dos compostos isolados, identificando assim quatro compostos de duas plantas em estudo.

O grande sucesso deste estágio fica marcado pela publicação e apresentação em congresso na CHEMPOR'01 dos resultados obtidos neste PRODEP, sob o título "EXTRACÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FLAVONÓIDES NA *Blumea balsamifera*", pág. 1049 - 1056.

## BIBLIOGRAFIA

- [1]- Marcano D.; Hasegawa M. "Fitoquímica Orgânica", Caracas (1991)
- [2]- R. M. Silverstein; F. X. Webster "Spectrometric Identification of Organic Compounds", Toronto (1998)
- [3]- Ruangrugsri, N.; Tappayuthpijarn, P.; Tantivatana, P.; Borris, R. P. and Cordell, G. A. "Traditional Medicinal plants of Thailand I. Isolation and structure elucidation of two new flavonoids, (2R,3R)-Dihydroquercetin-4'-Methyl Ether and (2R,3R)-Dihydroquercetin-4',7-Dimethyl Ether from *Blumea balsamifera*", *J. Nat. Products*, **44**(5), 541-545 (1981).
- [4]- Ruangrugsri, N.; Tantivatana, P.; Tappayuthpijarn, P.; Borris, R. P. and Cordell, G. A. "Traditional Medicinal Plants of Thailand VI. Isolation of Cryptomeridiol from *Blumea balsamifera*", *J. Sci. Soc. Thailand*, **11**, 47-50 (1985).
- [5]- Chisowa, E. H.; Hall, D. R.; Farman, D. I. "Chemical composition of the essential oil of *Blumea gariepina* DC" *J. Essent. Oil Res.* **10** (3), 337-338 (1998)
- [6]- Ahmad, V. U.; Alam, N. "Acetylenic thiophene derivatives from *Blumea oblique*" *Phytochemistry* **42** (3), 733-735 (1996).
- [7]- Ahmad, V. U.; Alam, N. "New antifungal bithienylacetylenes from *Blumea oblique*" *J. Nat. Prod.* **58** (9), 1426-1429 (1995).
- [8]- Agarwal, R.; Singh, R.; Siddiqui, I. R.; Singh, J. "Triterpenoid and prenylated phenol glycosides from *Blumea lacera*" *Phytochemistry* **38**(4), 935-938 (1995).
- [9]- Khanna, R. K.; Sharma, M. L.; Chowdhury, A.R. "Chemical examination of essential oil from *Blumea membranacea* (DC.) Hook.f." *Indian J. For.* **17**(3), 271-272(1994).
- [10]- Mwangi, J. W.; Achola, K. J.; Lwande, W.; Hassanali, A.; Laurent, R. "Constituents of the essential oil of *Blumea brevipes* (Oliv. & Hiern) Willd." *Flavour Fragrance J.* **9**(5), 233-235 (1994).
- [11]- Dung, N. X.; Loi, D. T.; Hung, D. T.; Leclercq, P. A. "Chemical composition of the oil of *Blumea lanceolaria* (Roxb.) Druce from Vietnam" *J. Essent. Oil Res.* **3**(4), 285-286 (1991).
- [12] - Ruecker, G.; Paulini, G.; Sakulas, H.; Lawong, B.; Goeltenboth, F. "Medicinal plants from Papua New Guinea: graniline-esters and germacranolides from *Blumea arfakiana*" *Planta Med.* **57**(3), 278-281 (1991).
- [13]- Dutta, S. C.; Saha, B. N.; Pathak, M. G.; Mathur, R. K. "Essential oil of *Blumea lanceolaria* (Roxb) Duncz" *Indian Perfum.* **33**(1), 38-39 (1989).
- [14]- Laakso, I.; Seppanen-Laakso, T.; Hiltunen, R.; Ekundayo, O. "Composition of the essential oil of *Blumea lacera* DC. (Asteraceae) leaves from Nigeria" *Flavour Fragrance J.* **4**(2), 73-75 (1989).
- [15]- Mehta, S. C.; Mehta, P.; Vardhan, H. "Essential oil composition of *Blumea membranacea*" *Indian Perfum.* **31**(3), 231-234 (1987).
- [16]- Kulkarni, M. M.; Rojtkar, S. R.; Nagasampagi, B.A. "Four 6-hydroxyflavonols from *Blumea malcomii*" *Phytochemistry* **26**(7), 2079-2083 (1987).
- [17]- Pathak, V. P.; Jakupovic, J.; Jain, S., Bhakuni, D. S. "Amplectol: a novel acetylenic thiophene derivative from *Blumea amplectens* var. *arenaria*" *Planta Med.* **53**(1), 103-104 (1987).
- [18]- Mehta, S. C.; Vardhan, H.; Saxena, S. P. "Some pharmacological actions of the essential oil of *Blumea membranacea*" *Indian J. Physiol. Pharmacol.* **30**(2), 149-154 (1986).
- [19]- Pandey, U. C.; Sharma, R.P.; Kulanthaivel, P.; Herz, W. "Isoalantolactone derivatives and germacranolides from *Blumea densiflora*" *Phytochemistry* **24**(7), 1509-1514 (1985).

- [20]- Bohlmann, F.; Wallmeyer, M.; Jakupovic, J.; Gerke, T.s; King, R. M.; Robinson, H. "Cuathemone sesquiterpenoids from *Blumea alata*" *Phytochemistry* **24**(3), 505-509 (1985).
- [21]-Woerdenbag, H.J.; Merfort, I.; Paßreiter, C.M.; Schmidt, T.J.; Willuhn, G.; Uden, W.; Pras, N., Kampinga, H.H. and Konings, A.W.T "Cytotoxicity of Flavonoids and Sesquiterpene Lactones from Arnica Species Against the GLC<sub>4</sub> and the COLO 320 Cell Lines" *Planta Med.* **60**, 434-437 (1994).
- [22]-Selway, J.W.T. "Antiviral Activity of Flavones and Flavans" in "Plants Flavonoids in Biology and Medicine - Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships" Ed. Cody, V., Middleton, Jr., E. and Harborne, J.B., Alan R. Liss, Inc., New York, 521-536 (1986).
- [23]-Wagner, H "Antihepatotoxic Flavonoids" in "Plants Flavonoids in Biology and Medicine - Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships" Ed. Cody, V., Middleton, Jr., E. and Harborne, J.B., Alan R. Liss, Inc., New York, 545-558 (1986)
- [24]-Gábor, M. "Anti-inflammatory and Anti-allergic Properties of Flavonoids" in "Plants Flavonoids in Biology and Medicine - Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships" Ed. Cody, V., Middleton, Jr., E. and Harborne, J.B., Alan R. Liss, Inc., New York, p. 471. (1986)
- [25]- Mabri, T. J. And Uluben, A; "Chemistry and Utilization of Phenulpropanoids including flavonoids" *J. Agric. Food Chem.* **28** 188-190 (1980)
- [26]- Pérez C.; Trujillo J. M. " Absolute Structure of two new C<sup>13</sup>-Norisoprenoids from *Apollonias barbujana*" *J. Nat. Prod.* **59**(1), 69 - 74 (1996)
- [27]- Pérez C. ; Almonacid L.N.; Trujillo J.M.; Gonzalez <sup>a</sup> G.; Alonso S. J.; Navarro E. "Lignans from *Apollonias barbujana*" *Phytochemistry*, **40**(5), 1511 – 1513 (1995)
- [28]- Pérez C.; Trujillo J. M. " New C<sup>13</sup>-Norisoprenoids from *Apollonias barbujana*" *Natural Product Letters* **8**, 1 - 6 (1996)
- [29]-Agrawal, P.K.; Thkur, R.S.; Bansal, M. C. "Flavonoids" in "Carbon-13 NMR Flavonoids" Ed. P. K. Agrawal, Elsevier, New York, 95-235 (1989)
- [30]-Eckhard Wollenweber and Volker H. Dietz " Occurance and Distribution of Free Flavonoid Aglycones in Plants", *Phytochemistry*, **20**(5), 869 – 932 (1981)
- [31]-Grece, M.D., Monaco, P. Previtera, L. "Stigmasterols from *Typha letifolia*" *Jounal of Natural Products*, **53**(6) 1430 – 1435 (1990)

Porto, 26 de Outubro de 2001

Mónica Carla Sousa Eiras Amaral Pombares Mónica Pombares

## ANEXO 1 (MESTREC)



## COMO FAZER TRATAMENTO DO FID DE ESPECTROS RMN

1º - Obter o programa MestreC 2.3 (versão 2.3)

O programa MestreC pode ser obtido via [www](http://qobruue.usc.es), através da morada

<http://qobruue.usc.es>

uma vez na página desejada:

a) – clicar **DOWNLOAD**

b) – clicar **DOWNLOAD NOW** your copy of MestreC 2.3

### RMN <sup>1</sup>H

2º - Abrir o programa;

