

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Estudo Fitoquímico e Avaliação das Atividades
Antimicrobianas e Antiparasitárias dos Flavonóides Isolados
de *Myrcia hiemalis* (Myrtaceae)**

PAULO DANIEL SILVA

Salvador
2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Estudo Fitoquímico e Avaliação das Atividades Antimicrobianas e Antiparasitárias dos Flavonóides Isolados de *Myrcia hiemalis* (Myrtaceae)

Paulo Daniel Silva

Orientador: Dr. Frederico Guaré Cruz

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia para obtenção do grau de Mestre em Química, área de concentração em Química Orgânica.

Salvador
2007

Dedico este trabalho aos meus pais,
Victor e Araci,
meus irmãos, Márcio e Gisele,
e avós, Etel e Eva,
por todo carinho e apoio.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Frederico Guaré Cruz, pela amizade, confiança e orientação.

A Prof. Maria Lenise da Silva Guedes pela identificação da espécie *Myrcia hiemalis*.

Ao Dr. Marcos A. Vannier-Santos, Eliomara, Tereza Cristina e Diego, pelas colaborações e ensinamentos.

A Giselle, Lourdes, Mayara, Isley, Jailton, Eduardo e Fernando, pelas contribuições a este trabalho.

Aos colegas dos Laboratórios 104 e 119, pela amizade e valorosos ensinamentos.

Aos colegas e amigos do Departamento de Química Orgânica, pela excelente convivência.

A todos meus amigos que acreditam e confiam em mim.

A CNPq, FAPESB, FINEP e CAPES pelo indispensável auxílio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A Família Myrtaceae	4
1.1.1. O Gênero <i>Myrcia</i>	5
1.2. A Química da Família Myrtaceae	6
1.2.1. A Química do Gênero <i>Myrcia</i>	13
1.3. Flavonóides	18
2. OBJETIVOS	23
3. PARTE EXPERIMENTAL	24
3.1. Material Vegetal – <i>Myrcia hiemalis</i>	24
3.2. Reagentes e Equipamentos	25
3.3. Obtenção do Extrato Etanólico e das Fases em Hexano, Diclorometano, Acetato de Etila e n-Butanol	26
3.4. Fracionamento da Fase em Diclorometano das Folhas de <i>Myrcia hiemalis</i> e Isolamento dos Constituintes Químicos	28
3.5. Ensaio Biológicos	38
3.5.1. Método da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	38
3.5.2. Ensaio Anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	39
3.5.3. Ensaio Anti- <i>Leishmania</i>	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1. Constituintes Químicos Isolados	41
4.1.1. Identificação e Determinação Estrutural dos Constituintes Químicos Isolados	43
4.1.1.1. Identificação da Substância I: Miricitrina	43
4.1.1.2. Identificação da Substância II: Daucosterol	50

4.1.1.3. Identificação da Substância III: 2',4'-diidróxi- 3',5'-dimetil-6'-metóxicalcona	57
4.1.1.4. Identificação da Substância IV: 2',6'-diidróxi- 3'-metil-4'-metóxicalcona	62
4.1.1.5. Identificação da Substância V: 2',3',4'-triidróxi- 5'-metil-6'-metóxicalcona	69
4.1.1.6. Identificação da Substância VI: 7-hidróxi- 6,8-dimetil-5-metóxi-flavanona	76
4.1.1.7. Identificação da Substância VII: 5,7-didróxi- 6,8-dimetilflavanona	81
4.2. Considerações Gerais	86
4.3. Ensaio Biológicos	88
4.3.1. Concentração Inibitória Mínima (CIM)	88
4.3.2. Ensaio Anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	90
4.3.3. Ensaio Anti- <i>Leishmania</i>	91
5. CONCLUSÃO	92
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Alguns constituintes químicos fixos obtidos de plantas da família Myrtaceae	06
Tabela 02: Alguns constituintes químicos fixos relatados para o gênero <i>Myrcia</i>	14
Tabela 03: Dados de RMN ^{13}C (75 MHz) e ^1H (300 MHz) da miricitrina, CD_3OD , δ (ppm)	46
Tabela 04: Dados de RMN ^{13}C (75 MHz) e ^1H (300 MHz) do daucosterol, Piridina- d_5 e CD_3OD , δ (ppm)	53
Tabela 05: Dados de RMN ^{13}C (75 MHz) e ^1H (300 MHz) da 2',4'-diidróxi-3',5'-dimetil-6'-metóxicalcona, CDCl_3 , δ (ppm)	59
Tabela 06: Dados de RMN ^{13}C (75 MHz) e ^1H (300 MHz) da 2',6'-diidróxi-4'-metóxi-3'-metilalcona, acetona- d_6 , δ (ppm)	65
Tabela 07: Dados de RMN ^1H (300 MHz) da 2',3',4'-triidróxi-5'-metil-6'-metóxicalcona, CDCl_3 , δ (ppm)	72
Tabela 08: Dados de RMN ^{13}C (75 MHz) e ^1H (300 MHz) da 7-hidróxi-6,8-dimetil-5-metóxi-flavanona, acetona- d_6 , δ (ppm)	78
Tabela 09: Dados de RMN ^{13}C (75 MHz) e ^1H (300 MHz) da 5,7-diidróxi-6,8-dimetilflavanona, CDCl_3 , δ (ppm)	83
Tabela 10: Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) do extrato etanólico e fases em hexano e diclorometano das folhas de <i>Myrcia hiemalis</i>	88
Tabela 11: Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) das substâncias isoladas das folhas de <i>Myrcia hiemalis</i>	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Espécime de <i>Myrcia hiemalis</i> _____	05
Figura 02: Diferentes classes de flavonóides _____	19
Figura 03: Rota biossintética da flavanona _____	20
Figura 04: Flavonas e flavonóis a partir da flavanona como intermediário comum _____	21
Figura 05: Vista do local da coleta na Área de Proteção Ambiental da Lagoa do Abaeté – Salvador, BA _____	24
Figura 06: Partes aéreas de <i>M. hiemalis</i> _____	24
Figura 07: Esquema de obtenção do extrato etanólico e das fases em hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol das folhas de <i>Myrcia hiemalis</i> _____	27
Figura 08: Esquema geral do fracionamento da fase em diclorometano (DCM) das folhas de <i>Myrcia hiemalis</i> _____	31
Figura 09: Esquema de isolamento da Substância II _____	32
Figura 10: Esquema de isolamento da Substância III _____	33
Figura 11: Esquema de isolamento da Substância IV _____	34
Figura 12: Esquema de isolamento da Substância V _____	35
Figura 13: Esquema de isolamento da Substância VI _____	36
Figura 14: Esquema de isolamento da Substância VII _____	37
Figura 15: Constituintes químicos isolados das folhas de <i>M. hiemalis</i> _____	42
Figura 16: Estrutura da miricitrina _____	43
Figura 17: Espectro de RMN ¹ H da miricitrina, CD ₃ OD, 300 MHz _____	47
Figura 18: Ampliação do espectro de RMN ¹ H da miricitrina, CD ₃ OD, 300 MHz _____	47
Figura 19: Espectro de RMN ¹³ C da miricitrina, CD ₃ OD, 75 MHz _____	48
Figura 20: Ampliação do espectro de RMN ¹³ C da miricitrina (90 a 180 ppm), CD ₃ OD, 75 MHz _____	48
Figura 21: Espectro de RMN de HMQC da miricitrina, CD ₃ OD, 300 MHz _____	49
Figura 22: Estrutura do daucosterol _____	50
Figura 23: Esquema simplificado da biossíntese do daucosterol _____	52

Figura 24: Espectro de RMN ^1H do daucosterol, piridina- d_5 e CD_3OD , 300 MHz	53
Figura 25: Ampliação do espectro de RMN ^1H do daucosterol, piridina- d_5 e CD_3OD , 300 MHz	53
Figura 26: Espectro de RMN ^{13}C do daucosterol, piridina- d_5 e CD_3OD , 75 MHz	54
Figura 27: Espectro de DEPT 135 do daucosterol, piridina- d_5 e CD_3OD , 75 MHz	54
Figura 28: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C do daucosterol (0 a 45 ppm), piridina- d_5 e CD_3OD , 75 MHz	55
Figura 29: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C do daucosterol (71 a 80 ppm), piridina- d_5 e CD_3OD , 75 MHz	55
Figura 30: Estrutura da chalcona 2',4'-diidróxi-3',5'-dimetil-6'-metóxicalcona	57
Figura 31: NOE diferencial observado pela irradiação dos hidrogênios do grupo metoxílico	58
Figura 32: Espectro de RMN ^1H da 2',4'-diidróxi-3',5'-dimetil-6'-metóxicalcona, CDCl_3 , 300 MHz	60
Figura 33: Ampliação do espectro de RMN ^1H da 2',4'-diidróxi-3',5'-dimetil-6'-metóxicalcona, CDCl_3 , 300 MHz	60
Figura 34: Espectro de RMN ^{13}C da 2',4'-diidróxi-3',5'-dimetil-6'-metóxicalcona, CDCl_3 , 75 MHz	61
Figura 35: Espectro de NOE diferencial por irradiação dos hidrogênios do grupo metoxílico da 2',4'-diidróxi-3',5'-dimetil-6'-metóxicalcona, CDCl_3 , 300 MHz	61
Figura 36: Estrutura da chalcona 2',6'-diidróxi-3'-metil-4'-metóxicalcona	62
Figura 37: 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)	64
Figura 38: NOE diferencial observado (a) pela irradiação hidrogênio ligado ao carbono aromático do anel B e (b) pela irradiação dos hidrogênios do grupo metoxílico	64
Figura 39: Espectro de RMN ^1H da 2',6'-diidróxi-3'-metil-4'-metóxicalcona, acetona- d_6 , 300 MHz	66

Figura 40: Ampliação do espectro de RMN ^1H da 2',6'-diidróxi-3'-metil-4'-metóxicalcona, acetona- d_6 , 300 MHz	66
Figura 41: Espectro de RMN ^{13}C da 2',6'-diidróxi-3'-metil-4'-metóxicalcona, acetona- d_6 , 75 MHz	67
Figura 42: Espectro de NOE diferencial por irradiação do hidrogênio ligado ao anel aromático B da 2',6'-diidróxi-3'-metil-4'-metóxicalcona, acetona- d_6 , 300 MHz	67
Figura 43: Espectro de NOE diferencial por irradiação do hidrogênio olefínico β carbonílico da 2',6'-diidróxi-3'-metil-4'-metóxicalcona, acetona- d_6 , 300 MHz	67
Figura 44: Espectro de NOE diferencial por irradiação dos hidrogênios do grupo metoxílico da 2',6'-diidróxi-3'-metil-4'-metóxicalcona, acetona- d_6 , 300 MHz	68
Figura 45: Ampliação do espectro de HMBC da 2',6'-diidróxi-3'-metil-4'-metóxicalcona, acetona- d_6 , 300 MHz	68
Figura 46: Estrutura da chalcona 2',3',4'-triidróxi-5'-metil-6'-metóxicalcona	69
Figura 47: Correlação heteronuclear spin-spin a longa distância ($^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$) observada de átomos de carbono e hidrogênio (HMBC)	69
Figura 48: NOE diferencial observado pela irradiação do hidrogênio olefínico β carbonílico	69
Figura 49: Espectro de RMN ^1H da 2',3',4'-triidróxi-5'-metil-6'-metóxicalcona, CDCl_3 , 300 MHz	73
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	73
Figura 51: Ampliação do espectro de RMN ^1H da 2',3',4'-triidróxi-5'-metil-6'-metóxicalcona, CDCl_3 , 300 MHz	74
Figura 52: Espectro de RMN ^{13}C da 2',3',4'-triidróxi-5'-metil-6'-metóxicalcona- (a) região de 15 a 180 ppm e (b) região de 0 a 20 ppm, CDCl_3 , 300 MHz	74
Figura 53: Ampliação do espectro de HMBC da 2',3',4'-triidróxi-5'-metil-6'-metóxicalcona, CDCl_3 , 300 MHz	75
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'-metóxicalcona, CDCl_3 , 300 MHz	75

Figura 55: Espectro de NOE diferencial por irradiação do hidrogênio olefínico β carbonílico da 2',3',4'-triidróxi-5'-metil-6'-metóxicalcona, CDCl_3 , 300 MHz _____	75
Figura 56: Estrutura da flavanona 7-hidróxi-6,8-dimetil-5-metóxilflavanona _____	76
Figura 57: Espectro de RMN ^1H da 7-hidróxi-6,8-dimetil-5-metóxilflavanona, acetona- d_6 , 300 MHz _____	79
Figura 58: Ampliação do espectro de RMN ^1H da 7-hidróxi-6,8-dimetil-5-metóxilflavanona – região de (a) 5,2 a 5,8 ppm e de (b) 2,6 a 3,1 ppm, acetona- d_6 , 300 MHz _____	79
Figura 59: Espectro de RMN ^{13}C da 7-hidróxi-6,8-dimetil-5-metóxilflavanona, acetona- d_6 , 75 MHz _____	80
Figura 60: Estrutura da flavanona 5,7-diidroxi-6,8-dimetilflavanona _____	81
Figura 61: Espectro de RMN ^1H da 5,7-diidroxi-6,8-dimetilflavanona, CDCl_3 , 300 MHz _____	84
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, CDCl_3 , 300 MHz _____	84
Figura 63 : Espectro de RMN ^{13}C da 5,7-diidroxi-6,8-dimetilflavanona, CDCl_3 , 75 MHz _____	85
Figura 64: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C da 5,7-hidroxi-6,8-dimetil-7-metoxiflavanona – região entre 100 e 198 ppm, CDCl_3 , 75 MHz _____	85
Figura 65: Rota biossintética da flavanona a partir do cinamoil-CoA _____	87
Figura 66: Resultados anti- <i>T. cruzi</i> com IC_{50} das substâncias III, IV e VI _____	91

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt – Acetato de etila

Acetona-d₆ – Acetona deuterada

CC – Cromatografia em coluna

CCDC – Cromatografia em camada delgada comparativa

CCDP – Cromatografia em camada delgada preparativa

CD – Camada delgada

CDCl₃ – Clorofórmio deuterado

CD₃OD – Metanol deuterado

CoA – Coenzima A

d – Duplete

δ – Deslocamento químico em partes por milhão

DCM – Diclorometano

DMSO – Dimetilsulfóxido

dd – Duplo duplete

DEPT – Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (Intensificação do sinal sem distorção por transferência de polarização)

HMBC – Correlation spectroscopy via long-range coupling [Espectro de correlação heteronuclear (¹³C – ¹H) a duas e três ligações (²J, ³J)]

HMQC – Heteronuclear Multiple Quantum Coherence (Espectro de coerência heteronuclear múltiplo-quântica)

Hz – Hertz

IPP – Isopentenyl diphosphate (difosfato de isopentenila)

J – Constante de acoplamento (Hz)

m – Multiplete

NOE – Nuclear Overhauser Effect [Efeito Overhauser nuclear (¹H-RMN)]

Piridina-d₅ – Piridina deuterada

PP – Difosfato

ppm – Partes por milhão

RMN – Ressonância magnética nuclear

t - Tripleto

RESUMO

O presente trabalho descreve o estudo fitoquímico da fase em diclorometano dos componentes fixos das folhas de *Myrcia hiemalis*, bem como os ensaios biológicos realizados com o extrato etanólico, fases em diclorometano e hexano e substâncias isoladas. A espécie *M. hiemalis* está sendo estudada quimicamente pela primeira vez.

Do estudo fitoquímico da fase em diclorometano das folhas de *Myrcia hiemalis* foram isolados e identificados sete componentes não-voláteis: miricitrina, daucosterol, 2',4'-diidróxi-3',5'-dimetil-6'-metóxicalcona, 2',6'-diidróxi-3'-metil-4'-metóxicalcona, 2',3',4'-diidróxi-5'-metil-6'-metóxicalcona, 7-hidróxi-6,8-dimetil-5-metóxi-flavanona e 5,7-diidróxi-6,8-dimetilflavanona. As estruturas das substâncias foram determinadas através das análises de diversas técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C .

Foram realizados testes antimicrobianos utilizando a técnica de Concentração Inibitória Mínima (CIM) com os microorganismos: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides*, *Candida albicans* e *Crinipellis pernicioso*. A fase em diclorometano apresentou atividade contra as bactérias Gram-positivas testadas e contra o fungo *Crinipellis pernicioso*. Das substâncias isoladas, apresentaram atividade antimicrobiana a 2',4'-diidróxi-3',5'-dimetil-6'-metóxicalcona contra *Micrococcus luteus* e a 7-hidróxi-6,8-dimetil-5-metóxi-flavanona contra *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus*.

Testes anti-*Trypanosoma cruzi* e anti-*Leishmania amazonensis* foram realizados com substâncias isoladas utilizando a técnica desenvolvida pela FIOCRUZ, sendo que a 2',4'-diidróxi-3',5'-dimetil-6'-metóxicalcona apresentou atividade contra os parasitos (anti-*T. cruzi*: IC_{50} 13,12 μM ; anti-*L. amazonensis*: 100% inibição a 50 μM) e a 2',6'-diidróxi-3'-metil-4'-metóxicalcona apresentou atividade contra *T. cruzi* (IC_{50} 35,95 μM).

ABSTRACT

The current work describes the phytochemistry study of the dichloromethane phase of the non-volatile components of *Myrcia hiemalis* leaves, as well as the biological assays carried out with ethanolic extract, hexane phase, dichloromethane phase and isolated substances. This is the first time *M. hiemalis* species is chemically studied.

Seven components not volatile had been isolated and identified from the phytochemistry study of the dichloromethane phase of the ethanolic extract of *Myrcia hiemalis* leaves, as they follow: myricitrin, daucosterol, 2',4'-dihydroxy-3',5'-dimethyl-6'-methoxychalcone, 2',6'-dihydroxy-3'-methyl-4'-methoxychalcone, 2',3',4'-dihydroxy-5'-methyl-6'-methoxychalcone, 7-hydroxy-6,8-dimethyl-5-methoxyflavanone and 5,7-dihydroxy-6,8-dimethylflavanone. The structures of the substances were determined through the analyses of diverse NMR techniques of ^1H and ^{13}C .

Antimicrobial tests were carried out using the technique of Minimal Inhibitory Concentration (MIC) with the following microorganisms: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides*, *Candida albicans* and *Crinipellis perniciosus*. The dichloromethane phase presented activity against the tested Gram-positive bacteria as well as the fungus *Crinipellis perniciosus*. The 2',4'-dihydroxy-3',5'-dimethyl-6'-methoxychalcone presented antimicrobial activity against *Micrococcus luteus* and the substance 7-hydroxy-6,8-dimethyl-5-methoxyflavanone acted against *Bacillus subtilis* and *Micrococcus luteus*.

Anti-*Trypanosoma cruzi* and anti-*Leishmania amazonensis* tests were done with isolated substances using a technique developed for the FIOCRUZ. It was observed a activity of 2',4'-dihydroxy-3',5'-dimethyl-6'-methoxychalcone against both parasites (anti-*T. cruzi*: IC_{50} 13,12 μM ; anti-*L. amazonensis*: 100% inhibition in 50 μM) and 2',6'-dihydroxy-3'-methyl-4'-methoxychalcone presented activity against *T. cruzi*. (IC_{50} 35,95 μM).

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies de um total estimado entre 350.000 e 550.000 espécies no planeta. Várias dessas espécies são endêmicas de uma região e ainda não foram avaliadas do ponto de vista fitoquímico e farmacológico (SIMÕES e MARIOT, 2003).

O estudo químico das plantas tem sido um aliado de extrema importância no desenvolvimento das áreas farmacêutica, química, agrícola, alimentícia, entre outras, bem como, para entender a evolução das espécies e as relações estrutura-atividade. O desenvolvimento das áreas da saúde e agrônômicas se deve muito a descobertas de novas drogas e o entendimento da ação biológica.

Os países tropicais em desenvolvimento são afetados por doenças parasitárias que infectam milhares de pessoas e são consideradas negligenciadas pela indústria farmacêutica, pois afetam, na maioria dos casos, pessoas que vivem em condições precárias. Dentre estas, merecem atenção especial a leishmaniose e a doença de Chagas.

A leishmaniose é causada por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. Essa doença afeta a pele, causa úlceras no rosto, nos braços e pernas, o que resulta em sérias deficiências físicas e problemas sociais. A leishmaniose mucocutânea, sempre derivada da forma cutânea, causa ulceração, seguida da destruição de membranas mucosas e do tecido do nariz, da boca e da garganta. Ela pode levar à morte por infecção secundária das vias respiratórias. A leishmaniose cutânea e a mucocutânea se espalharam na América Latina desde a época dos Incas: as máscaras fúnebres sem nariz dão o testemunho da presença desta doença “que come a carne” (ALTAMIRANO-ENCISO *et al.*, 2003). O Peru é um dos países mais afetados por leishmaniose cutânea e mucocutânea. A Bolívia, o Brasil e o Peru contabilizam 90% de todos os casos mundiais. O número de pessoas infectadas aumentou consideravelmente desde o início dos anos 80, seguindo a migração sazonal de agricultores em grande escala (Fonte: website DNDi). Estima-se que existam aproximadamente 12 milhões de casos nos países tropicais e subtropicais e que 350 milhões de pessoas estejam em situação de risco da infecção (HIRST e STAPLEY, 2000). Portadores do vírus HIV são

potencialmente susceptíveis de contrair essa doença oportunista e estima-se que afeta 2-7% dos pacientes com AIDS (MONTALBAN *et al.*, 1990; DESJEUX, 2001).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a leishmaniose está entre as seis mais importantes doenças tropicais (BORST e OULLETTE, 1995; GALLAGHER *et al.*, 1994).

