

FLAVONÓIDES DAS FLORES DE *STIFFITIA CHRYSANTHA* MIKAN

Márcia Cristina Campos de Oliveira e Mário Geraldo de Carvalho

Departamento de Química - Instituto de Ciências Exatas - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - 23851-970 - Seropédica - RJ

Dalva T. Ferreira

Departamento de Química - Universidade Estadual de Londrina - CP 6001 - 86051 - Londrina - PR

Raimundo Braz-Filho

Setor de Química de Produtos Naturais - LCQUI-CCT - Universidade Estadual do Norte Fluminense - 28015-620 - Campos - RJ

Recebido em 3/12/97; aceito em 19/6/98

FLAVONOIDS FROM FLOWERS OF *STIFFITIA CHRYSANTHA* MIKAN. The flowers of *Stiffitia chrysantha* Mikam (Asteraceae) contain eriodictiol, quercetin, luteolin and β -D-glycopyranosil-sitosterol. These compounds and its derivatives were identified by their ^1H and ^{13}C NMR, infra-red and mass spectra data. The heteronuclear 2D NMR were used to confirm the assignments of the proton and carbon chemical shifts, it was used to eliminate definitively the ambiguous correlation reported in the literature for C-5 and C-9 of quercetin and C-23 and C-25 of β -D-glycopyranosil-sitosterol.

Keywords: *Stiffitia chrysantha*; Asteraceae; flavonoids.

INTRODUÇÃO

A família Asteraceae compreende 1100 gêneros com aproximadamente 25000 espécies encontradas frequentemente em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, ocorrendo tanto em localidades ao nível do mar como atingir os picos das mais altas montanhas¹.

Stiffitia chrysantha Mikam apresenta-se como arbusto alto muito ramificado, ocorre desde a Bahia até São Paulo e é comum nas matas do Estado do Rio de Janeiro. Trata-se de um arbusto ornamental, devido a presença flores vistosas, sendo muito usada para arranjos florais². O presente trabalho descreve o primeiro estudo fitoquímico do gênero *Stiffitia* onde revelamos o isolamento de flavonóides e de um esteróide glicosilado das flores de *Stiffitia chrysantha*. As estruturas das substâncias isoladas foram estabelecidas com base na análise de dados espectrais, principalmente RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensional.

Nos últimos anos tem-se observado um interesse crescente no estudo da atividade biológica de plantas que contém flavonóides. Neste sentido tem-se desenvolvido trabalhos sobre ação dos flavonóides na biologia das plantas, bioquímica ecológica, quimiotaxonomia, tecnologia de alimentos e farmacologia. Levando em consideração estes fatores, tornam relevantes os conhecimentos sobre as fontes naturais de flavonóides. Para melhor contribuir com os estudos da atividade biológica dos flavonóides é importante sua identificação correta nos extratos de plantas, até mesmo quando eles se apresentam como traços³. A flavona luteolina (1) ocorre frequentemente nos tecidos florais, quercetina (2) dá a cor creme pálida ou branca às flores que são muito características de Asteraceae⁴. Os flavonóides por serem compostos fenólicos agem como potentes antioxidantes e formam quelatos com os metais. Eles agem contra vírus, bactérias, fungos e na alimentação, reprodução e desenvolvimento animal. Podem também interferir na germinação de sementes e reprodução de mudas⁵. Devido a importância e a potencialidade química dos flavonóides, evidencia-se a necessidade da intensificação das investigações de diversos substratos de plantas que contenham estas substâncias. Neste primeiro estudo fitoquímico da espécie *Stiffitia chrysantha* observamos que esta apresenta-se como uma produtora em potencial de flavonóides, destacando-se a quercetina pela atividade inibidora de crescimento e proliferação de células malignas e promoção de tumores. Estudos recentes revelaram que a

quercetina (2) inibe a atividade de várias enzimas, incluindo a CAMP (independente proteína quinase, Ca^{++} -fosfolipídeo dependente proteína quinase) associada com tumores mamários. A atividade anti-tumoral da quercetina (2) tem sido usada como parâmetro de avaliação da atividade de outros flavonóides⁶.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma mistura dos flavonóides 1 e 2 do extrato etanólico revelou absorção em 3250 cm^{-1} atribuída ao estiramento de hidroxila fenólica, absorções em 1450 e 1510 cm^{-1} referentes a presença de estiramento de $\text{C}=\text{C}$ de anel aromático e a banda em 1640 cm^{-1} correspondente a estiramento de carbonila conjugada.