3º - Fazer open;

4º - Escolher o espectro e abrir;

5º - Clicar em **zero filling** e seleccionar:

número de pontos = 1048576

6º - Clicar em **apodize** e seleccionar:

LB = 0

7º - Clicar em **FT** e fazer OK;

8º - Clicar em **view** e retirar a opção **dual display** (opcional);

9º - Clicar em **zoom** e ampliar a zona dos sinais mais próximos de 0 ppm;

10º - Clicar em **phase correction**;

a) Colocar o **pivot** sobre o sinal mais à direita, isto é, o sinal mais próximo de 0 ppm, (normalmente escolhe-se um singuleto com intensidade razoável);

b) Com o botão de **ordem zero** acertar a base do sinal de modo a que este fique o mais simétrico possível;

c) Sem movimentar o pivot, fazer andar o espectro para o fim da escala de ppm e usando o botão de **ordem um** acertar a base do sinal mais à esquerda, de modo a que este fique o mais simétrico possível;

11º - Clicar em **full**;

(Nota: mesmo quando queremos ver o espectro inteiro devemos ampliar o mais possível. O início e o fim da escala que não contêm sinais podem ser cortados);

12° - Clicar em **base line correction**;

- a) seleccionar **multipoints baseline correction**;
- b) clicar nos extremos da base de cada pico de modo a que no final a linha de base esteja o mais horizontal possível;

(Nota: pode-se fazer a correcção da linha de base várias vezes consecutivas, a fim de se obter a melhor possível).

13° - Clicar em **zoom** e ampliar o sinal do solvente\*;

\*COMO IDENTIFICAR O SINAL DO SOLVENTE?

\*Dimetilsulfoxido  $\Rightarrow$  quintuplete  $\cong$  2.5 ppm

\*Clorofórmio  $\Rightarrow$  singuleto  $\cong$  7.2 ppm

14° - Clicar em **reference**;

- a) clicar no meio do sinal;
- b) escolher o solvente usado, nunca esquecendo que estamos a analisar um espectro RMN  $^1\text{H}$ ;
- c) clicar em **OK**;

15° - Sem retirar o **zoom** andar ao longo da escala e escolher um sinal bem definido, por exemplo um

duplete. Esse sinal será a unidade, logo é importante uma boa escolha;

16° - Clicar em **tools** e seleccionar **integration**;

- a) clicar num extremo da base desse sinal e arrastar o cursor até ao outro extremo;
- b) fazer o mesmo procedimento de a) para todos os sinais do espectro;
- c) no fim clicar em **tools**, seleccionar **integration** e em seguida **integral options** e:
  - 1) em **font** escolher tamanho de letra 4;
  - 2) valores por baixo de espectro;
  - 3) aproximar o mais possível o sinal de integração da linha de base do espectro;
  - 4) retirar a curva do integral pois enche muito o espectro final;

17° - Sem retirar o **zoom** e começando pelo pico mais à esquerda:

- a) Clicar em **tools**;
- b) Clicar em **peak piking**;
- c) Clicar **options**;
- d) Clicar **show peak piking on the screen**;

- e) Clicar novamente em **peak piking**;
- f) Clicar novamente em **options**;
- g) Clicar em **font** e seleccionar tamanho de letra 4;
- h) Clicar **peak by peak**;
- i) Clicar sobre todos os picos;

18° - Imprimir.

Sempre que se queira saber qual a constante de acoplamento de um determinado sinal fazer:

18° - Clicar em **measure coupling constantes**:

Clicar uma vez sobre um pico e depois sobre o outro pico do sinal para o qual queremos saber a constante de acoplamento. A constante aparece num quadro e colocando o cursor sobre esse valor sem clicar vemos o esquema de acoplamento. Como não há maneira de imprimir estes dados (daí esta operação aparecer depois da impressão) eles têm de ser registados numa folha à parte (normalmente faz-se uma lista com os vários deslocamentos químicos ( $\delta$ ), integração, multiplicidade e constante de acoplamento(J)).

## RMN <sup>13</sup>C

2º - Abrir o programa;

3º - Fazer open;

4º - Escolher o espectro e abrir;

5º - Clicar em **zero filling** e seleccionar:

número de pontos = 1048576

6º - Clicar em **apodize** e seleccionar:

LB = 2 - 3

7º - Clicar em **FT** e fazer OK;

8º - Clicar em **view** e retirar a opção **dual display** (opcional);

9º - Clicar em **zoom** e ampliar a zona dos sinais mais próximos de 0 ppm;

10º - Clicar em **phase correction**;

d) Colocar o **pivot** sobre o sinal mais à direita, isto é, o sinal mais próximo de 0 ppm, (normalmente escolhe-se um singuleto com intensidade razoável);

e) Com o botão de **ordem zero** acertar a base do sinal de modo a que este fique o mais simétrico possível;

f) Sem movimentar o pivot, fazer andar o espectro para o fim da escala de ppm e usando o botão de **ordem um** acertar a base do sinal mais à esquerda, de modo a que este fique o mais simétrico possível;

11º - Clicar em **full**;

(Nota: mesmo quando queremos ver o espectro inteiro devemos ampliar o mais possível. O início e o fim da escala que não contêm sinais podem ser cortados);

13º - Clicar em **zoom** e ampliar o sinal do solvente\*;

### \*COMO IDENTIFICAR O SINAL DO SOLVENTE?

\*Dimetilsulfoxido ⇒ septupletto

\*Clorofórmio ⇒ tripleto

14º - Clicar em **reference**;

d) clicar no meio do sinal;

e) escolher o solvente usado, nunca esquecendo que estamos a analisar um espectro RMN <sup>13</sup>C;

f) clicar em **OK**;

17° - Sem retirar o **zoom** e começando pelo pico mais à esquerda fazer:

j) Clicar em **tools**;

k) Clicar em **peak piking**;

l) Clicar **options**;

m) Clicar **show peak piking on the screen**;

n) Clicar novamente em **peak piking**;

o) Clicar novamente em **options**;

p) Clicar em **font** e seleccionar tamanho de letra 4;

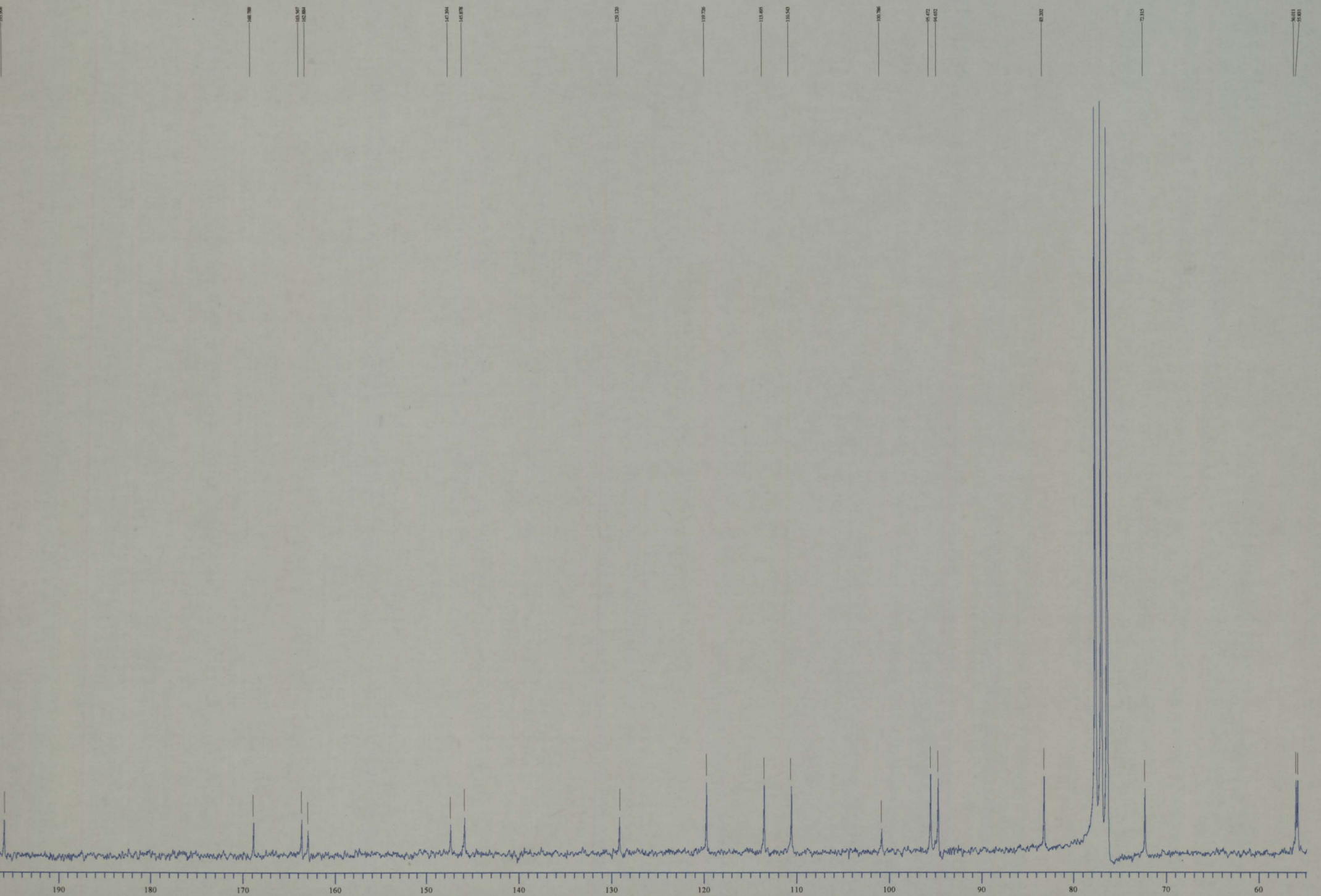
q) Clicar **peak by peak**;

r) Clicar sobre todos os picos;

