

Flavonóides de *Piper carniconnectivum* C.DC.. Piperaceae

Harley da S. Alves,¹ George E. de Oliveira,¹ Maria das G. Zoghbi,² Maria Célia de O. Chaves^{*1}

¹Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, Caixa Postal 5009, 58051-970

João Pessoa-PB, Brazil

²Museu Emílio Goeldi, 66077-830 Belém-PA, Brazil.

RESUMO: Os flavonóides 5,3',4'-triidroxi-7-metoxiflavona, 5,3'-diidroxi-7-4'-dimetoxiflavona, 5,4'-diidroxi-7-metoxiflavona e uma mistura de esteróides (β -sitosterol e estigmasterol) foram isoladas das partes aéreas de *Piper carniconnectivum* C.DC, Piperaceae. As estruturas desses compostos foram estabelecidas por análises espectroscópicas de UV, IV e RMN de ^1H e ^{13}C , incluindo técnicas uni e bidimensionais.

Unitermos: *Piper carniconnectivum*, 5,3',4'-triidroxi-7-metoxiflavona, 5,3'-diidroxi-7-4'-dimetoxiflavona, 5,4'-diidroxi-7-metoxiflavona, β -sitosterol, estigmasterol

ABSTRACT: "Flavonoids from *Piper carniconnectivum* C. DC. (Piperaceae)". The flavonoids 5,3',4'-triidroxi-7-methoxyflavone, 5,3'-diidroxy-7-4'-dimethoxyflavone, 5,4'-diidroxy-7-methoxyflavone and steroids mixture (β -sitosterol and stigmasterol) were isolated from the dried aerial parts of *Piper carniconnectivum* C.DC. Their structures were established by spectroscopic analyses (UV, IV and ^1H , ^{13}C NMR, including 1D and 2D NMR).

Keywords: *Piper carniconnectivum*, 5,3',4'-triidroxi-7-methoxyflavone, 5,3'-diidroxy-7-4'-dimethoxyflavone, 5,4'-diidroxy-7-methoxyflavone, β -sitosterol, stigmasterol.

INTRODUÇÃO

Nas análises fitoquímicas de espécies de Piperáceas do Norte e Nordeste Brasileiro foram isoladas amidas (Araújo-Júnior et al, 1997; Santos et al, 1999a; Cunha et al, 2001; Chaves et al, 2003a; Chaves et al, 2003b), aristolactamas (Araújo-Júnior et al, 1999; Cardoso-Júnior et al, 2003 Chaves et al, 2006), fenilpropanóides (Santos et al, 1997; Santos et al, 1998a; Santos et al, 1999b, Chaves et al, 2002), fenilalcanóides (Santos et al, 1998b), terpenos e um derivado do ácido benzólico (Chaves et al, 2002).

Piper carniconnectivum C. DC., Piperaceae, conhecida popularmente como pimenta-longa, é uma espécie nativa da região Amazônica, Norte do Brasil (Yuncker, 1972). Um flavonóide (galangina), um fenilpropanóide (2-metoxi-4,5-metilenodioxipropofenona), uma cumarina conhecida por xantiletina, três ciclopentenodionas e quatro flavonóides: 5-hidroxi-7-metoxi-6-metilflavanona, 5-hidroxi-7-metoxi-8-metilflavanona, 5-hidroxi-7-metoxi-6,8-dimetilflavanona e 2'-hidroxi-4',6'-dimetoxi-3',5'-dimetilchalcona foram isolados nessa planta (Facundo et al, 2003; Facundo & Braz-Filho, 2004).

Investigações fitoquímicas de espécies de Piperaceae têm mostrado variações distintas de flavonóides, especialmente aqueles com anel B não-substituído. Alguns flavonóides tri ou tetraoxigenados têm sido isolados (Parmar et al, 1997). Esse é o primeiro relato da ocorrência

de 5,3',4'-triidroxi-7-metoxiflavona (**1**) e 5,4'-diidroxi-7-metoxiflavona (**3**) em *Piper*. Esses compostos já foram isolados em várias outras famílias de plantas, tais como: (**1**) isolado em Asteraceae (Bohm, 1999), Lamiaceae (Ahmad et al, 2000), Solanaceae (Wollenweber et al, 1995). (**3**) Ginkgoaceae (Hou, et al, 2008), Eucryphiaceae (Wollenweber et al, 2000), Solanaceae (Wollenweber et al, 1995). 5,3'-diidroxi-7-4'-dimetoxiflavona (**2**) já foi isolada em *Piper auritum* (Ampofo, 1987) e *Piper sylvaticum* (Avijit & Sudhir, 1982), além de outras famílias, tais como: Isoetaceae (Seijas et al, 2004), Thymelaeaceae (Wang et al, 2008), Eucryphiaceae (Wollenweber et al, 2000).