A doença de Chagas causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* afeta 16-18 milhões de pessoas na América do Sul e América Central, sendo mais de 5 milhões no Brasil e estima-se que 100 milhões estão em risco de infecção (COURA *et al.*, 2002). Como no caso da leishmaniose, a doença de Chagas também é considerada negligenciada, pelo mesmo motivo: a maioria dos pacientes vive em condições de extrema pobreza (LUNARDI *et al.*, 2003). A doença possui duas fases: uma fase aguda e outra crônica. Na fase aguda, após um período de incubação variável do *Tripanosoma*, mas de não menos que uma semana, ocorre febre, ínguas por todo o corpo, inchaço do fígado e do baço e um vermelhidão no corpo semelhante a uma alergia e que dura pouco tempo. Nesta fase, nos casos mais graves, pode ocorrer inflamação do coração com alterações do eletrocardiograma e número de batimentos por minuto aumentado. Ainda nos casos mais graves o paciente pode desenvolver sintomas de meningite e de encefalite. Os casos fatais são raros, mas, quando ocorrem, são nesta fase em decorrência da inflamação do coração ou do cérebro. Mesmo sem tratamento, a doença fica mais branda e os sintomas desaparecem após algumas semanas ou meses. A fase crônica da doença é caracterizada por manifestações de arritmias, perda da capacidade de “bombeamento” do coração, progressivamente, até causar desmaios, podendo evoluir para arritmias cardíacas fatais. O coração pode aumentar bastante, tornando inviável seu funcionamento. Outras manifestações desta fase podem ser o aumento do esôfago e do intestino grosso, causando dificuldades de deglutição, engasgos e pneumonias por aspiração e constipação crônica e dor abdominal (Fonte: website ABC da Saúde; TARTAROTTI *et al.*, 2004).

Mesmo com o aumento de casos dessas doenças tropicais, principalmente leishmaniose e tripanossomíase, os estudos para a descoberta de novas drogas ou vacinas estão pouco desenvolvidos. As drogas em uso para os pacientes foram desenvolvidas há várias décadas, apresentam eficácia variável, têm sérios efeitos colaterais, os tratamentos são longos e a cura normalmente não é alcançada (COSTA-PINTO *et al.*, 2001; CROFT, 1997). Além disso, o parasito pode desenvolver resistência às drogas (OPPERDOES, 1994).

Sendo assim, há extrema necessidade da descoberta e do desenvolvimento de novas drogas efetivas e de baixo custo, bem como seguras para o tratamento das doenças parasitárias.

A revisão da literatura revelou que a espécie *Myrcia hiemalis* ainda não foi estudada quimicamente. Sendo assim, o presente trabalho apresenta o estudo fitoquímico das folhas da espécie *Myrcia hiemalis* e alguns bioensaios antibacterianos, fungitóxicos e antiparasitários dos extratos e das substâncias isoladas, além de contribuir para o conhecimento químico do gênero *Myrcia*.

1.1. A Família Myrtaceae

A família Myrtaceae, inserida na ordem Myrtales, compreende cerca de 4500 espécies, distribuídas em mais de 150 gêneros (BARROSO *et al.*, 1991), sendo a segunda maior família da ordem, após a família Melastomataceae. Há dois grandes centros de dispersão das espécies da família Myrtaceae: nas Américas, especialmente na parte da América que possui clima tropical (BARROSO *et al.*, 1991) e no sul da Austrália, onde predomina o clima temperado (CRONQUIST, 1981). Entretanto, apesar de menos freqüentes em regiões de clima temperado (BARROSO *et al.*, 1991), com exceção de parte da Austrália com este clima, as mirtáceas ocorrem em praticamente todo o mundo (JOLY, 1966).

As mirtáceas são plantas lenhosas, arbustivas ou arbóreas, com folhas inteiras, de disposição alterna ou oposta e às vezes oposta cruzada, com estípulas muito pequenas. As folhas apresentam glândulas oleíferas. As flores são em geral brancas ou às vezes vermelhas. Produzem fruto baciforme ou capsular loculicida (JOLY, 1966).

Alguns exemplos mais conhecidos no Brasil são goiabeira e araçazeiro (*Psidium*), jabuticabeira (*Myrciaria*), pitangueira, grumixameira e cerejeira-nacional (*Eugenia*) (JOLY, 1966).

Dentre as mirtáceas cultivadas no Brasil, destacam-se as do gênero *Eucalyptus*, com muitas espécies produtoras de madeira, essências importantes, além de espécies ornamentais, e do gênero *Syzygium*, representado, entre outras, pelo cravo-da-índia, cujos botões florais são colhidos verdes para o preparo da inigualável especiaria. Outras cultivadas são o jameleiro (*Syzygium*), jameiro (*Jambosa*), jameiro-vermelho (*Eugenia*), pimenteira-da-jamaica (*Pimenta*) e com certa raridade espécies de *Myrcia* (JOLY, 1966).

As mirtáceas brasileiras caracteristicamente possuem tronco de casca lisa, separando-se todo ano o ritidoma, que se renova com cada estação de crescimento. Florescem no início da primavera (JOLY, 1966).

A família Myrtaceae apresenta muitas espécies que produzem frutos carnosos, muito apreciados pela população. Na medicina popular, espécies dessa família são utilizadas pela população brasileira no tratamento de diversas enfermidades, destacando-se antidiabéticas, anti-reumáticas, antidiarréicas, adstringentes, antiinflamatórias e no tratamento de úlceras crônicas, hemorragias, febre, cistite e

uretrite. Entre as famílias de Angiospermae citadas, em número de espécies utilizadas, para fins medicinais no Brasil, a família Myrtaceae ocupa o terceiro lugar (CRUZ e KAPLAN, 2004).

1.1.1. O Gênero *Myrcia*

O gênero *Myrcia* é um dos maiores da família Myrtaceae sendo formado por mais de 300 espécies (CRONQUIST, 1981), com mais de 50 catalogadas nos herbários da Bahia. As espécies desse gênero apresentam panículas mircióides, constituídas de ramos opostos decussados (em forma de cruz) ou verticilados (inseridas em um só nó caulinar), sendo os inferiores geralmente mais longos, eretos ou patentes. Suas flores geralmente se dispõem em grupos de três em três, todas sésseis ou com pedicelo curto. Apresentam hispânico mais ou menos desenvolvido, formado pela parede do receptáculo floral que pode ser campanulado, afunilado, globoso, anguloso ou liso, prolongado ou não acima do ovário (BARROSO, 1991).

Algumas espécies deste gênero (*M. salicifolia*, *M. citrifolia*, *M. uniflora*, *M. multiflora* e *M. sphaerocarpa*) são popularmente conhecidas como pedra-hume-caá (planta insulina ou insulina vegetal) e são utilizadas na medicina popular para o tratamento de diabetes.

A espécie *Myrcia hiemalis* é um arbusto de aproximadamente 2 metros de altura com casca lisa e folhas discolors abundantes (Figura 01).



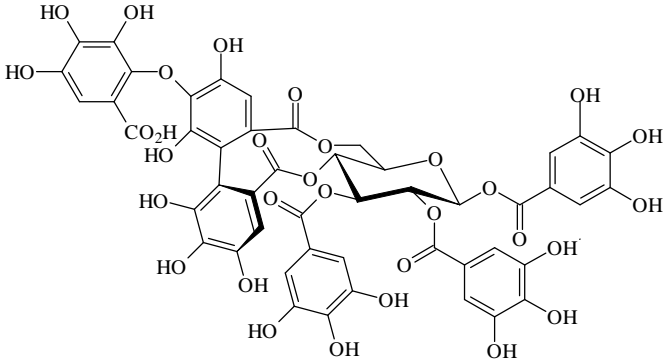
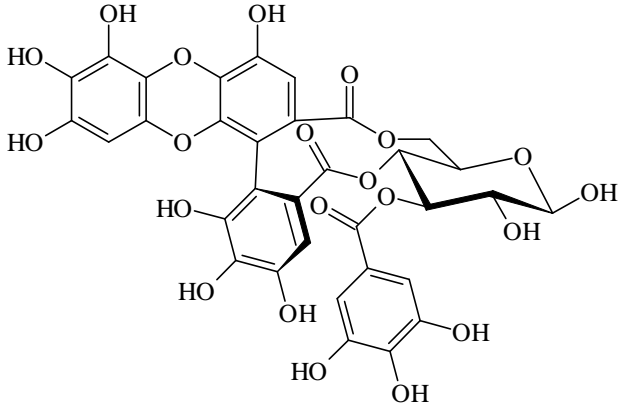
Figura 01: Espécime de *Myrcia hiemalis*

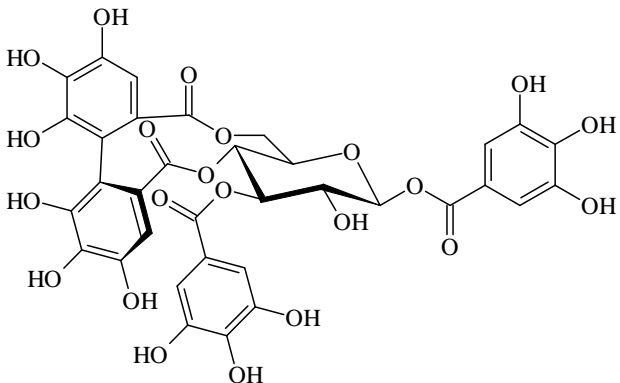
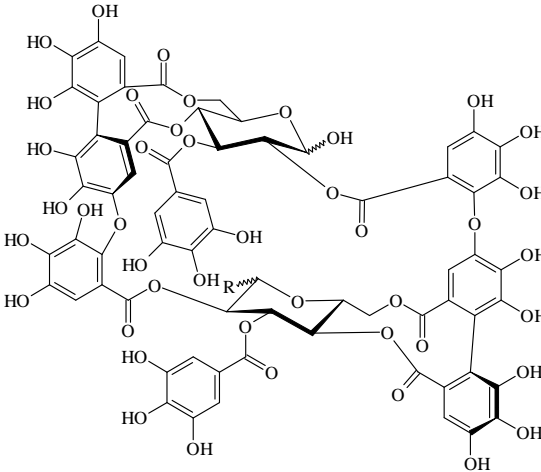
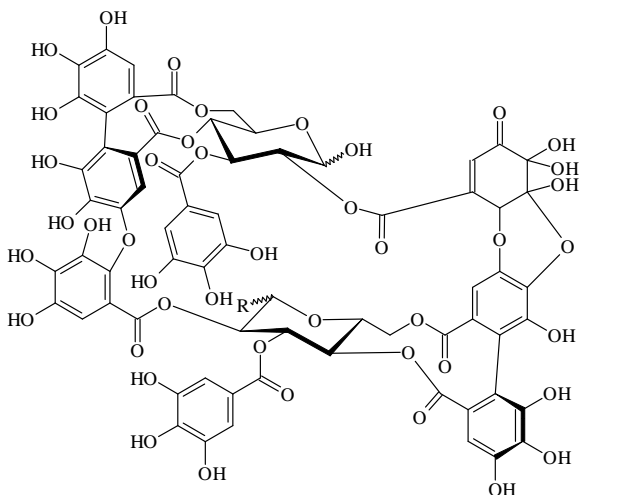
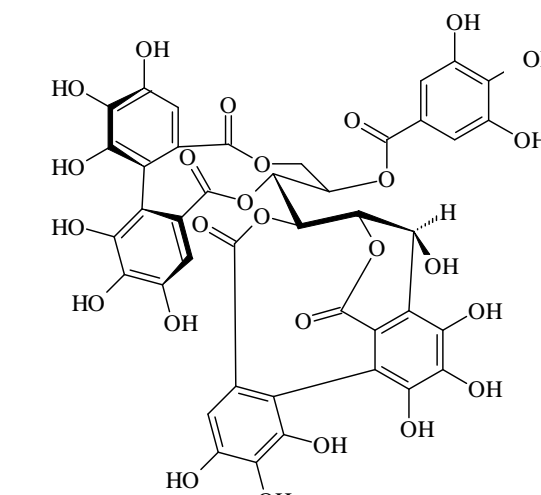
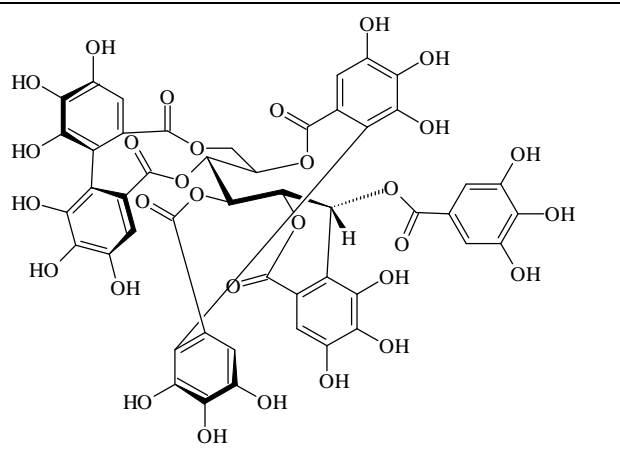
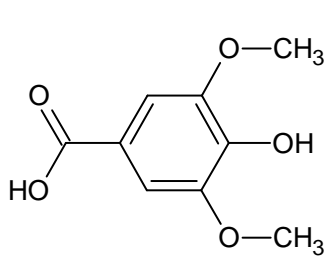
1.2. A química da família Myrtaceae

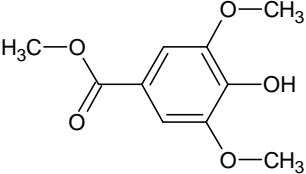
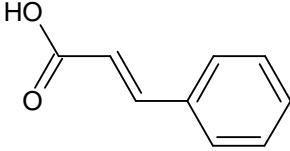
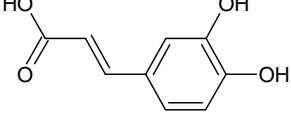
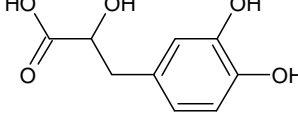
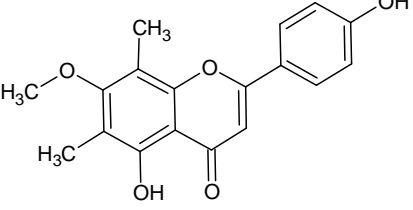
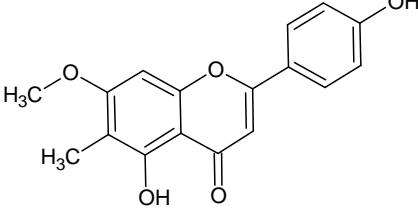
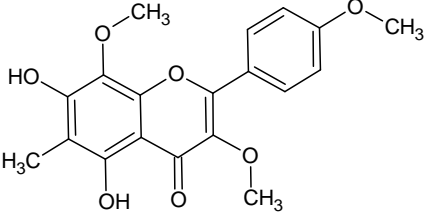
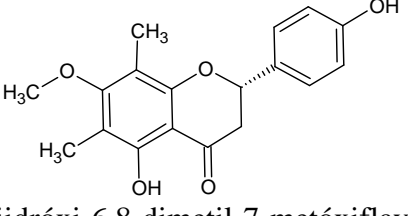
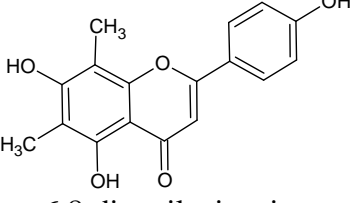
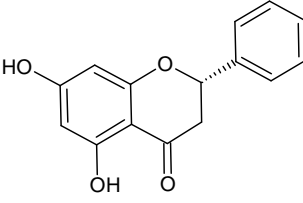
A família Myrtaceae é quimicamente muito diversa. As plantas pertencentes a esta família caracterizam-se pela produção de taninos, flavonóides, mono- e sesquiterpenos, triterpenóides, derivados do floroglucinol, cromenos, estilbenóides e outros (AMARAL *et al.*, 2001; FURUYA *et al.*, 1987; HÄBERLEIN e TSCHIERSCH, 1998; GOTTLIEB *et al.*, 1972; LEE, 1998; LEE *et al.*, 1997; MAYER, 1990; MUSTAFA *et al.*, 2003; MUSTAFA *et al.*, 2005; RAO e RAO, 1991; SANTOS *et al.*, 1997; SARKER *et al.*, 2001; SIDDIQUI *et al.*, 2000; SLOWING *et al.*, 1994; SRIVASTAVA *et al.*, 1995; TANAKA *et al.*, 1996; YANG *et al.*, 2000; YE *et al.*, 2004; YOSHIDA *et al.*, 1996; WANG e FUGIMOTO, 1993; WESTON *et al.*, 1999; WOLLENWEBER *et al.*, 2000) (Tabela 01).

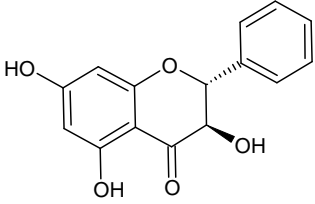
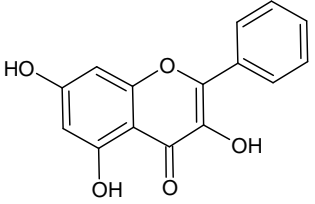
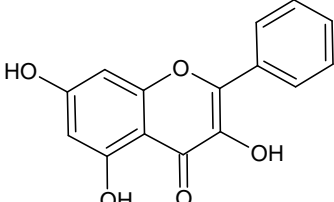
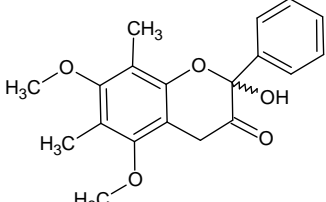
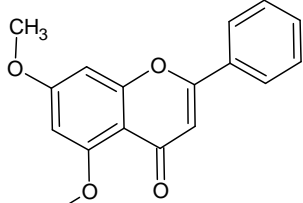
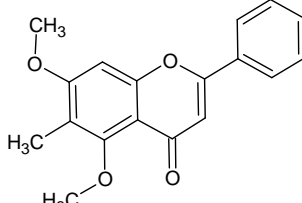
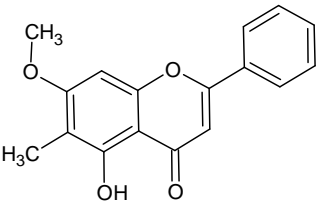
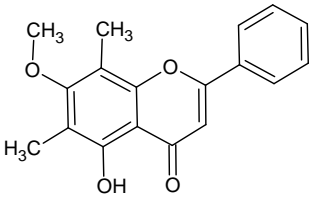
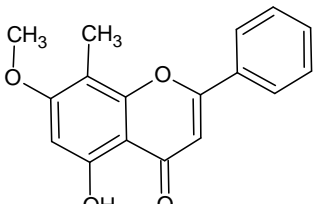
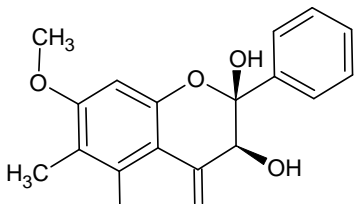
Considerando o grande número de espécies da família Myrtaceae, em torno de 4500, fica evidente que há muito ainda a ser estudado, principalmente em relação aos constituintes químicos fixos.

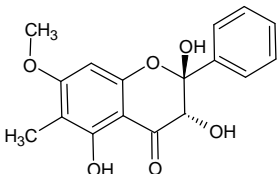
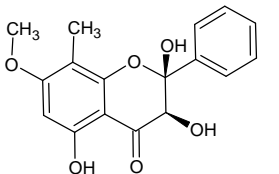
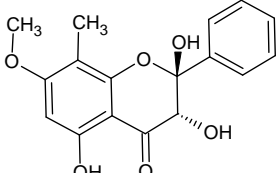
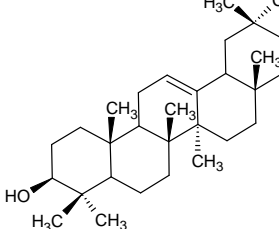
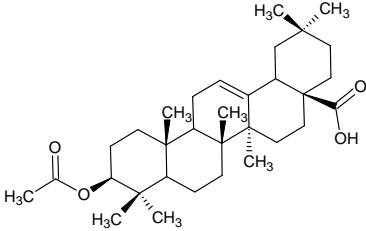
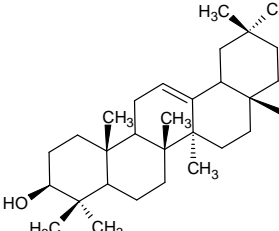
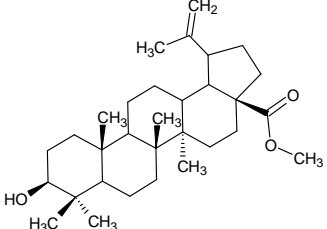
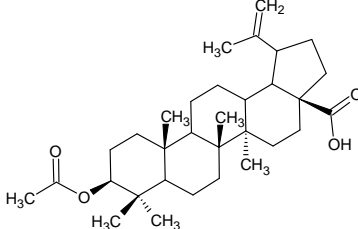
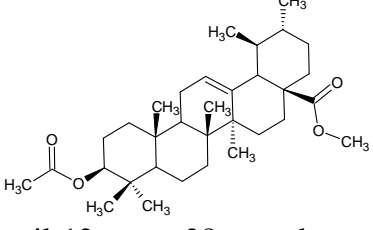
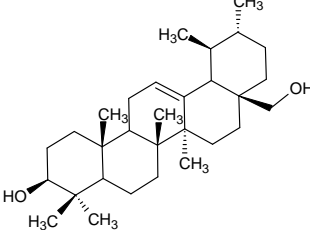
Tabela 01: Alguns constituintes químicos fixos obtidos de plantas da família Myrtaceae.