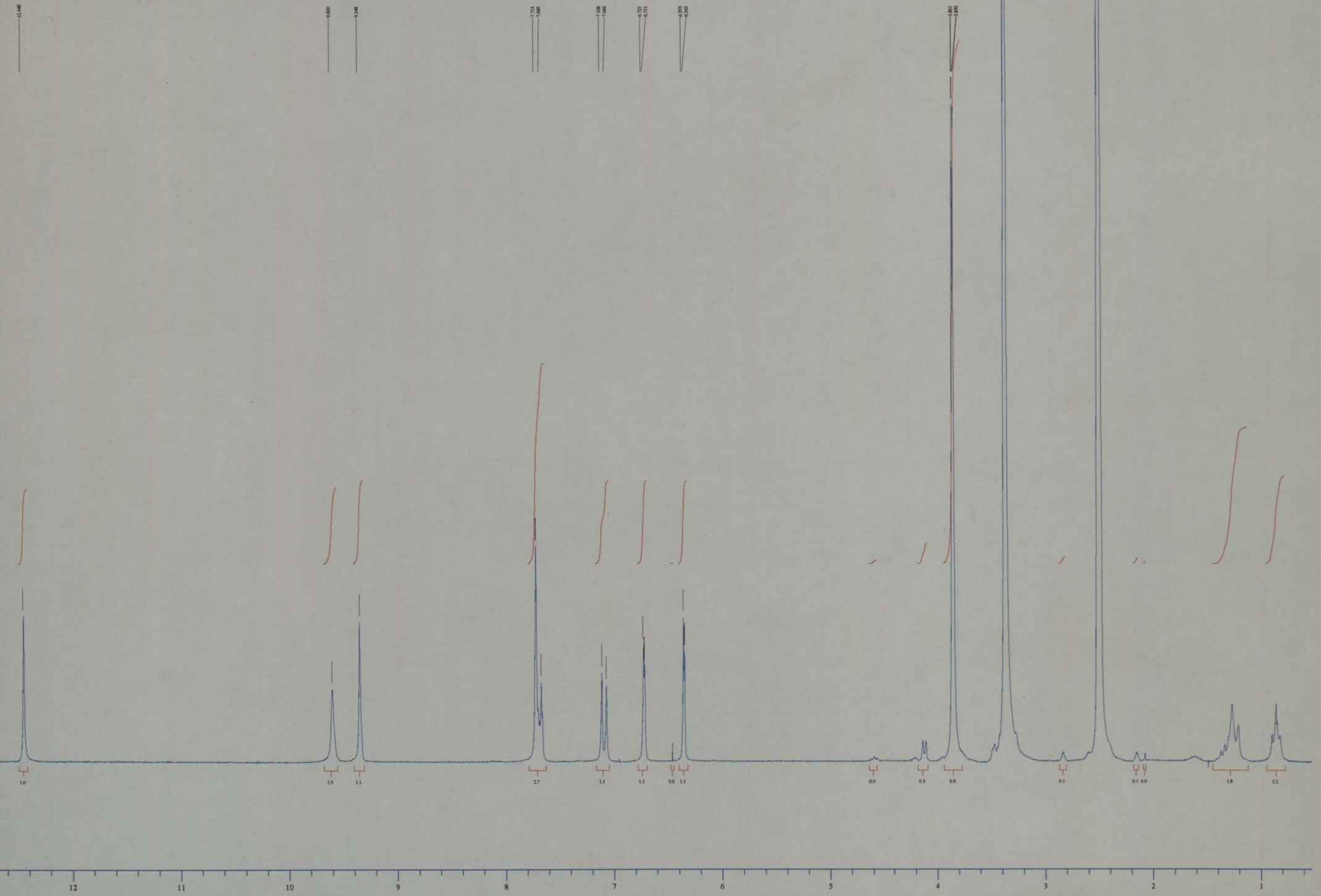
18° - Imprimir.

