

Figura 41: Espectro de RMN ^{13}C da 2',6'-diidróxi-3'-metil-4'-metóxicalcona, acetona- d_6 , 75 MHz

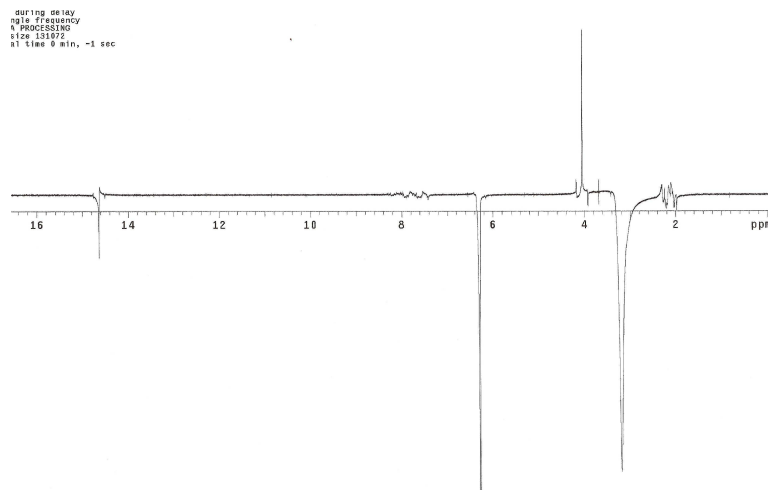


Figura 42: Espectro de NOE diferencial por irradiação do hidrogênio ligado diretamente ao anel aromático B da 2',6'-diidróxi-3'-metil-4'-metóxicalcona, acetona- d_6 , 300 MHz.

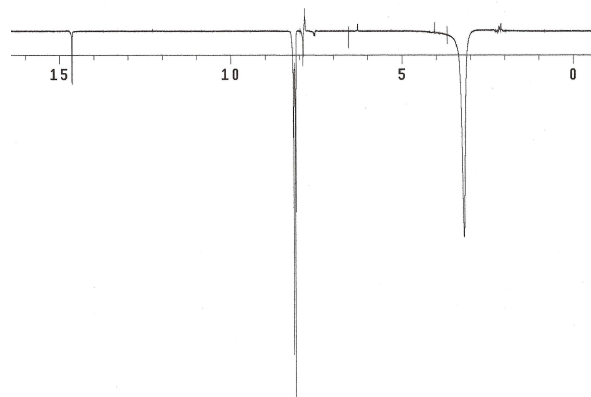


Figura 43: Espectro de NOE diferencial por irradiação do hidrogênio vinílico β carbonílico da 2',6'-diidróxi-3'-metil-4'-metóxicalcona, acetona- d_6 , 300 MHz.

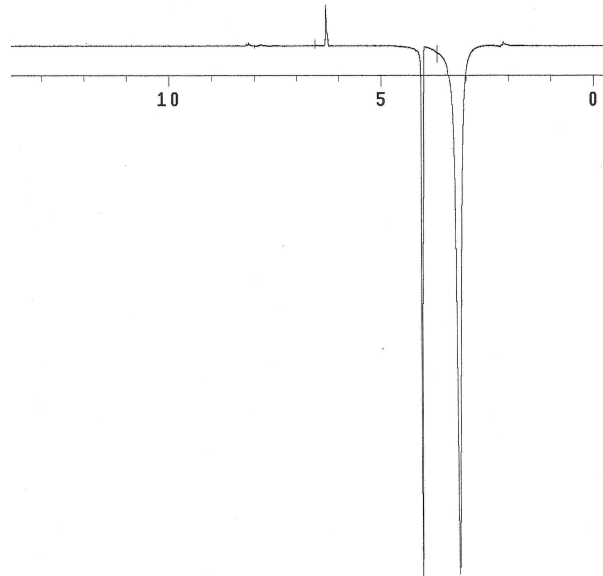


Figura 44: Espectro de NOE diferencial por irradiação dos hidrogênios do grupo metoxílico da 2',6'-diidróxi-3'-metil-4'-metóxicalcona, acetona-d₆, 300 MHz.

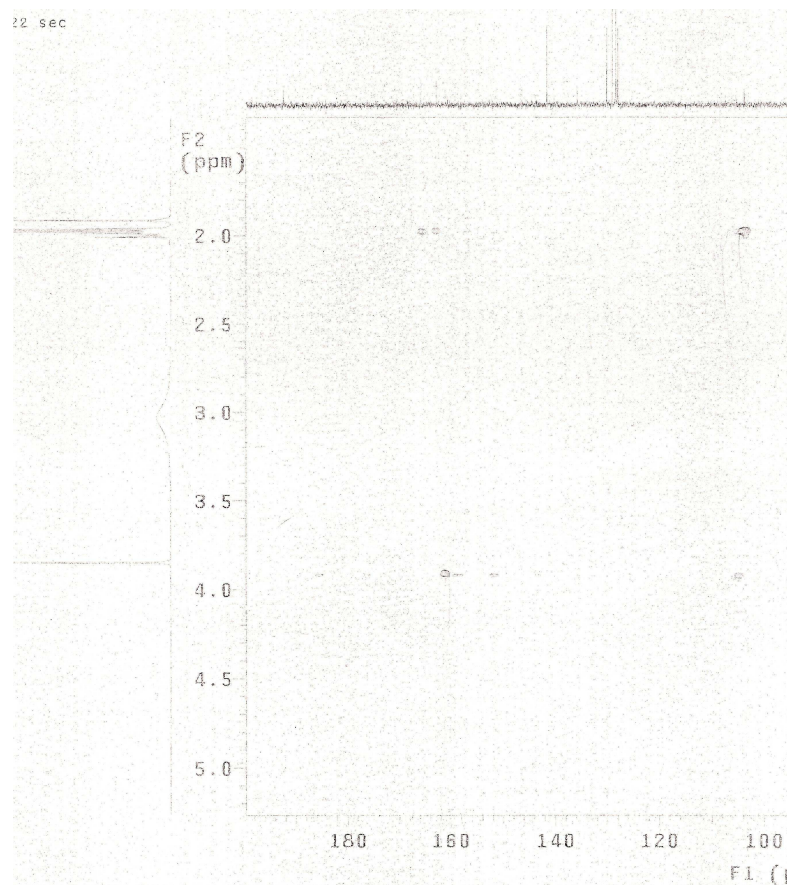


Figura 45: Ampliação do espectro de HMBC da 2',6'-diidróxi-3'-metil-4'-metóxicalcona, acetona-d₆, 300 MHz.

4.1.1.5. Identificação da Substância V: 2', 3', 4'-triidróxi-6'-metóxi-5'-metilchalcona (Figura 46)

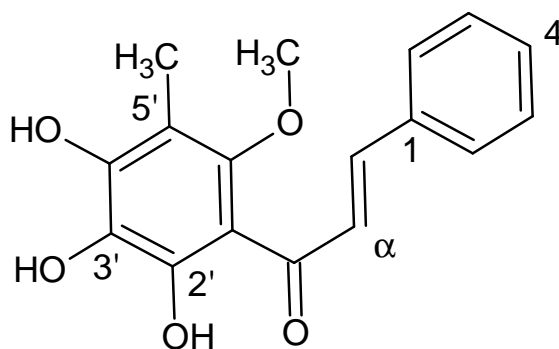


Figura 46: Estrutura da chalcona 2',3',4'-triidróxi-6'-metóxi-5'-metilchalcona

A Substância V (6 mg), cristais amarelos e solúveis em clorofórmio, foi isolada do fracionamento da fase em diclorometano das folhas de *M. hiemalis* (p. 28 e p. 35).

O espectro de RMN ^1H da Substância V (Figura 49, p. 73) apresentou sinais importantes para a determinação estrutural:

- Simpleto em 2,18 ppm, integrando para três hidrogênios, sugerindo um grupo metílico;
- Simpleto em 3,81 ppm, integrando para três hidrogênios, sugerindo um grupo metoxílico;
- Simpleto em 6,20 ppm, integrando para um hidrogênio, sugerindo um grupo hidroxílico ligado a carbono aromático. Este sinal em acetona- d_6 foi deslocado no espectro para 9,15 ppm e desapareceu quando foi realizado em acetona- d_6 e uma gota de água deuterada, sugerindo troca do hidrogênio hidroxílico com a água (Figura 50, p. 73);
- Dois multipletos entre 7,42 e 7,45 ppm e entre 7,64 e 7,68 ppm, integrando para três e dois hidrogênios respectivamente, sugerindo um grupo fenílico;
- Dois dupletos em 7,88 e 7,96 ppm, com constantes de acoplamento de 15,6 Hz, sugerindo dois hidrogênios olefínicos vicinais acoplados entre si. A constante de acoplamento de 15,6 Hz indica a configuração *trans* (Figura 51, p. 74);
- Simpleto em 13,60 ppm, sugerindo a presença de um grupo hidroxílico ligado a um carbono aromático, com desproteção devido à presença de um grupamento

carbonílico na posição orto, o que possibilita a formação de ligação de hidrogênio intramolecular (a ligação de hidrogênio diminui a densidade eletrônica ao redor do hidrogênio) (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

O espectro de RMN ^{13}C da Substância V (Figura 52, p. 74) apresentou apenas os sinais dos carbonos hidrogenados, devido à pequena massa da substância isolada (6 mg):

- Os sinais em 125,88 e 144,04 ppm foram atribuídos aos carbonos insaturados por dupla ligação α e β à carbonila, respectivamente;

- Os sinais em 130,57, 129,0 e 128,55 ppm, estes dois últimos com intensidade para dois carbonos cada, foram atribuídos aos carbonos hidrogenados do grupo fenílico (anel A);

- O sinal em 62,55 ppm foi atribuído a um carbono carbinólico, concluiu-se que trata-se de um grupo metoxílico ligado ao anel aromático B;

- O sinal em 8,28 ppm foi atribuído ao carbono do grupo metílico ligado ao anel aromático B.

O espectro de interação heteronuclear spin-spin a longa distância ($^2\text{J}_{\text{CH}}$ e $^3\text{J}_{\text{CH}}$) de átomos de carbono e hidrogênio (HMBC) (Figura 53, p. 75) revelou informações importantes para a determinação das posições dos substituintes do anel B:

- a interação a longa distância H-5' (metílico) com C-5' ($^2\text{J}_{\text{CH}}$);
- a interação a longa distância H-5' (metílico) com C-4' e C-6', ambos oxigenados ($^3\text{J}_{\text{CH}}$).