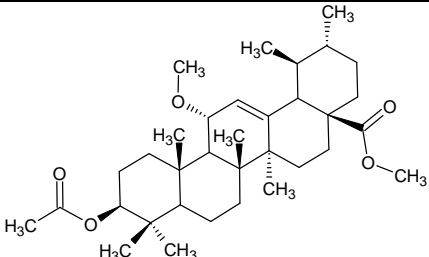
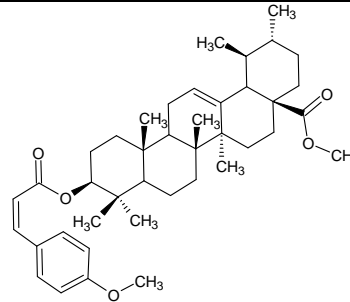
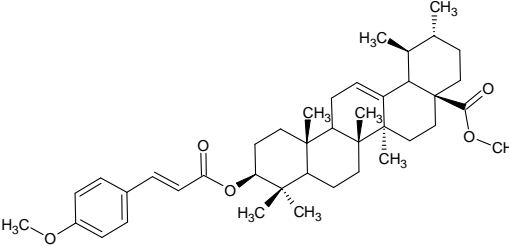
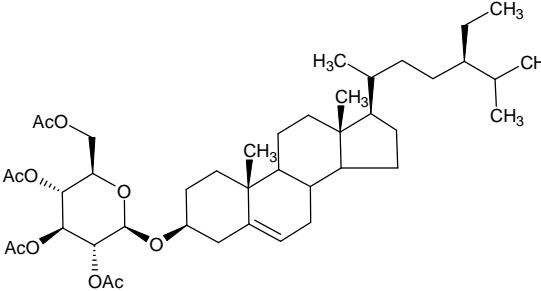
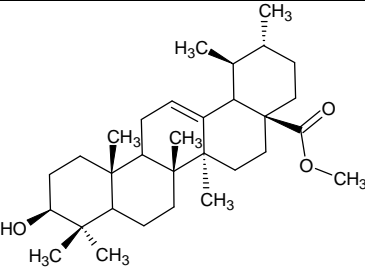
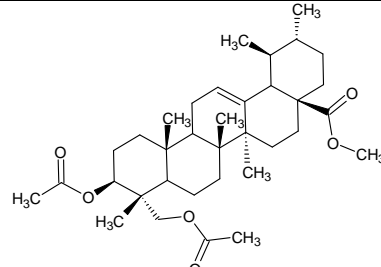
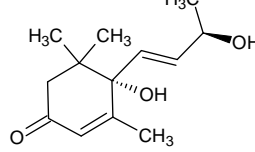
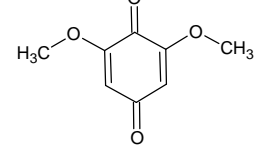
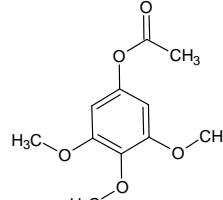
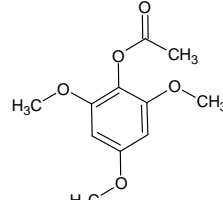
 <p style="text-align: center;">Syzyginina A</p>	 <p style="text-align: center;">Syzyginina B</p>
Espécie: <i>Syzygium aromaticum</i>	Espécie: <i>Syzygium aromaticum</i>
Referência: TANAKA <i>et al.</i> , 1996	Referência: TANAKA <i>et al.</i> , 1996

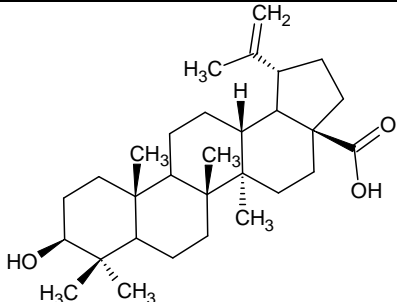
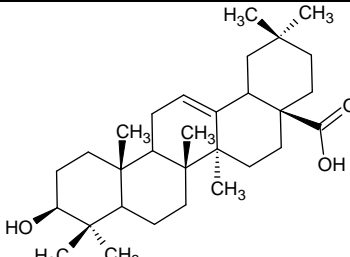
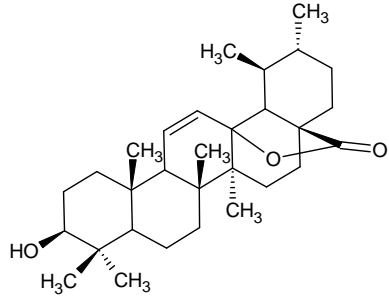
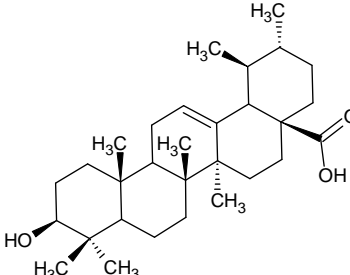
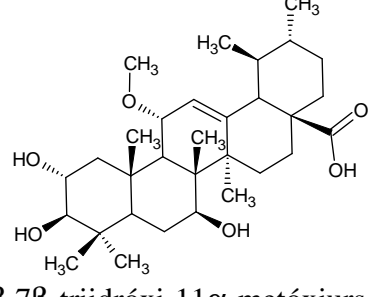
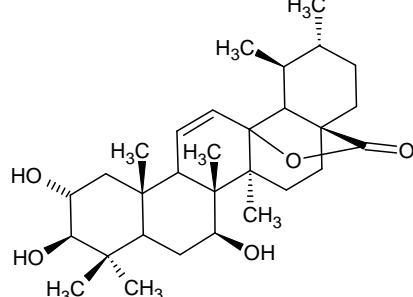
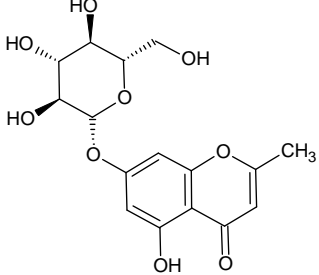
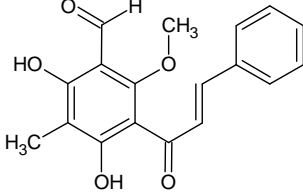
 <p style="text-align: center;">Telimagrandina</p>	 <p style="text-align: center;">Eugenioflogina D₁</p> <p>R= β-O-glicose</p>
<p>Espécie: <i>Melaleuca leucadendron</i> Referência: YOSHIDA <i>et al.</i>, 1996</p>	<p>Espécie: <i>Eugenia uniflora</i> Referência: LEE <i>et al.</i>, 1997</p>
 <p style="text-align: center;">Eugenioflogina D₂</p> <p>R= β-O-glicose</p>	 <p style="text-align: center;">1-O-galoil castalagina</p>
<p>Espécie: <i>Eugenia uniflora</i> Referência: LEE <i>et al.</i>, 1997</p>	<p>Espécie: <i>Eugenia jambos</i> Referência: YANG <i>et al.</i>, 2000</p>
 <p style="text-align: center;">Casuarinina</p>	 <p style="text-align: center;">Ácido siríngico</p>
<p>Espécie: <i>Eugenia jambos</i> Referência: YANG <i>et al.</i>, 2000</p>	<p>Espécie: <i>Liptospermum scoparium</i> Referência: WESTON <i>et al.</i>, 1999</p>

 <p>Siringato de metila</p>	 <p>Ácido cinâmico</p>
Espécie: <i>Liptospermum scoparium</i>	Espécie: <i>Liptospermum scoparium</i>
Referência: WESTON <i>et al.</i> , 1999	Referência: WESTON <i>et al.</i> , 1999
 <p>Ácido cafeico</p>	 <p>Ácido 2-hidróxi-3-(3,4-diidróxifenil)-propanóico</p>
Espécie: <i>Liptospermum scoparium</i>	Espécie: <i>Liptospermum scoparium</i>
Referência: WESTON <i>et al.</i> , 1999	Referência: WESTON <i>et al.</i> , 1999
 <p>Sideroxilina</p>	 <p>8-desmetil-sideroxilina</p>
Espécies: <i>Callistemon coccineus</i> ; <i>Eucalyptus saligna</i> <i>Eucalyptus tereticornis</i>	Espécies: <i>Eucalyptus saligna</i> <i>Eucalyptus tereticornis</i>
Referências: WOLLENWEBER <i>et al.</i> , 2000; SARKER <i>et al.</i> , 2001; WANG e FUGIMOTO, 1993	Referências: SARKER <i>et al.</i> , 2001; WANG e FUGIMOTO, 1993
 <p>5,7-diidróxi-6-metil-3,8,4'-trimetoxiflavona</p>	 <p>5,4'-diidróxi-6,8-dimetil-7-metóxi- flavanona (angoforol)</p>
Espécie: <i>Metrosideros robusta</i>	Espécie: <i>Callistemon coccineus</i>
Referência: WOLLENWEBER <i>et al.</i> , 2000	Referência: WOLLENWEBER <i>et al.</i> , 2000
 <p>6,8-dimetilapigenina</p>	 <p>Pinocembrina</p>
Espécies: <i>Callistemon acuminatus</i> ; <i>Callistemon juniperinus</i> ; <i>Callistemon rigidus</i> ; <i>Callistemon salignus</i> ; <i>Syzygium alternifolia</i>	Espécie: <i>Leptospermum scoparium</i>
Referências: WOLLENWEBER <i>et al.</i> , 2000; RAO e RAO, 1991	Referências: MAYER, 1990; WESTON <i>et al.</i> , 1999

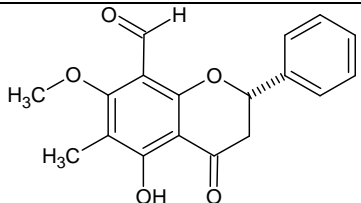
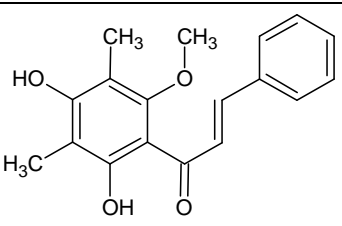
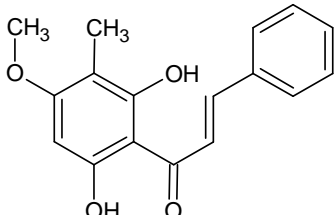
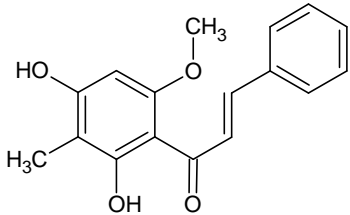
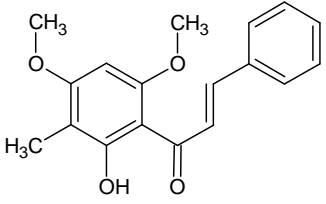
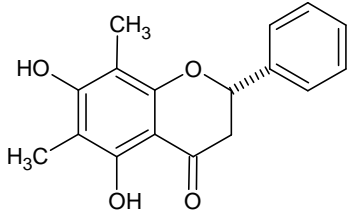
 <p>Pinobankisina</p>	 <p>Galangina</p>
Espécie: <i>Leptospermum scoparium</i>	Espécie: <i>Leptospermum scoparium</i>
Referência: MAYER, 1990	Referências: MAYER, 1990; WESTON <i>et al.</i> , 1999
 <p>Crisina</p>	 <p>2-hidroxi-6,8-dimetil-5,7-dimetoxiflavan-3-ona</p>
Espécie: <i>Leptospermum scoparium</i>	Espécie: <i>Leptospermum scoparium</i>
Referências: MAYER, 1990; WESTON <i>et al.</i> , 1999	Referência: HÄBERLEIN e TSCHIER SCH, 1998
 <p>5,7-dimetoxiflavona</p>	 <p>6-metil-5,7-dimetoxiflavona</p>
Espécie: <i>Leptospermum scoparium</i>	Espécie: <i>Leptospermum scoparium</i>
Referência: HÄBERLEIN e TSCHIER SCH, 1998	Referência: HÄBERLEIN e TSCHIER SCH, 1998
 <p>5-hidroxi-6-metil-7-metóxi flavona</p>	 <p>5-hidroxi-6,8-dimetil-7-metóxi flavona</p>
Espécie: <i>Leptospermum scoparium</i> <i>Leptospermum polygalifolium</i>	Espécie: <i>Leptospermum scoparium</i>
Referência: HÄBERLEIN e TSCHIER SCH, 1998; MUSTAFA <i>et al.</i> , 2003	Referência: HÄBERLEIN e TSCHIER SCH, 1998
 <p>5-hidroxi-8-metil-7-metóxi flavona</p>	 <p>Z-2,3,5-triidróxi-7-metóxi-6-metilflavanona</p>
Espécie: <i>Leptospermum polygalifolium</i>	Espécie: <i>Leptospermum polygalifolium</i>
Referência: MUSTAFA <i>et al.</i> , 2003	Referência: MUSTAFA <i>et al.</i> , 2003

 <p><i>E</i>-2,3,5-triidróxi-6-metil-7-metóxi-flavanona</p>	 <p><i>Z</i>-2,3,5-triidróxi-8-metil-7-metóxi-flavanona</p>
Espécie: <i>Leptospermum polygalifolium</i>	Espécie: <i>Leptospermum polygalifolium</i>
Referência: MUSTAFA <i>et al.</i> , 2003	Referência: MUSTAFA <i>et al.</i> , 2003
 <p><i>Z</i>-2,3,5-triidróxi-8-metil-7-metóxi-flavanona</p>	 <p>β-amirina</p>
Espécie: <i>Leptospermum polygalifolium</i>	Espécies: <i>Eucalyptus globulus</i> ; <i>Myrcia citrifolia</i>
Referência: MUSTAFA <i>et al.</i> , 2003	Referências: SANTOS <i>et al.</i> , 1997; GOTTLIEB <i>et al.</i> , 1972
 <p>Ácido β-O-acetiloleanólico</p>	 <p>Eritridiol</p>
Espécie: <i>Eucalyptus globulus</i>	Espécie: <i>Eucalyptus globulus</i>
Referência: SANTOS <i>et al.</i> , 1997	Referência: SANTOS <i>et al.</i> , 1997
 <p>Éster metílico do ácido betulínico</p>	 <p>Ácido 3-β-acetilbetulínico</p>
Espécie: <i>Eucalyptus globulus</i>	Espécie: <i>Eucalyptus globulus</i>
Referência: SANTOS <i>et al.</i> , 1997	Referência: SANTOS <i>et al.</i> , 1997
 <p>3-β-acetil-12-ursen-28-oato de metila</p>	 <p>Uvaol</p>
Espécie: <i>Eucalyptus globulus</i>	Espécies: <i>Eucalyptus globulus</i> ; <i>Leptospermum scoparium</i>
Referência: SANTOS <i>et al.</i> , 1997	Referências: SANTOS <i>et al.</i> , 1997; MAYER, 1990

 <p>3-β-acetil-11-α-metóxi-12-ursen-28-oato de metila</p>	 <p>3-β-cis-p-metóxicinamoil-12-ursen-28-oato de metila</p>
Espécie: <i>Eucalyptus globulus</i>	Espécie: <i>Eucalyptus globulus</i>
Referência: SANTOS <i>et al.</i> , 1997	Referência: SANTOS <i>et al.</i> , 1997
 <p>3-β-trans-p-metóxicinamoil-12-ursen-28-oato de metila</p>	 <p>Tetraacetil daucosterol</p>
Espécie: <i>Eucalyptus globulus</i>	Espécie: <i>Eucalyptus globulus</i>
Referência: SANTOS <i>et al.</i> , 1997	Referência: SANTOS <i>et al.</i> , 1997
 <p>3-β-hidróxi-12-ursen-28-oato de metila</p>	 <p>3-β, 23-diacetil-12-ursen-28-oato de metila</p>
Espécie: <i>Eucalyptus globulus</i>	Espécie: <i>Eucalyptus globulus</i>
Referência: SANTOS <i>et al.</i> , 1997	Referência: SANTOS <i>et al.</i> , 1997
 <p>Vomifoliol</p>	 <p>2,6-dimetoxi-p-benzoquinona</p>
Espécie: <i>Eucalyptus globulus</i>	Espécie: <i>Eucalyptus globulus</i>
Referência: SANTOS <i>et al.</i> , 1997	Referência: SANTOS <i>et al.</i> , 1997
 <p>Acetato de 3,4,5-trimetoxibenzeno</p>	 <p>Acetato de 2,4,6-trimetoxibenzeno</p>
Espécie: <i>Eucalyptus globulus</i>	Espécie: <i>Eucalyptus globulus</i>
Referência: SANTOS <i>et al.</i> , 1997	Referência: SANTOS <i>et al.</i> , 1997

 <p style="text-align: center;">Ácido betulínico</p>	 <p style="text-align: center;">Ácido oleanólico</p>
Espécie: <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Espécie: <i>Eucalyptus camaldulensis</i> <i>Leptospermum polygalifolium</i>
Referência: SIDDIQUI <i>et al.</i> , 2000	Referência: SIDDIQUI <i>et al.</i> , 2000; MUSTAFA <i>et al.</i> , 2003
 <p style="text-align: center;">3β-hidróxiurs-11-en-28,13β-olídeo</p>	 <p style="text-align: center;">Ácido ursólico</p>
Espécies: <i>Eucalyptus camaldulensis</i> ; <i>Eucalyptus tereticornis</i>	Espécies: <i>Eucalyptus camaldulensis</i> ; <i>Eucalyptus tereticornis</i>
Referências: SIDDIQUI <i>et al.</i> , 2000; WANG e FUGIMOTO, 1993	Referências: SIDDIQUI <i>et al.</i> , 2000; WANG e FUGIMOTO, 1993
 <p style="text-align: center;">Ácido 2α,3β,7β-triidróxi-11α-metóxiurs-12-en-28-óico</p>	 <p style="text-align: center;">2α,3β,7β-triidróxiurs-11-en-28,13β-olídeo</p>
Espécie: <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Espécie: <i>Eucalyptus camaldulensis</i>
Referência: SIDDIQUI <i>et al.</i> , 2000	Referências: SIDDIQUI <i>et al.</i> , 2000
 <p style="text-align: center;">Noreugenina-7-O-β-D-glicosídeo</p>	 <p style="text-align: center;">3'-formil-4',6'-diidróxi-5'-metil-2'-metóxicalcona</p>
Espécie: <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Espécie: <i>Cleistocalis operculatus</i>
Referência: WANG e FUGIMOTO, 1993	Referência: YE <i>et al.</i> , 2004

Continuação da Tabela 01

 <p>8-formil-5-hidróxi-6-metil-7-metóxi-flavanona</p>	 <p>2',4'-diidróxi-3',5'-dimetil-6'-metóxi-chalcona</p>
Espécie: <i>Cleistocalis operculatus</i>	Espécie: <i>Syzygium samarangense</i> <i>Metrosideros excelsa</i>
Referência: YE <i>et al.</i> , 2004	Referência: SRIVASTAVA <i>et al.</i> , 1995 MUSTAFA <i>et al.</i> , 2005
 <p>2',6'-diidróxi-3'-metil-4'-metóxi-chalcona</p>	 <p>2',4'-diidróxi-3'-metil-6'-metóxi-chalcona</p>
Espécie: <i>Metrosideros excelsa</i>	Espécie: <i>Metrosideros excelsa</i>
Referência: MUSTAFA <i>et al.</i> , 2005	Referência: MUSTAFA <i>et al.</i> , 2005
 <p>2'-hidróxi-3'-metil-4',6'-dimetóxi-chalcona</p>	 <p>5,7-diidróxi-6,8-dimetil-flavanona</p>
Espécie: <i>Metrosideros excelsa</i>	Espécie: <i>Metrosideros excelsa</i>
Referência: MUSTAFA <i>et al.</i> , 2005	Referência: MUSTAFA <i>et al.</i> , 2005

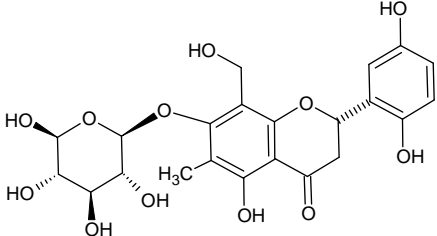
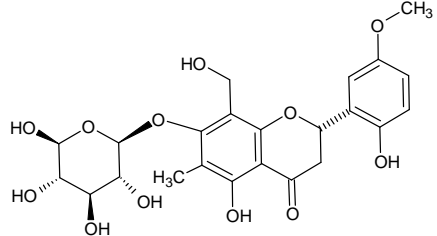
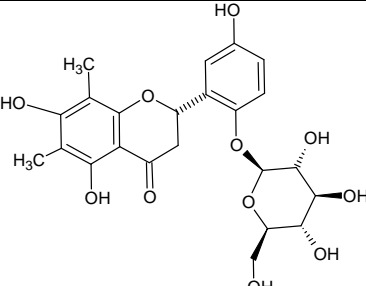
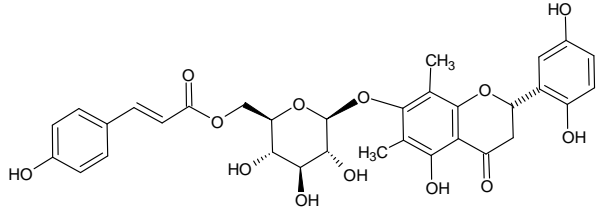
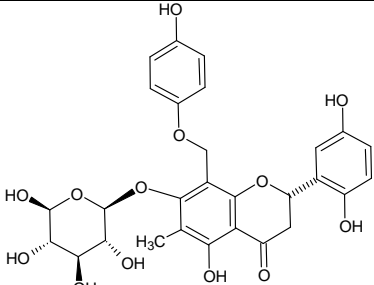
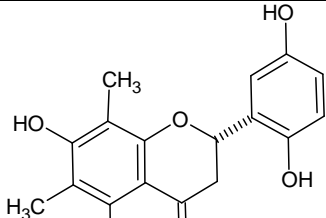
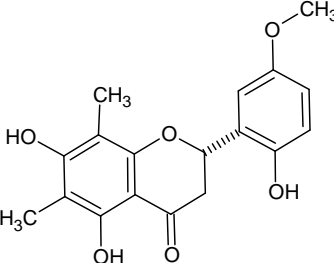
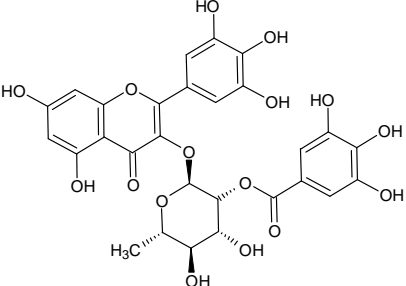
Continuação da Tabela 01