MATERIAL E MÉTODOS

Métodos gerais

Nas colunas cromatográficas foi utilizada como fase fixa Sephadex LH-20 e gel de sílica (0,063-0,200 mm, Merck) e nas placas cromatográficas em camada delgada analítica gel de sílica 60 PF 254 (Merck). Os compostos foram detectados usando luz UV (λ_{max} 259 e 360 nm). Os espectros de IV foram obtidos em pastilha de KBr e os de UV em MeOH e MeOH/ AlCl_3 . Os espectros de RMN foram registrados a 200 MHz (^1H) e 50 MHz (^{13}C) utilizando técnicas uni e bidimensionais. Os deslocamentos químicos foram relatados em ppm relativos a acetona-d₆ a 27 °C.

Material botânico

As partes aéreas da planta foram coletadas no Museu Emílio Goeldi, Belém-PA, onde uma exsicata da espécie está depositada sob o código MSP-009.

Extração e isolamento

O pó das partes aéreas de *Piper carniconnectivum* (1300 g) foi exaustivamente extraído com EtOH 95% (4x 2 L). O extrato foi concentrado sob pressão reduzida e particionado com hexano, CHCl₃ and AcOEt. A fase hexânica, após concentração em rotaevaporador, foi submetida a cromatografia em coluna de gel de sílica utilizando-se como eluente hexano, CHCl₃, ACOEt e MeOH puros ou em misturas binárias, fornecendo 101 frações. As frações 55-59 foram novamente submetidas a cromatografia em coluna com gel de sílica (0,063-0,200 mm, Merck) produzindo dezoito frações, dentre as quais as frações 6-7, que após purificação e análise dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C, mostrou tratar-se da mistura dos esteróides β-sitosterol (A) e estigmasterol (B). A fase clorofórmica concentrada foi submetida a cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 e MeOH. A fração 8 foi purificada em coluna de Sephadex e eluída também com metanol produzindo nove frações. As frações 3-6 e 9, submetidas a recristalização com uma mistura de CHCl₃ e MeOH (1:1), forneceu os compostos **1** e **2**, respectivamente. As frações 15-17 da coluna inicial foram novamente submetidas a cromatografia em coluna de Sephadex e eluídas com MeOH resultando em dez frações. A fração 9, após eluição com MeOH em coluna de Sephadex LH-20, forneceu o composto **3**.

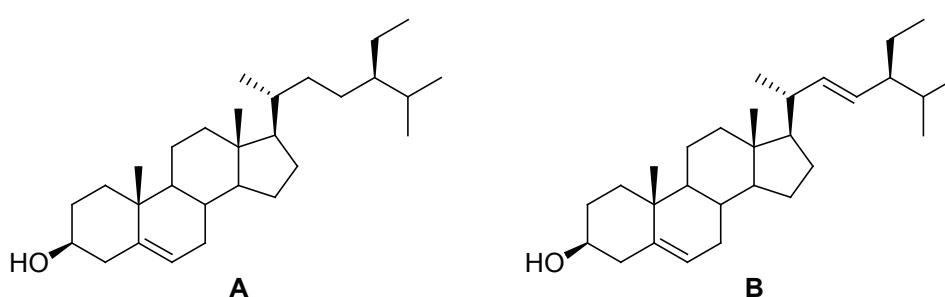
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados espectrais de RMN de ¹H e ¹³C aliados a comparação com dados da literatura (Kojima et al, 1990; Tomaz et al, 2008) permitiram identificar a mistura dos esteróides β-sitosterol e estigmasterol (A e B).