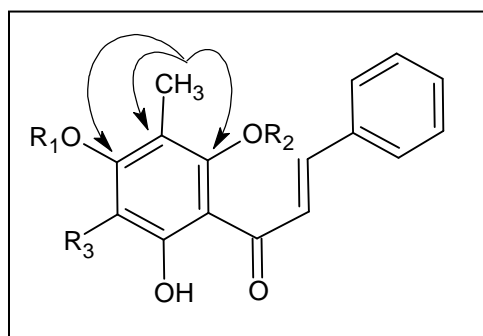


Figura 47: Correlação heteronuclear spin-spin a longa distância ($^2\text{J}_{\text{CH}}$ e $^3\text{J}_{\text{CH}}$) observada de átomos de carbono e hidrogênio (HMBC).

O experimento de NOE diferencial pela irradiação do sinal em 6,20 ppm apresentou NOE negativo com a hidroxila quelatogênica (13,60 ppm) ligada ao anel

aromático B (Figura 54, p. 75). A confirmação das posições dos substituintes do anel B foi por NOE diferencial por irradiação do hidrogênio olefínico ligado ao carbono β carbonílico, que levou a intensificação apenas do sinal simpleto em 3,81 ppm, referente aos hidrogênios do grupo metoxílico ligado ao anel aromático B (Figura 55, p. 75). Sendo assim, concluiu-se que existem grupos hidroxílicos nas posições 2' e 4' e o grupo metoxílico na posição 6'.

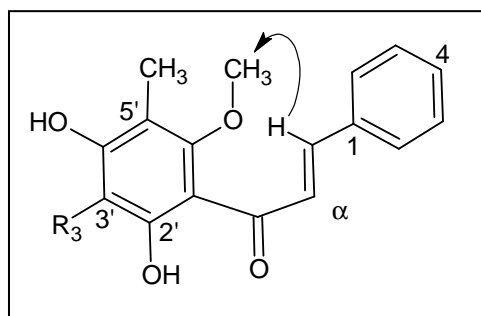


Figura 48: NOE diferencial observado pela irradiação do hidrogênio olefínico β carbonílico.

Considerando que todos os sinais do espectro de RMN ^1H foram atribuídos à estrutura e que o espectro de RMN ^{13}C apresentou somente os sinais dos carbonos hidrogenados, que foram os do grupo fenílico (anel A), grupo metoxílico, grupo metílico e os vinílicos, concluiu-se que o anel B encontra-se todo substituído. Sendo assim, o carbono 3' deve ser oxigenado e, portanto, atribuiu-se como substituinte por eliminação um grupo hidroxílico.

Diante das evidências, propõe-se que a Substância V deve ser a chalcona **2',3',4'-triidróxi-5'-metil-6'-metóxicalcona**. Não foi encontrado na literatura relato sobre o isolamento dessa substância.

Tabela 07: Dados de RMN ^1H (300 MHz) da 2',3',4'-triidróxi-5'-metil-6'-metóxicalcona, CDCl_3 , δ (ppm)

Numeração do átomo	$\delta^{13}\text{C}$	H; δ (ppm); multiplicidade; J (Hz)
1	135,4*	
2	129,0 ^a	1 H; 7,64-7,68; m
3	128,55 ^a	1 H; 7,42-7,45; m
4	130,57	1 H; 7,42-7,45; m
5	128,55 ^b	1 H; 7,42-7,45; m
6	129,0 ^b	1 H; 7,64-7,68; m
C = O	193,0*	
α	125,88	1 H; 7,88; d; 15,6
β	144,04	1 H; 7,96; d; 15,6
1'	109,8*	
2'		
3'		
4'	162,8*	
5'	109,5*	
6'	156,0*	
HO – 2'		1 H; 13,60; s
HO – 3' ou 4'		1 H; 6,20; s
CH_3 – 5'	8,28	3 H; 2,18; s
MeO – 6'	62,55	3 H; 3,81; s

Letras em sobrescrito indicam que a atribuição dos sinais pode estar trocada

* Valores atribuídos através do espectro de HMBC

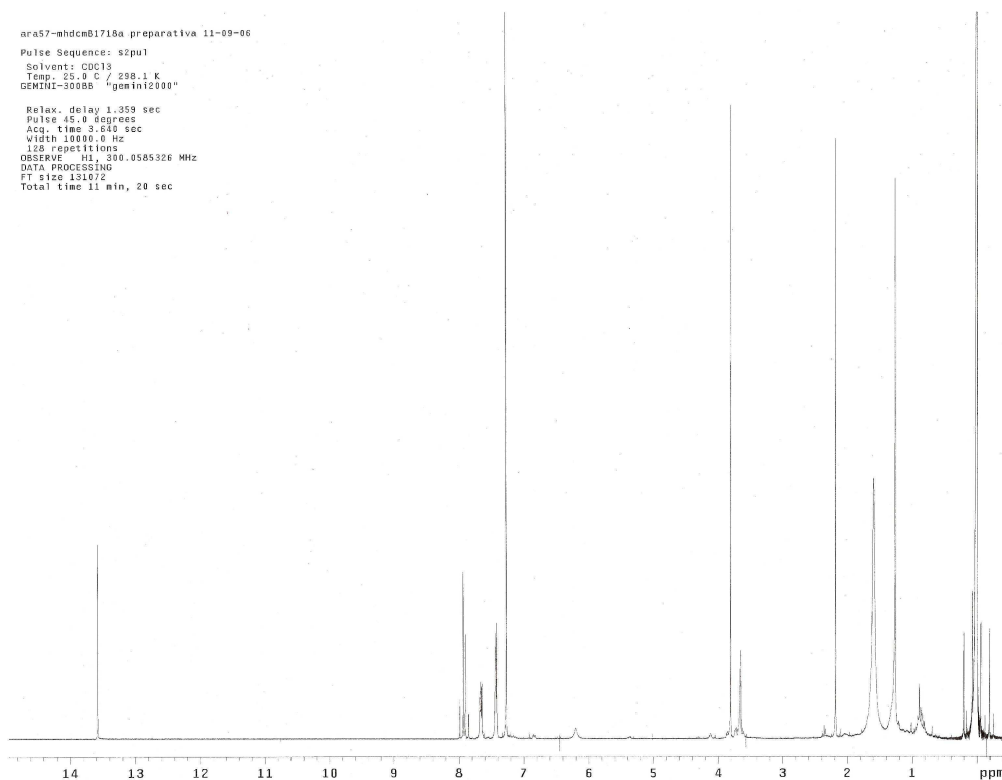


Figura 49: Espectro de RMN ^1H da 2',3',4'-triidróxi-5'-metil-6'-metóxicalcona, CDCl_3 , 300 MHz

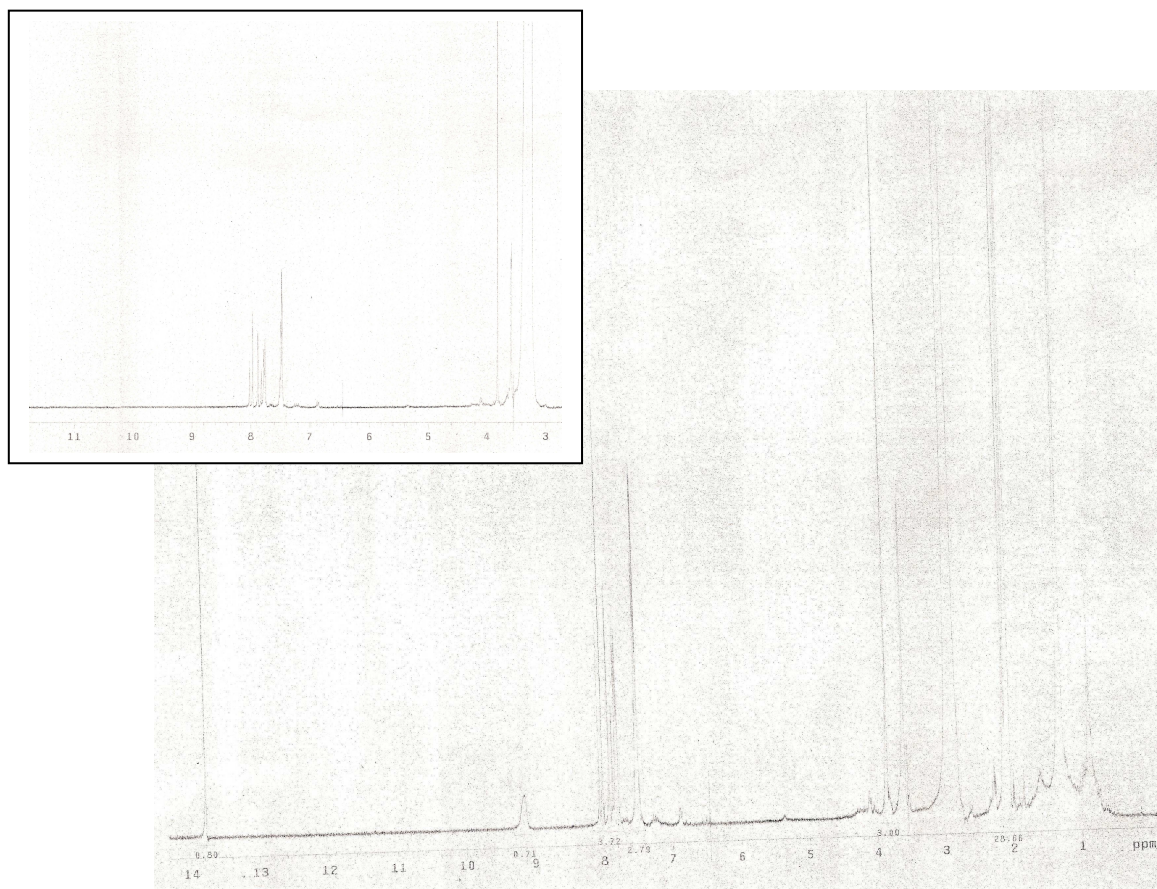


Figura 50: Espectro de RMN ^1H da 2',3',4'-triidróxi-5'-metil-6'-metóxicalcona em acetona- d_6 e ampliação em acetona- d_6 com gota de D_2O , 300 MHz