## ANEXO 2 – REGISTOS RMN

Espectro RMN 13C do composto 1 em clorofórmio deuterado

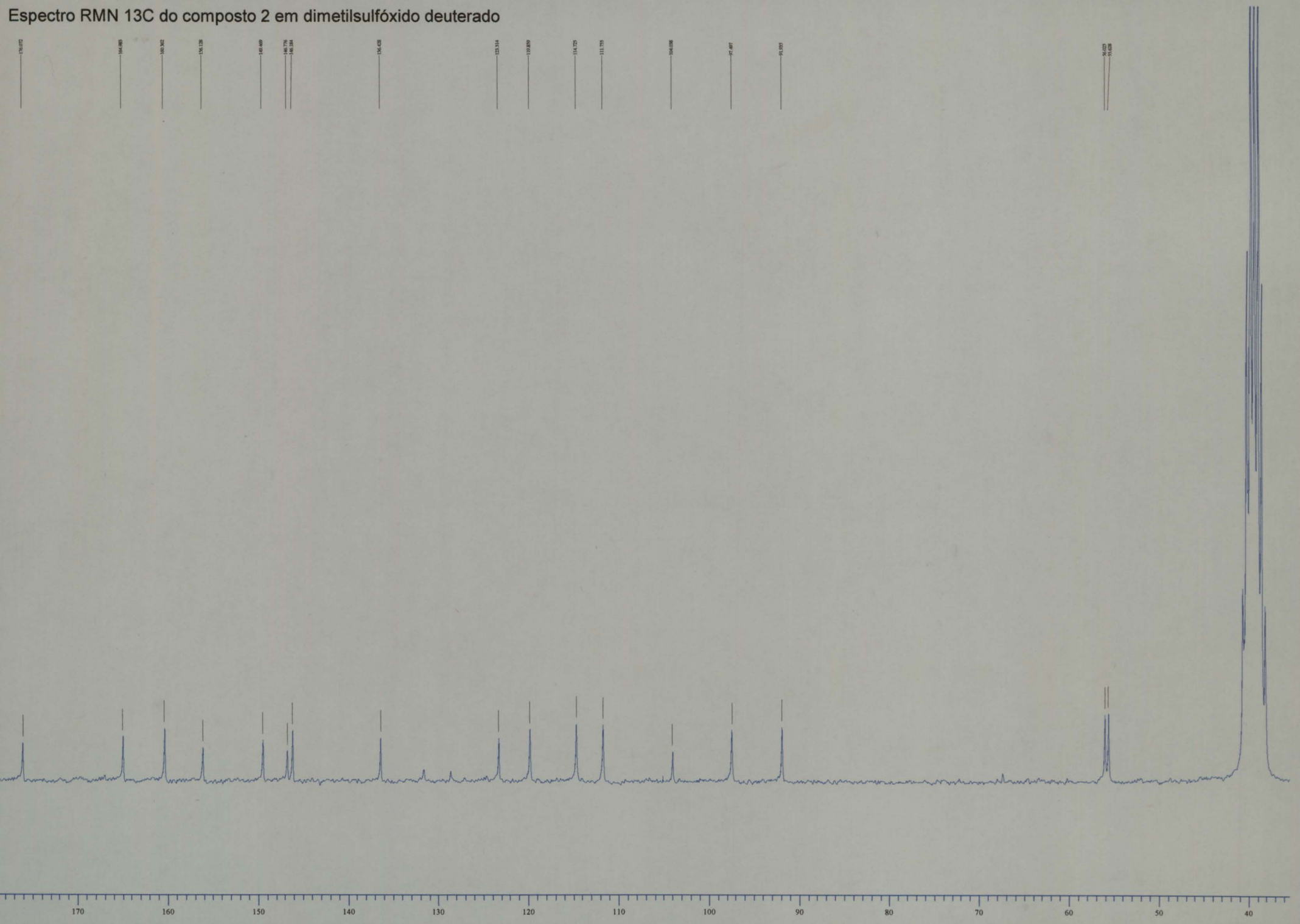


Espectro RMN 1H do composto 2 em dimetilsulfóxido deuterado

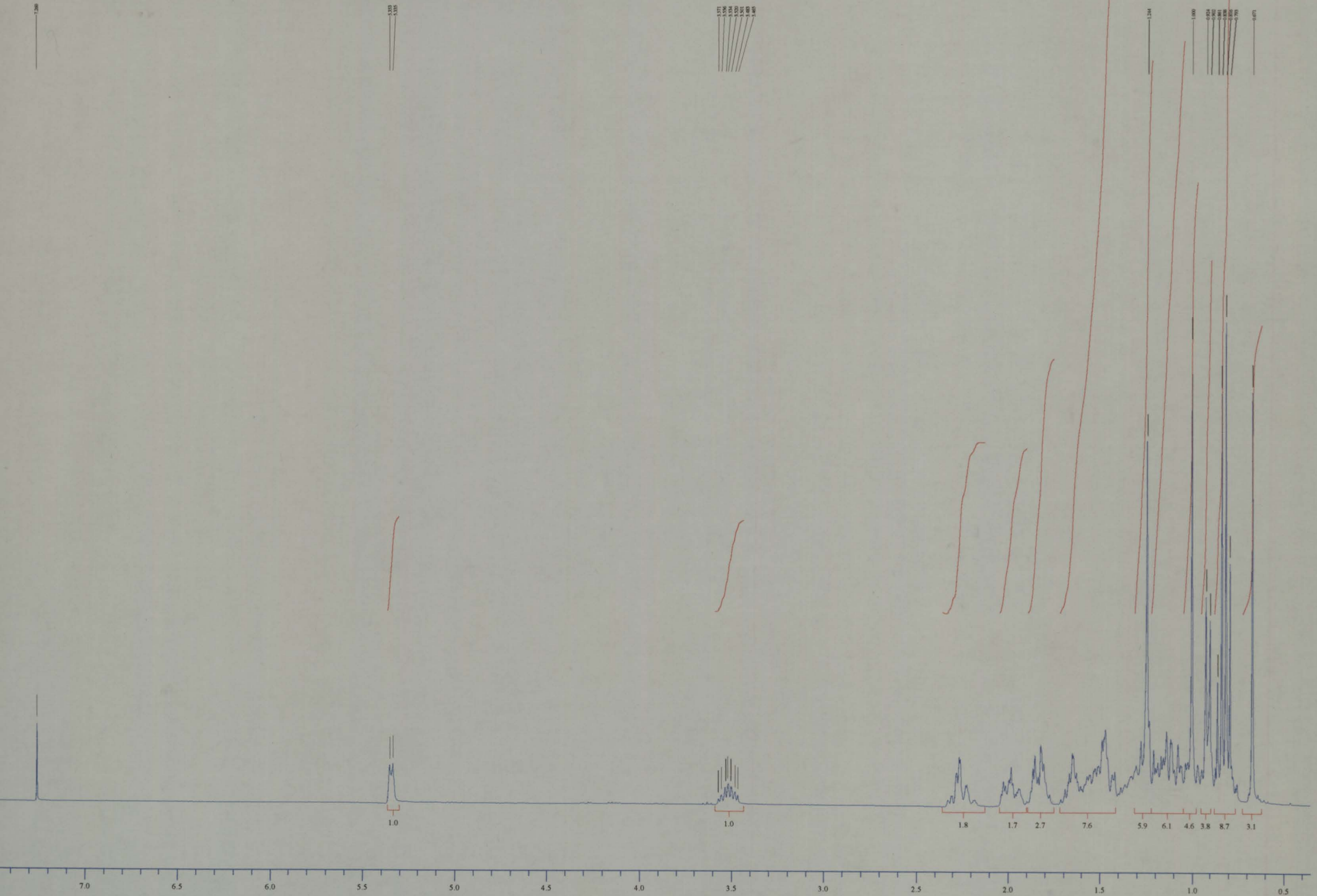




Espectro RMN 13C do composto 2 em dimetilsulfóxido deuterado



Espectro RMN 1H do Composto 4 obtido em mistura de clorofórmio deuterado



**ANEXO 3 – REGISTOS IV**

File # 1 : BASELINE

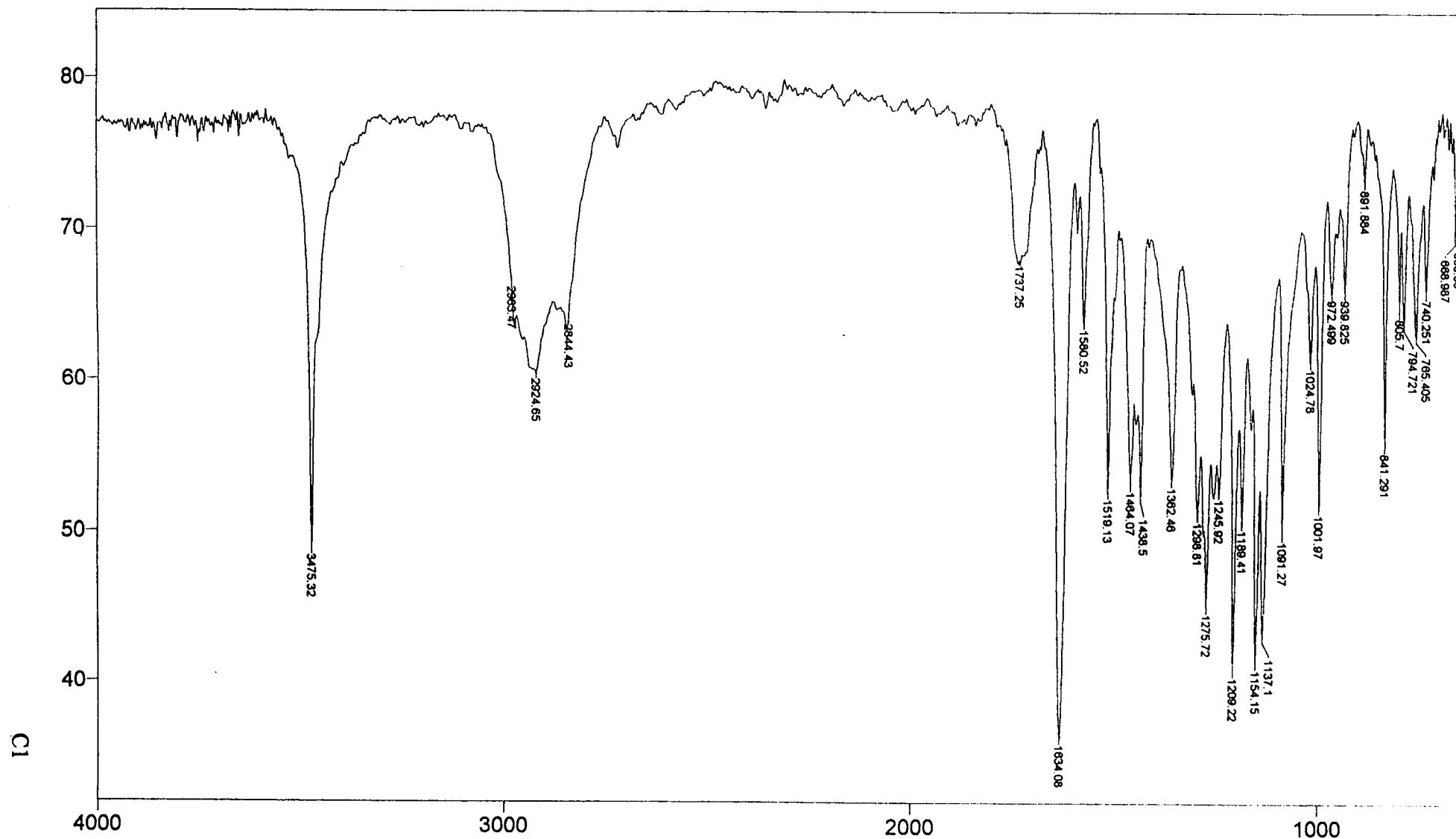
Mode = 1 (Near-IR)

Sample Description: **Composto 1**

Scans = 32

Res = 4 cm-1 20 scans/min

Apod = Cosine



transmittance / Wavenumber (cm-1)