O espectro de RMN de ¹³C, experimento APT, das substâncias **1** e **2** mostrou sinais para quinze carbonos, dentre os quais seis para carbonos metínicos (δ 120,08,

116,62, 114,15, 104,18, 98,62, 93,15 para **1**; e δ 121,35, 116,34, 110,45, 104,41, 98,62, 93,20 para **2**), nove para carbonos quaternários (δ 183,12, 166,50, 165,37, 162,97, 158,60, 150,00, 146,57, 123,49, 106,00 para **1**; e δ 183,17, 166,49, 165,18, 162,98, 158,62, 151,51, 148,84, 123,35, 105,91 para **2**), além de dois sinais para carbonos metílicos em δ 56,51 e δ 56,34 para **2** e um sinal em δ 56,35 para **1**. O espectro de RMN de ¹H mostrou um singuleto característico de OH-5 em ponte de hidrogênio com carbonila da posição 4 de flavonas (δ 12,98 para **1** e **2**), sugestão reforçada pela presença de carbono metínico em δ 104,18 e δ 104,41 para os carbonos da posição 3 de **1** e **2**, respectivamente (Agrawal, 1989), além de dois doubletos característicos da presença de um par de hidrogênios acoplados em *meta*, para cada composto [δ 6,67 (J = 2,3 Hz, 1H) e 6,30 (J = 2,3 Hz, 1H) para **1**; δ 6,70 (J = 2,2 Hz, 1H) e 6,31 (J = 2,2 Hz, 1H) para **2**]. Tais doubletos, juntamente com os seus carbonos correspondentes (δ 93,15 e 98,62 para **1**; δ 93,20 e 98,62 para **2**), deduzidos com a ajuda do experimento HMQC, foram atribuídos às posições 6 e 8 do anel A dos dois compostos, visto que os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos são característicos de carbonos vizinhos a dois outros com substituintes oxigenados (Asim, 2002). Essas atribuições foram corroboradas pela presença de correlação, no espectro HMBC, entre o singuleto atribuído a OH-5 e os valores de deslocamento químico atribuídos a C-6, C-10 e C-5 (δ 12,98/98,62, 106,00, 162,97 para **1**, δ 12,98/98,62, 105,91, 162,98 para **2**). O experimento HMBC ainda mostrou correlação entre H-6 e os carbonos das posições 7, 10 e 5 (δ 6,30/166,50, 106,00, 162,97 para **1**; δ 6,31/166,49, 105,91, 162,98 para **2**) e entre H-8 e os carbonos das posições 7, 9, 10 e 6 (δ 6,67/166,50, 158,60, 106,00 e 98,62 para **1**; δ 6,70/166,49, 158,62, 105,91 e 98,62 para **2**), o que confirmou os deslocamentos químicos para os carbonos 6, 10, 7 e 5 e permitiu atribuir C-9. O mesmo espectro também mostrou as correlações entre H-3 e C-2 (δ 6,61/165,37; δ 6,74/165,18), respectivamente para **1** e **2**. Esses dados são sugestivos de que os dois compostos têm anéis A e C iguais.

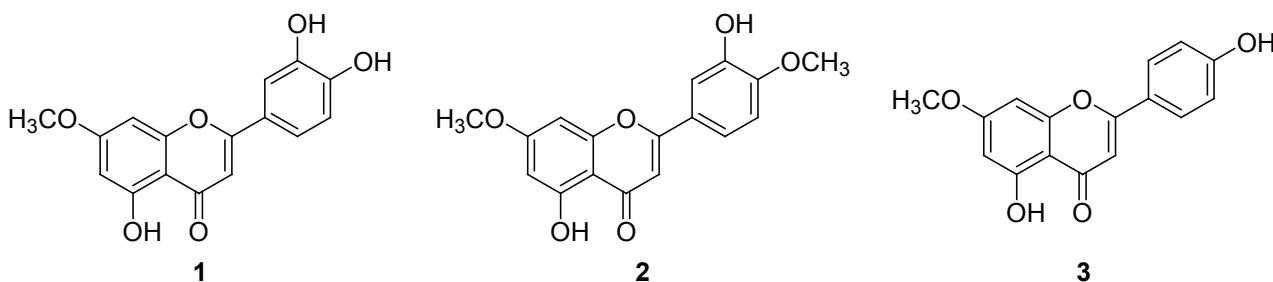
O espectro de RMN de ¹H de **1** e **2** ainda revela sinais em δ 7,50 (d, J = 2,2 Hz, 1H), δ 7,48 (dd, J = 2,2 e 8,0 Hz, 1H), 6,99 (d, J = 8,0 Hz, 1H), para **1** e δ 7,64 (sl, 1H), δ 7,62 (dd, J = 2,0 e 8,8 Hz, 1H) e δ 7,0 (d, J = 8,8 Hz, 1H)