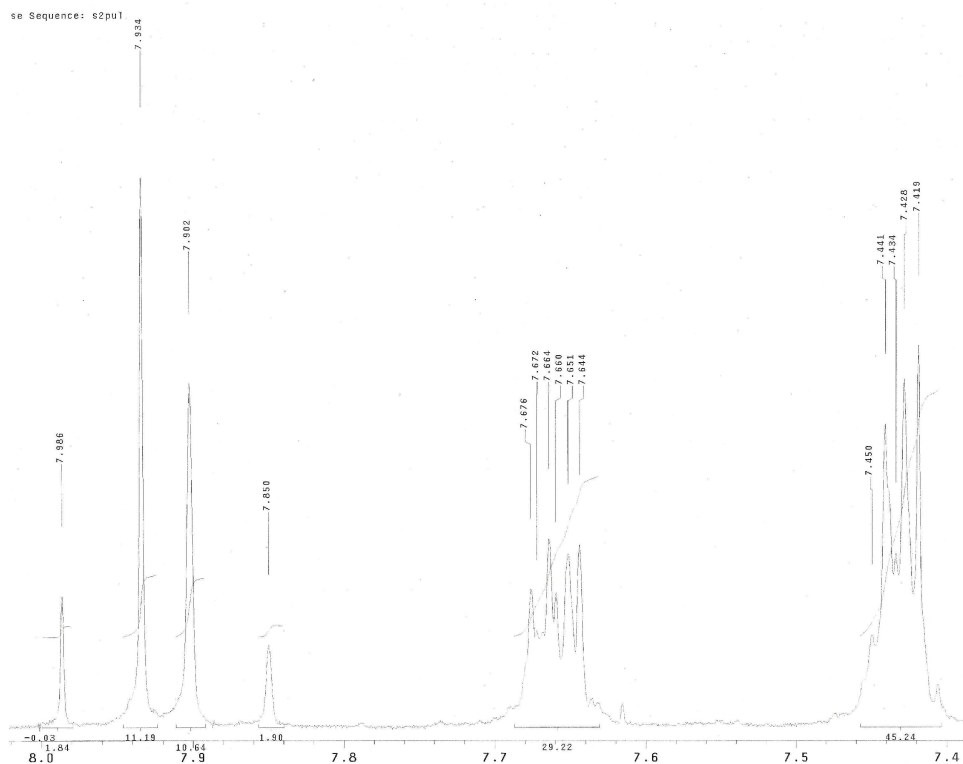


Figura 51: Ampliação do espectro de RMN ^1H da 2',3',4'-trihidroxi-5'-metil-6'-metóxicalcona, CDCl_3 , 300 MHz

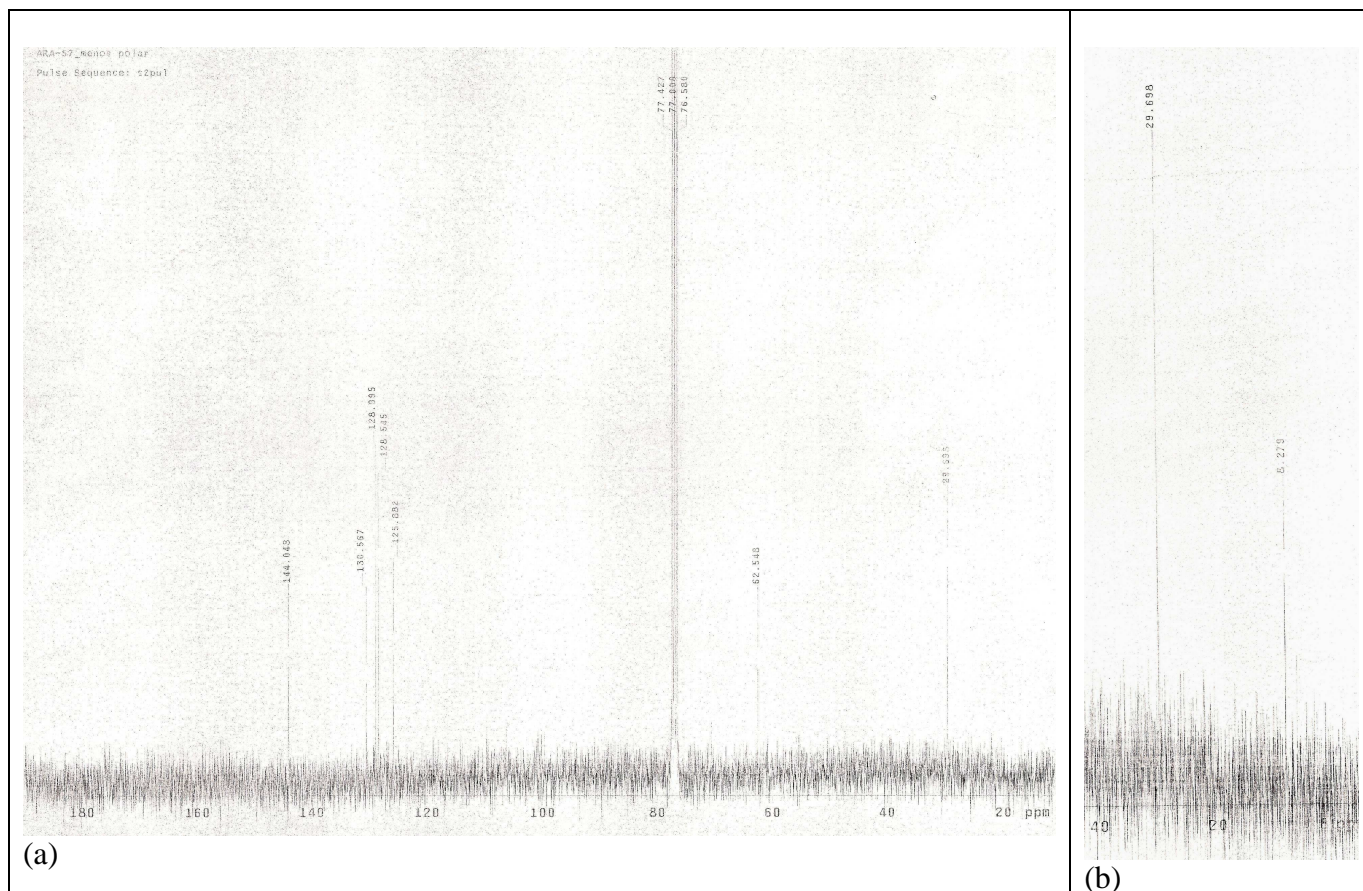


Figura 52: Espectro de RMN ^{13}C da 2',3',4'-trihidroxi-5'-metil-6'-metóxicalcona- (a) região de 15 a 180 ppm e (b) região de 0 a 20 ppm, CDCl_3 , 300 MHz

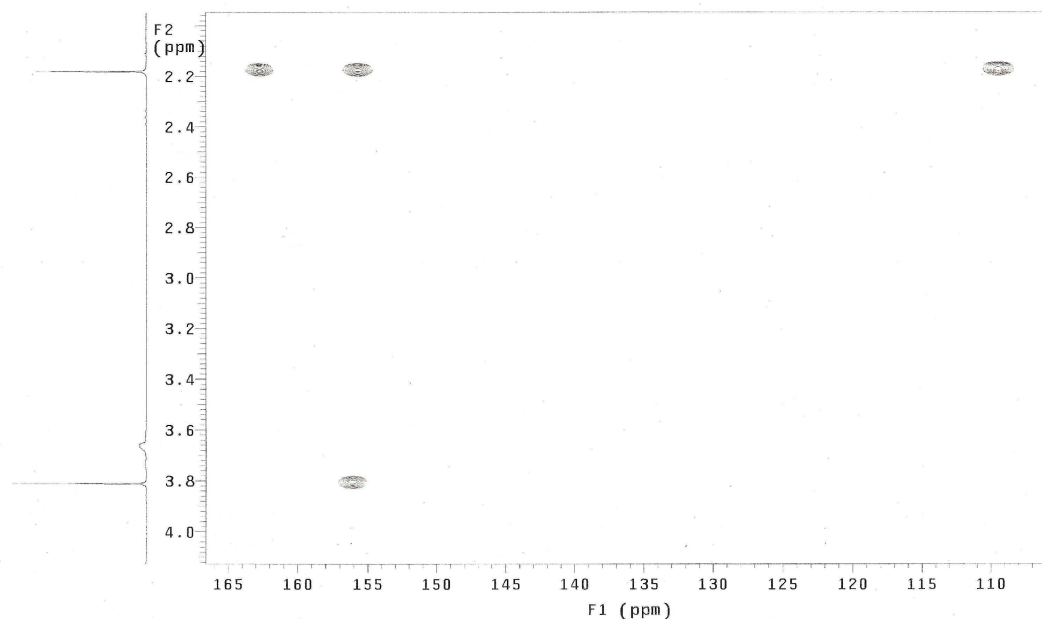


Figura 53: Ampliação do espectro de HMBC da 2',3',4'-triidróxi-5'-metil-6'-metóxichalcona, CDCl₃, 300 MHz

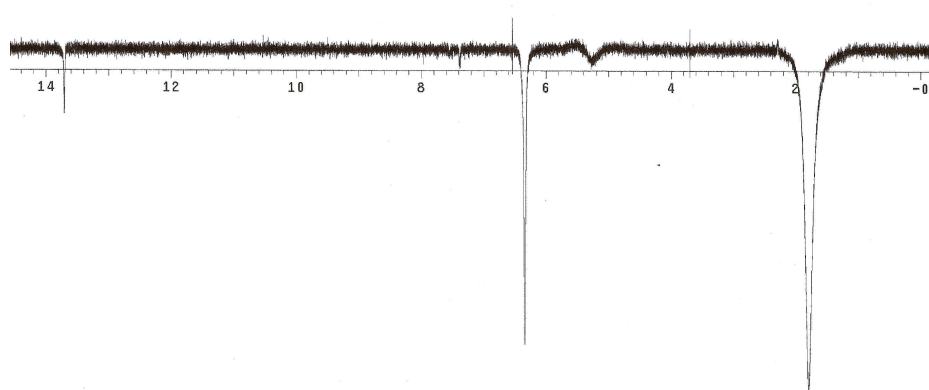


Figura 54: Espectro de NOE diferencial por irradiação do hidrogênio do grupo hidroxílico ligado ao anel aromático B da 2',3',4'-triidróxi-5'-metil-6'-metóxichalcona, CDCl₃, 300 MHz.