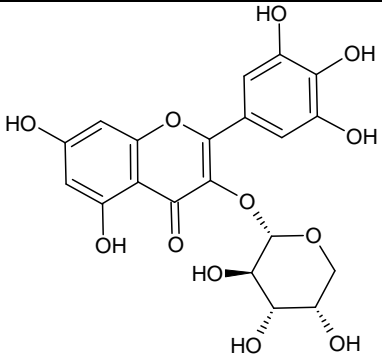
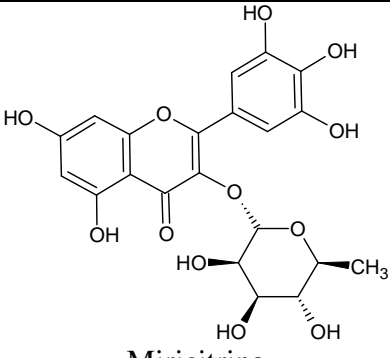
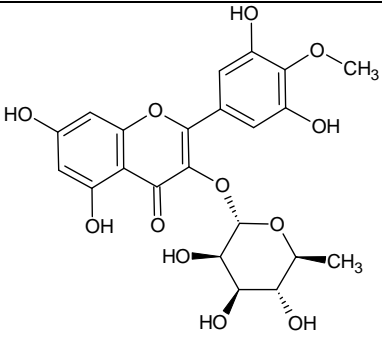
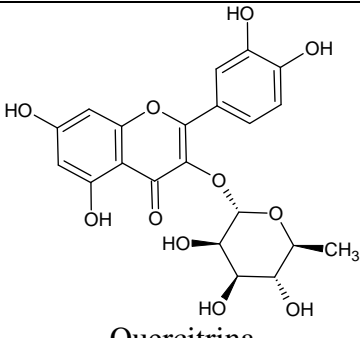
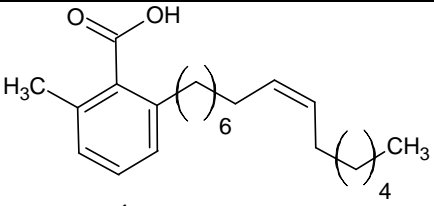
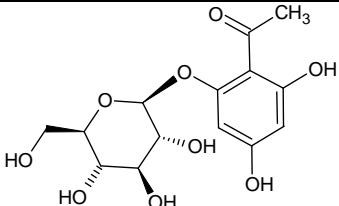
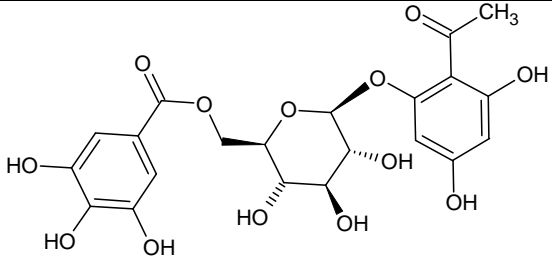
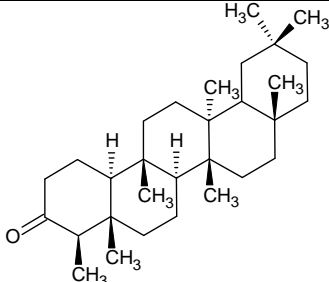
1.2.1. A química do gênero *Myrcia*

Apesar do gênero *Myrcia* estar representado por um grande número de espécies, verificou-se que existem poucos trabalhos publicados relativos ao estudo dos constituintes químicos fixos e de atividades biológicas de espécies deste gênero, sendo que todos são de espécies do Brasil (Tabela 02). Trabalhos encontrados na literatura, com *Myrcia multiflora*, relatam o isolamento de flavonóides e acetofenonas glicosiladas, que apresentaram atividade antidiabética (YOSHIKAWA *et al.*, 1998; MATSUDA *et al.*, 2002). No estudo fitoquímico de *Myrcia guianensis* foram isolados dois flavonóides, uma hidroxicetona cíclica, um sesquiterpeno e um esteróide (FEHLBERG, 2006) e de *Myrcia rotundifolia* (Berg.) Legrand foram isolados terpenos e esteróides (CERQUEIRA, 2002). Em outro trabalho, com *Myrcia citrifolia*, foram

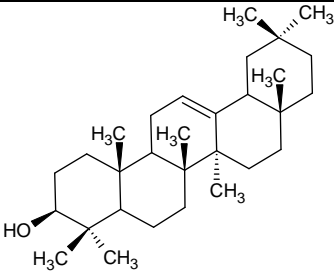
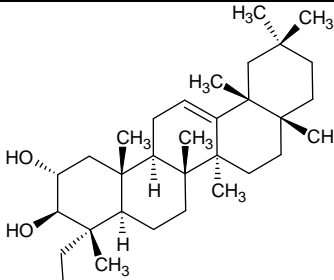
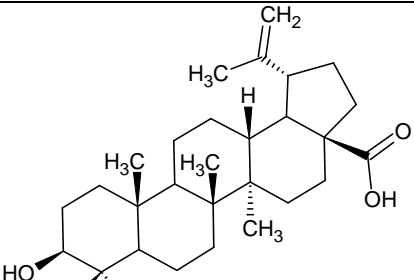
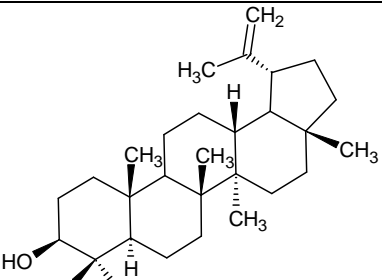
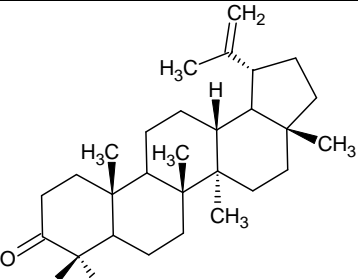
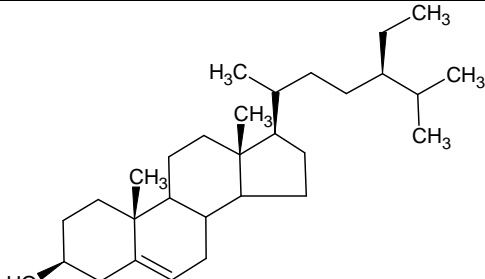
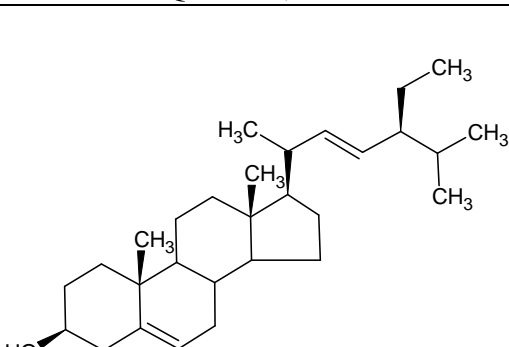
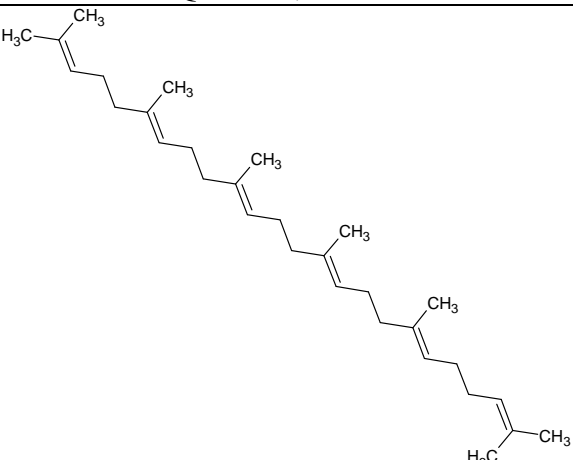
isolados um flavonóide e um triterpeno (GOTTLIEB *et al.*, 1972). A grande maioria dos estudos com plantas do gênero *Myrcia* está vinculada a óleos essenciais.

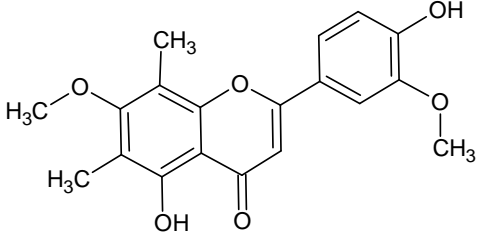
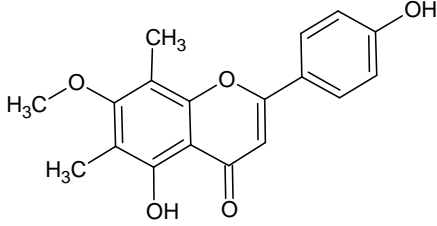
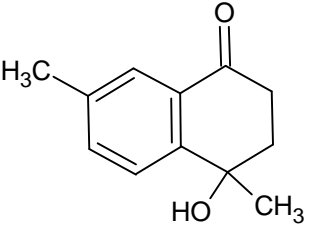
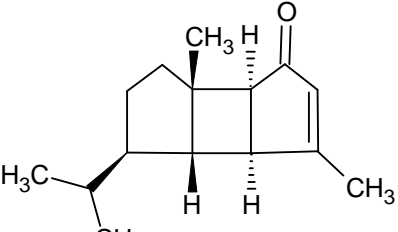
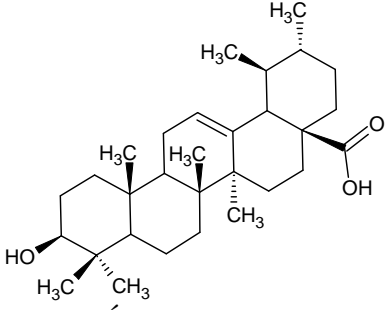
Tabela 02: Alguns constituintes químicos fixos relacionados para o gênero *Myrcia*.

 <p style="text-align: center;">Myrciacitrina I</p>	 <p style="text-align: center;">Myrciacitrina II</p>
Espécie: <i>Myrcia multiflora</i>	Espécie: <i>Myrcia multiflora</i>
Referência: YOSHIKAWA <i>et al.</i> , 1998	Referência: YOSHIKAWA <i>et al.</i> , 1998
 <p style="text-align: center;">Myrciacitrina III</p>	 <p style="text-align: center;">Myrciacitrina IV</p>
Espécie: <i>Myrcia multiflora</i>	Espécie: <i>Myrcia multiflora</i>
Referência: MATSUDA <i>et al.</i> , 2002	Referência: MATSUDA <i>et al.</i> , 2002
 <p style="text-align: center;">Myrciacitrina V</p>	 <p style="text-align: center;">Myriacetina</p>
Espécie: <i>Myrcia multiflora</i>	Espécie: <i>Myrcia multiflora</i>
Referência: MATSUDA <i>et al.</i> , 2002	Referência: YOSHIKAWA <i>et al.</i> , 1998
 <p style="text-align: center;">Metoximatteucina</p>	 <p style="text-align: center;">1-desmantina</p>
Espécie: <i>Myrcia multiflora</i>	Espécie: <i>Myrcia multiflora</i>
Referência: YOSHIKAWA <i>et al.</i> , 1998	Referência: YOSHIKAWA <i>et al.</i> , 1998

 <p style="text-align: center;">Guajaverina</p>	 <p style="text-align: center;">Miricitrina</p>
Espécie: <i>Myrcia multiflora</i>	Espécie: <i>Myrcia multiflora</i>
Referência: YOSHIKAWA <i>et al.</i> , 1998	Referência: YOSHIKAWA <i>et al.</i> , 1998
 <p style="text-align: center;">Mearnsitrina</p>	 <p style="text-align: center;">Quercitrina</p>
Espécie: <i>Myrcia multiflora</i>	Espécie: <i>Myrcia multiflora</i>
Referência: YOSHIKAWA <i>et al.</i> , 1998	Referência: YOSHIKAWA <i>et al.</i> , 1998
 <p style="text-align: center;">Ácido ginkgólico</p>	 <p style="text-align: center;">Myrciafenona A</p>
Espécie: <i>Myrcia multiflora</i>	Espécie: <i>Myrcia multiflora</i>
Referência: YOSHIKAWA <i>et al.</i> , 1998	Referência: YOSHIKAWA <i>et al.</i> , 1998
 <p style="text-align: center;">Myrciafenona B</p>	 <p style="text-align: center;">Friedelina</p>
Espécie: <i>Myrcia multiflora</i>	Espécie: <i>Myrcia rotundifolia</i>
Referência: YOSHIKAWA <i>et al.</i> , 1998	Referência: CERQUEIRA, 2002

Continuação da Tabela 02

 <p>β-amirina</p>	 <p>Ácido arjunólico</p>
<p>Espécie: <i>Myrcia rotundifolia</i></p>	<p>Espécie: <i>Myrcia rotundifolia</i></p>
<p>Referência: CERQUEIRA, 2002</p>	<p>Referência: CERQUEIRA, 2002</p>
 <p>Ácido betulínico</p>	 <p>Lupeol</p>
<p>Espécie: <i>Myrcia rotundifolia</i></p>	<p>Espécie: <i>Myrcia rotundifolia</i></p>
<p>Referência: CERQUEIRA, 2002</p>	<p>Referência: CERQUEIRA, 2002</p>
 <p>Lupenona</p>	 <p>Sitosterol</p>
<p>Espécie: <i>Myrcia rotundifolia</i></p>	<p>Espécie: <i>Myrcia rotundifolia</i></p>
<p>Referência: CERQUEIRA, 2002</p>	<p>Referência: CERQUEIRA, 2002</p>
 <p>Estigmasterol</p>	 <p>Esqualeno</p>
<p>Espécie: <i>Myrcia rotundifolia</i></p>	<p>Espécie: <i>Myrcia rotundifolia</i></p>
<p>Referência: CERQUEIRA, 2002</p>	<p>Referência: CERQUEIRA, 2002</p>

 <p>5,4'-dihidroxi-6,8- dimetil-7,3'-dimetoxiflavona</p>	 <p>Sideroxilina</p>
Espécie: <i>Myrcia guianensis</i>	Espécie: <i>Myrcia guianensis</i>
Referência: FEHLBERG, 2006	Referência: FEHLBERG, 2006
 <p>4-hidroxi-4,7-dimetil-1-tetralona</p>	 <p>Bourbonenona</p>
Espécie: <i>Myrcia guianensis</i>	Espécie: <i>Myrcia guianensis</i>
Referência: FEHLBERG, 2006	Referência: FEHLBERG, 2006
 <p>Ácido ursólico</p>	
Espécie: <i>Myrcia guianensis</i>	
Referência: FEHLBERG, 2006	

Continuação da Tabela 02

1.3. Flavonóides

Os Flavonóides constituem um grupo de derivados fenólicos amplamente distribuídos no Reino Vegetal, sendo que vários desses apresentam coloração intensa, variando de púrpura a amarelo. São em sua maioria pigmentos responsáveis pela coloração de numerosas flores e de alguns frutos, atraindo polinizadores e assim favorecendo a reprodução das espécies. Alguns flavonóides agem como antioxidantes, outros são inibidores enzimáticos e a grande maioria absorve a luz ultravioleta (HARBORNE e WILLIAMS, 2000). Nessa classe de produtos naturais, mais de 6000 estruturas são conhecidas, podendo ser encontrados tanto na forma livre (agliconas) como conjugada com açúcares (glicosídeos). Estes compostos geralmente são encontrados nos vacúolos embora, em alguns casos, estejam presentes em cromoplastos e cloroplastos.

Na família Myrtaceae os flavonóides estão amplamente distribuídos, incluindo também, apesar de poucos trabalhos encontrados na literatura, a ocorrência no gênero *Myrcia* (FEHLBERG, 2006; GOTTLIEB *et al.*, 1972; MATSUDA *et al.*, 2002; YOSHIKAWA *et al.*, 1998).

O esqueleto básico destes metabólitos de estrutura polifenólica, presentes em todas as plantas e por elas utilizados como marcadores quimiotaxonômicos, é um esqueleto carbônico C₆-C₃-C₆, com um anel cromano possuindo um segundo anel aromático na posição 2, 3 ou 4. As agliconas são classificadas de acordo com a estrutura e o estado de oxidação da unidade C₃ na molécula (Figura 02) (PETERSON e DWYER, 1998).

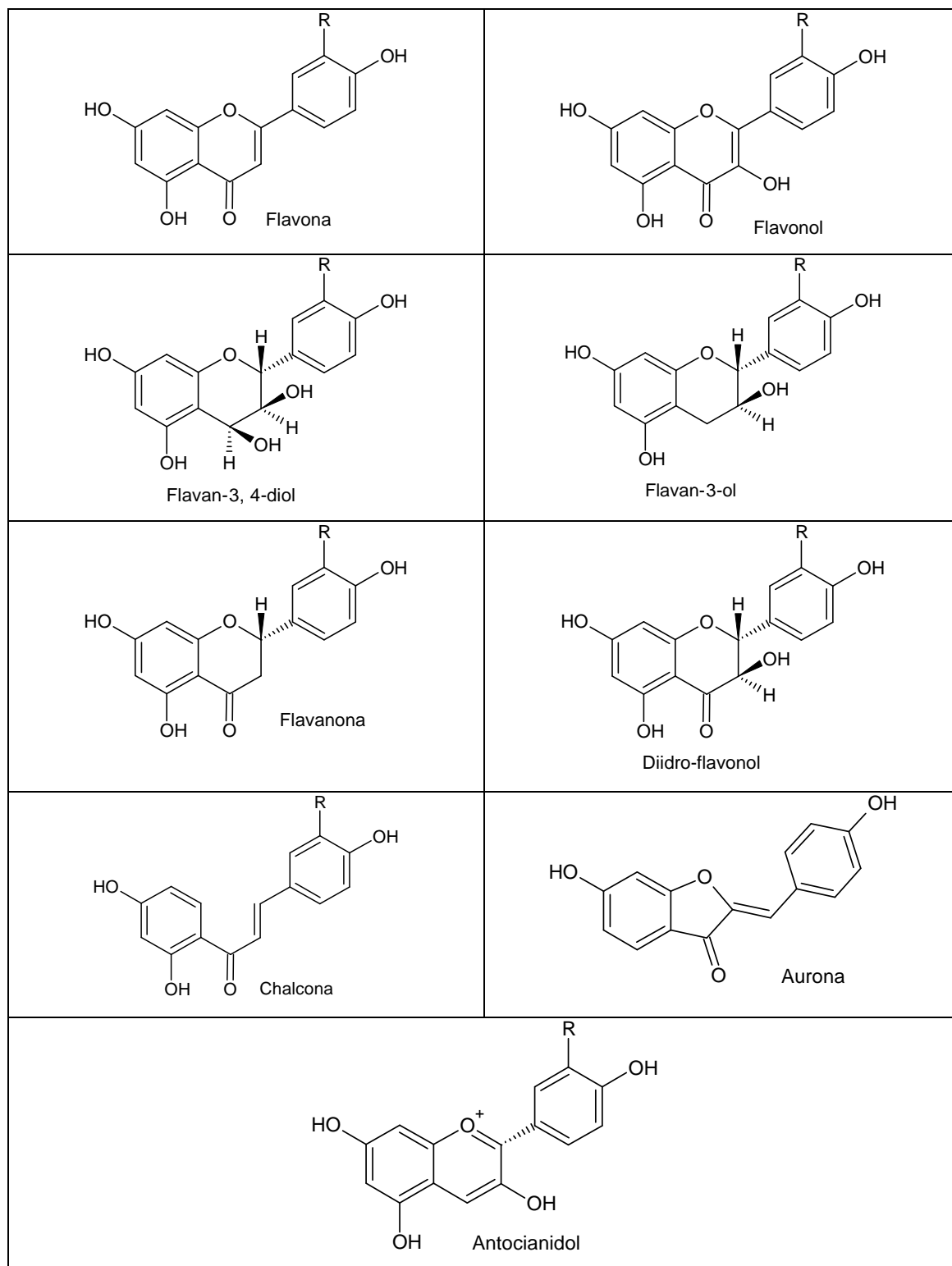


Figura 02: Diferentes classes de flavonóides

A rota biossintética dos flavonóides apresenta a singularidade de seus anéis aromáticos serem formados de rotas metabólicas distintas: chiquimato e acetato. Sua porção fenil-propanoídica (anéis **B** e **C**) é derivada do ácido *p*-cumárico formado pela

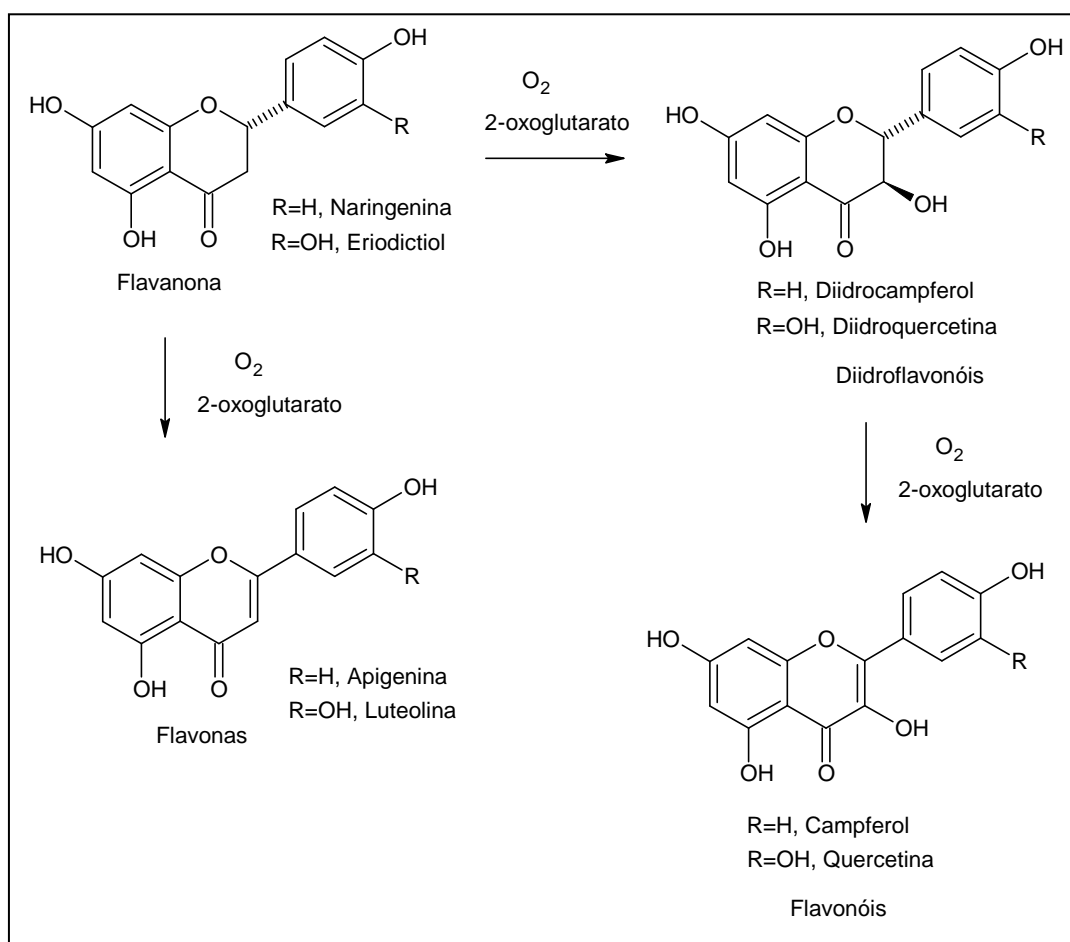


Figura 04: Flavonas e flavonóis a partir da flavanona como intermediário comum

O interesse econômico nos flavonóides é decorrente de suas diferentes propriedades, tais como, as cores que esses pigmentos possuem, sua importância no processo de tanagem do couro, na manufatura do cacau e suas contribuições na nutrição e sabor dos alimentos (SIMÕES *et al.*, 1999). Além disso, são atribuídas algumas propriedades farmacológicas aos representantes desta classe: anticarcinogênico, atividade antioxidante, antiinflamatório, antialérgico, antiulcerogênico, antivirais, hormonal, inibidora de enzimas, anti-hepatotóxica, antiespasmolítica, diurética, antifúngica, bactericida, antiparasitária e analgésica (HARBORNE e WILLIANS, 2000; PETERSON e DWYER, 1998), entre outras (FERREIRA *et al.*, 2006; LUNARDI *et al.*, 2003; LIU, *et al.*, 2003; OLIVELLA *et al.*, 2001; PIÑERO *et al.*, 2006; RICE-EVANS e PACKER, 2003; SORIANO *et al.*, 2004; YOKOMIZO e MORIAKI, 2006).