A análise do espectro de RMN de ^1H mostrou a presença de sinais de hidrogênios aromáticos. Os dois dubletos ($J = 2,0\text{ Hz}$) em $\delta: 6,25$ e $\delta: 6,51$ foram atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8, do anel A, respectivamente. O espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear de carbono e hidrogênio ligados entre si ($^1\text{Hx}^{13}\text{C} - \text{COSY} - ^1\text{J}_{\text{CH}}$) mostrou sinal de correlação entre H-6($\delta: 6,25$) com o sinal δ_c 98,46(C-6) e H-8($\delta: 6,51$) com δ_c 93,60(C-8). Os sinais dos carbonos quaternários oxigenados presentes nos espectros de RMN de ^{13}C (PND): 164,30; 161,13; 156,63 ppm são compatíveis com as frequências dos carbonos oxigenados deste anel.

O espectro de RMN 2D ($^1\text{Hx}^1\text{H}-\text{COSY}$) mostrou sinal de interação entre um duplo duplete em 7,71 ppm e os sinais em δ_{H} : 6,98 e 7,82 ppm. O número de hidrogênios hidroxílicos revelados no espectro de RMN de ^1H e os sinais adicionais de carbonos aromáticos quaternários δ_c : 136,08; 145,38 e 147,99 e δ_{CH} : 120,36; 116,27; 115,45 ligados aos prótons que absorvem, respectivamente, em 7,71; 6,98 e 7,82 ppm, são compatíveis com o anel B. O sinal em 136,08 ppm representa um carbono quaternário carbinólico idêntico ao C-3 da quercetina 1 registrado na literatura⁷.

A presença dos sinais de menor intensidade em 6,58(s), 6,98(d, $J = 8,0\text{ Hz}$), 7,47(dd, $J = 2,0$ e $8,0\text{ Hz}$), e 7,51(d, $J = 2,0\text{ Hz}$) presentes no espectro de RMN de próton e os demais sinais de menor intensidade presentes no espectro de RMN de carbono-13 permitiram identificar outra flavona na amostra analisada. O acoplamento do sinal em 103,3 ppm (C-3) com o sinal em 6,58 ppm (H-3) ($^1\text{J}_{\text{CH}}$) é compatível com a presença da luteolina 2 como um componente em menor percentagem na mistura. A Tabela 1 faz comparações dos deslocamentos químicos

dos carbonos de **1** e **2** com os modelos da literatura⁷. Esta comparação facilitou a identificação dos constituintes da mistura.

Tabela 1. Comparação dos dados de RMN ¹³C da mistura de Quercetina e Luteolina com valores descritos na literatura⁷.

C	Quercetina (1)	Luteolina (2)	Quercetina (Literatura)	Luteolina (Literatura)
2	149,97	164,49	147,5	164,50
3	136,08	103,10	136,50	103,30
4	176,13	182,00	176,5	182,20
5	161,13	161,91	161,00	157,5 -161,0 ^a
6	98,46	99,10	99,50	99,20
7	164,30	164,50	166,00	164,70
8	93,60	94,08	94,50	94,20
9	156,63	157,66	156,70	156,2- 161,4 ^a
10	103,40	104,03	104,00	104,20
1'	122,36	119,11	123,00	119,30
2'	115,45	113,66	116,00	113,80
3'	145,38	146,06	145,70	146,20
4'	147,99	147,01	148,10	150,10
5'	116,27	115,82	116,50	116,40
6'	120,36	121,95	121,00	122,10

^a- Faixas de valores atribuídos para os diferentes exemplos na literatura.

A literatura faz atribuições diferentes para as frequências dos carbonos C-5 e C-9 (Tabela 1) e os sinais de interações a duas ligações (²J_{CH}) observados no espectro bidimensional (¹Hx¹³C-COSY) do H-6 e OH-5 com C-5 e do H-8 com C-9 permitiram atribuir inequivocamente os deslocamentos químicos dos átomos de carbono dos componentes na mistura.

Os íons fragmentários correspondentes aos picos registrados no espectro de massas por impacto de elétrons com m/z: 137(100) e 95(27), serviram para a confirmação do padrão de substituição do anel B de **1** e **2**.