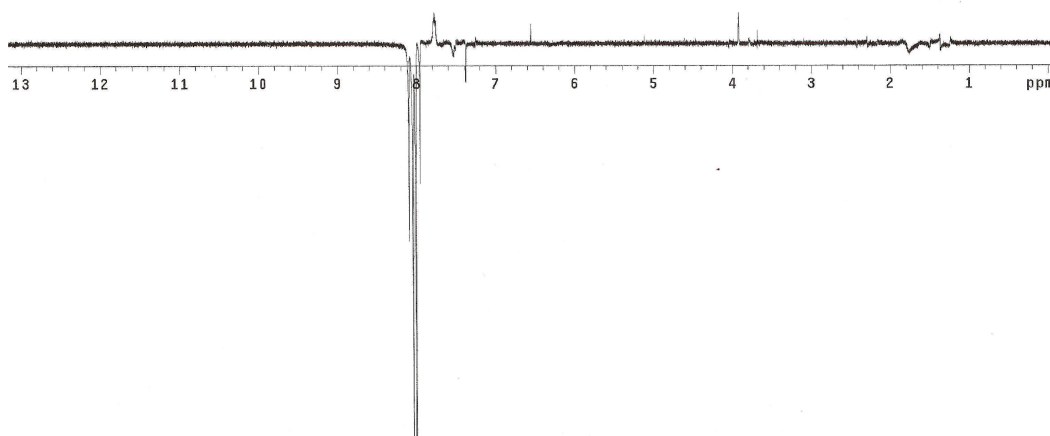


Figura 55: Espectro de NOE diferencial por irradiação do hidrogênio olefínico β carbonílico da 2',3',4'-triidróxi-5'-metil-6'-metóxichalcona, CDCl₃, 300 MHz.

4.1.1.6. Identificação da Substância VI: 7-hidróxi-6,8-dimetil-5-metóxi-flavanona (Figura 56)

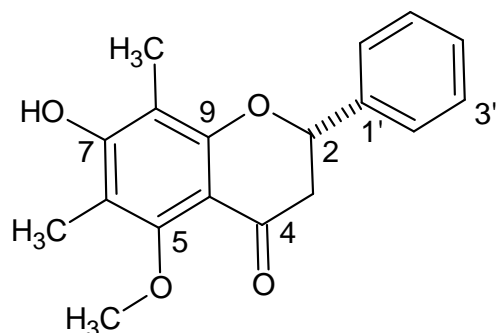


Figura 56: Estrutura da flavanona 7-hidróxi-6,8-dimetil-5-metóxi-flavanona

A substância VI (174,7 mg), cristais incolores, solúveis em acetona e com ponto de fusão na faixa de 200,1 – 200,7 °C, foi isolada do fracionamento da fase em diclorometano das folhas de *M. hiemalis* (p. 28 e p. 36).

O espectro de RMN ^1H (Figura 57, p. 79) apresentou sinais úteis para a identificação da substância VI:

- Dois simpletos em 2,11 e 2,12 ppm, integrando para três hidrogênios cada, sugerindo dois grupos metílicos;
- Simpleto em 3,79 ppm, integrando para três hidrogênios, sugerindo um grupo metoxílico;
- Duplo duplete em 2,74 ppm, com constantes de acoplamento de 3,3 e 16,5 Hz, integrando para um hidrogênio, sugerindo um sistema ABX para hidrogênio alifático (Figura 58, p. 79);
- Duplo duplete em 2,96 ppm, com constantes de acoplamento de 12,9 e 16,5 Hz, integrando para um hidrogênio, sugerindo um sistema ABX para hidrogênio alifático (Figura 58, p. 79);
- Duplo duplete em 5,50 ppm, com constantes de acoplamento de 3 e 12,6 Hz, integrando para um hidrogênio, sugerindo um sistema ABX para hidrogênio alifático (Figura 58, p. 79);

Os deslocamentos químicos, multiplicidades e constantes de acoplamento dos *dd* são típicos de H-3 equatorial, H-3 axial e H-2, respectivamente, do anel de uma

flavanona. Este anel possui conformação preferencial de meia-cadeira, onde observa-se claramente os acoplamentos entre os átomos de hidrogênio deste anel. O valor da constante $J = 16,5$ Hz corresponde ao acoplamento geminal H-3 axial com H-3 equatorial. A constante com valor aproximadamente $J = 12,6$ Hz refere-se ao acoplamento axial-axial do H-2 com H-3 axial. O valor de $J = 3,3$ Hz corresponde ao acoplamento axial-equatorial de H-2 com H-3 equatorial.

- Dois multipletos entre 7,37 e 7,47 ppm e entre 7,57 e 7,60 ppm, integrando para três e dois hidrogênios respectivamente, sugerindo um grupo fenílico;

- Simpleto em 8,02 ppm, integrando para um hidrogênio, sugerindo um grupo hidroxílico ligado a anel aromático.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 59, p. 80) apresentou sinais importantes na determinação da estrutura da Substância VI:

- Sinal em 189,0 ppm atribuído a um carbono carbonílico sem conjugação. Segundo a literatura, para flavanonas o valor do deslocamento químico abaixo de 192 ppm do carbono carbonílico é típico quando não há presença de hidroxila quelatogênica (AGRAWAL *et al*, 1981).

- Os sinais em 46,18 e 79,27 ppm foram atribuídos a carbonos alifáticos α e β à carbonila, respectivamente e, portanto, concluiu-se que estrutura poderia ser de uma flavanona;

- Os sinais em 160,71, 160,20 e 158,38 ppm, foram atribuídos a carbonos oxigenados do anel aromático A;

- Os sinais em 140,77, 129,38, 128,99 e 126,86 ppm, foram atribuídos aos carbonos de um grupo fenílico não substituído (anel B), sendo que os sinais 129,38 e 126,86 ppm apresentaram intensidade para dois carbonos cada;

- Os sinais em 109,45 e 112,60 ppm foram atribuídos aos carbonos C-metilados do anel aromático A;

- O sinal em 108,06 ppm foi atribuído ao carbono do anel aromático A ligado ao carbono carbonílico;

- O sinal em 61,03 ppm foi atribuído ao carbono do grupo metoxílico ligado ao anel aromático A;

- Os sinais em 8,48 e 8,74 ppm foram atribuídos a dois grupos metílicos ligados ao anel aromático A.

Através da análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C e por comparação com a literatura (HUFFORD e OGUNTMEIN, 1982; AGRAWAL *et al.*, 1981) constatou-se que Substância VI é a **7-hidróxi-6,8-dimetil-5-metóxilavanona**.

Tabela 08: Dados de RMN ^{13}C (75 MHz) e ^1H (300 MHz) da 7-hidróxi-6,8-dimetil-5-metóxilavanona, Acetona- d_6 , δ (ppm).

C / H	$\delta^{13}\text{C}$		H ; δ ; multiplicidade; J (Hz)
		Lit.*	
2	79,27	77,8	1 H; 5,50; dd; 3 e 12,6
3	46,18	44,8	1 H; 2,74; dd; 3,3 e 16,5 1 H; 2,96; dd; 12,9 e 16,5
4	189,0	188,5	
5	160,20 ^a	160,2	
6	109,45 ^b	112,0	
7	160,70 ^a	159,0	
8	112,60 ^b	108,2	
9	158,38	157,0	
10	108,06 ^b	107,5	
1'	140,77	139,5	
2'	126,86 ^c	126,0	1 H; 7,57-7,60; m
3'	129,38 ^c	128,5	1 H; 7,37-7,47; m
4'	129,0	128,1	1 H; 7,37-7,47; m
5'	129,38 ^d	128,5	1 H; 7,37-7,47; m
6'	126,86 ^d	126,0	1 H; 7,57-7,60; m
O-CH ₃	61,03	60,4	3 H; 3,79; s
CH ₃ - 6	8,48 ^e	8,4	3 H; 2,11; s
CH ₃ - 8	8,74 ^e	8,6	3 H; 2,12; s
HO - 7			8,02; s

Letras em sobrescrito indicam que a atribuição dos sinais pode estar trocada

* HUFFORD e OGUNTMEIN, 1982.

mhdca371-b1821
Pulse Sequence: s2pu1

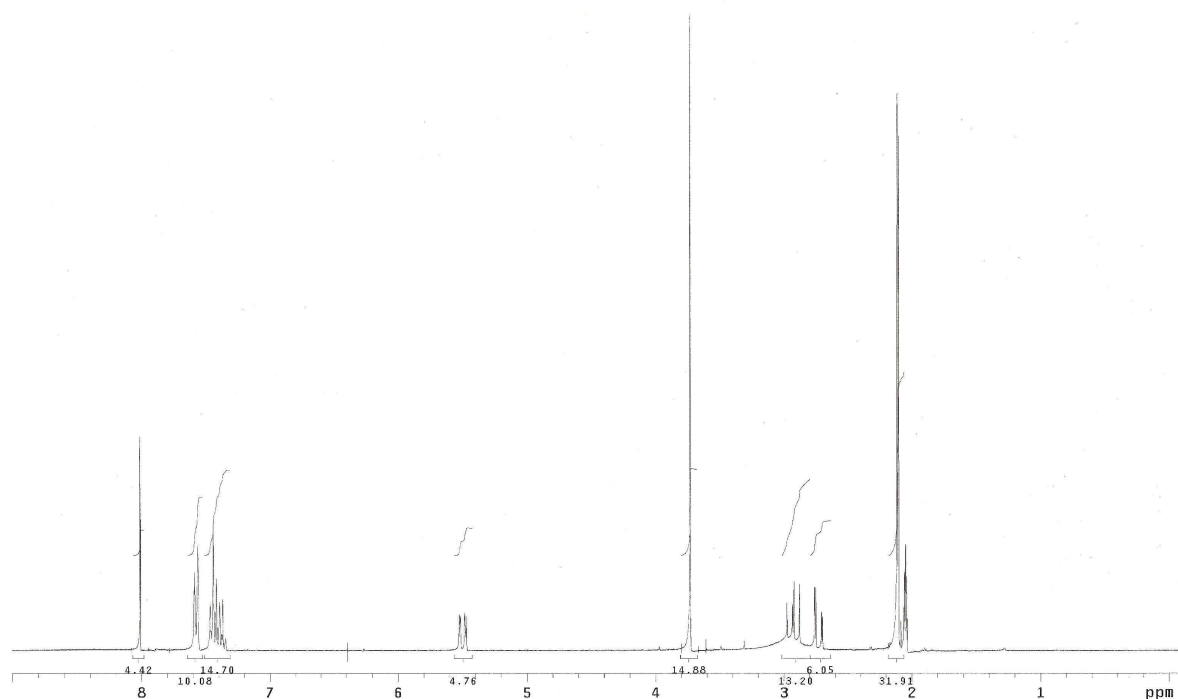


Figura 57: Espectro de RMN ^1H da 7-hidróxi-6,8-dimetil-5-metóxi flavanona, acetona- d_6 , 300 MHz