Os flavonóides contribuem para a prevenção de importantes patologias relacionadas ao dano oxidativo, que resulta do acúmulo de radicais livres, substâncias que danificam as células. Essa forma de estresse pode ser provocada por elementos

externos, como o consumo de cigarros, ou por fatores em nível celular. Acredita-se que o dano causado pelo estresse oxidativo contribua para o envelhecimento e o surgimento de muitas doenças, tais como doenças cardiovasculares, envelhecimento, câncer e outras (HARBORNE, 1992).

Os flavonóides, além de outras funções biológicas, são ativos contra alguns microorganismos (WEIDENBÖRNER *et al.*, 1990). Pelo menos em alguns casos a presença destas substâncias parece servir como uma barreira química à invasão de microorganismos nas plantas (HARBORNE, 1977). Flavonóides lipofílicos metilados podem oferecer proteção contra fungos e bactérias por causa da facilidade que eles têm em penetrar nas membranas plasmáticas (WOLLENWEBER *et al.*, 1981).

Algumas chalconas e flavanonas são citadas na literatura por apresentarem alta atividade contra os protozoários *Trypanosoma cruzi* (doença de Chagas), espécies de *Leishmania* (leishmaniose) e *Plasmodium falciparum* (malaria) (PIÑERO *et al.*, 2006; LUNARDI *et al.*, 2003; HERMOSO *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2003). Além disso, há relatos recentes da atividade anti-AIDS de chalconas (WU *et al.*, 2003).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Contribuir para o conhecimento químico do gênero *Myrcia*.

2.1. Objetivos Específicos

- Realizar o estudo fitoquímico da fase em diclorometano do extrato etanólico das folhas de *Myrcia hiemalis* (Myrtaceae), isolando e identificando metabólitos secundários não voláteis;

- Verificar atividade biológica dos extratos e metabólitos secundários isolados contra as bactérias *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella choleraesuis*, contra os fungos *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides*, *Candida albicans*, *Crinipellis perniciosus*, e contra os protozoários *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis*.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Material Vegetal – *Myrcia hiemalis*

O espécime de *Myrcia hiemalis* estudado foi coletado em agosto de 2005, na Área de Proteção Ambiental da Lagoa do Abaeté, no Município de Salvador, Estado da Bahia. O local trata-se de uma área com dunas repleta de vegetação arbustiva (Figura 05).

O espécime apresentava-se como um arbusto de aproximadamente 3m de altura (Figura 06). A identificação botânica foi realizada pela Prof^a Maria Lenise S. Guedes e registrada no Herbário “Alexandre Leal Costa” do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, sob o número 61532.



Figura 05: Vista do local da coleta na Área de Proteção Ambiental da Lagoa do Abaeté – Salvador, BA.



Figura 06: Partes aéreas de *Myrcia hiemalis*.

3.2. Reagentes e Equipamentos.

- As folhas secas foram trituradas no Moinho Thomas Wiley Laboratory Mill-Model 4.
- A concentração do extrato etanólico e das frações (hexano, diclorometano e acetato de etila) foi realizada sob pressão reduzida no evaporador rotatório de marca BUCHI, modelo R-3000.
- Os reagentes utilizados nos procedimentos cromatográficos e na preparação dos extratos foram das marcas Merck, VETEC e QUIMEX.
- Nas separações cromatográficas em coluna foi utilizado gel de sílica 60 – 230 mesh (0,063-0,210 mm) e 230 – 400 mesh (0,040-0,063 mm) da marca Merck..
- Na cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) foi utilizado gel de sílica GF₂₅₄ da Merck e na cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foi utilizado gel de sílica PF₂₅₄₊₃₆₆ da Merck. As cromatoplasmas para CCDC foram preparadas espalhando-se manualmente a suspensão de sílica em água destilada em placa de vidro ou através do espalhador mecânico Heidelberg, obtendo-se placas com espessuras de 0,25 mm (comparativas) e 1,00 mm (preparativas). Foram utilizadas placas de vidro de 2,5 x 7,0 cm, 5,0 x 20,0 cm e 20,0 x 20,0 cm. Depois de secas ao ar livre todas as cromatoplasmas foram ativadas em estufas a 70 °C por um período de aproximadamente uma hora.
- Como reveladores foram utilizados irradiações com lâmpada ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm e vapores de iodo.
- Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C unidimensionais e bidimensionais foram obtidos no espectrômetro Varian Gemini 300, operando com frequências do hidrogênio a 300 MHz e do carbono a 75 MHz.
- Os solventes utilizados para dissolução das amostras para obtenção dos espectros de RMN foram clorofórmio deuterado, acetona deuterada, metanol deuterado e piridina deuterada.
- Os pontos de fusão foram obtidos utilizando o aparelho digital de ponto de fusão MQAPF – 301 da marca Micro Química.

3.3. Obtenção do Extrato Etanólico e das Fases em Hexano, Diclorometano, Acetato de Etila e n-Butanol

As folhas secas (2,77 kg) de um espécime de *M. hiemalis* coletado em agosto de 2005, depois de trituradas foram submetidas a três extrações sucessivas com etanol, obtendo-se, após eliminação do solvente em evaporador rotatório sob pressão reduzida à aproximadamente 35 °C, 349,9 g de extrato etanólico das folhas. A seguir, o extrato etanólico foi solubilizado em 1 litro de etanol e acrescentou-se 500 mL de água. Logo após, foi submetido à partição (líquido-líquido) em um funil de separação, por três vezes sucessivas com cada solvente, na ordem: hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol. Após eliminação do solvente, em evaporador rotatório sob pressão reduzida à aproximadamente 35 °C, obteve-se as seguintes massas: 127,4 g da fase em hexano, 37,1 g da fase em diclorometano, 38,9 g da fase em acetato de etila e 34,2 g da fase em n-butanol (Figura 07, p. 27).

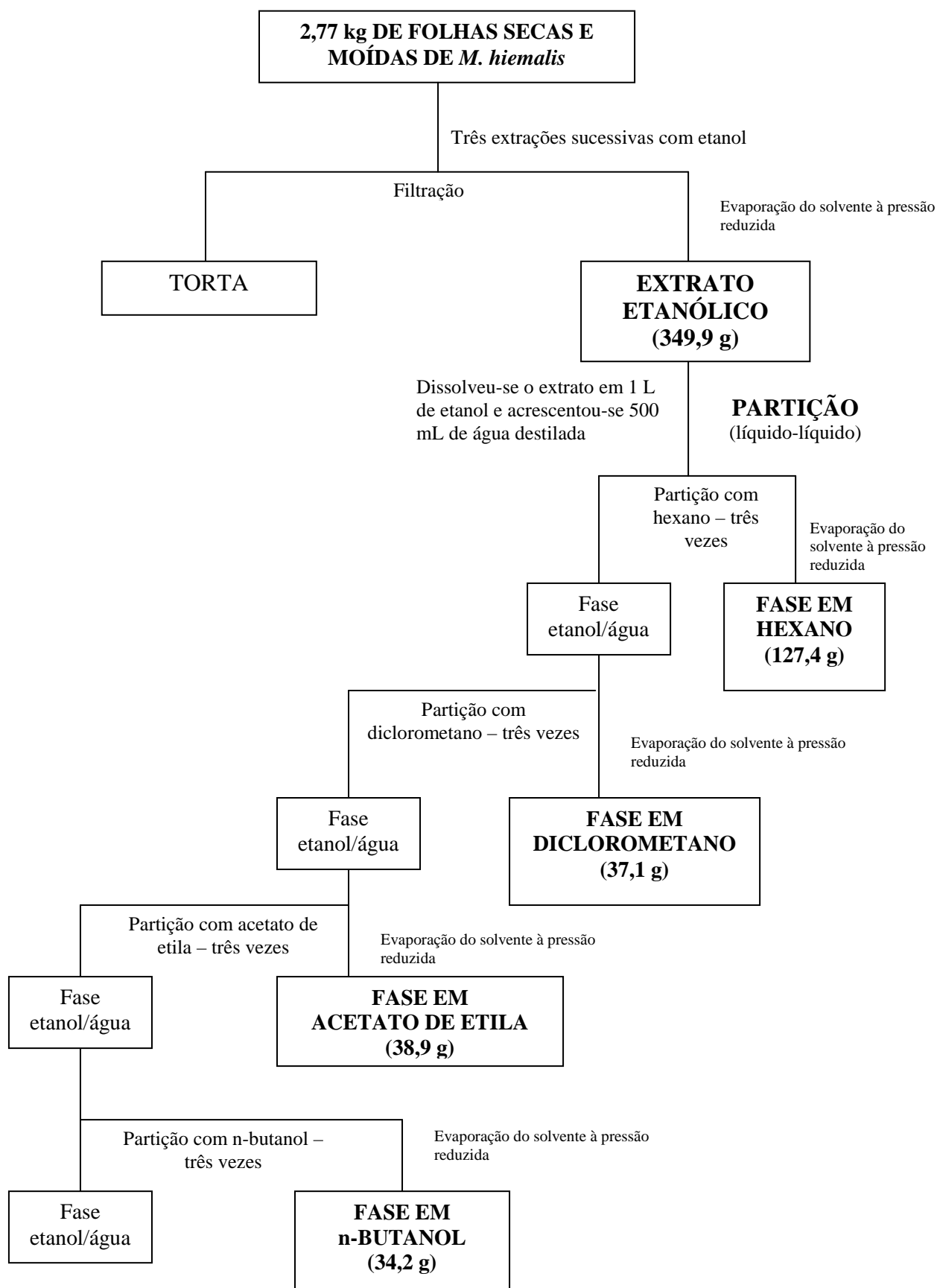


Figura 07: Esquema de obtenção do extrato etanólico e das fases em hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol de *Myrcia hiemalis*.

3.4. Fracionamento da Fase em Diclorometano das Folhas de *Myrcia hiemalis* e Isolamento dos Constituintes Químicos

Durante a partição do extrato etanólico com diclorometano, para a obtenção da fase em diclorometano das folhas de *M. hiemalis*, ocorreu a formação de um sólido amarelo pálido dentro do funil de separação entre as duas fases. O precipitado (MhDCM-ppt 01) foi filtrado com algodão e obteve-se a **Substância I** com a massa de 823 mg.

O extrato diclorometânico das folhas (37,1 g) foi submetido a uma coluna cromatográfica filtrante (código MhDCM-A), empacotada a seco com gel de sílica 60, utilizando-se misturas de Hex:AcOEt em gradiente de polaridade crescente como eluentes, obtendo-se 26 frações de aproximadamente 70 mL cada, denominadas MhDCM-A1 a A26.

Após a evaporação do solvente, todas as frações desta coluna foram submetidas a CCDC e após análise dos resultados algumas frações foram reunidas e submetidas a outros fracionamentos cromatográficos.

Nas frações MhDCM-A2 e A3 foi observado na mistura a presença de um sólido amorfo de cor laranja. Na fração MhDCM-A5 foi constatado na mistura a presença de cristais de cor amarela. Já nas frações MhDCM-A19 e A20 (Hex:AcOEt 1:9), observou-se na mistura a presença de um sólido amorfo de cor branca que foi filtrado com algodão, pois não apresentou solubilidade em metanol, solvente que solubilizou o restante da mistura, e obteve-se assim a **Substância II** (24 mg).

As frações MhDCM-A2, A3 e A5 (Hex:AcOEt 8:2) foram solubilizadas em clorofórmio por aquecimento em placa aquecedora, para obter o máximo de solubilização em quantidade mínima do solvente. Em seguida, as frações foram resfriadas no “freezer” por cerca de 1 h e o precipitado foi filtrado com algodão. Obteve-se então, das frações MhDCM-A2 e A3, a **Substância III** (830 mg) e, da fração MhDCM-A5, a **Substância IV** (350 mg).

Os sobrenadantes das frações MhDCM-A3 a A7 foram reunidos (4,8 g) e submetidos à coluna cromatográfica (código MhDCM-A3.7-B) empacotada com sílica 0,040-0,063 mm em hexano, utilizou-se misturas de Hex: AcOEt em gradiente crescente de polaridade como eluentes. Foram obtidas 32 frações denominadas MhDCM-A3.7-B1 a B32. No “bico” dessa coluna foi raspado, juntamente com a fração MhDCM-A3.7-B27,

um precipitado branco denominado MhDCM-A3.7-B27-ppt (3 mg). Após a análise dos resultados obtidos por CCDC, algumas frações foram reunidas. Foi coletado nas frações MhDCM-A3.7-B8 e B9 (Hex:AcOEt 8:2) novamente a **Substância III** (930 mg).

As frações MhDCM-A3.7-B17 a B26 (Hex:AcOEt 7:3) apresentaram na mistura, após eliminação do solvente em evaporador rotatório sob pressão reduzida, cristais incolores e amarelos. Cada fração foi então solubilizada em clorofórmio com aquecimento em placa aquecedora, de modo a obter o máximo de solubilização em quantidade mínima de solvente. Em seguida, as frações foram resfriadas no “freezer” por cerca de 1 h e os cristais amarelos foram filtrados com algodão. Obteve-se novamente a **Substância IV** (192 mg).

Após análise por CCDC, os resíduos das lavagens com clorofórmio dos cristais amarelos das frações MhDCM-A5 e MhDCM-A3.7-B17 foram reunidas (39 mg). A mistura (código ARA) foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) com gel de sílica PF₂₅₄₊₃₆₆ da Merck. Foram necessárias cinco eluições da fase móvel, uma mistura Hex:AcOEt 95:5. O resultado foram três manchas bem definidas, sendo que obteve-se na mancha com maior deslocamento na cromatoplaça a **Substância V** (6 mg). Na mancha intermediária obteve-se a **Substância III** (4 mg) e mais próximo da origem a **Substância IV** (22 mg), ambas já isoladas anteriormente.

Os cristais incolores das frações MhDCM-A3.7-B17 a B26 que foram solúveis em clorofórmio não puderam ser separados pelo método utilizado para isolar a **Substância IV**. Sendo assim, foram testados vários solventes de modo a encontrar um que solubilizasse a mistura exceto os cristais incolores. Esses cristais foram lavados primeiramente com hexano e depois com hexano e gotas de acetona, por várias vezes. Obteve-se então, também das frações MhDCM-A3.7-B17 a B26, a **Substância VI** (90 mg).

As frações MhDCM-A3.7-B12 a B15 foram reunidas (247 mg) e submetidas à coluna cromatográfica (código PDA) empacotada com hexano em sílica 0,040-0,063mm, utilizou-se misturas de Hex:AcOEt em gradiente crescente de polaridade como eluentes. Foram obtidas 29 frações denominadas PDA-01 a 29. Após a análise dos resultados obtidos por CCDC as frações PDA-06 a 21 foram reunidas (101 mg) e submetidas à coluna cromatográfica (código PDA-06.21) empacotada com sílica 0,040-0,063 mm em hexano, utilizou-se misturas de Hex:AcOEt em gradiente crescente de polaridade como eluentes e obteve-se 104 frações denominadas PDA-06.21-01 a 104. Obteve-se nas frações PDA-06.21-17 a 29 (Hex:AcOEt 8:2) uma mistura (32 mg) contendo

predominantemente cristais incolores e uma pequena quantidade de cristais laranja, que foram identificados por CCDC como sendo a **Substância VII** e a **Substância III**, respectivamente.

As frações MhDCM-A3.7-B16 a B22 foram reunidas (1,4 g) e submetidas à coluna cromatográfica (código BRU) empacotada com sílica 0,040-0,063mm em hexano, utilizou-se misturas de Hex:AcOEt em gradiente crescente de polaridade como eluentes. Foram obtidas 30 frações denominadas BRU-01 a 30. Obteve-se na fração BRU-24 (Hex:AcOEt 7:3) novamente a **substância VI** (42 mg).

As frações da coluna cromatográfica filtrante MhDCM-A10 a A16 foram reunidas (6,4 g) e submetidas à coluna cromatográfica (código MhDCM-A10.16-D) empacotada com sílica 0,040-0,063 mm em hexano, utilizou-se misturas de Hex:AcOEt em gradiente crescente de polaridade como eluentes. Foram obtidas 35 frações denominadas MhDCM-A10.16-D1 a 35. Nas frações MhDCM-A10.16-D9 a D12 (Hex:AcOEt 8:2) foi coletado a **substância III** (527 mg), já isolada anteriormente neste estudo. As frações MhDCM-A10.16-D21 a 25, após a análise por CCDC, foram reunidas (751 mg) e submetidas à coluna cromatográfica (código MAAS) empacotada com sílica 0,040-0,063 mm em hexano, utilizou-se misturas de Hex:AcOEt em gradiente crescente de polaridade como eluentes e obteve-se 23 frações denominadas MAAS-01 a 23. Os cristais incolores da fração MAAS-12 (Hex:AcOEt 7:3) foram identificados por CCDC como sendo a **Substância VI** (42 mg).

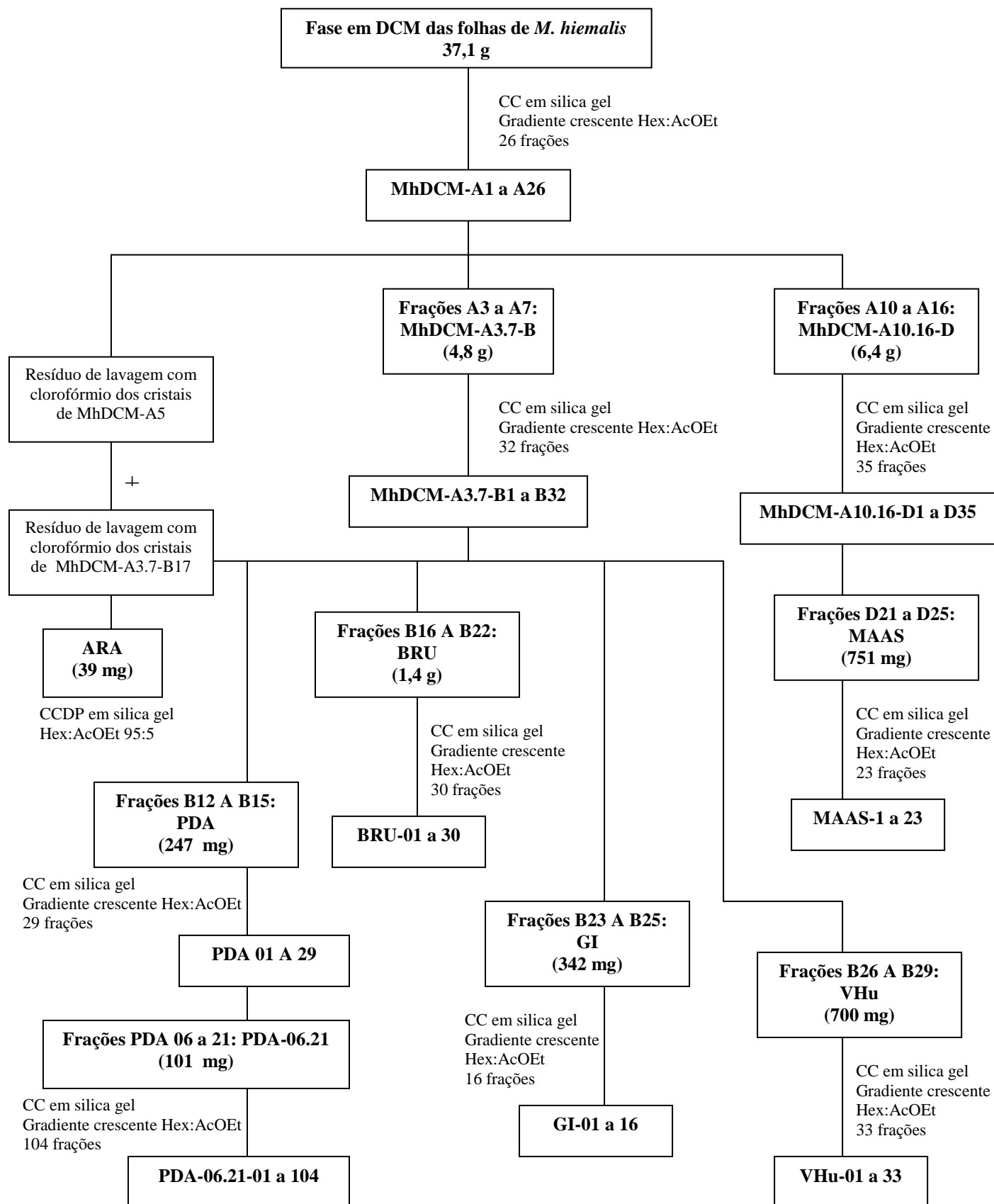


Figura 08: Esquema geral do fracionamento da fase em diclorometano (DCM) das folhas de *Myrcia hiemalis*.