A obtenção do derivado acetilado (**1a** e **2a**) da mistura contendo as substâncias **1** e **2** permitiu a confirmação das estruturas propostas. O espectro de RMN¹H do derivado acetilado da mistura revelou três sinais simples correspondentes a grupos acetoxílicos: 2,32; 2,34; 2,42 ppm. A análise dos sinais de hidrogênios aromáticos mostra claramente que houve deslocamentos paramagnéticos de H-6 ($\Delta\delta=0,55$ ppm) e H-8 ($\Delta\delta=0,81$ ppm), devido aos efeitos do grupo acetoxílicos já revelados na literatura⁸.

O espectro 2D de interação homonuclear (¹Hx¹H-COSY) do derivado acetilado mostra a interação entre H-6 (δ_H : 6,88 d, J= 2,0Hz) com H-8 (δ_H : 7,31 d, J= 2,0Hz) e de H-6' (δ_H : 7,75 dd, J= 2,0Hz e J= 8,0Hz) com H-5' (δ_H : 7,4 d, J= 8,0Hz). Isto serviu para confirmar a atribuição do deslocamento químico de H-2' (δ_H : 7,70d) em campo mais baixo do que o H-5'.

As diferenças significativas dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono-13 aromáticos da mistura de **1** + **2** observadas pela comparação com os dados correspondentes aos derivados acetilados (**1a** + **2a**) foram consistentes com as alterações eletrônicas provocadas pela conversão dos grupos hidroxílicos em acetoxílicos. A blindagem dos carbonos *ipso* C-5, C-7, C-3' e C-4' em **1a** e C-3, C-5, C-7, C-3' e C-4' em **2**, é devido ao efeito γ de proteção exercido pelo átomo de oxigênio carbonílico e pelo grupo metila da função acetoxila. Os carbonos em posição *orto* e *para* ao grupo acetoxílico sofrem um efeito desprotetor devido a diminuição da capacidade de blindagem resultante do efeito mesomérico de átomos de oxigênio. Isto ocorre devido a presença de grupo carbonila [-OAc- retirador de elétrons (efeito indutivo e mesomérico)] que, atenua a deslocalização dos elétrons não compartilhados do heteroátomo.

O espectro de I.V. da substância **3** apresentou banda de

absorção em 3300 cm⁻¹ que foi atribuída a estiramento de grupos hidroxílicos, absorção em 1650 cm⁻¹, referente ao estiramento do grupo carbonila conjugada e as bandas em 1600 e 1450 cm⁻¹ que indicam a presença de anel aromático.

O espectro de RMN ¹H possui dois sinais na região de prótons aromáticos: δ_H : 7,02 (d, J= 2,0Hz, 1H); δ_H : 6,86 (d, J= 2,0Hz, 2H) e o sinal de 2H em δ_H : 5,94 (d, J= 2,0Hz). Os sinais de absorção de carbono-13 presentes no espectro 1D (PND) em δ_C : 114,74; 115,94; 119,20; 96,74 e 95,83, são compatíveis com sinais de cinco carbonos metínicos aromáticos protegidos. O sinal de próton carbinólico: δ_H : 5,38(dd, J= 12,60 e J= 3,10Hz) e os dois duplo dubletos de dois prótons metilênicos em δ_H : 2,74 (dd, J= 17,10 e J= 3,10Hz) e δ_H : 3,13 (dd, J= 12,60 e J= 3,10Hz) permitem propor a estrutura da flavona eriodictiol **3** já registrada na literatura⁷. Os valores das constantes de acoplamento (J= 3,1Hz e J= 12,6Hz) permitiram sugerir a posição axial para H-2. O valor dos deslocamentos químicos de H-3_{ax} e H-3_{eq} contrariam a generalização de maior proteção para hidrogênios em posição axial em relação ao hidrogênio em posição equatorial. Isto mostra que o hidrogênio em posição equatorial (H-3_{eq}) está dentro do cone de proteção da carbonila (**3c**).