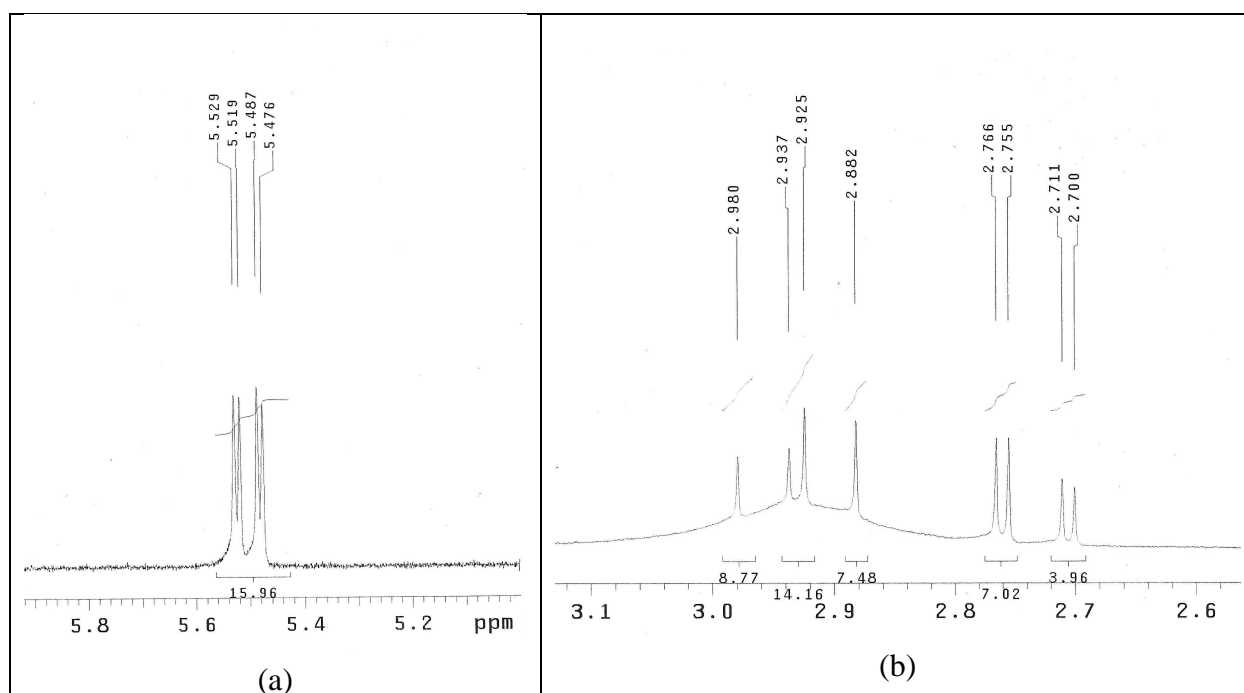


Figura 58: Ampliação do espectro de RMN ^1H da 7-hidróxi-6,8-dimetil-5-metóxi flavanona – região de (a) 5,2 a 5,8 ppm e de (b) 2,6 a 3,1 ppm, acetona- d_6 , 300 MHz

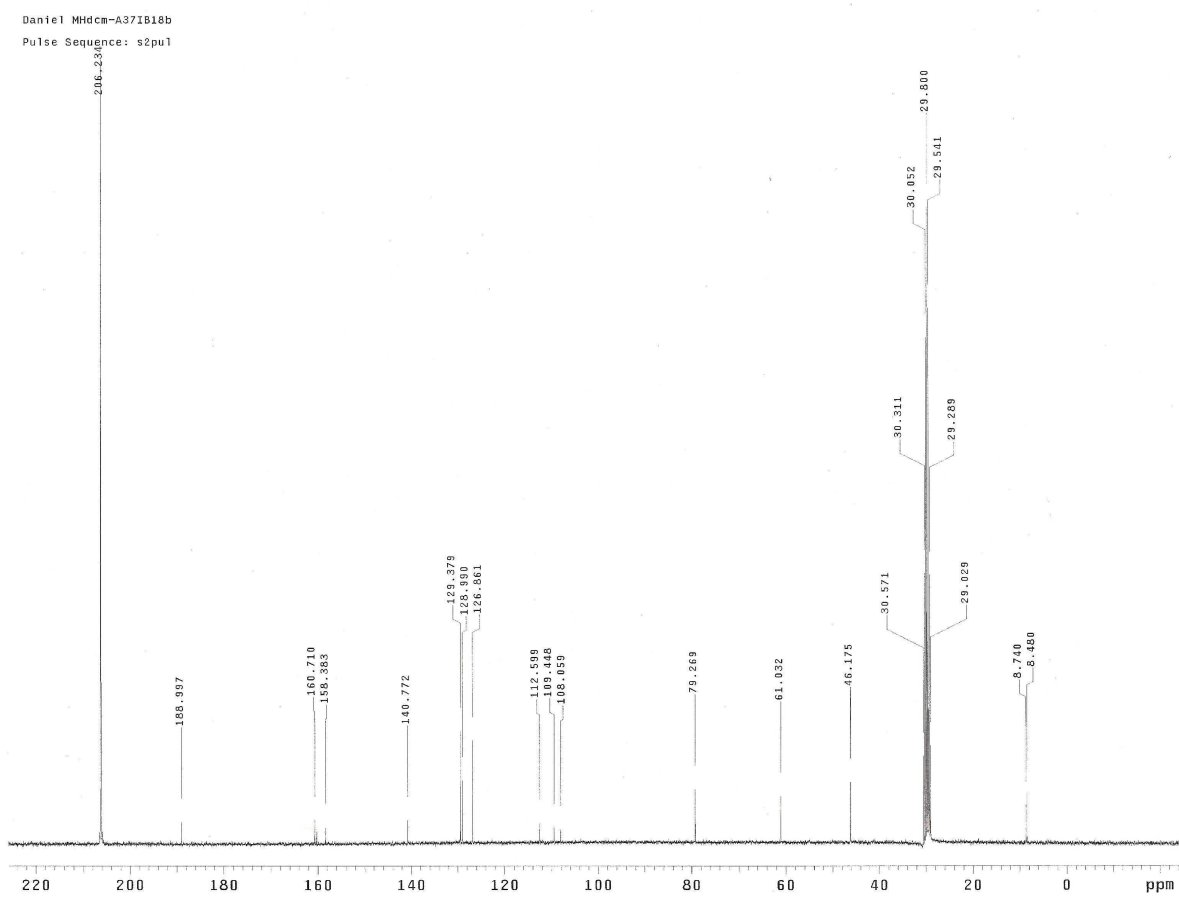


Figura 59: Espectro de RMN ^{13}C da 7-hidróxi-6,8-dimetil-5-metóxi flavanona, acetona- d_6 , 75 MHz

4.1.1.7. Identificação da Substância VII: 5,7-diidróxi-6,8-dimetilflavanona (Figura 59)

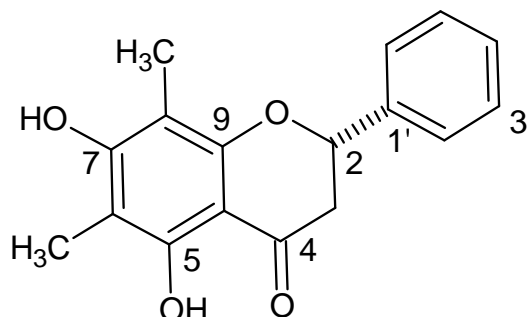


Figura 60: Estrutura da flavanona 5-hidróxi-6,8-dimetilflavanona

A substância VII, cristais incolores, solúveis em clorofórmio, foi isolada do fracionamento do extrato diclorometânico das folhas de *M. hiemalis* (p. 28 e p. 37).

O espectro de RMN ^1H (Figura 61, p. 84) apresentou sinais úteis para a identificação da substância VII:

- Dois simpletos em 2,08 e 2,09 ppm, integrando para três hidrogênios cada, sugerindo dois grupos metílicos;

- Duplo duplete em 2,86 ppm, com constantes de acoplamento de 3,3 e 17,1 Hz, integrando para um hidrogênio, sugerindo um sistema ABX para hidrogênio alifático (Figura 62, p. 84);

- Duplo duplete em 3,05 ppm, com constantes de acoplamento de 12,9 e 17,1 Hz, integrando para um hidrogênio, sugerindo um sistema ABX para hidrogênio alifático (Figura 62, p. 84);

- Duplo duplete em 5,41 ppm, com constantes de acoplamento de 3 e 12,6 Hz, integrando para um hidrogênio, sugerindo um sistema ABX para hidrogênio alifático (Figura 62, p. 84);

Os deslocamentos químicos, multiplicidades e constantes de acoplamento dos *dd* são típicos de H-3 equatorial, H-3 axial e H-2, respectivamente, do anel de uma flavanona. Este anel possui conformação preferencial de meia-cadeira, onde observa-se claramente os acoplamentos entre os átomos de hidrogênio deste anel. O valor da constante $J = 17,1$ Hz corresponde ao acoplamento geminal H-3 axial com H-3 equatorial.

A constante com valor aproximadamente $J = 12,6$ Hz refere-se ao acoplamento axial-axial do H-2 com H-3 axial. O valor de $J = 3$ Hz corresponde ao acoplamento axial-equatorial de H-2 com H-3 equatorial.