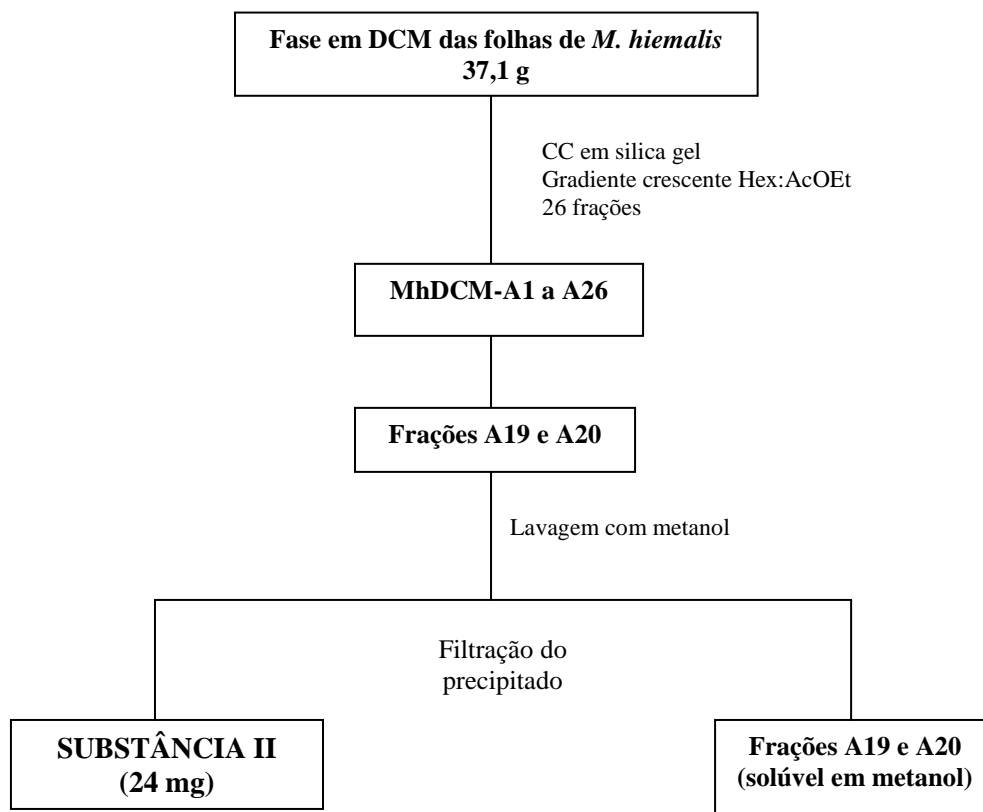


Figura 09: Esquema de isolamento da Substância II.

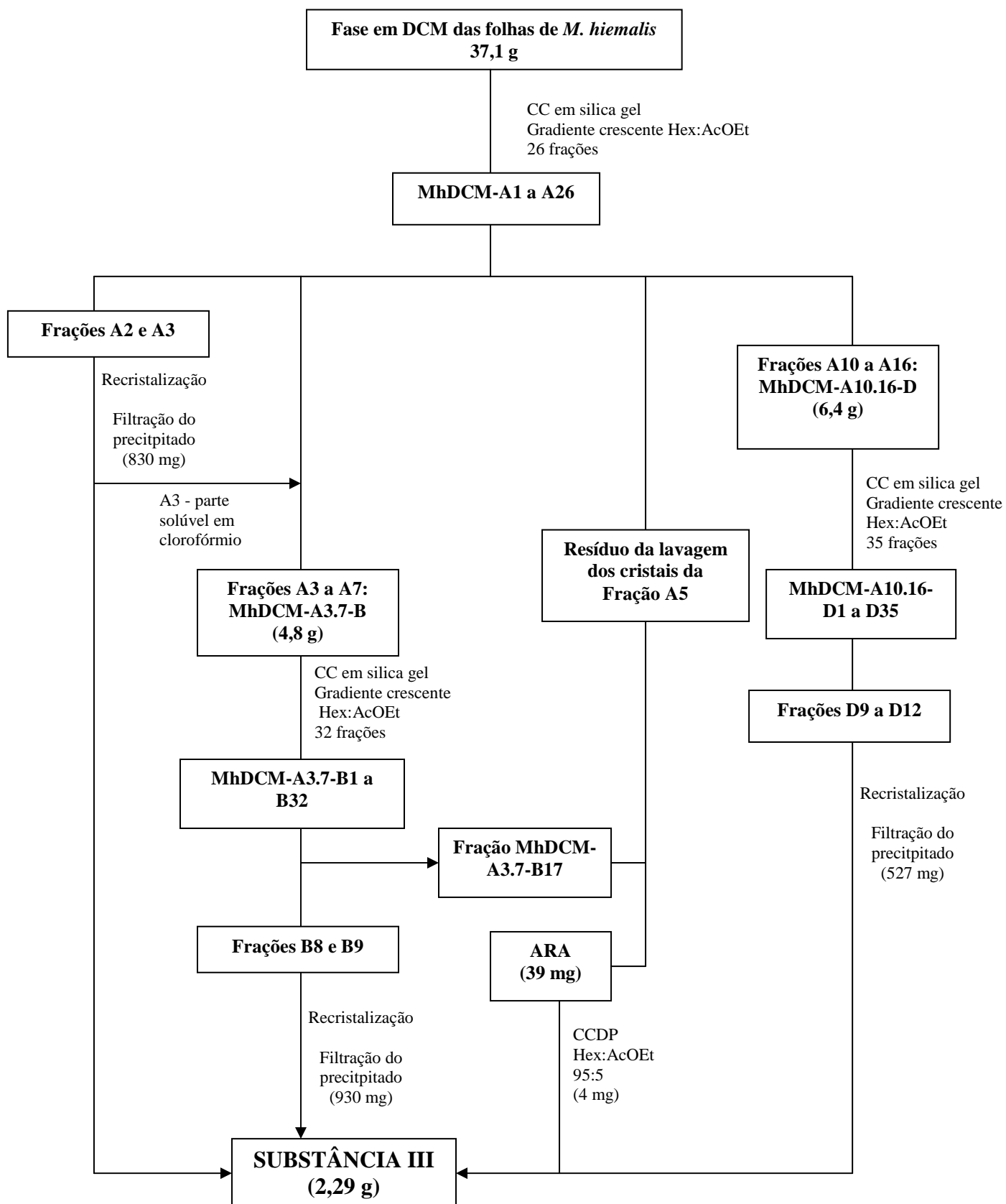


Figura 10: Esquema de isolamento da Substância III.

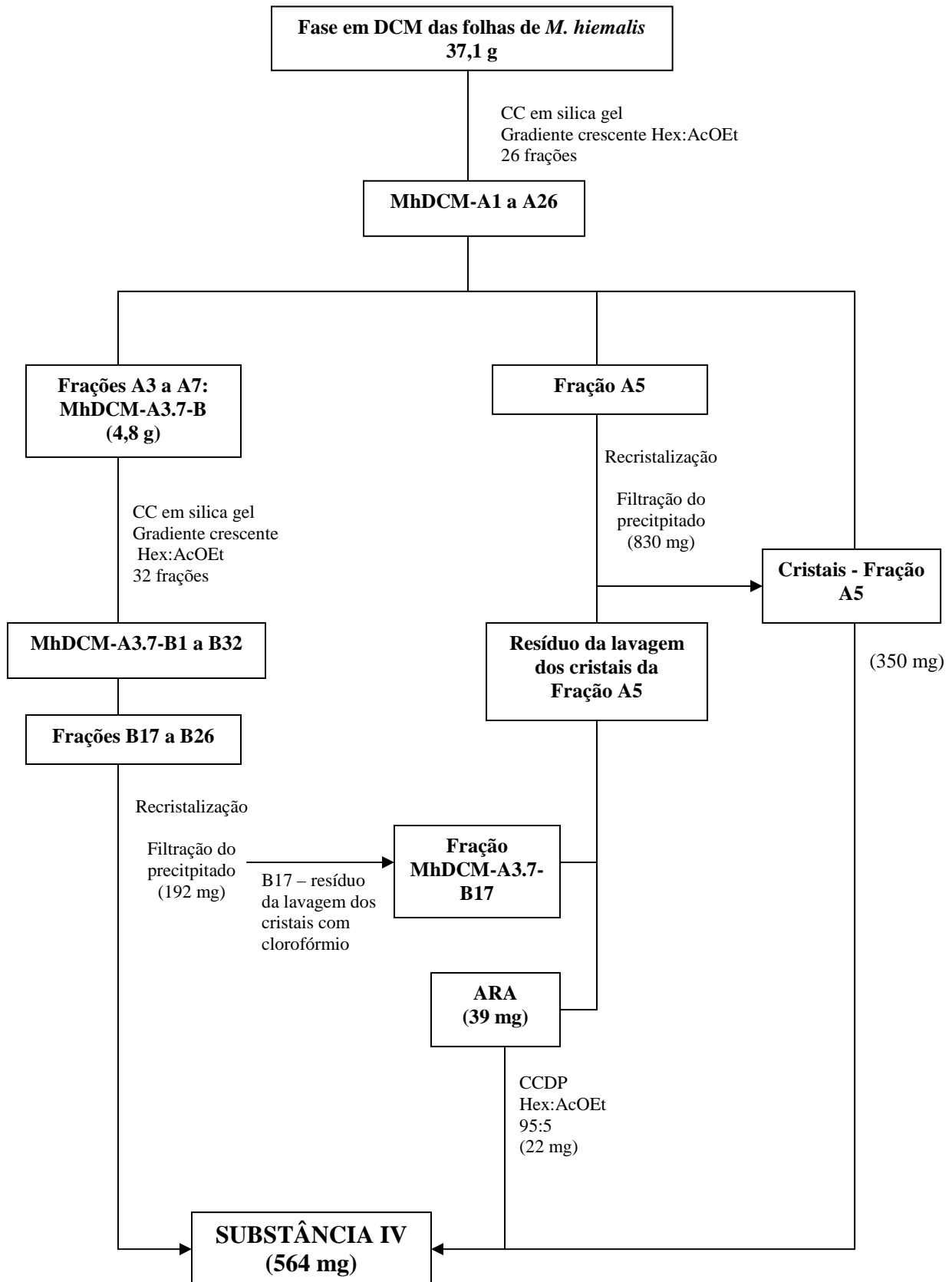


Figura 11: Esquema de isolamento da Substância IV.

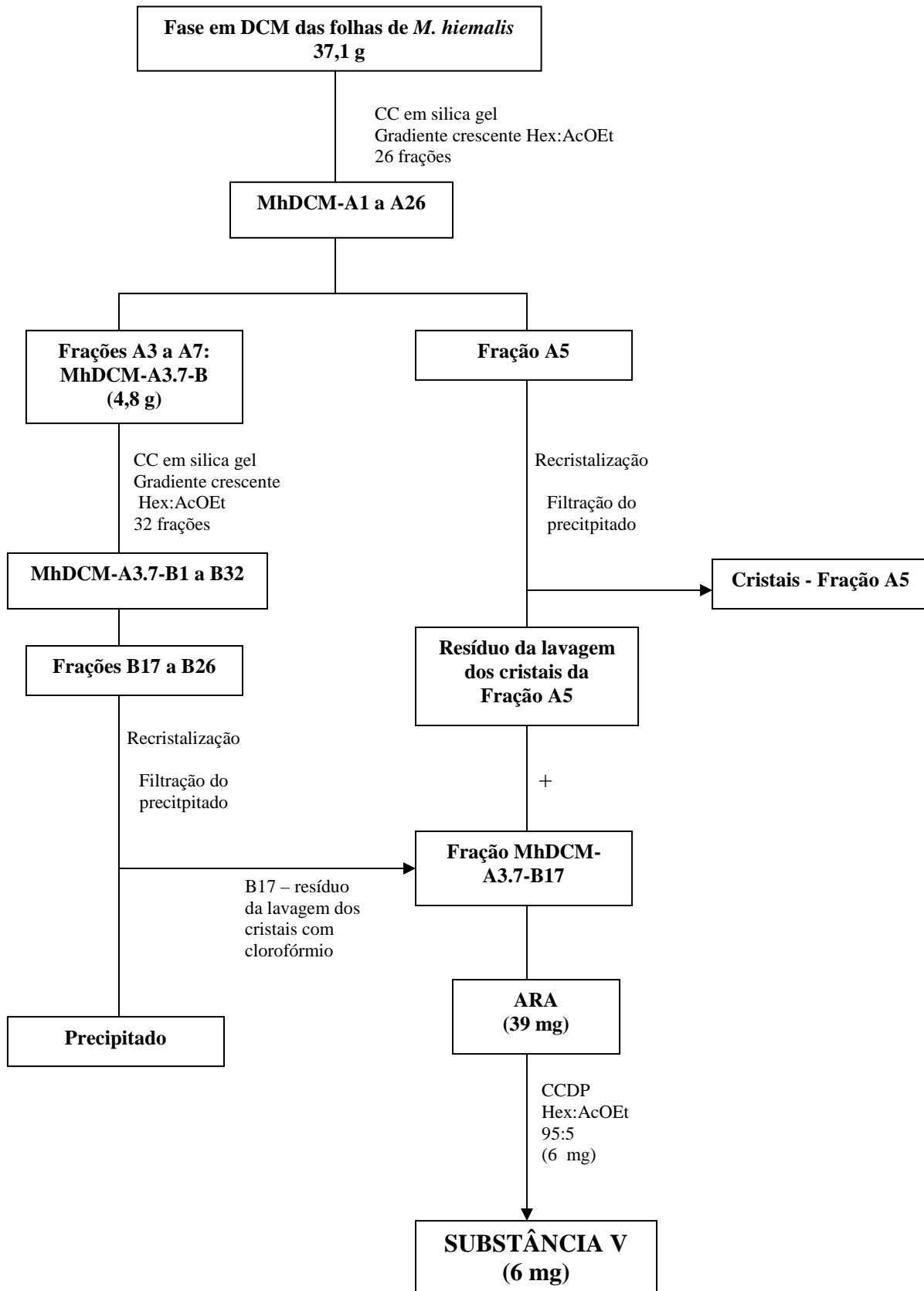


Figura 12: Esquema de isolamento da Substância V.

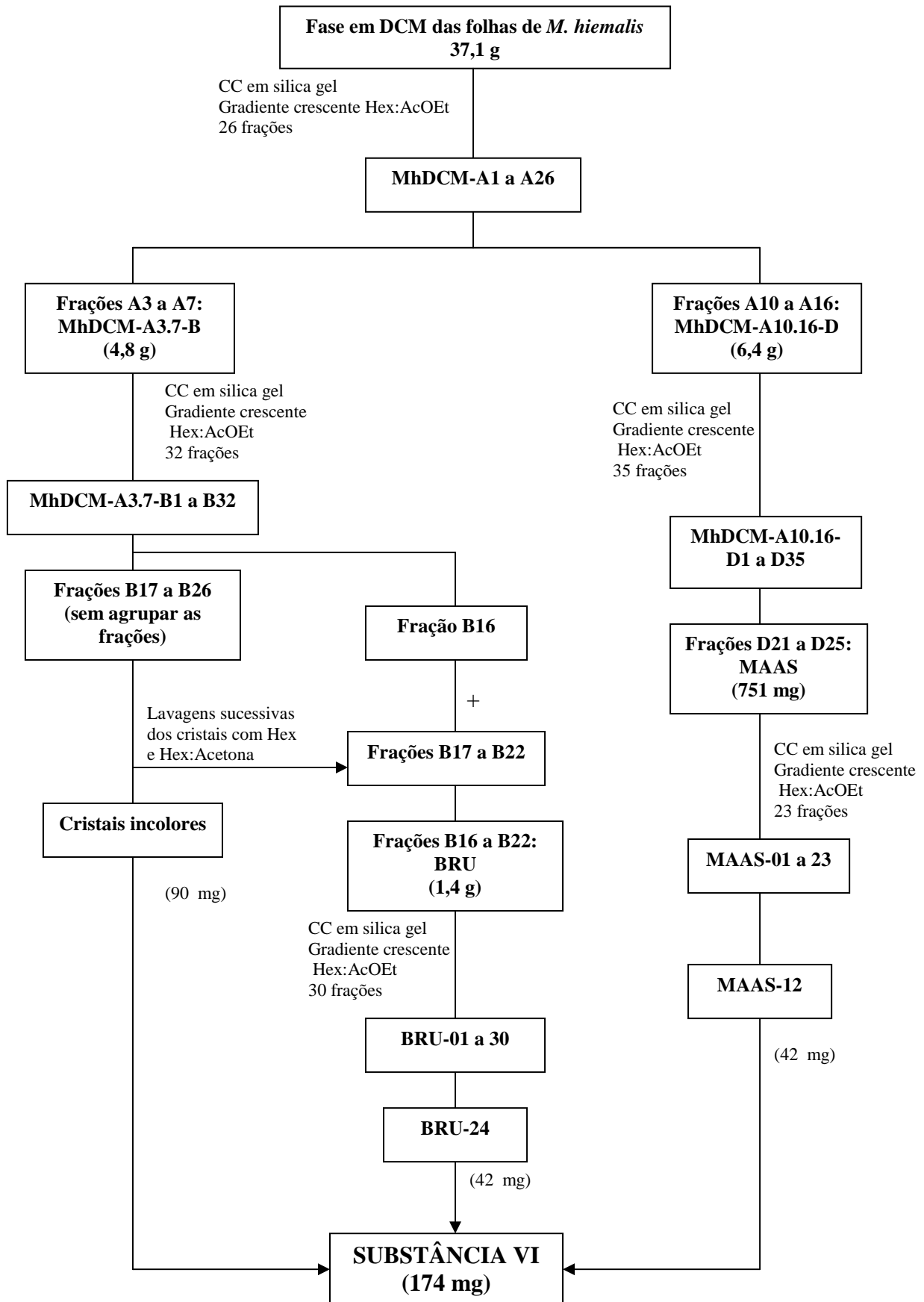


Figura 13: Esquema de isolamento da Substância VI.

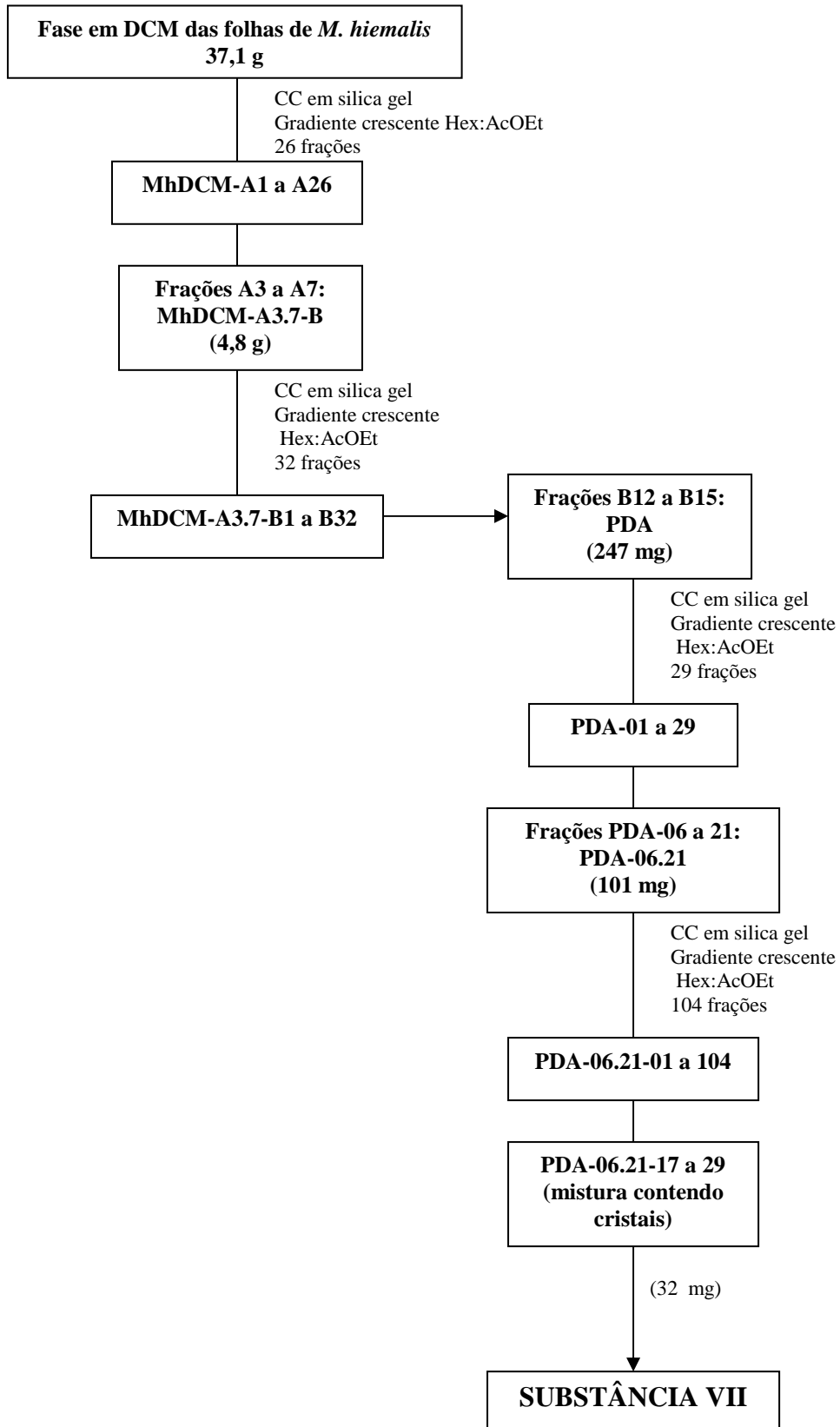


Figura 14: Esquema de isolamento da Substância VII.