O derivado metilado da substância **3**, permitiu a confirmação da estrutura através da análise do espectro obtido por experiência com irradiação dupla nas frequências dos prótons metoxílicos e posterior diferença de espectro. A irradiação em δ_H : 3,82 (MeO-7) gerou NOE de 11% em δ_H : 6,06 (H-6 e H-8). Esta interação espacial entre os prótons revela claramente a proximidade de H-6 e H-8 com este grupo metoxila. A posição *orto* das hidroxilas do anel B, foi confirmada com a irradiação dos prótons metoxílicos do derivado (MeO-4': 3,86 e MeO-3': 3,91 ppm) que exerceu NOE em H-5' (6,89 ppm; 5%) e em H-2' (6,98 ppm; 7%), respectivamente.

O espectro I.V. da substância natural **4** apresentou absorções em: 3370 cm⁻¹ devido a estiramento de OH e as absorções em 2950, 2850, 1420, 1380 cm⁻¹ que são dos grupos -CH, -CH₂ e -CH₃ da substância analisada.

A amostra foi insolúvel nos solventes orgânicos usuais para registro de espectro de RMN ¹H e ¹³C e, conseqüentemente, foi necessário preparar o derivado acetilado (**4a**). Os espectros de RMN ¹³C e DEPT $\theta = 90^\circ$ e 135° forneceram o número de átomos de carbono correspondentes a C, -CH, -CH₂ e -CH₃ e permitiu identificar o derivado **4a** como um esteróide glicosilado.

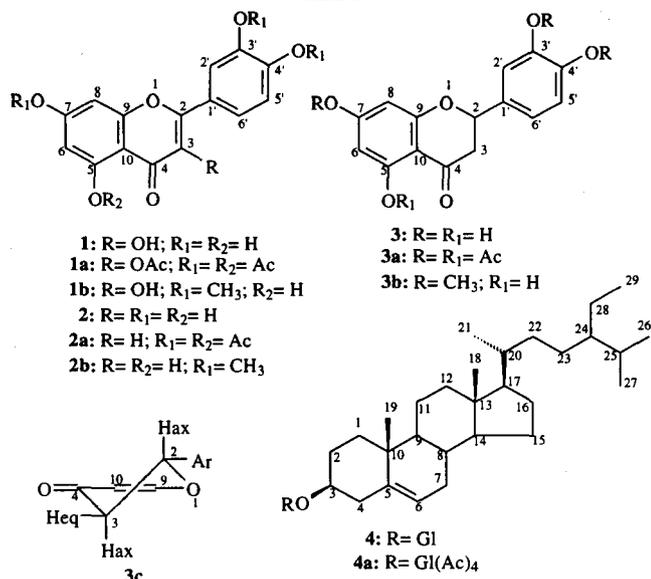
Os resultados obtidos através dos espectros de RMN ¹³C do derivado acetilado foram utilizados, também, para analisar corretamente os deslocamentos químicos dos átomos de carbono-23 (-CH₂: 25,94 ppm) e 25 (CH: 29,06ppm). Isto confirma as observações de Alves e col.⁹ e Itoh e col.¹⁰ que chamaram a atenção para as atribuições incorretas existentes na literatura¹¹.

Os íons fragmentários correspondentes aos picos m/z: 256(21), 169(17), 109(20), 97(42) e 69(65), entre outros, estão de acordo com a estrutura proposta para esta substância. O pico m/z:109(20) confirma a presença da dupla ligação entre os carbonos 5 e 6. Todas estas informações permitiram definir a estrutura para as atribuições da substância natural **4** como 3 β -O- β -D-glicopiranosilsterol.

PARTE EXPERIMENTAL

Procedimentos Experimentais Gerais. A análise das frações foi feita por cromatografia usando Sílica-gel da Merck para coluna e GF 254 para camada fina analítica e preparativa. As substâncias foram reveladas utilizando vapores de iodo e/ou irradiação ultravioleta nos comprimentos de onda 254nm e 366nm. Os solventes utilizados foram da Merck ou Vetec. A eliminação dos solventes do extrato e das frações de colunas cromatográficas foi feita em evaporador rotatório BUCHI à pressão reduzida.

Substâncias isoladas



Os pontos de fusão foram determinados em aparelhos MEL-TEMP II e não foram corrigidos.

Os espectros de I.V. foram registrados em pastilhas de KBr num espectrômetro Perkin-Elmer 1420, existente no departamento de Química da UFRuRJ.

Os espectros uni-(1D) e bidimensionais (2D) foram registrados em um espectrômetro AC-200 do Bruker, operando a 200 MHz para hidrogênio e 50,3 MHz para carbono-13 com pulsos de frequência e transformada de Fourier. As amostras para análise foram dissolvidas em acetona-d₆ ou em CDCl₃, tendo TMS como referência interna e colocada em tubo de 5 mm de diâmetro.