File # 1 : BASELINE

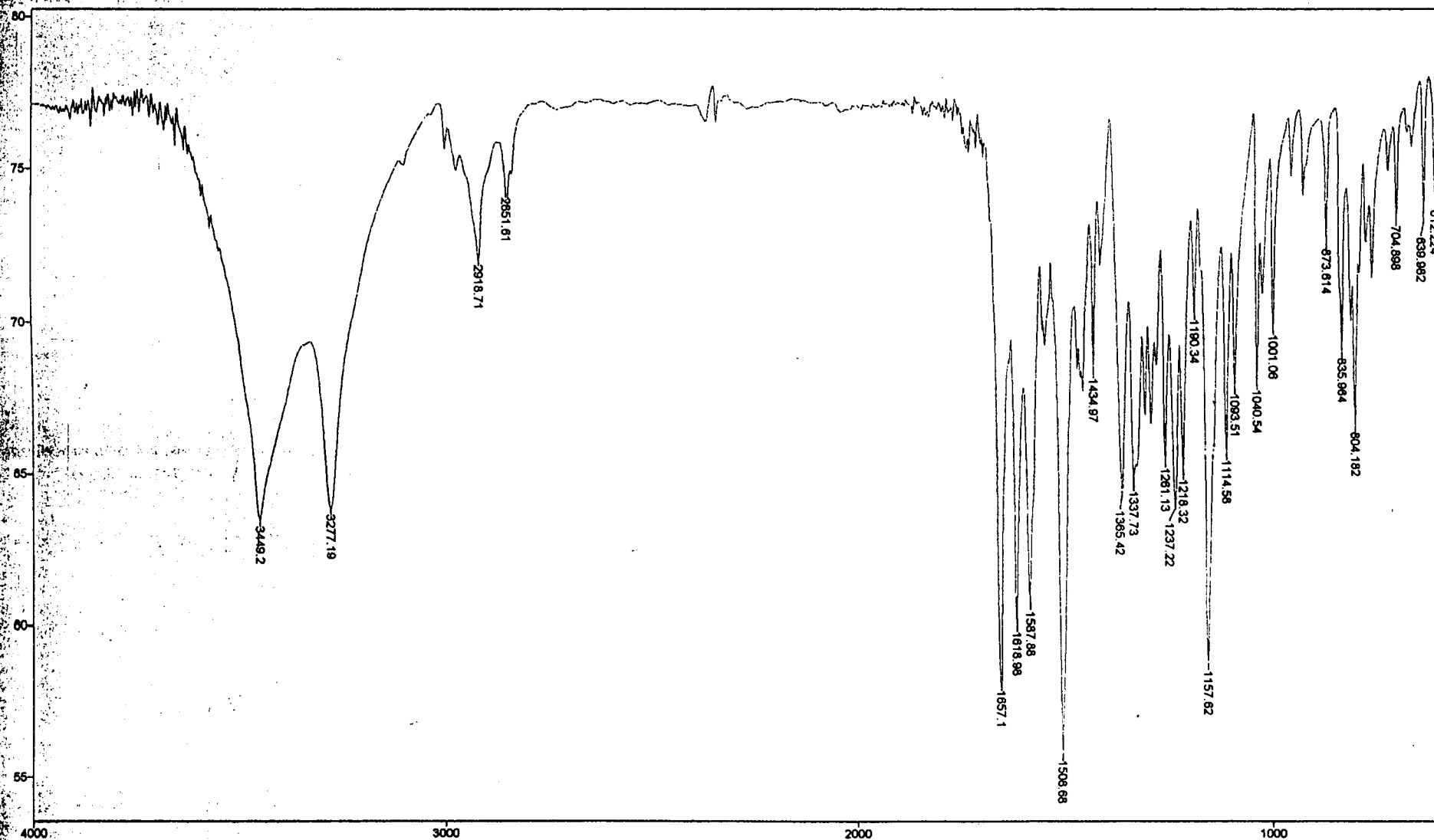
Mode = 1 (Near-IR)

Sample Description: Mistura com Compostos 2 e 3

Scans = 32

Res = 4 cm-1 20 scans/min

Apod = Cosine



Transmittance / Wavenumber (cm-1)

File # 1: BASELINE

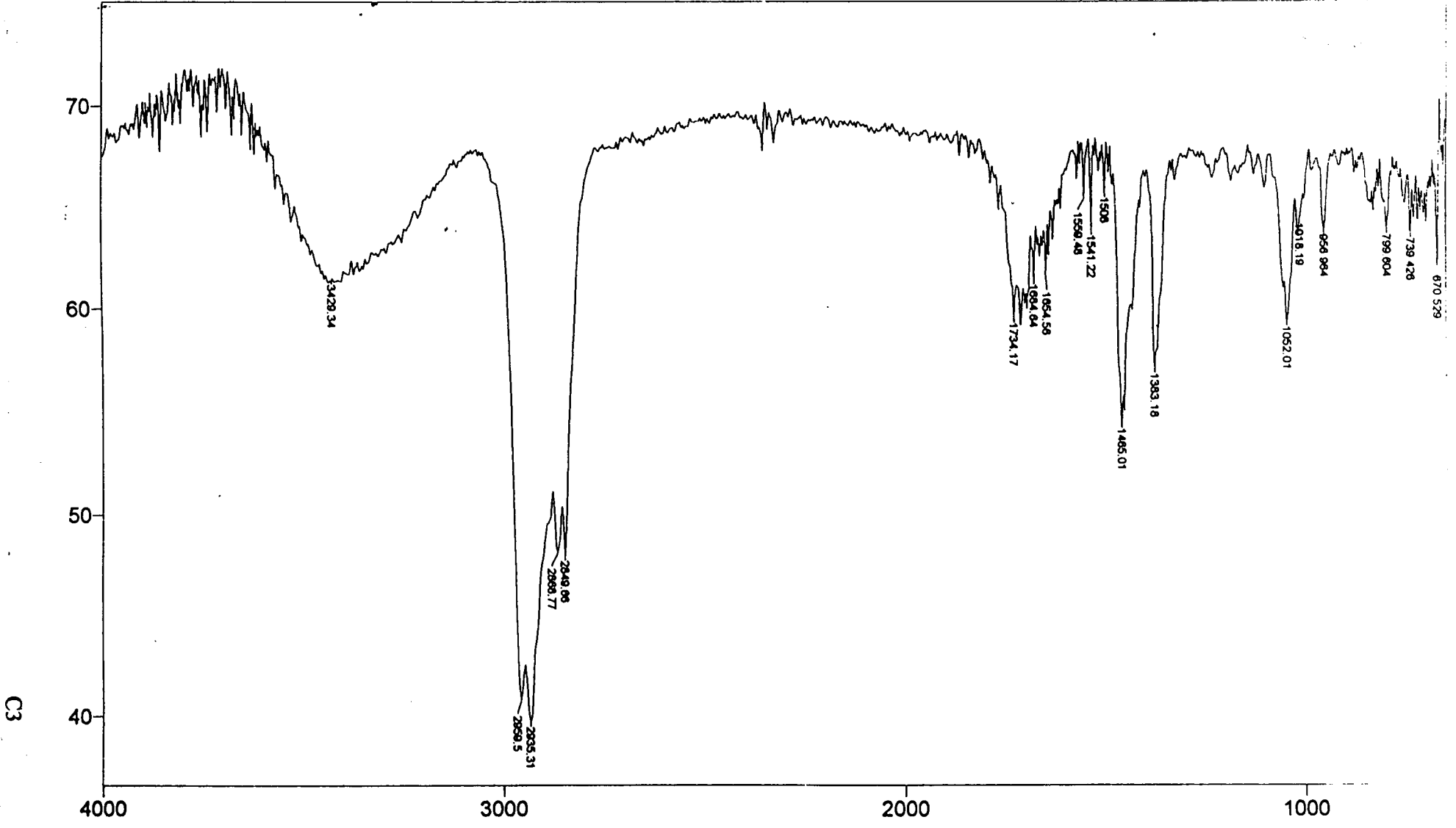
Mode = 1 (Near-IR)

Sample Description: **Composto 4**

Scans = 32

Res = 4 cm-1 21 scans/min

Apod = Cosine



## ANEXO 4 – REGISTOS UV

### Composto 1

$\lambda_{\text{máx}}^{\text{MeOH}}$ , nm, (log $\epsilon$ )		$\lambda_{\text{máx}}^{\text{MeOH+NaOH}}$ , nm, (log $\epsilon$ )		$\lambda_{\text{máx}}^{\text{MeOH+AlCl}_3}$ , nm, (log $\epsilon$ )		$\lambda_{\text{máx}}^{\text{MeOH+AlCl}_3+\text{HCl}}$ , nm, (log $\epsilon$ )	
1	1 [3]	1	1 [3]	1	1 [3]	1	1 [3]
206	205 (4,81)	211,2		206,4	206(4,92)	206,2	206(4,91)
215,4	216sh(4,68)						
229,8	230sh(4,57)	288,8		289,4	225(4,70)	224,0	225(4,68)
288,6	287(4,49)				287sh(4,11)	289,8	287sh(4,22)
324	327sh(3,76)	348		318,2	315(4,57)	313,8	312(4,50)
				382,2	384(3,92)	382,2	384(3,89)