3.5. Ensaio Biológicos

Os testes de Concentração Inibitória Mínima contra as bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* e *Salmonella choleraesuis* e os fungos *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides*, *Candida albicans* e *Crinipellis perniciosus*, foram realizados no Laboratório de Bioensaios do GESNAT no Instituto de Química - Universidade Federal da Bahia. Os testes foram executados pela Dra. Lourdes Cardoso de Souza Neta e Msc. Giselle Aparecida Nobre Costa.

Os testes contra os parasitos *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis* foram realizados Laboratório de Biomorfologia Antiparasitária e Centro de Microscopia Eletrônica da FIOCRUZ-BA, sob a coordenação do Dr. Marcos Antônio Vannier-Santos. Os testes contra *Trypanosoma cruzi* foram executados pela Dra. Lourdes Cardoso de Souza Neta e Diego Menezes, e contra *Leishmania amazonensis* foram executados por Eliomara Souza Sobral Alves e Tereza Cristina Soares Campelo Brandão.

3.5.1. Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos, frações e substâncias isoladas das folhas de *M. hiemalis* foram realizados segundo a metodologia de BICALHO e colaboradores (2003). Todos os ensaios foram avaliados utilizando caldo Nutriente para bactérias e caldo Extrato de Malte para os fungos. As amostras foram diluídas utilizando-se água e DMSO 20 %. Para avaliação de extratos, utilizou-se soluções estoques de concentração 2 mg/mL e para substâncias puras soluções de concentração 400 µg/mL.

Em cada poço da placa de Elisa foram adicionados 100 µL do meio de cultura apropriado e, em seguida, foi incorporado 100 µL da amostra que se encontrava a uma concentração de 2000 µg.mL⁻¹ para extrato ou fração, e de 400 µg.mL⁻¹ para substância pura. Posteriormente, com uma pipeta de microdiluição de 12 canais foram feitas as diluições seriadas, transferindo-se 100 µl da linha A para a linha B, da linha B para a linha C, assim sucessivamente. Após a diluição seriada foram inoculados 100 µL de suspensão do microrganismo (10⁸ células.mL⁻¹; bactérias: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 10240, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Streptococcus*

mutans ATCC 25175, *Escherichia coli* ATCC 94863, *Salmonella choleraesuis* ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa*; fungos: *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Cladosporium cladosporioides* IMI 178517, *Candida albicans* ATCC 18804 e *Crinipellis perniciosus* CEPLAC/Ilhéus-Bahia-Brasil). O controle positivo utilizado foi cloranfenicol para bactérias e ciclopiroxilamina para fungos e o negativo foi uma solução aquosa de DMSO (20 %). As placas foram incubadas a 35 °C por 24 h com bactérias e a 26 °C por 72 h com fungos.

As amostras e o controle foram avaliados nas concentrações de 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.6, 7.8 e 3.9 µg/mL. A leitura da CIM foi observada visualmente (através de turvação do meio – indicando inatividade de microrganismos). Todos os testes foram realizados em triplicata.

3.5.2. Ensaio Anti-*Trypanosoma cruzi*

Os ensaios foram realizados utilizando-se epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* Y-strain que foram cultivados a 28 °C em frascos de plástico contendo 5 cm³ de meio de cultura e suplementado com 10% de soro fetal bovino, com uma quantidade média de 5.10⁶ células/cm³. As células dispersas no meio foram centrifugadas a 2500 rpm, à 20 °C por 8 minutos, para que se depositassem no fundo do recipiente e pudessem ser coletadas. Após coletadas, foram fixadas em formaldeído e a proliferação do microorganismo foi contada numa câmara de *Neubauer* através de um microscópio sob iluminação. As células foram transferidas para tubos de ensaio contendo 3 mL do meio e diferentes concentrações da droga testada. Após 72 h foi realizada a contagem das células vivas e mortas em câmara de *Neubauer* com microscópio. O controle foi feito com DMSO e com o meio de cultura. Todas as concentrações foram testadas em triplicata e o teste foi feito em triplicata.

O IC₅₀ (50% inhibitory concentration), concentração da droga que causou redução de 50% no crescimento das células, foi obtido através da interpretação estatística dos dados por análise de divergência (ANOVA). Para isso, utilizou-se o método computacional Graphpad Prism 4.0.

3.5.3. Ensaio Anti-*Leishmania*

Os ensaios foram realizados utilizando-se promastigota de *Leishmania* que foram cultivadas a 26-27 °C em frascos de plástico contendo 5 cm³ de meio de cultura e suplementado com 10% de soro fetal bovino, com uma quantidade média de 5.10⁵ células/cm³. As células dispersas no meio foram centrifugadas a 2500 rpm, para que se depositassem no fundo do recipiente e pudessem ser coletadas. Após coletadas, foram fixadas em formaldeído e a proliferação do microorganismo foi contada numa câmara de *Neubauer* sob iluminação através de um microscópio. As células foram transferidas para tubos de ensaio contendo 3 mL do meio e diferentes concentrações da droga testada. Após 72 h foi feita a contagem das células vivas e mortas em câmara de *Neubauer* com microscópio. O controle foi feito com DMSO e com o meio de cultura. Todas as concentrações foram testadas em triplicata e o teste foi feito em triplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Constituintes Químicos Isolados

Através do procedimento experimental com as folhas de *Myrcia hiemalis*, descrito anteriormente (p. 26-37), foram isoladas as seguintes substâncias (Figura 15):

Substância I: Miricitrina

Substância II: Daucosterol

Substância III: 2',4'-diidróxi-3',5'-dimetil-6'-metóxicalcona

Substância IV: 2',6'-diidróxi-3'-metil-4'-metóxicalcona

Substância V: 2',3',4'-triidróxi-5'-metil-6'-metóxicalcona

Substância VI: 7-hidróxi-6,8-dimetil-5-metóxi-flavanona

Substância VII: 5,7-diidróxi-6,8-dimetilflavanona

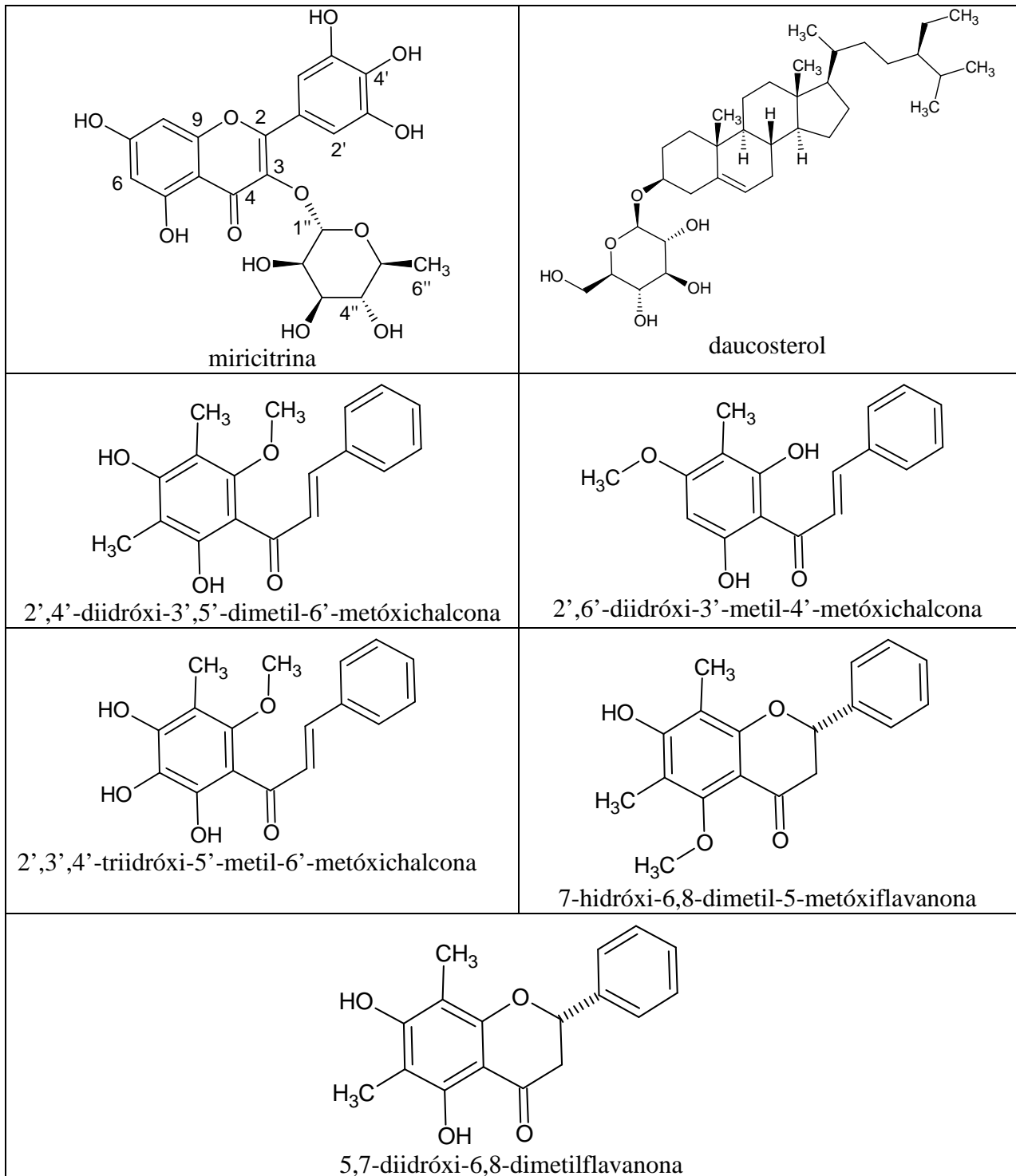


Figura 15: Constituintes químicos isolados das folhas de *M. hiemalis*

4.1.1. Identificação e Determinação Estrutural dos Constituintes Químicos Isolados

4.1.1.1. Identificação da Substância I: Miricitrina (Figura 16)

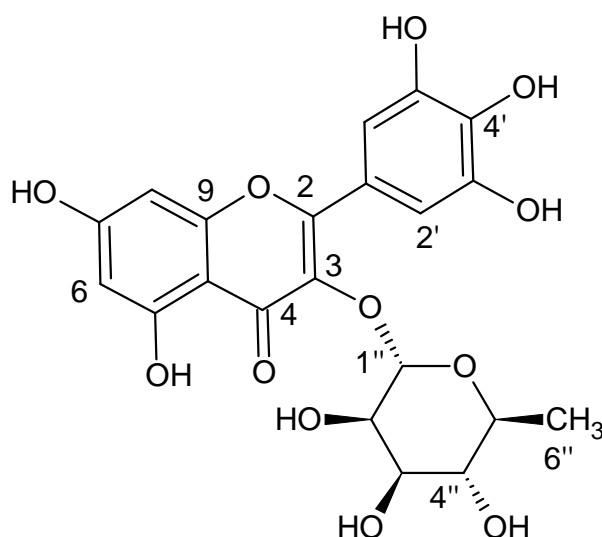


Figura 16: Estrutura da miricitrina

A Substância I (823 mg), um sólido amarelo pálido, solúvel em metanol e com ponto de fusão na faixa de 201,2-203,1 °C, foi isolada durante a partição líquido-líquido do extrato etanólico das folhas de *M. hiemalis* com diclorometano, pois solidificou entre as duas fases dentro do funil de partição (p. 28).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 17, p. 47) apresentou sinais importantes na identificação da substância I:

- Duplete em 0,97 ppm, integrando para três hidrogênios, com constante de acoplamento de 6 Hz, sugerindo a presença de um grupo metílico; multipletos entre 3,30 e 4,24 ppm característicos de um açúcar; duplete em 5,32 ppm, integrando para um hidrogênio, com constante de acoplamento de 1,5 Hz (Figura 18, p. 47).

Devido à multiplicidade dos sinais e a integração dos hidrogênios, concluiu-se ser de um monossacarídeo. O duplete em 0,97 ppm é típico do grupo metílico da ramnose. O duplete em 5,32 ppm sugere ser do hidrogênio anomérico H-1'' da ramnose e pela

constante de acoplamento entre 1-4 Hz trata-se da configuração α (se fosse β -ramnose a constante de acoplamento seria entre 6-8 Hz) (MENDEZ *et al.*, 1995);

- Dois dupletos, em 6,20 ppm e 6,36 ppm, integrando para um hidrogênio cada, com constantes de acoplamento de 1,8 Hz e 2,4 Hz, respectivamente, sugerindo ser de hidrogênios ligados a anel aromático com acoplamento em meta (Figura 18, p. 47);

- Simpleto em 6,95 ppm, integrando para dois hidrogênios equivalentes, sugerindo tratar-se de dois hidrogênios ligados a anel aromático.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 19, p. 48) apresentou os seguintes dados relevantes para a identificação da substância I:

- O sinal em 179,62 ppm, indicando a presença de carbono carbonílico α,β insaturado;

- Os sinais em 136,27 e 159,42 ppm atribuídos aos carbonos olefínicos α e β ao grupo carbonílico, respectivamente;

- Os sinais em 165,80 e 163,12 ppm foram atribuídos aos carbonos hidroxilados do anel aromático A;

- Os sinais em 146,80 (intensidade para dois carbonos) e 137,88 ppm foram atribuídos aos carbonos hidroxilados do anel aromático B, nas posições 3' e 5' para os carbonos com deslocamento químico equivalentes em 146,80 ppm e na posição 4' para o carbono com deslocamento químico em 137,88 ppm;

- O sinal em 103,58 ppm foi atribuído ao carbono 1'' da ramnose;

- Os sinais em 71,86, 72,01, 72,11 e 73,33 ppm foram atribuídos aos carbonos carbinólicos da ramnose;

- O sinal em 17,64 ppm foi atribuído ao carbono do grupo metílico da ramnose.

O espectro de coerência heteronuclear múltiplo-quântica (HMQC) foi importante para identificar os acoplamentos entre hidrogênio e carbono ligados entre si na Substância I (Figura 21, p. 49).

Pela análise de RMN ^1H e ^{13}C e por comparação com os dados da literatura em que os deslocamentos químicos destes sinais apresentaram-se de acordo, concluiu-se que a Substância I trata-se do flavonóide O-glicosilado **miricitrina** (ZAPESOCHNAYA, 1982; CHUNG *et al.*, 1996). Já existem relatos da presença da miricitrina em espécies do gênero *Myrcia* (YOSHIKAWA *et al.*, 1998).

Os flavonóides O-glicosilados estão amplamente distribuídos nas plantas e existem vários estudos em relação às atividades biológicas destes compostos (RICE-EVANS e PACKER, 2003; SCALBERT e WILLIAMSON, 2000). A miricitrina é utilizada como ingrediente funcional em alimentos e cosméticos, e na medicina devido a sua potente atividade anti-oxidante (MANACH *et al.*, 2005; ONG e KHOO, 1997; SCALBERT *et al.*, 2005; SHIMIZU *et al.*, 2006; TAMARA e JOHN, 2004; YOKOMIZO e MORIWAKI, 2005) e antiinflamatória (MEOTTI, 2006).

Tabela 03: Dados de RMN ^{13}C (75 MHz) e ^1H (300 MHz) da miricitrina, CD_3OD , δ (ppm)

C / H	$\delta^{13}\text{C}$		H ; δ ; multiplicidade; J (Hz)
		Lit.*	
2	159,42	157,7	
3	136,27	134,72	
4	179,62	178,24	
5	163,12	161,81	
6	99,79 ^a	99,30	1 H; 6,36; d; 2,4
7	165,80	164,94	
8	94,68 ^a	94,23	1 H; 6,20; d; 1,8
9	158,46	157,01	
10	105,86	104,54	
1'	121,91	120,0	
2'	109,50	108,3	1 H; 6,95; s
3'	146,80	146,3	
4'	137,86	137,0	
5'	146,80	146,3	
6'	109,50	108,3	1 H; 6,95; s
1''	103,58	102,35	1 H; 5,32; d; 1,5
2''	71,85	70,59	1 H; 4,23; m
3''	73,33	71,71	1 H; 3,34; m
4''	72,11	71,12	1 H; 3,79; m
5''	72,01	70,88	1 H; 3,52; m
6''	17,64	18,02	3 H; 0,97; d; 6,0

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

* CHUNG *et al.*, 1982.