- Multiplete entre 7,40 e 7,50 ppm, integrando para cinco hidrogênios, sugerindo um grupo fenílico não substituído;

- Simpleto em 12,28 ppm, sugerindo a presença de um grupo hidroxílico ligado a um carbono aromático, com desproteção devido à presença de um grupamento carbonílico na posição orto, o que possibilita a formação de ligação de hidrogênio intramolecular (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 63, p. 85) apresentou sinais importantes na determinação da estrutura da Substância VII:

- Sinal em 196,33 ppm atribuído a um carbono carbonílico;

- Os sinais em 43,44 e 78,65 ppm foram atribuídos a carbonos alifáticos α e β à carbonila, respectivamente e, portanto, concluiu-se que estrutura poderia ser de uma flavanona;

- Os sinais em 160,85, 159,25 e 157,61 ppm, foram atribuídos aos carbonos oxigenados do anel aromático A;

- Os sinais em 138,90, 128,76, 128,55 e 125,86 ppm, foram atribuídos aos carbonos de um grupo fenílico (anel B), sendo que os sinais 128,76 e 125,86 ppm apresentaram intensidade para dois carbonos cada;

- Os sinais em 103,0 e 102,79 ppm foram atribuídos aos carbonos C-metilados do anel aromático A;

- O sinal em 102,01 ppm foi atribuído ao carbono do anel aromático A ligado ao carbono carbonílico;

- Os sinais em 7,61 e 6,87 ppm foram atribuídos a dois grupos metílicos ligados ao anel aromático A.

Através da análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C e por comparação com a literatura (HUFFORD e OGUNTMEIN, 1982; AGRAWAL *et al.*, 1981) constatou-se que Substância VII é a **5,7-diidróxi-6,8-dimetilflavanona**.

Tabela 09: Dados de RMN ^{13}C (75 MHz) e ^1H (300 MHz) da 5,7-diidróxi-6,8-dimetilflavanona, CDCl_3 , δ (ppm)

C / H	$\delta^{13}\text{C}$		H ; δ ; multiplicidade; J (Hz)
		Lit.*	
2	78,65	79,3	1 H; 5,41; dd; 3 e 12,6
3	43,44	43,5	1 H; 2,86; dd; 3,3 e 17,1 1 H; 3,05; dd; 12,9 e 17,1
4	196,33	196,9	
5	160,85 ^a	162,4	
6	103,0 ^b	103,0	
7	159,25 ^a	160,0	
8	102,79 ^b	102,9	
9	157,61 ^a	158,3	
10	102,79 ^b	104,0	
1'	138,90	140,5	
2'	125,86 ^c	126,6	1 H; 7,40-7,50; m
3'	128,76 ^c	129,2	1 H; 7,40-7,50; m
4'	128,55	128,8	1 H; 7,40-7,50; m
5'	128,76 ^d	129,2	1 H; 7,40-7,50; m
6'	125,86 ^d	126,6	1 H; 7,40-7,50; m
HO - 5			1 H; 12,28; s
CH ₃ - 6	7,61 ^e	7,9	3 H; 2,09; s
CH ₃ - 8	6,87 ^e	7,1	3 H; 2,08; s

Letras em sobrescrito indicam que a atribuição dos sinais pode estar trocada

* HUFFORD e OGUNTIMEIN, 1982.

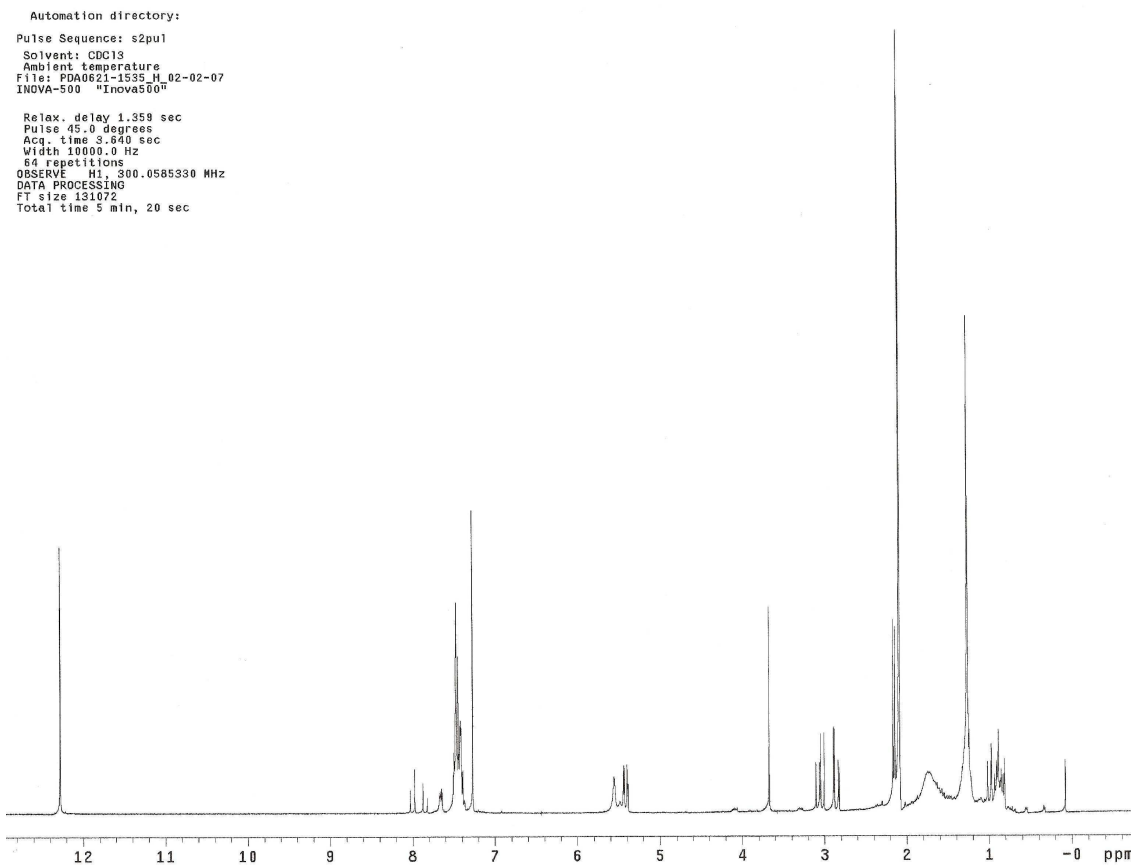


Figura 61: Espectro de RMN ¹H da 5,7-diidroxi-6,8-dimetilflavanona, CDCl₃, 300 MHz

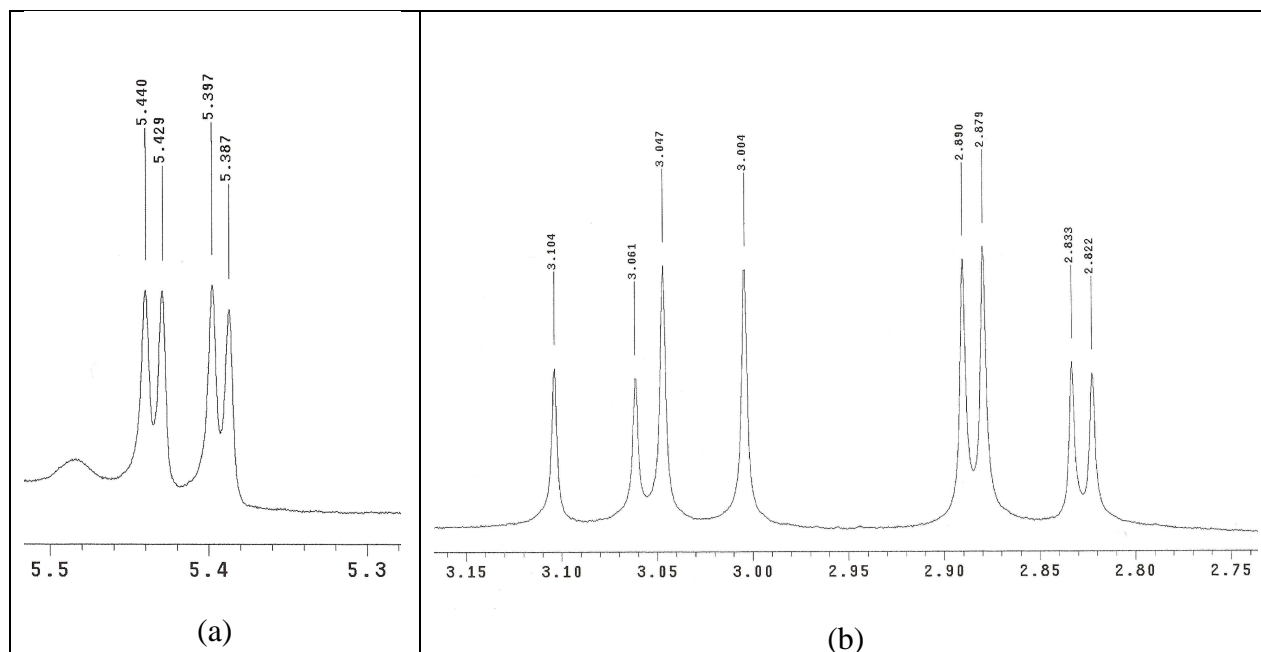


Figura 62: Ampliação do espectro de RMN ¹H da 5,7-diidroxi-6,8-dimetilflavanona – região de (a) 5,3 a 5,5 ppm e de (b) 2,75 a 3,15 ppm, CDCl₃, 300 MHz

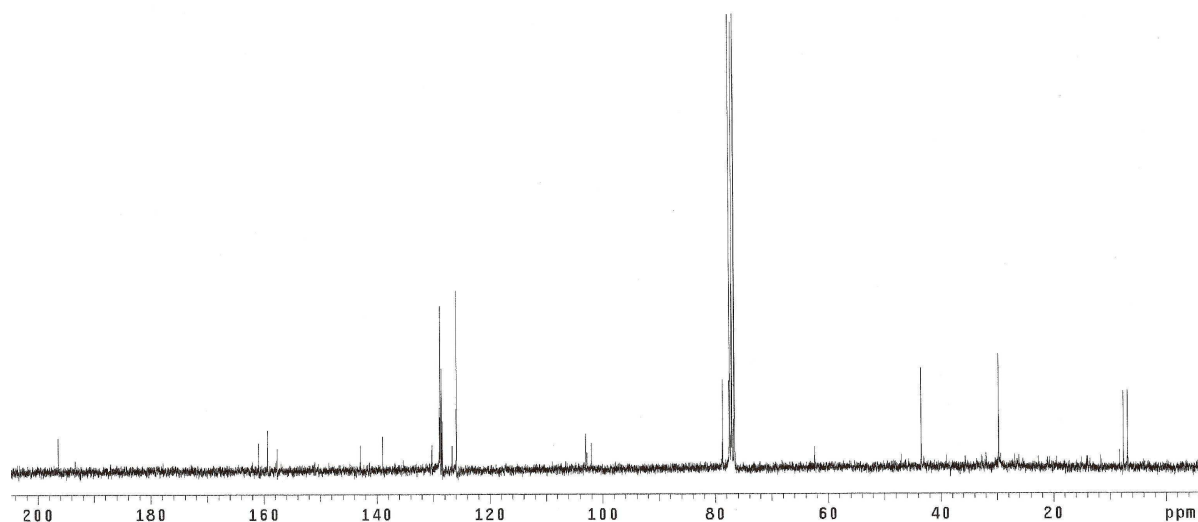


Figura 63 : Espectro de RMN ^{13}C da 5,7-diidróxi-6,8-dimetilflavanona, CDCl_3 , 75 MHz