para **2**, o que sugere anel aromático 1,3,4-trisubstituído, cujos sinais foram atribuídos para as posições 2', 6' e 5', respectivamente. Tal fato, juntamente com a presença de mais um sinal característico para metoxila aromática em δ 3,98 (s, 3H) para **2** permite sugerir a existência de hidroxila e metoxila como substituintes do anel B de **2** e duas hidroxilas no mesmo anel de **1**. O espectro de HMQC permitiu atribuir os sinais δ 114,15, 116,62, 120,08 e δ 110,45, 116,34, 121,35, com seus respectivos hidrogênios (δ 7,50/114,15, δ 6,99/116,62, δ 7,48/120,08 e δ 7,64/110,45, 7,00/116,34, 7,62/121,35), para as posições 2', 5' e 6' de **1** e **2**, respectivamente. Os experimentos HMBC registrados para **1** e **2** mostraram as correlações: δ 7,50 (H-2')/150,00, δ 7,48 (H-6')/165,37 e 146,57 e δ 6,99 (H-5')/146,57, 123,49 para **1**, além das seguintes: δ 7,64 (H-2')/165,18 e 151,51, δ 7,62 (H-6')/165,18, 148,84, δ 7,00 (H-5')/ 148,84 e 123,35 para **2**, o que permitiu atribuir δ 150,00, 165,37, 146,57 e 123,49, além de δ 151,51, 165,18, 148,84 e 123,35 para as posições 3', 2, 4'

e 1', respectivamente de **1** e **2**. O espectro 2D-NOESY de **2** mostrou correlação entre o sinal da metoxila em δ 3,91 (s, 3H) com δ 6,31 (H-6) e δ 6,70 (H-8), o que permitiu deduzir que a absorção em δ 3,98 corresponde a metoxila do anel B, o que foi evidenciado através da correlação, no mesmo espectro, entre δ 3,98/δ7,62.

O espectro de RMN de ¹H de **3** mostrou, para o anel B, sinais típicos de um sistema AA'BB': δ 7,96 (dd, *J* = 8,8 e 2,0 Hz, 2H), δ 7,02 (dd, *J* = 8,8 e 2,0 Hz, 2H), os quais, juntamente com os sinais dos carbonos correspondentes, vistos no experimento HMQC, ou seja: δ 129,29 e 116,85, respectivamente, foram atribuídos, com o auxílio da correlação δ 7,96/165,28 (C-2) para as posições 2', 6' e 3', 5', respectivamente. Os sinais para carbonos não hidrogenados em δ 162,00 e 183,17 foram atribuídos, respectivamente, para 4' e 4. Comparação dos dados de RMN de ¹H e ¹³C de **3** com aqueles obtidos para **1** e **2** mostrou que os anéis A e C são idênticos para as três substâncias, diferindo apenas quanto ao padrão de substituição do anel B.



(**1**) 5, 3',4'-triidroxi-7-metoxiflavona, pó amarelo (30 mg), p.f.: 266-268 °C; ν_{max} (KBr, cm⁻¹): 3417, 2924, 1653, 1597, 1498; UV (λ_{max} , nm) MeOH: 255, 346 sh; UV (λ_{max} , nm) MeOH+AlCl₃: 273 sh. Dados RMN de ¹H (200 MHz, acetona-d₆) e ¹³C (Tabela 1)

(**2**) 5, 3'-diidroxi-7, 4'-dimetoxiflavona, cristais em agulha amarelos (15 mg), p.f.: 234 °C; ν_{max} (KBr, cm⁻¹): 3.433, 2.924, 2.848, 1.653, 1.589, 1.500; UV (λ_{max} , nm) MeOH: 268, 346 sh; UV (λ_{max} , nm) MeOH+AlCl₃: 275, 360 sh. Dados RMN de ¹H (200 MHz, acetona-d₆) e ¹³C (Tabela 1).

(**3**) 5,4'-diidroxi-7-metoxiflavona, pó amarelo (7 mg), p.f.: 286-288 °C; ν_{max} (KBr, cm⁻¹): 3.414, 2.924, 2.850, 1.664, 1.602, 1.500; UV (λ_{max} , nm) MeOH: 267, 339 sh; UV (λ_{max} , nm) MeOH+AlCl₃: 277, 384 sh. Dados RMN de ¹H (200 MHz, acetona-d₆) e ¹³C (Tabela 1).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pelo suporte financeiro, a Dra. Elsie Guimarães pela identificação do material botânico e a Vicente Carlos Oliveira Costa pelos espectros de RMN.