### Composto 2

$\lambda_{\text{máx}}^{\text{MeOH}}$ , nm, (log $\epsilon$ )		$\lambda_{\text{máx}}^{\text{MeOH+NaOH}}$ , nm, (log $\epsilon$ )		$\lambda_{\text{máx}}^{\text{MeOH+AlCl}_3}$ , nm, (log $\epsilon$ )		$\lambda_{\text{máx}}^{\text{MeOH+AlCl}_3+\text{HCl}}$ , nm, (log $\epsilon$ )	
2		2		2		2	
207,0		207,0		207,0		208,0	
255,0		264,0		266,5		265,5	
269,0		399,5		425,5		425,5	



**ANEXO 5 – ARTIGO CHEMPOR**

8<sup>th</sup> INTERNATIONAL CHEMICAL ENGINEERING CONFERENCE

# CHEMPOR' 2001

# 2

Editors

**F. Ramôa Ribeiro**

**J.J.C. Cruz Pinto**

Organized by



UNIVERSIDADE  
de AVEIRO

Centro Cultural e de Congressos de Aveiro

Aveiro, Portugal

12-14 September 2001

# EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF FLAVONOIDS FROM *Blumea balsamifera*

Margarida M.S.M. Bastos<sup>1</sup>, Anake Kijjoa<sup>2</sup>, José Teixeira<sup>3</sup>, Annette Silva<sup>1</sup>, Mónica Pombares<sup>1</sup>

<sup>1</sup>LEPAE, Dep. of Chemical Engineering, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto  
R. Dr. Roberto Frias, 4200-465 Porto, Portugal

<sup>2</sup>Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, 4099-003 Porto, Portugal

<sup>3</sup>Paralab, Praça dos Pescadores, 47, Matosinhos, Portugal

## 1. ABSTRACT

Extraction of aerial parts of *Blumea balsamifera* was carried out in order to obtain compounds for bioassays which could explain its use as medicinal plant. We now describe the isolation and structural elucidation, by spectroscopic methods (UV, IR, RMN), of two flavonoids (2*R*, 3*R*)-7,7'-dimethoxy-3,5,2'-trihydroxyflavanone (1), and ombuine (2).

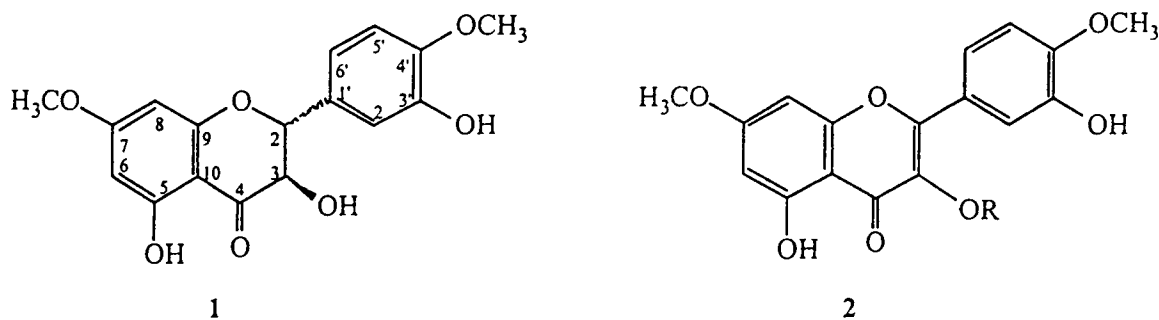
## 2. INTRODUCTION

*Blumea balsamifera* DC (Compositae) has been reported for its use in the Chinese and Thai systems of traditional medicine. Preparations of this plant have been used as carminative, mild stimulant, vermifuge, preventive medicament, abortifacient and as topical application for septic ulcers in the ancient Chinese medicine. In Thailand, the dried leaves are cut into small pieces and smoked as a cigarette to relieve sinusitis pain. An infusion of the leaves is used as stomachic, carminative, diaphoretic, expectorant and emmenagogue. A decoction from the fresh leaves alone or in combination with other plants is used as bath for women after giving birth [1, 2].

The phytochemistry of *Blumea* has been of great interest. Following initial studies on the essential oil, aliphatic hydrocarbons, monoterpenes, sesquiterpenes, triterpenes and steroids, some polyacetylene and thiophene derivatives, several coumarins and flavonoids have been isolated from *Blumea* species [3-18].

The biological activities of flavonoids are well recognized. Venorunon® and Legalon® are examples of flavonoids used in the treatment of some cardiovascular diseases and hepatic lesions. Flavonoids have been reported to possess other activities such as antitumoral, anti-inflammatory, anti-allergic, antioxidant and antiviral [19-22].

The aim of this study was to isolate and elucidate the chemical structure of compounds from extracts of *B. balsamifera* that could explain the therapeutical use of this plant in traditional medicine.



### 3. MATERIALS AND METHODS

#### 3.1 Chemicals

Silica gel for column chromatography was 60 (0.2-0.5mm, Merck) and for thin layer chromatography (TLC) was G-60 F<sub>245</sub> (Merck). All other common reagents were pro analytical grade from commercial sources.

#### 3.2 Extraction and Purification

*B. balsamifera* DC were collected in Thailand in 1998. Dried and powdered aerial parts (2 Kg) were percolated with CHCl<sub>3</sub>. The chloroform extract was concentrated under reduced pressure to give a crude extract (25,4g) which was suspended in ethanol (160 mL). The ethanol solution was treated with 160 ml of 4% aqueous lead acetate solution and was allowed to stand for three days in a dark chamber. The suspension was then filtered and the filtrate was concentrated and extracted with CHCl<sub>3</sub> (4x50mL). The combined chloroform solution were dried (anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), evaporated to yield a brown syrupy mass (8.6g) which was chromatographed over silica gel (200 g). Mixtures of hexane, dichloromethane, acetone and methanol were used as eluents and 250 mL fractions were collected. Isolation of the flavonoids from the column fractions was carried out by TLC. The flavonoids 1 and 2 were then purified by recrystallization in methanol.

#### 3.3 Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy

The <sup>1</sup>H NMR spectra were recorded at 200 MHz on a Bruker AC200 Spectrometer with broad-band probe heads with 5mm diameter NMR tubes. Spectra were acquired in CDCl<sub>3</sub> or DMSO solutions. The proton chemical shifts were referenced to the resonance of chloroform at  $\delta$ 7.26 or dimethylsulfoxide at  $\delta$ 2.49.

The <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded at 50.3 MHz on a Bruker AC200 Spectrometer with broad-band probe heads with 5mm diameter NMR tubes. The carbon chemical shifts were referenced to the resonance of chloroform at  $\delta$ 77.0 or dimethylsulfoxide at  $\delta$ 39.5.

#### 3.4 Infrared Spectroscopy (IR)

The IR spectra were recorded on a Bomem model MB104. Spectra were acquired in KBr disc. Absorption bands are reported in wavenumbers (cm<sup>-1</sup>).

#### 3.5 Ultraviolet Spectroscopy (UV)

The Ultraviolet spectra were recorded on a Shimadzu model 265. Spectra were acquired in methanol solution. Absorption bands are reported in wavelength (nm).

## 4. RESULTS AND DISCUSSION

316 fractions were collected from the column of the crude extract (Table 1) and the fractions which contain the same constituents were combined into 21 groups of fractions (Table 2). The compounds 1 and 2 were obtained from B.b.8 and B.b12 groups.

The IR spectra of the two compounds showed the characteristic absorption bands in the region 1500-1600 cm<sup>-1</sup> due to aromatic rings, along with a carbonyl band at 1620-1670cm<sup>-1</sup>. The presence of hydroxyl groups was evidenced by the absorption at 3300-3450 cm<sup>-1</sup>.

Table 1-Fractions Collected and Eluents used in Column Chromatography

Eluents	Fractions
<i>n</i> -Hexane /Dichloromethane (8/2)	1-9
<i>n</i> -Hexane / Dichloromethane (6/4)	10-31
<i>n</i> -Hexane / Dichloromethane (1/1)	32-49
<i>n</i> -Hexane / Dichloromethane (3/7)	50-120
<i>n</i> -Hexane / Dichloromethane (1/9)	121-167
Dichloromethane	168-188
Dichloromethane /Acetone (8/2)	189-214
Dichloromethane /Acetone (7/3)	215-285
Dichloromethane /Acetone (1/1)	286-300
Acetone	301-306
Methanol	307-316

Table 2- Groups of Fractions (Weight) after comparison by TLC.