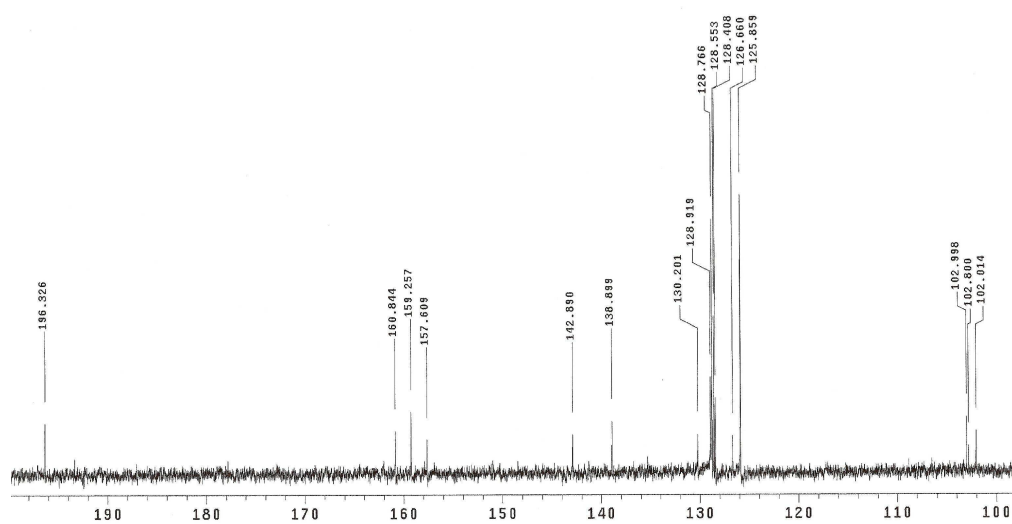


Figura 64 : Ampliação do espectro de RMN ^{13}C da 5,7-diidróxi-6,8-dimetilflavanona – região entre 100 e 198 ppm, CDCl_3 , 75 MHz

4.2. Considerações Gerais

As chalconas 2',4'-diidróxi-3',5'-dimetil-6'-metóxicalcona, 2',6'-diidróxi-3'-metil-4'-metóxicalcona e 2',3',4'-triidróxi-5'-metil-6'-metóxicalcona, e as flavanonas 7-hidróxi-6,8-dimetil-5-metóxi-flavanona e 5,7-diidróxi-6,8-dimetilflavanona apresentam o grupo fenílico (anel B) não substituído, enquanto que a grande maioria dos flavonóides encontrados na natureza apresentam oxigenação no anel B, o que sugere que a rota biossintética destes compostos, da via do chiquimato, seja a partir do cinamoil-CoA.

Considerando que o flavonóide miricitrina, também isolado das folhas de *M. hiemalis*, apresenta oxigenação no grupo fenílico, sugere que esta espécie utiliza, para a biossíntese de seus flavonóides, dois precursores biossintéticos diferentes da rota do chiquimato (Figuras 04, p. 20; 05, p. 21; e, 65, p. 87).

Outra característica constatada na espécie estudada é que as chalconas e flavanonas isoladas são C-metiladas. A biossíntese dos flavonóides C-metilados têm como precursor biossintético, da via do acetato, o metilmalonil-CoA (SCHRÖDER *et al.*, 1998; DEWICK, 2001). Os flavonóides O-metilados são comuns em plantas, ao passo que os C-metilados são raros e, portanto, revelam uma característica da química da família Myrtaceae (MUSTAFA *et al.*, 2005; SARKER *et al.*, 2001; WOLLENWEBER, 2000).

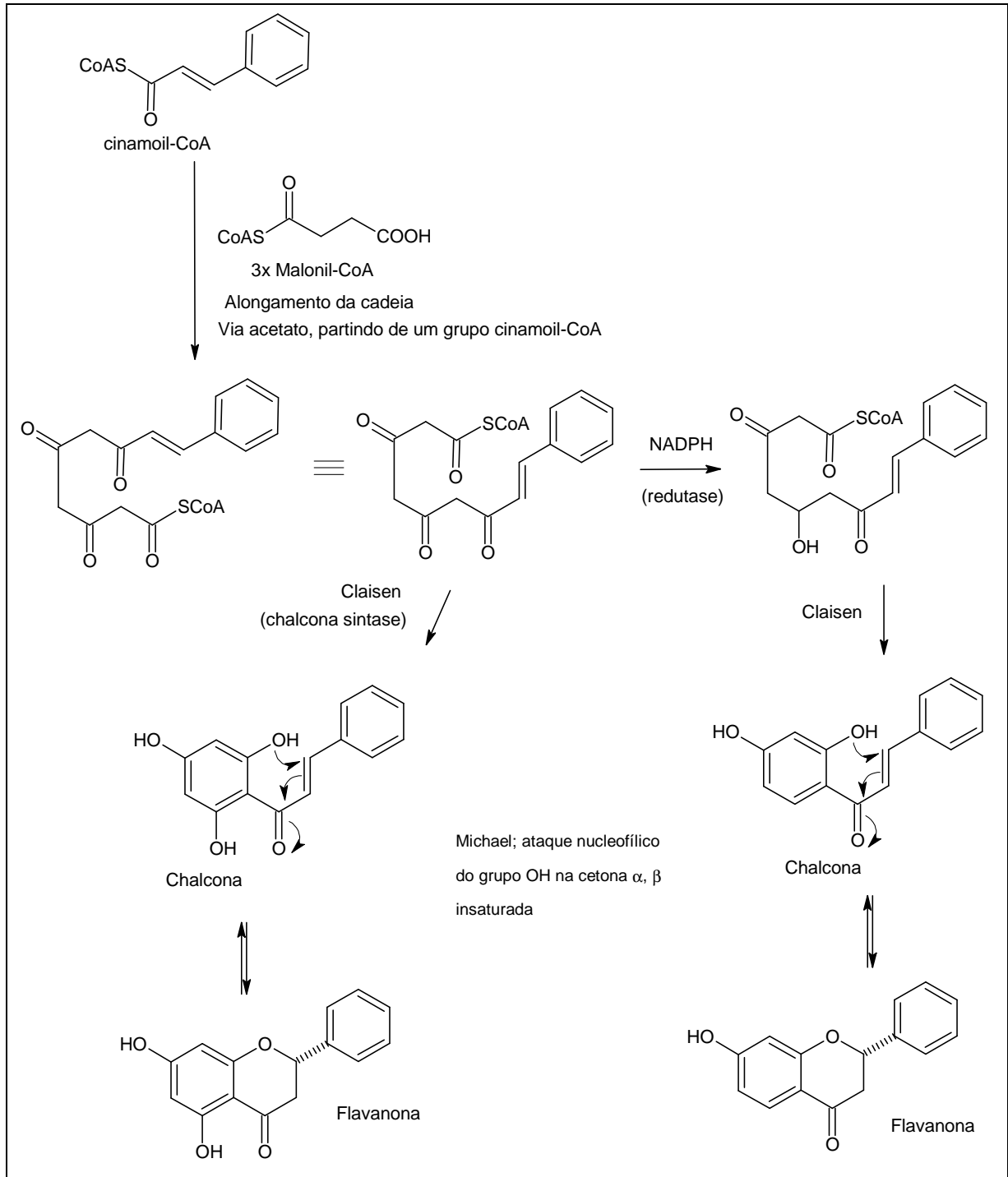


Figura 65: Rota biossintética da flavanona a partir do cinamoil-CoA

4.3. Ensaio Biológicos

4.3.1. Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Inicialmente, os testes foram realizados para uma avaliação qualitativa do potencial das amostras de extrato etanólico, fases em hexano e diclorometano das folhas de *M. hiemalis*, frente à inibição dos microrganismos. Onze microrganismos foram testados, sendo quatro bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* e *Streptococcus mutans*), três Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella choleraesuis*) e quatro fungos (*Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides*, *Candida albicans* e *Crinipellis perniciososa*). Após a análise da **Tabela 10**, percebeu-se que as bactérias Gram-positivas, *B. subtilis*, *S. aureus*, *M. luteus* e *S. mutans* e o fungo *C. perniciososa*, mostraram-se sensíveis frente à fase em diclorometano do extrato etanólico das folhas de *M. hiemalis*. Sendo assim, a fase em diclorometano foi fracionada a fim de avaliar o potencial de cada substância como possível responsável pela atividade identificada na mistura.

Tabela 10: Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) do extrato etanólico e fases em hexano e diclorometano das folhas de *Myrcia hiemalis*

Microorganismo	Amostra ($\mu\text{g/mL}$)			Controle positivo ($\mu\text{g/mL}$)	
	Extrato EtOH	Fase DCM	Fase Hex	Cloranfenicol	Ciclopiroxolamina
<i>Staphylococcus aureus</i>	> 500	31.25	> 500	3,9	-
<i>Bacillus subtilis</i>	> 500	62.5	> 500	3,9	-
<i>Micrococcus luteus</i>	> 500	31.25	> 500	3,9	-
<i>Streptococcus mutans</i>	> 500	125	> 500	7,8	-
<i>Escherichia coli</i>	> 500	> 500	> 500	3,9	-
<i>Salmonella choleraesuis</i>	> 500	> 500	> 500	3,9	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	> 500	> 500	> 500	125	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	> 500	> 500	-	15,6
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	-	> 500	> 500	-	3,9
<i>Candida albicans</i>	-	> 500	> 500	-	3,9
<i>Crinipellis perniciososa</i>	> 500	125	> 500	-	15,6

> 500: não inibiu em concentração menor que $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; -: não foi avaliado.