Tabela 1. dados de RMN de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) e correlações obtidas em experimentos HMQC e HMBC registrados em acetona-d₆, J(Hz) e δ (ppm) para **1**, **2** e **3**.

	HMQC						HMBC		
	δC			δC			$^{2,3}\text{J}(\text{CH})$		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1									
2	165.37	165.18	165.28				H-3,H-6'	H-6',H-2', H-3	H-2',H-6', H-3
3	104.18	104.41	104.00	6.61 (s, 1H)	6.74 (s, 1H)	6.67 (s, 1H)			
4	183.12	183.17	183.17				H-3	H-3	
5	162.97	162.98	163.03				OH-5,H-6	OH-5,H-6	H-6
6	98.62	98.62	98.63	6.30 (d, 1H, $J = 2,3\text{Hz}$)	6.31 (d, 1H, $J = 2,2\text{Hz}$)	6.31 (d, 1H, $J = 2,2\text{Hz}$)	OH-5,H-8	H-8, OH-5	H-8
7	166.50	166.49	166.53				H-6, OMe-7	OMe-7, H-6	OMe-7, H-6 e 8
8	93.15	93.20	93.17	6.67 (d, 1H, $J = 2,3\text{Hz}$)	6.70 (d, 1H, $J = 2,2\text{Hz}$)	6.69 (d, 1H, $J = 2,2\text{Hz}$)		H-6	H-6
9	158.60	158.62	158.65				H-8	H-8	H-8
10	106.00	105.91	105.93				H-3,OH-5	H-6, H-8, OH-5, H-3	H-6, H-8
1'	123.49	123.35	123.00				H-2', H-5'	H-5', H-6' H-3	H-2',H-6', H-3
2'	114.15	110.45	129.29	7.50 (d, 1H, $J = 2,2\text{Hz}$)	7.64 (sl, 1H)	7.96 (dd, 2H, $J = 8,8$ e 2,0 Hz)	H-6'	H-6'	
3'	150.00	151.51	116.85			7.02 (dd, 2H, $J = 8,8$ e 2,0 Hz)	H-2'	H-5', H-2'	
4'	146.57	148.84	162.00			9.29 (s, 1H)	H-5', H-6'	H-6',H-5', OMe-4'	H-2',H-6', H-5', H-3'
5'	116.62	116.34	116.85	6.99 (d, 1H, $J = 8,0$)	7.00 (d, 1H, $J = 8,8 \text{ Hz}$)	7.02 (dd, 2H, $J = 8,8$ e 2,0 Hz)			
6'	120.08	121.35	129.29	7.48 (dd, 1H, $J = 8,0$ e 2,2 Hz)	7.62 (dd, 1H, $J = 2,0$ e 8,8 Hz)	7.96 (dd, 2H, $J = 8,8$ e 2,0 Hz)			
OMe-7	56.35	56.34	56.36	3.91 (s, 3H)	3.91 (s, 3H)	3.91 (s, 3H)			
OMe-4'			56.51		3.98 (s, 3H)				
OH-5				12,98 (s, 1H)	12,98(s, 1H)	12,98 (s, 1H)			
OH-4'						9.29 (s, 1H)			

REFERÊNCIAS

- Agrawal PK 1989. *Carbon-13 NMR of Flavonoids: Studies in Organic Chemistry* 39. Lucknow, India: Elsevier.
- Ahmad VU, Ali Z, Zahid M, Alan N, Saba N, Khan T 2000. Phytochemical study of *Salvia moorcroftiana*. *Fitoterapia* 71: 84-85.
- Ampofo SA, Roussis V, Wiemer DF 1987. New prenilated phenolics from *Piper auritum*. *Phytochemistry* 26: 2367-2370.
- Araújo-Jr JX, Chaves MCO, da Cunha EVL, Gray AI 1997. Piperdardine, a piperidine alkaloid from *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry* 44: 559-561.
- Araújo-Jr JX, Chaves MCO, da Cunha EVL, Gray AI 1999. Cepharanone b from *Piper tuberculatum*. *Biochem Syst Ecol* 27: 325-327.
- Avijit B, Sudhir P 1982. Constituents of *Piper sylvaticum*: structure of Sylvatesmin. *J Nat Prod* 45: 672-673.
- Asim M 2002. Isolation and structural studies in the chemical constituents of *Salvia moorcroftiana* and *Euprorbia decipiens*. International Centre for Chemical Sciences. Pakistan.
- Bohm,BA 1999. Major exudate flavonoids of *Dubautia arborea* (Asteraceae). *Biochem Syst Ecol* 27: 755-757.
- Cardozo-Júnior EL, Chaves MCO 2003. Caldensin, a new natural N-methylaristolactam from *Piper caldense*. *Pharm Biol*