Os espectros de massas foram registrados em AutoSpecQ EI + Magnet Bpm: 55, existente no Núcleo de Produtos Naturais (NPPN) da UFRJ.

Material vegetal. As flores de *Stiffitia chrysantha* de um espécime coletado no campus da UEL (Universidade Estadual de Londrina) foram submetidas a secagem em estufa a 60°C. O material seco (267 g) foi exaustivamente extraído com etanol 95% resultando em 130,99 g de extrato bruto.

Isolamento da mistura de 1 e 2. O extrato bruto foi fracionado por meio de cromatografia em coluna, utilizando-se Sílica-Gel 60 e eluentes em polaridades crescentes (diclorometano e acetato de etila), com estes solventes foram eluídas 554 frações de 500 ml cada. A análise das frações por cromatografia em camada delgada revelou que as frações de 3 a 449 eram análogas. Após destilação do solvente destas frações, obteve-se um sólido amarelo (p.f. 278-280°C).

Isolamento da flavanona 3. As frações 1 e 2 apresentaram-se como um sólido vermelho após evaporação do solvente (p.f. 278-280°C). Nesta amostra foi identificado o Eriodictiol.

Isolamento do esteróide 4. As frações de 500-554 foram reunidas com base em análise por cromatografia em camada delgada e forneceu um precipitado branco após a evaporação do solvente (p.f. 295-300°C).

Acetato da mistura de 1 + 2 e das amostras 3 e 4. A mistura dos componentes 1 + 2 (116,7mg) e das amostras 3 (20,7 mg) e 4 (100mg), foram acetiladas com anidrido acético (2,0 ml) na presença de piridina (1,0 ml) a temperatura ambiente. Após 24 horas, as amostras foram submetidas ao tratamento usual de extração: H₂O, HCl (5%), e secagem com Na₂SO₄ fornecendo assim os derivados acetilados 1a+2a, 3a e 4a. Estes derivados foram identificados através da análise dos espectros de RMN de ¹H.

Derivado metilado da mistura de 1 e 2 e da amostra 3. A metilação destas amostras foi realizada utilizando-se diazometano. Este reagente foi preparado usando Diazald em éter e KOH alcoólico em banho-maria (40°C) seguido de destilação para fornecer a solução etérea do diazometano. Após adição do reagente o produto foi submetido a uma partição com hexano e clorofórmio. As fases clorofórmicas que continham os derivados foram concentradas em evaporador rotatório e os produtos secos em pistola de secagem Abder-Haldem forneceram 1b+2b (8,0mg) e 3b (3,0 mg). Estes produtos foram identificados através da análise dos espectros de RMN de ¹H.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro e pelas bolsas concedidas.

REFERÊNCIAS

- Barroso, G. M.; *Sistemática de Angiospermas do Brasil*. UFV-MG, 1986; 3, 237-239 e 249.
- Corrêa, M. P.; *Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*. Ministério da Agricultura; Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984, 5, 588.
- Buckingham, J.; *Dictionary of Natural Products*; Chapman & Hall; London, 1993.
- Harbone, J. B.; *Introducción a la Bioquímica Ecológica*; 1ª ed.; Alhambra; Inc. Spain, 1985; 47.
- Vivian, C.; Elliot, M.; Jeffrey, H.; *Plant Flavonoids in Biology and Medicine*; Alan R. Liss; Inc. New York, 1987, 23, 8.
- Ashendel, C. L.; Staller, J. M.; Boutwell, R. K.; *Cancer Res.* 1983; 43, 4333.
- Agrawal, P. K.; *Carbon-13 NMR of Flavonóides* 1989; 103, 135 e 155.
- Carvalho, M. G. de, Braz-Filho, R.; *Quím. Nova* 1993, 16, 89.
- Dutra, N. N.; Alves, H. M.; Carvalho, M. G. de; Braz-Filho, R.; *Quím. Nova* 1981, 15, 10.
- Itoh, T.; Yoshida, K.; Tamura, T.; Matsumoto, T.; *Phytochemistry* 1982, 21, 727.
- Chaubasia, N.; Wichtt, M.; *J. Nat. Prod.* 1987, 50, 881.