Groups	Fractions	Weight (mg)
B.b.1	1-10	17.6
B.b.2	11-15	10.5
B.b.3	16-25	19.6
B.b.4	26-32	15.9
B.b.5	33-41	31.5
B.b.6	42-49	19.0
B.b.7	50-63	36.0
B.b.8	64-71	69.9
B.b.9	72-77	56.1
B.b.10	78-90	262.7
B.b.11	91-101	248.5
B.b.12	102-115	837.3
B.b.13	116-129	200.3
B.b.14	130-138	68.1
B.b.15	139-165	220.9
B.b.16	166-189	174.4
B.b.17	190-191	1377.2
B.b.18	192-196	490.5
B.b.19	197-211	795.4
B.b.20	212-215	118.6
B.b.21	216-236	571.8

The UV spectra of two compounds consisted of two absorption wavelength maxima in the ranges 240-285 nm (band II, primarily due to the ring A absorption) and 300-550 nm (band I, due to the ring B).

The  $^1\text{H}$  NMR spectra of compounds 1 and 2 showed a typical 5,7,3',4',-tetra-oxygenated flavonoids: one pair of coupled doublets ( $J=2$  Hz) assigned to H-6 and H-8, and three signals characteristic of H-2' (doublet,  $d$ ,  $J=2$  Hz, coupled to H-6'), of H-5' (doublet,  $d$ ,  $J=8$  Hz, coupled to H-6') and H-6' (doublet of doublet,  $dd$ ,  $J=8$  and 2 Hz, coupled to H-2' and H-5').

The  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound 1 (Figure 1) strongly suggested that it was a dihydroflavonol derivative. This was clear from the spectrum which exhibited a typical AB system of H-2 and H-3 at  $\delta 4.55$  (H-2) and  $\delta 5.00$  (H-3) with a characteristic coupling constant of 12.5 Hz, indicating a *trans*-diaxial arrangement of H-2 and H-3 in a such system. The four remaining substituents, two hydroxyls and two methoxyls, were distributed over C-3', C-4', C-5 and C-7. The signal at  $\delta 11.20$  s is characteristic of the hydrogen bonded hydroxyl (OH-5). The chemical shifts of H-2' ( $\delta 7.15$ ), H-5' ( $\delta 6.92$ ), and H-6' ( $\delta 7.03$ ) are compatible with OH-3' ( $\delta 5.72$  *brs*) and OCH<sub>3</sub>-4'.

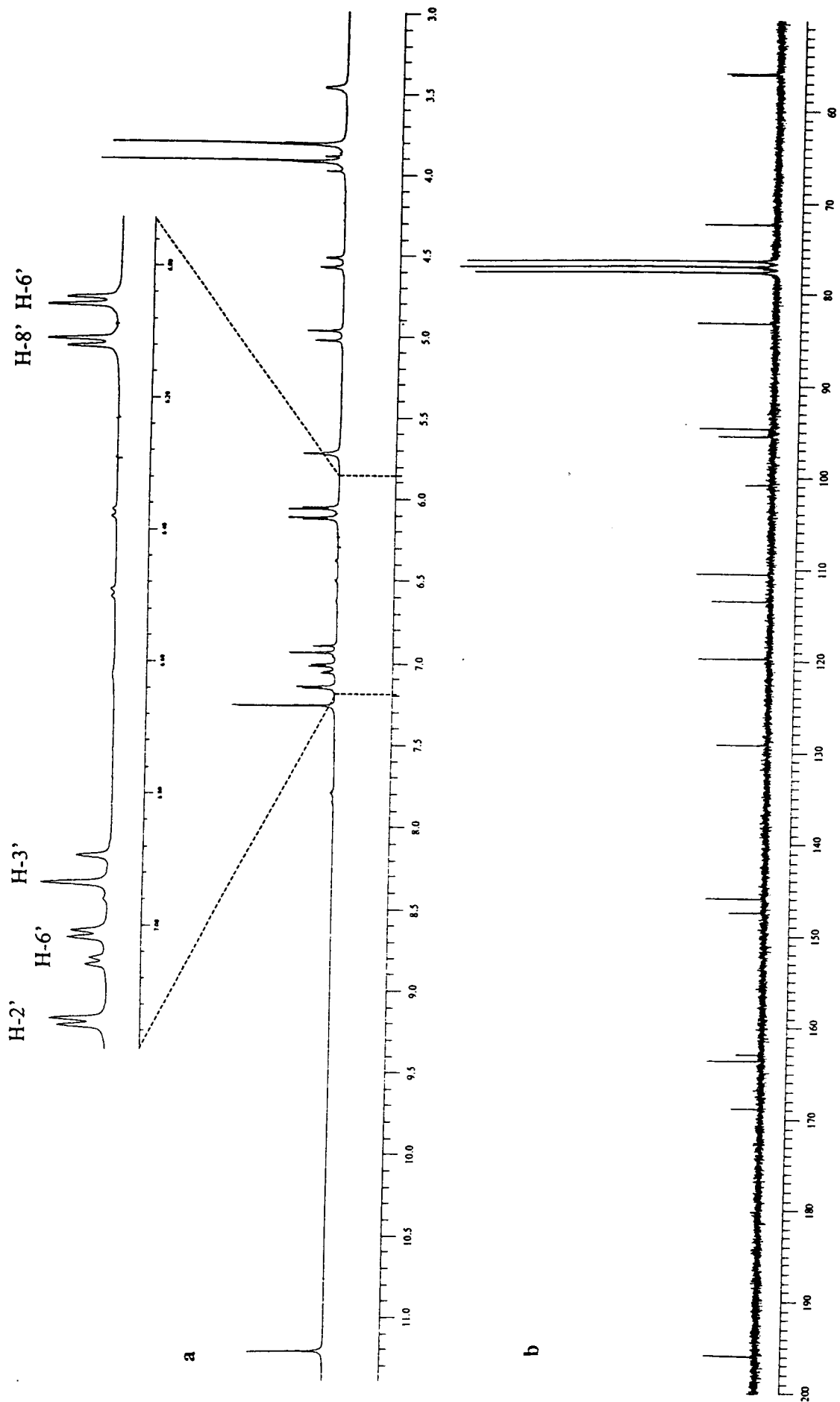


Figure 1 – NMR spectra of compound 1 in  $\text{CDCl}_3$  a)  $^1\text{H}$  NMR spectrum with expansion ; b)  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum

The  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum revealed clearly the signals of one carbonyl carbon ( $\delta 168.82$ ), two methoxy ( $\delta 55.03$ ,  $\delta 55.83$ ), two oxygen bearing carbons ( $\delta 83.22$  and  $\delta 72.34$ ) and twelve aromatic carbons. The  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts for compound 1 and for padmatin are shown in Table 4. The principal shifts were observed on C-2' and C-5' which are compatible with a 3'-hydroxy-4'-methoxyphenyl portion in compound 1 instead of 3',4'-dihydroxyphenyl in padmatin [23]. All the spectroscopic data for compound 1 were in agreement with those reported in the literature for (2*R*, 3*R*)-7,7'-Dimethoxy-3,5,2'-trihydroxyflavanone [1].

The  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound 2 showed the presence of three hydroxyls (12.45 *s*, 9.60 *brs* and 9.35 *s*) and two methoxyl groups ( $\delta 3.86$  and  $\delta 3.85$ ). This spectrum also exhibited three protons in a ABX system also as found in compound 1:  $\delta 7.09$  (*d*,  $J=8$  Hz, H-5'),  $\delta 7.69$  (*dd*,  $J=2$  and  $8$  Hz, H-6') and  $\delta 7.72$  (*d*,  $J=8$  Hz, H-5'). These chemical shifts suggested that the B ring moiety is 3'-hydroxy-4'-methoxyphenyl.