- 41: 216-218
- Chaves MCO, Santos BV 2002. Constituents from *Piper marginatum* fruits. *Fitoterapia* 73: 547-548.
- Chaves MCO, Júnior AGF, Santos BVO 2003a. Amides from *Piper tuberculatum* fruits. *Fitoterapia* 74: 181-183.
- Chaves MCO, Santos BVO, Oliveira AH 2003b. 1-Cinnamoyl pirrolidide from *Piper marginatum*. *Biochem Syst Ecol* 31: 1213-1214.
- Chaves MCO, Santos BVO, Oliveira AH 2006. Aristolactams from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). *Biochem Syst Ecol* 34: 75-77.
- Cunha EVL, Chaves MCO 2001. Two amides from *Piper marginatum* fruits. *Fitoterapia* 72: 197-198.
- Facundo VA, Sá AL, Silva SAF, Morais SM, Matos CRR, Braz-Filho R 2003. Three new natural cyclopentenedione derivatives from *Piper carniconnectivum*. *J Braz Chem Soc* 15: 140-145.
- Facundo VA, Braz-Filho R 2004. C-methylated flavonoids from the roots of *Piper carniconnectivum* C.DC. (Piperaceae). *Biochem Syst Ecol* 32: 1215-1217.
- Hou D, Song S, Song M, Zang Yi-X, Li X, Wang JH 2008. Verification of bilobalide's absolute configuration using CD spectrum and chemical constituents of the extract from *Ginkgo biloba*. *Shenyang Yaoke Daxue Xuebao* 25: 290-293, 320 apud *Chemical Abstracts* 149:5231.
- Kojima H, Sato N, Hatano A, Ogura H 1990. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. *Phytochemistry* 29: 2351-2355.
- Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha A, Tyagi OD, Prasad AK, Wengel J, Olsen CE, Boll PM 1997. *Phytochemistry* 46: 597-673
- Santos BVO, Chaves MCO, da Cunha EVL, Gray AI 1997. Croweacin from *Piper marginatum*. *Biochem Syst Ecol* 25: 471-472.
- Santos BVO, Chaves MCO, da Cunha EVL, Gray AI 1998a. Phenylalkanoids from *Piper marginatum*. *Phytochemistry* 49: 1381-1384.
- Santos BVO, Chaves MCO 1998b. Assignments of ¹H and ¹³C resonance signals in 2-methoxy-4,5-methylenedioxypyropiophenone with the assistance of 1D and 2D NMR experiments. *Acta Farm Bonaerense* 19: 45-47.
- Santos BVO, Chaves MCO 1999a. (E,E)-N-isobutyl-2,4-octadienamide from *Piper marginatum*. *Biochem Syst Ecol* 27: 113-114.
- Santos BVO, Chaves MCO 1999b. 2,4,5-trimethoxypropiophenone from *Piper marginatum*. *Biochem Syst Ecol* 27: 539-541.
- Seijas JA, Vazquez-Tato MP, Crecente-Campo J, Ramil-Rego P, Romero MI, Fernandez P 2004. Flavonoids from the roots of *Isoetes longissimum*. *Int Elect Con Synthetic Org Chem* 1-30: 935-937.
- Tomaz ACA, Nogueira RBSS, Pinto DS, Agra MF, Souza MFV, da-Cunha EVL 2008. Chemical constituents from *Richardia grandiflora* (Cham. & Schleld.) Steud. (Rubiaceae). *Rev Bras Farmacogn* 18: 47-52.
- Wang HG, Zhou MH, Lu JJ, Yu BY 2008. Antitumor constituents from the leaves of *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg. *Linchan Huaxue Yu Gongye* 28: 1-5.
- Wollenweber E, Doerr M 1995. Exsudate flavonoids in some Solanaceae. *Biochem Syst Ecol* 23: 457-458.
- Wollenweber E, Dorr M, Rozefelds AC, Minchin P, Forster PI 2000. Variation in flavonoid exudates in *Eucryphia* species from Australia and South America. *Biochem Syst Ecol* 28: 111-118.
- Yuncker TG 1972. The Piperaceae of Brazil. *Hoehnea* 2: 19-366.