Das substâncias isoladas do fracionamento da fase em diclorometano do extrato etanólico das folhas de *M. hiemalis*, foram realizados testes biológicos antibacterianos e fungitóxicos com as substâncias I, III, IV e VI. Após a análise da **Tabela 11**, observou-se que a chalcona 2',4'-diidróxi-3',5'-dimetil-6'-metóxicalcona (Substância III) apresentou potente atividade contra *Micrococcus luteus* e a flavanona 7-hidróxi-6,8-dimetil-5-metóxi-flavanona (Substância VI) apresentou atividade relevante contra *Micrococcus luteus* e *Bacillus subtilis*.

Os resultados preliminares dos testes antimicrobianos com uma amostra da fase em diclorometano das folhas de *M. hiemalis*, que revelaram atividade contra as bactérias Gram-positivas *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus mutans* e contra o fungo *Crinipellis pernicioso*, sugeriram que o efeito contra estes microorganismos, cujas substâncias isoladas não apresentaram atividade, pode pertencer a(s) substância(s) que não foi(ram) isolada(s) neste trabalho ou ao sinergismo de substâncias presentes na fase em diclorometano das folhas de *M. hiemalis*. Sendo assim, os resultados preliminares sugerem que deve ser realizada uma investigação mais aprofundada para determinar o(s) responsável(is) pelo efeito observado contra os microorganismos testados.

Tabela 11: Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) das substâncias isoladas das folhas de *Myrcia hiemalis*

Microorganismo	Amostra de substância ($\mu\text{g/mL}$)				Controle positivo ($\mu\text{g/mL}$)	
	I	III	IV	VI	Ciclopiroxolamina	Cloranfenicol
<i>Staphylococcus aureus</i>	> 100	> 100	> 100	> 100	-	3,9
<i>Bacillus subtilis</i>	> 100	100	> 100	25	-	3,9
<i>Micrococcus luteus</i>	> 100	12,5	> 100	25	-	3,9
<i>Streptococcus mutans</i>	> 100	> 100	> 100	> 100	-	7,8
<i>Escherichia coli</i>	> 100	> 100	> 100	> 100	-	3,9
<i>Salmonella choleraesuis</i>	> 100	> 100	> 100	> 100	-	3,9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	> 100	> 100	> 100	> 100	-	125
<i>Aspergillus niger</i>	> 100	> 100	> 100	> 100	15,6	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	> 100	> 100	> 100	> 100	3,9	-
<i>Candida albicans</i>	> 100	> 100	> 100	> 100	3,9	-
<i>Crinipellis pernicioso</i>	> 100	> 100	> 100	> 100	15,6	-

> 100: não inibiu em concentração menor que $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; -: não foi avaliado.

A resistência apresentada nas bactérias Gram-negativas nos bioensaios pode estar relacionada com a composição da parede celular, uma vez que a parede celular das bactérias Gram-positivas é composta de aproximadamente 90% de peptídeoglicanos diferindo das Gram-negativas que é mais resistente a difusão de substâncias, visto que a parede celular é revestida por uma camada externa, formada com porinas, lhe conferindo uma seletividade (BARON e FINEGOLD, 1990; COWAN, 1999; TRABULSI *et al.*, 1999).

Os resultados dos testes de sensibilidade a antibióticos, resumidos nas tabelas 10 e 11, contribuem com os estudos relativos às atividades antibacterianas e fungitóxicas, que vêm sendo observadas nos extratos e substâncias isoladas de espécies pertencentes à família Myrtaceae (BALBACH, 1986; CIMANGA *et al.*, 2002; D'AURIA *et al.*, 2001; JEDLICKOVÁ *et al.*, 1992; LOW *et al.*, 1974; RAMANOELINA *et al.*, 1987; WESTON *et al.*, 1999).

4.3.2. Ensaio Anti-*Trypanosoma cruzi*

Os testes preliminares realizados neste estudo com as chalconas 2',4'-diidróxi-3',5'-dimetil-6'-metóxicalcona (Substância III), 2',6'-diidróxi-3'-metil-4'-metóxicalcona (Substância IV) e a flavanona 7-hidróxi-6,8-dimetil-5-metóxi-flavanona (Substância VI), apontaram as chalconas com atividade contra *Trypanosoma cruzi* (Figura 66).

A 2',4'-diidróxi-3',5'-dimetil-6'-metóxicalcona apresentou potente atividade tripanossomicida nas concentrações testadas (IC_{50} 13,12 μ M) e a 2',6'-diidróxi-3'-metil-4'-metóxicalcona apresentou atividade relevante (IC_{50} 35,95 μ M), o que podem ser considerados resultados promissores, principalmente relativos à 2',4'-diidróxi-3',5'-dimetil-4'-metóxicalcona, que apresentou-se como uma droga em potencial no combate ao *T. cruzi*.

Cabe salientar, que a análise das estruturas das substâncias testadas, sugeriu que substituintes alquílicos no anel B das chalconas potencializam sua atividade anti-*T. cruzi* e que a ciclização para a formação do anel C, no caso das flavanonas, reduz a atividade antiparasitária. Porém, estes resultados preliminares devem ser investigados para elucidar a relação estrutura-atividade.

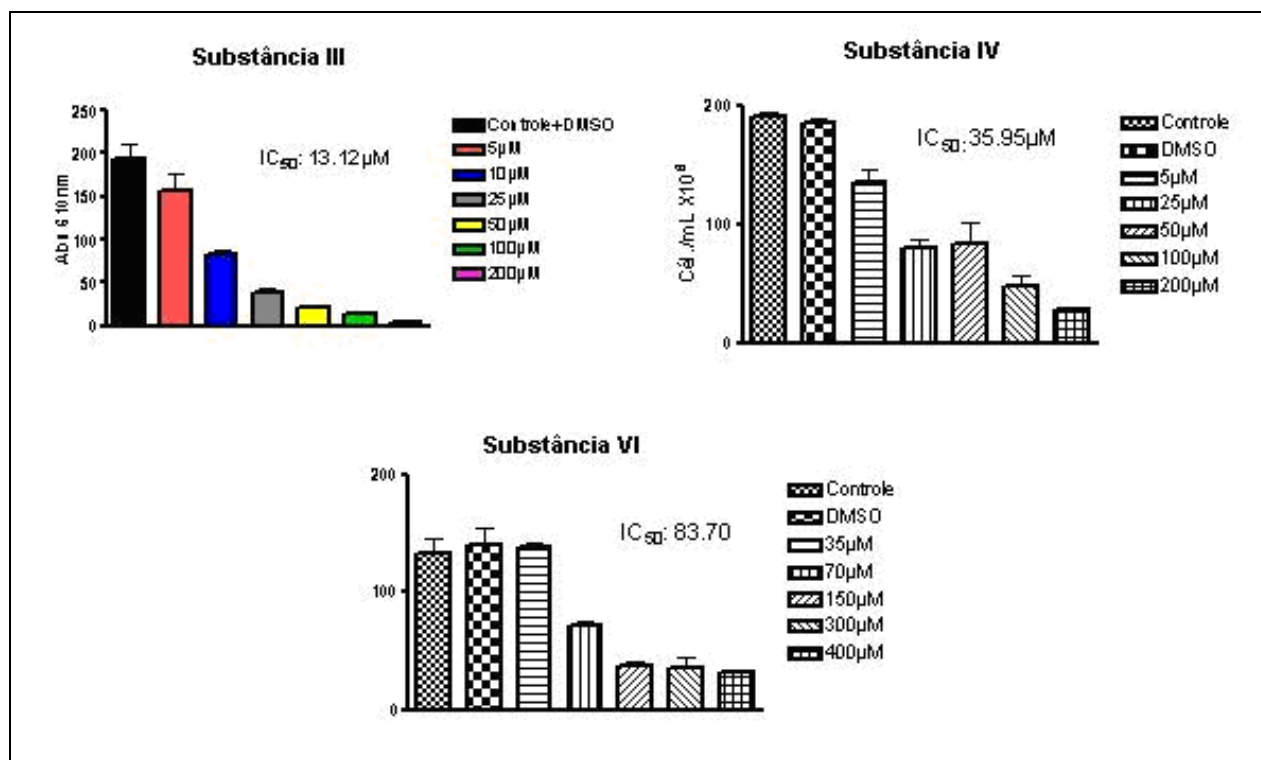


Figura 66: Resultados anti-*T. cruzi* com IC₅₀ das substâncias III, IV e VI.

4.3.3. Ensaio Anti-*Leishmania*

Foi realizado um *screening* com a chalcona 2',4'-diidróxi-3',5'-dimetil-6'-metóxicalcona (Substância III), que apresentou a uma concentração de 50 µM 100% de inibição contra o parasito *Leishmania amazonensis*. O resultado foi considerado muito relevante e sugere que sejam feitas novas investigações com diferentes concentrações da droga a fim de se obter o IC₅₀ e elucidar a relação estrutura-atividade

Alguns trabalhos publicados recentemente, apontam as chalconas com atividade antiparasitária muito relevantes (HERMOSO *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2003; LUNARDI *et al.*, 2003; PIÑERO *et al.*, 2006).

5. CONCLUSÃO

Do estudo fitoquímico da fase em diclorometano do extrato etanólico das folhas de *Myrcia hiemalis*, foram isolados sete componentes não voláteis: miricitrina, daucosterol, 2',4'-diidróxi-3',5'-dimetil-6'-metóxicalcona, 2',6'-diidróxi-3'-metil-4'-metóxicalcona, 2',3',4'-triidróxi-5'-metil-6'-metóxicalcona, 7-hidróxi-6,8-dimetil-5-metóxi-flavanona e 5,7-diidróxi-6,8-dimetil-flavanona.

Os resultados preliminares dos ensaios biológicos realizados revelaram que aalcona 2',4'-diidróxi-3',5'-dimetil-6'-metóxicalcona (Substância III) apresentou potente atividade contra a bactéria *Micrococcus luteus* (12,5 µg/mL) e também contra os parasitos *Trypanosoma cruzi* (IC₅₀ 13,12 µM) e *Leishmania amazonensis* (100% inibição a 50 µM), aalcona 2',6'-diidróxi-5'-metil-4'-metóxicalcona (Substância IV) foi eficiente contra protozoário *T. cruzi* (IC₅₀ 35,95 µM), e a flavanona 7-hidróxi-6,8-dimetil-5-metóxi-flavanona (Substância VI) apresentou atividade relevante contra as bactérias gram-positivas *Micrococcus luteus* (25 µg/mL) e *Bacillus subtilis*. (25 µg/mL).

O estudo também contribuiu para o conhecimento químico do gênero *Myrcia*, pois a espécie *M. hiemalis* ainda não havia sido estudada quimicamente.