Table 3 –  $^1\text{H}$  NMR chemical shifts of compounds 1-2

H	1		2
	$\delta$ $\text{CDCl}_3$	$\delta$ ref [1]	$\delta$ DMSO
2	5.00 <i>d</i> ( $J=12$ Hz)	5.09	---
3	4.55 <i>d</i> ( $J=12$ Hz)	4.55	---
6	6.05 <i>d</i> ( $J=2$ Hz)	6.10	6.36 <i>d</i> ( $J=2$ Hz)
8	6.12 <i>d</i> ( $J=2$ Hz)	6.10	6.73 <i>d</i> ( $J=2$ Hz)
2'	7.15 <i>d</i> ( $J=2$ Hz)	6.95	7.72 <i>d</i> ( $J=2$ Hz)
5'	6.92 <i>d</i> ( $J=8$ Hz)	6.95	7.09 <i>d</i> ( $J=8$ Hz)
6'	7.03 <i>dd</i> ( $J=8$ and $2$ Hz)	6.95	7.69 <i>dd</i> ( $J=8$ and $2$ Hz)
3-OH	3.46 <i>brs</i>		9.35 <i>s</i>
5-OH	11.20 <i>s</i>		12.45 <i>s</i>
3'-OH	5.72 <i>brs</i>		9.60 <i>brs</i>
-OCH <sub>3</sub>	3.82 <i>s</i>	3.79	3.86 <i>s</i>
-OCH <sub>3</sub>	3.92 <i>s</i>	3.79	3.85 <i>s</i>

Table 4 –  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts of compounds 1 - 3

C	1	Padmatin	2	2 [3]
	$\delta$ $\text{CDCl}_3$	$\delta$ ACETONE	$\delta$ DMSO	$\delta$ DMSO
2	83.22	84.3	146.70	146.7
3	72.34	72.9	136.39	136.4
4	195.92	196.3	176.03	176.0
5	163.60	164.4	160.31	160.4
6	95.49	95.4	97.44	97.4
7	168.82	169.0	164.92	164.9
8	94.66	94.4	91.88	91.8
9	162.91	163.2	156.06	156.0
10	100.81	102.2	103.98	104.0
1'	129.16	129.4	123.26	123.4
2'	113.52	115.7	114.68	114.8
3'	145.91	145.5	146.14	146.2
4'	147.41	146.5	149.39	149.4
5'	110.57	115.5	111.70	111.7
6'	119.73	120.3	119.75	119.8
OCH <sub>3</sub>	56.03	*	55.97	*

OCH <sub>3</sub>	55.83	*	55.56	*
------------------	-------	---	-------	---

\* - not presented

The signals of C-2 ( $\delta$ 146.70), C-3 ( $\delta$ 136.39) and C-4 ( $\delta$ 176.03) in the <sup>13</sup>C NMR spectrum, indicated that compound 2 is 3-hydroxyflavone instead a 3-hydroxyflavanonol as 1.

## 5. FUTURE WORK

Chemical structures of unidentified compounds from *B. balsamifera* will be elucidate and it will be evaluate their capacity to inhibit the growth of tumour cell lines as well as their inhibitory effect on nitric oxide production

## 6. REFERENCES

- [1]- Ruangrugsi, N.; Tappayuthpijarn, P.; Tantivatana, P.; Borris, R. P. and Cordell, G. A. "Traditional Medicinal plants of Thailand I. Isolation and structure elucidation of two new flavonoids, (2R,3R)-Dihydroquercetin-4'-Methyl Ether and (2R,3R)-Dihydroquercetin-4',7-Dimethyl Ether from *Blumea balsamifera*", *J. Nat. Products*, **44**(5), 541-545 (1981).
- [2]- Ruangrugsi, N.; Tantivatana, P.; Tappayuthpijarn, P.; Borris, R. P. and Cordel, G. A. "Traditional Medicinal Plants of Thailand VI. Isolation of Cryptomeridiol from *Blumea balsamifera*", *J. Sci. Soc. Thailand*, **11**, 47-50 (1985).
- [3]- Chisowa, E. H.; Hall, D. R.; Farman, D. I. "Chemical composition of the essential oil of *Blumea gariepina* DC" *J. Essent. Oil Res.* **10** (3), 337-338 (1998)
- [4]- Ahmad, V. U.; Alam, N. "Acetylenic thiophene derivatives from *Blumea oblique*" *Phytochemistry* **42** (3), 733-735 (1996).
- [5]- Ahmad, V. U.; Alam, N. "New antifungal bithienylacetylenes from *Blumea oblique*" *J. Nat. Prod.* **58** (9), 1426-1429 (1995).
- [6]- Agarwal, R.; Singh, R.; Siddiqui, I. R.; Singh, J. "Triterpenoid and prenylated phenol glycosides from *Blumea lacera*" *Phytochemistry* **38**(4), 935-938 (1995).
- [7]- Khanna, R. K.; Sharma, M. L.; Chowdhury, A.R. "Chemical examination of essential oil from *Blumea membranacea* (DC.) Hook.f." *Indian J. For.* **17**(3), 271-272(1994).
- [8]- Mwangi, J. W.; Achola, K. J.; Lwande, W.; Hassanali, A.; Laurent, R. "Constituents of the essential oil of *Blumea brevipes* (Oliv. & Hiern) Willd." *Flavour Fragrance J.* **9**(5), 233-235 (1994).
- [9]- Dung, N. X.; Loi, D. T.; Hung, D. T.; Leclercq, P. A. "Chemical composition of the oil of *Blumea lanceolaria* (Roxb.) Druce from Vietnam" *J. Essent. Oil Res.* **3**(4), 285-286 (1991).
- [10] - Ruecker, G.; Paulini, G.; Sakulas, H.; Lawong, B.; Goeltenboth, F. "Medicinal plants from Papua New Guinea: graniline-esters and germacranolides from *Blumea arfakiana*" *Planta Med.* **57**(3), 278-281 (1991).
- [11]- Dutta, S. C.; Saha, B. N.; Pathak, M. G.; Mathur, R. K. "Essential oil of *Blumea lanceolaria* (Roxb) Dunc" *Indian Perfum.* **33**(1), 38-39 (1989).
- [12]- Laakso, I.; Seppanen-Laakso, T.; Hiltunen, R.; Ekundayo, O. "Composition of the essential oil of *Blumea lacera* DC. (Asteraceae) leaves from Nigeria" *Flavour Fragrance J.* **4**(2), 73-75 (1989).



- [13]- Mehta, S. C.; Mehta, P.; Vardhan, H. "Essential oil composition of *Blumea membranacea*" *Indian Perfum.* 31(3), 231-234 (1987).
- [14]- Kulkarni, M. M.; Rojatkar, S. R.; Nagasampagi, B.A. "Four 6-hydroxyflavonols from *Blumea malcomii*" *Phytochemistry* 26(7), 2079-2083 (1987).
- [15]- Pathak, V. P.; Jakupovic, J.; Jain, S., Bhakuni, D. S. "Amplectol: a novel acetylenic thiophene derivative from *Blumea amplectens* var. *arenaria*" *Planta Med.* 53(1), 103-104 (1987).
- [16]- Mehta, S. C.; Vardhan, H.; Saxena, S. P. "Some pharmacological actions of the essential oil of *Blumea membranacea*" *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 30(2), 149-154 (1986).
- [17]- Pandey, U. C.; Sharma, R.P.; Kulanthaivel, P.; Herz, W. "Isoalantolactone derivatives and germacranolides from *Blumea densiflora*" *Phytochemistry* 24(7), 1509-1514 (1985).
- [18]- Bohlmann, F.; Wallmeyer, M.; Jakupovic, J.; Gerke, T.s; King, R. M.; Robinson, H. "Cuathemone sesquiterpenoids from *Blumea alata*" *Phytochemistry* 24(3), 505-509 (1985).
- [19]- Woerdenbag, H.J.; Merfort, I.; Paßreiter, C.M.; Schmidt, T.J.; Willuhn, G.; Uden, W.; Pras, N., Kampinga, H.H. and Konings, A.W.T "Cytotoxicity of Flavonoids and Sesquiterpene Lactones from Arnica Species Against the GLC<sub>4</sub> and the COLO 320 Cell Lines" *Planta Med.* 60, 434-437 (1994).
- [20]- Selway, J.W.T. "Antiviral Activity of Flavones and Flavans" in "Plants Flavonoids in Biology and Medicine - Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships" Ed. Cody, V., Middleton, Jr., E. and Harborne, J.B., Alan R. Liss, Inc., New York, 521-536 (1986).
- [21]- Wagner, H "Antihepatotoxic Flavonoids" in "Plants Flavonoids in Biology and Medicine - Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships" Ed. Cody, V., Middleton, Jr., E. and Harborne, J.B., Alan R. Liss, Inc., New York, 545-558 (1986)
- [22]- Gábor, M. "Anti-inflammatory and Anti-allergic Properties of Flavonoids" in "Plants Flavonoids in Biology and Medicine - Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships" Ed. Cody, V., Middleton, Jr., E. and Harborne, J.B., Alan R. Liss, Inc., New York, p. 471. (1986)
- [23]- Agrawal, P.K.; Thkur, R.S.; Bansal, M. C. "Flavonoids" in "Carbon-13 NMR Flavonoids" Ed. P. K. Agrawal, Elsevier, New York, 95-235 (1989)

## 7. ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by Fundação para a Ciência e Tecnologia from Ministério da Ciência e Tecnologia (LEPÆ-Unit 511).





FACULDADE DE ENGENHARIA  
UNIVERSIDADE DO PORTO

BIBLIOTECA



000088317