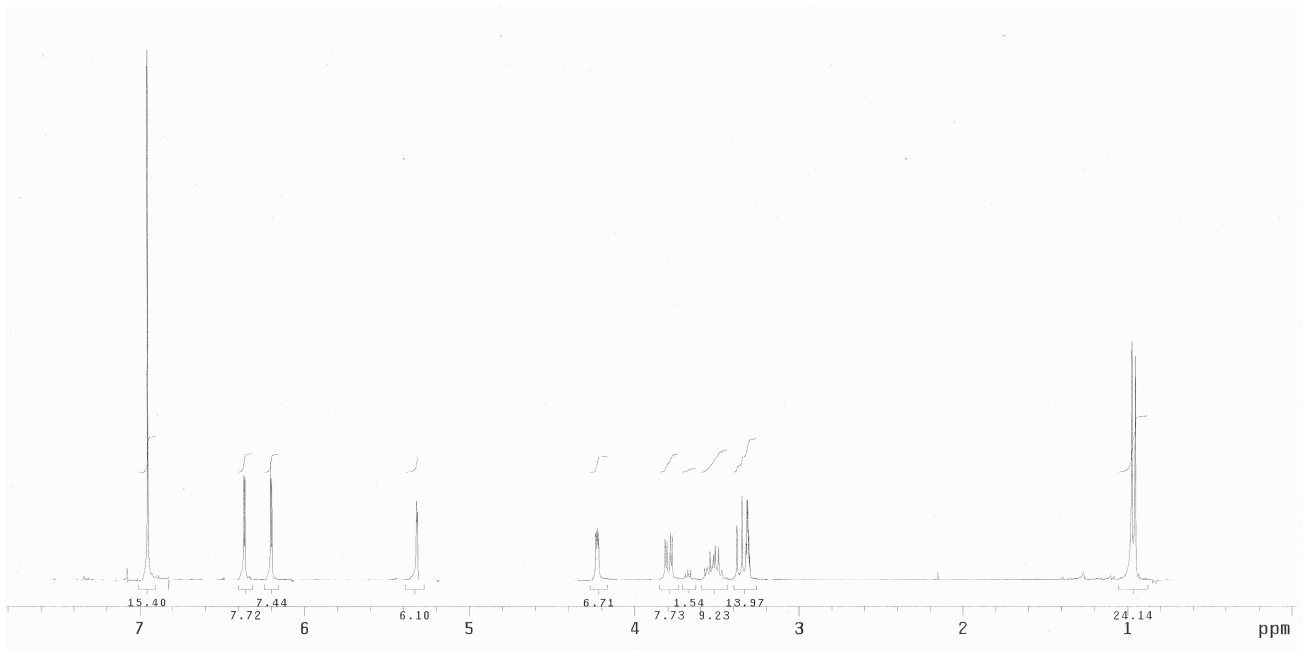


Figura 17: Espectro de RMN ^1H da miricitrina, CD_3OD , 300 MHz

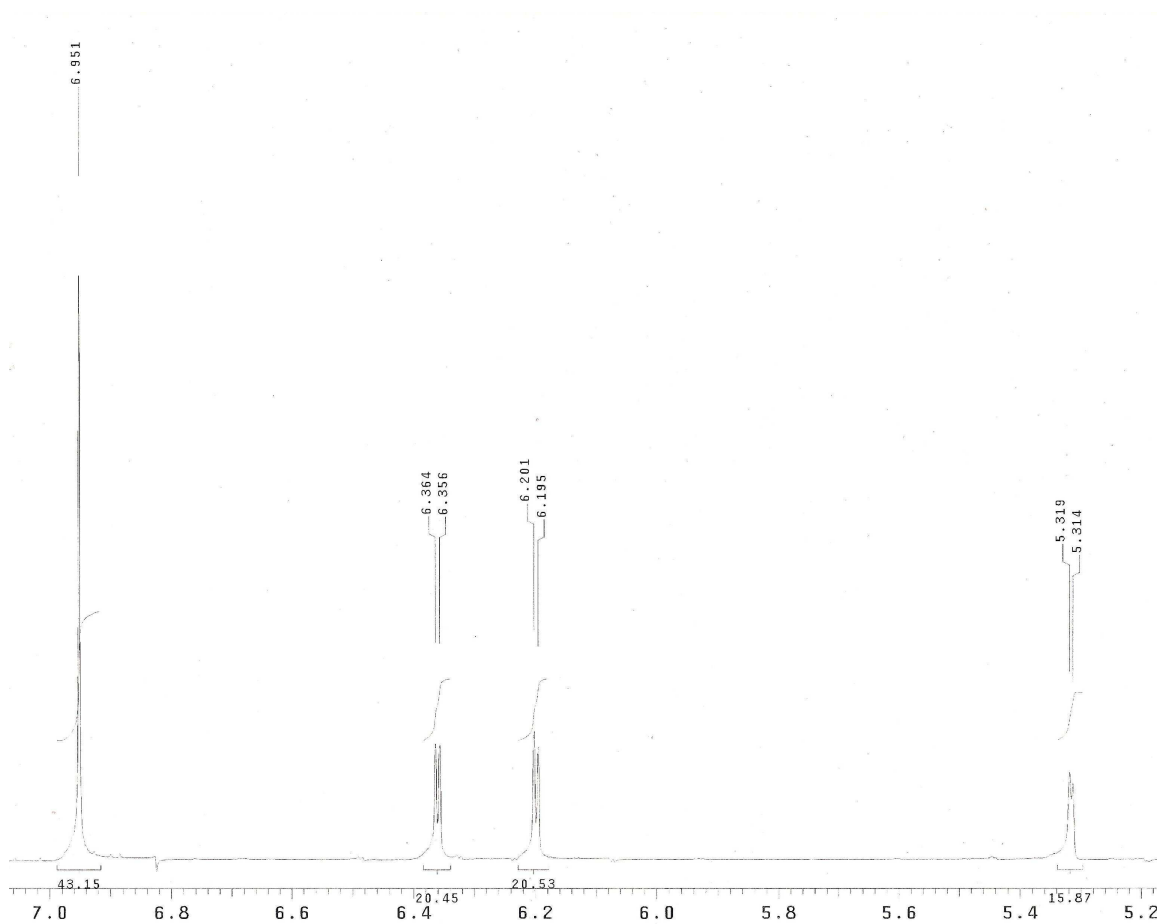


Figura 18: Ampliação do espectro de RMN ^1H da miricitrina, CD_3OD , 300 MHz

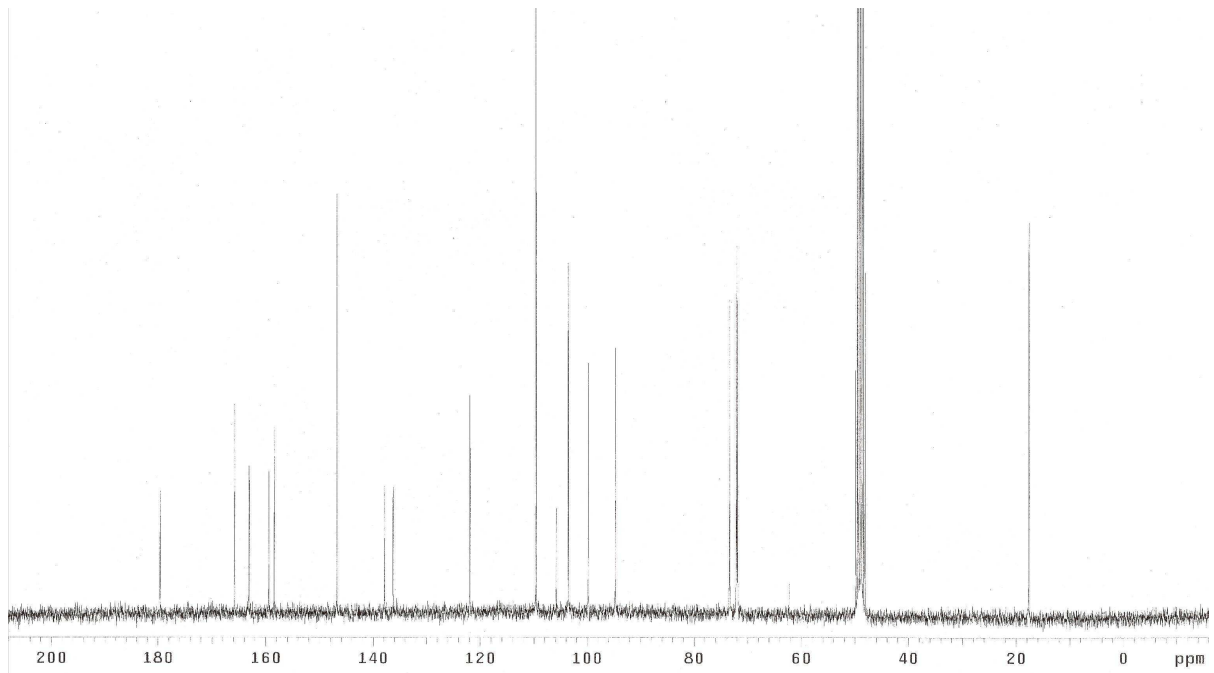


Figura 19: Espectro de RMN ^{13}C da miricitrina, CD_3OD , 75 MHz

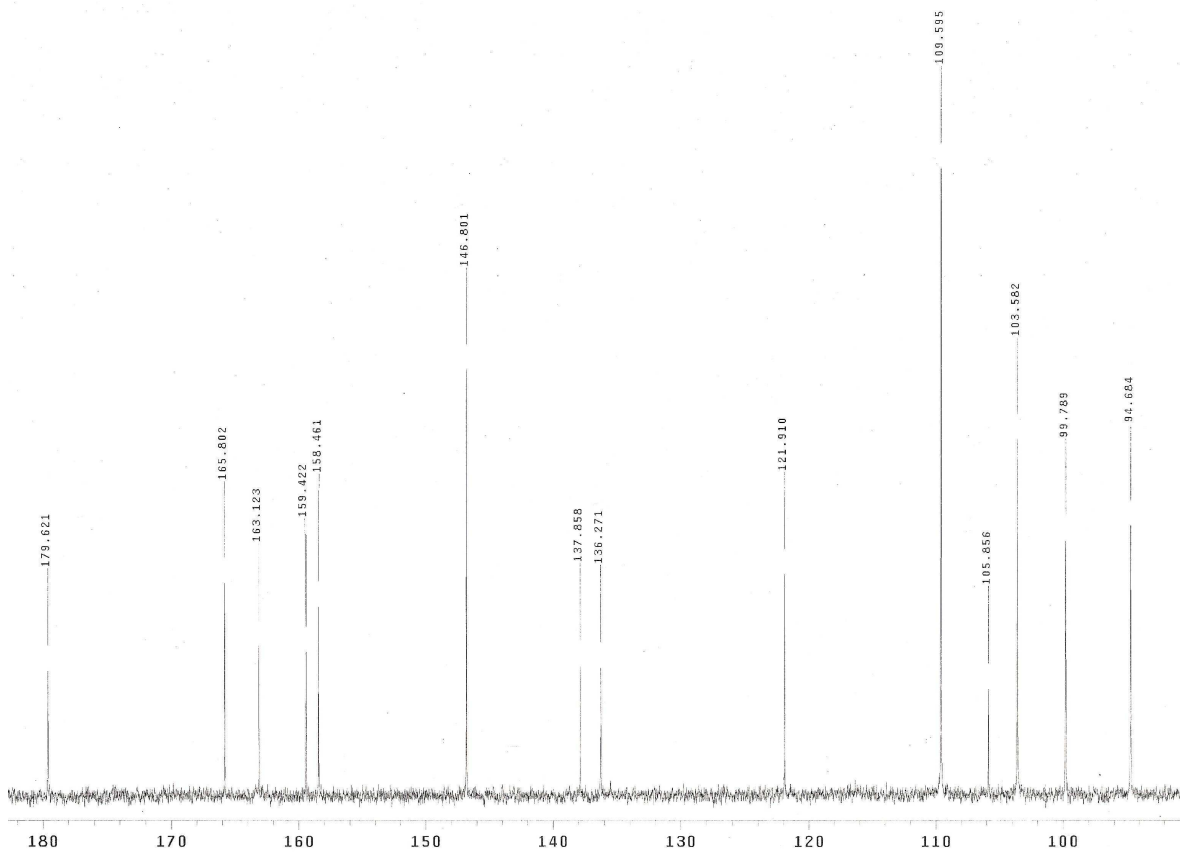


Figura 20: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C da miricitrina (90 a 180 ppm), CD_3OD , 75 MHz

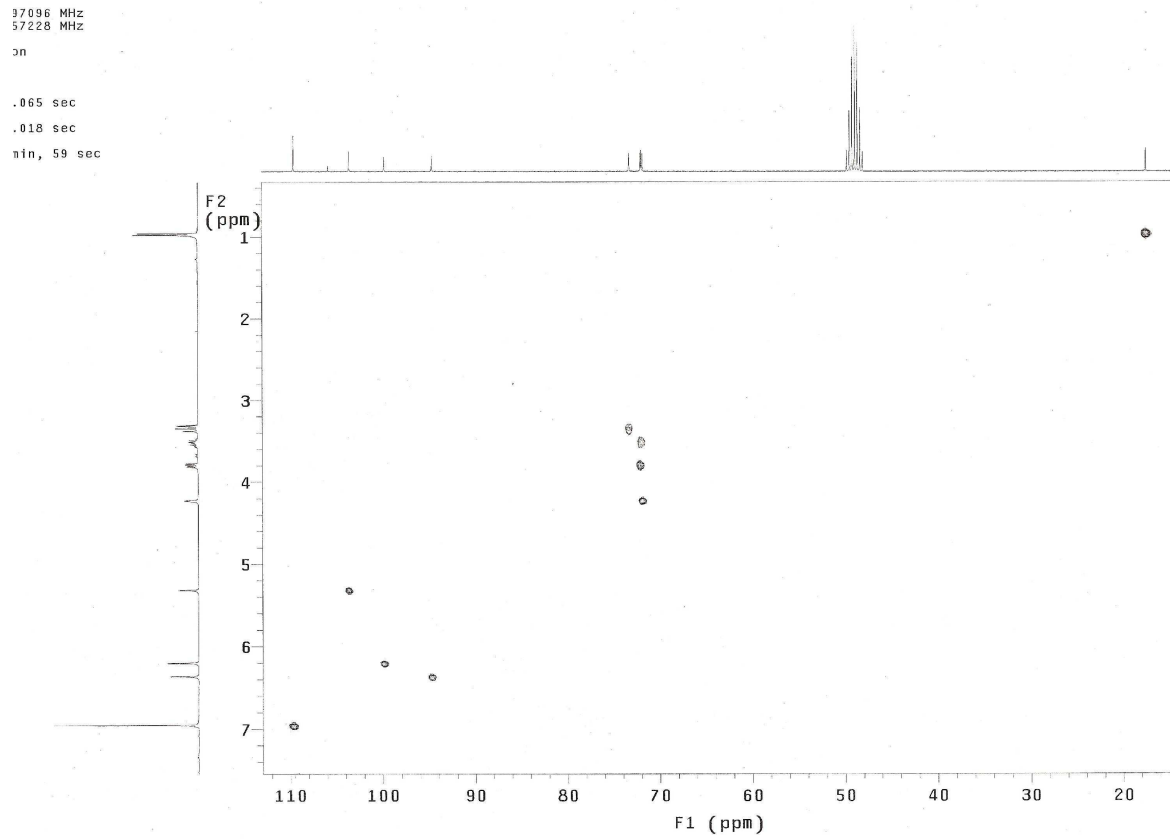


Figura 21: Espectro de RMN de HMQC da miricitrina, CD_3OD , 300 MHz

4.1.1.2. Identificação da Substância II: Daucoesterol (Figura 22)

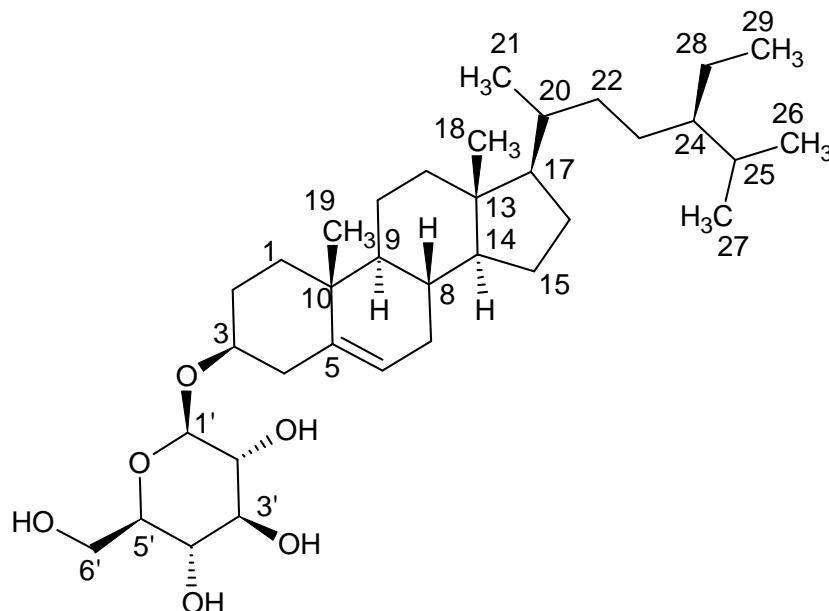


Figura 22: Estrutura do daucoesterol

A Substância II (24 mg), um sólido branco, solúvel em piridina e com ponto de fusão na faixa de 259,4-260,0 °C, foi isolada da coluna filtrante da fase em diclorometano das folhas de *M. hiemalis* (p. 28 e p. 32).

O espectro de RMN ^1H (Figura 24, p. 54) apresentou sinais importantes para a determinação estrutural do composto:

- Sinais entre 0,54 e 0,86 ppm, sugerindo a presença de grupos metílicos. Pela observação mais detalhada dessa região do espectro, constatou-se a presença de seis grupos metílicos;

- Multiplete entre 5,15 e 5,25 ppm, parcialmente encoberto pelo sinal da água do solvente, sugerindo um hidrogênio olefínico;

- Multipletos entre 3,57 e 4,19 ppm, característicos de um açúcar; duplete em 4,67 ppm, integrando para um hidrogênio, com constante de acoplamento de 7,8 Hz; dois duplos dupletos, um em 4,16 ppm, com constantes de acoplamento de 11,7 e 2,4 Hz, e outro em 3,98 ppm, com constantes de acoplamento de 11,7 e 5,4 Hz. Devido a multiplicidade dos sinais e a integração dos hidrogênios, concluiu-se que trata-se de um

monossacarídeo. O duplete em 4,67 ppm sugere ser do hidrogênio anomérico (H-1') e o valor da constante de acoplamento indicou a configuração β para o açúcar (Figura 25, p. 54). Já os dois duplos dupletos em 4,16 ppm e 3,98 ppm sugerem tratar-se dos dois hidrogênios 6' (Figura 25, p. 54). Sendo assim, concluiu-se que o monossacarídeo ligado à substância é a β -glicose.

Os espectros de RMN de ^{13}C (Figura 26, p. 55) e DEPT 135 (Figura 27, p. 55) apresentaram sinais relevantes para identificação da Substância II:

- O sinal em 141,54 ppm atribuído a um carbono olefínico, que por comparação com o espectro de DEPT 135 concluiu-se não ser hidrogenado;

- O sinal em 122,48 ppm atribuído a um carbono olefínico, que por comparação com o espectro de DEPT 135 concluiu-se ser mono-hidrogenado;

- O sinal em 102,78 ppm atribuído ao carbono 1', sugerido pelo espectro de DEPT 135 tratar-se de um carbono mono-hidrogenado;

- O sinal em 79,10 ppm atribuído a um carbono carbinólico, indicando pelo espectro de DEPT 135 tratar-se de um carbono mono-hidrogenado, o que sugeriu tratar-se de um esteróide;

- Os sinais em 78,52, 78,42, 75,42 e 71,91 ppm que foram atribuídos aos carbonos carbinólicos da β -glicose, que por comparação com o espectro de DEPT 135 concluiu-se que se tratavam de grupos metínicos;

- O sinal em 63,0 ppm foi atribuído ao carbono carbinólico 6' do açúcar, pois em comparação com o espectro de DEPT 135 concluiu-se que corresponde a um grupo metilênico;

- Os sinais em 43,12 e 37,52 ppm foram atribuídos por comparação com o espectro de DEPT 135 a carbonos quaternários;

- Os sinais em 40,66, 39,74, 38,17, 34,80, 32,76, 30,71, 29,11, 26,97, 25,08, 23,95 e 21,88 ppm foram atribuídos por comparação com o espectro de DEPT a carbonos metilênicos. Estes dados levaram a conclusão de que haveria uma cadeia lateral alifática e saturada, sugerindo uma estrutura de triterpeno tetracíclica.

A análise dos espectros de RMN ^1H , ^{13}C e DEPT 135 e a comparação destes dados com a literatura (LENDL *et al.*, 2005) permitiu a identificação da Substância II como sendo o esteróide **daucosterol**.

Tabela 04: Dados de RMN ^{13}C (75 MHz) e ^1H (300 MHz) do daucoesterol, Piridina- d_5 e CD_3OD , δ (ppm)

C / H	$\delta^{13}\text{C}$		H ; δ ; multiplicidade; J (Hz)	C / H	$\delta^{13}\text{C}$		H ; δ ; multiplicidade; J (Hz)
		Lit.*				Lit.*	
1	38,17	36,8	2 H; t, d	19	19,86 ^b	18,5	3 H; 0,76; s
2	30,71	29,0	1 H; m	20	37,03	35,6	1 H; m
3	79,10	78,4	1 H; m	21	19,42 ^b	18,0	3 H; 0,85; d; 6,6
4	39,74	38,1	2 H; m	22	34,80	33,4	2 H; m
5	141,54	139,9		23	26,97	25,4	2 H; m
6	122,48	121,4	1 H; 5,15- 5,25; m	24	46,76	45,4	1 H; m
7	32,76	31,4	2 H; m	25	30,10	28,6	1 H; m
8	32,76	31,4	1 H; m	26	19,59 ^b	18,1	3 H; 0,72; d; 5,7
9	51,11	49,7	1 H; m	27	20,33 ^b	18,9	3 H; 0,74; d; 5,7
10	37,52	36,2		28	23,95	22,5	2 H; m
11	21,88	20,5	2 H; m	29	12,50 ^a	11,1	3 H; 0,82; t; ~10,5
12	40,66	39,3	2 H; t, m	1'	102,78	100,6	1 H; 4,67; d; 7,8
13	43,12	41,8		2'	75,42	73,1	1 H; m
14	57,59	56,3	1 H; m	3'	78,52	76,1	1 H; m
15	25,08	23,7	2 H; m	4'	71,91	69,7	1 H; m
16	29,11	27,7	2 H; m	5'	78,42	75,6	1 H; m
17	56,97	55,5	1 H; m	6'	63,00	61,1	1H ; 3,97; dd; 11,7 e 5,4 1 H; 4,16; dd; 11,7 e 2,4
18	12,39 ^a	11,1	3 H; 0,54; s				

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

* LENDL *et al.*, 2005.

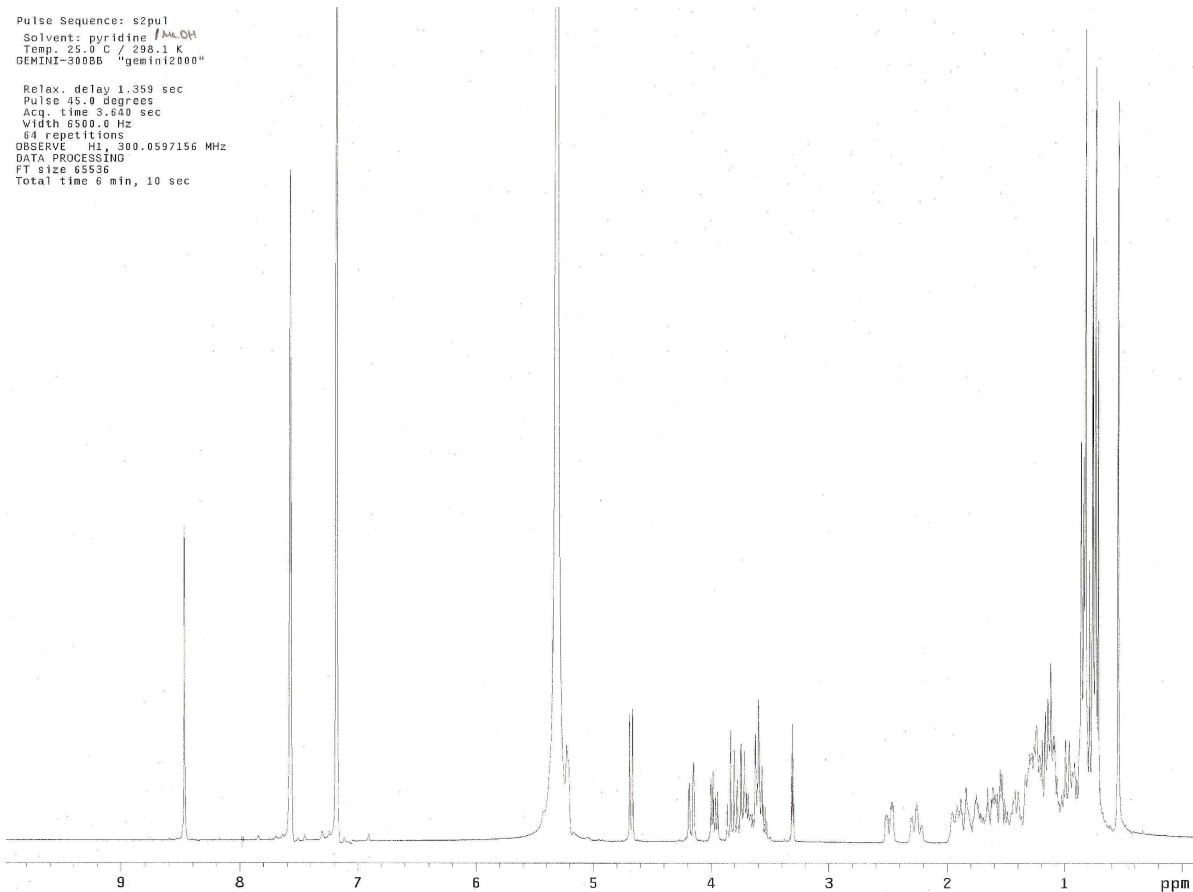


Figura 24: Espectro de RMN ^1H do daucosterol, piridina- d_5 e CD_3OD , 300 MHz

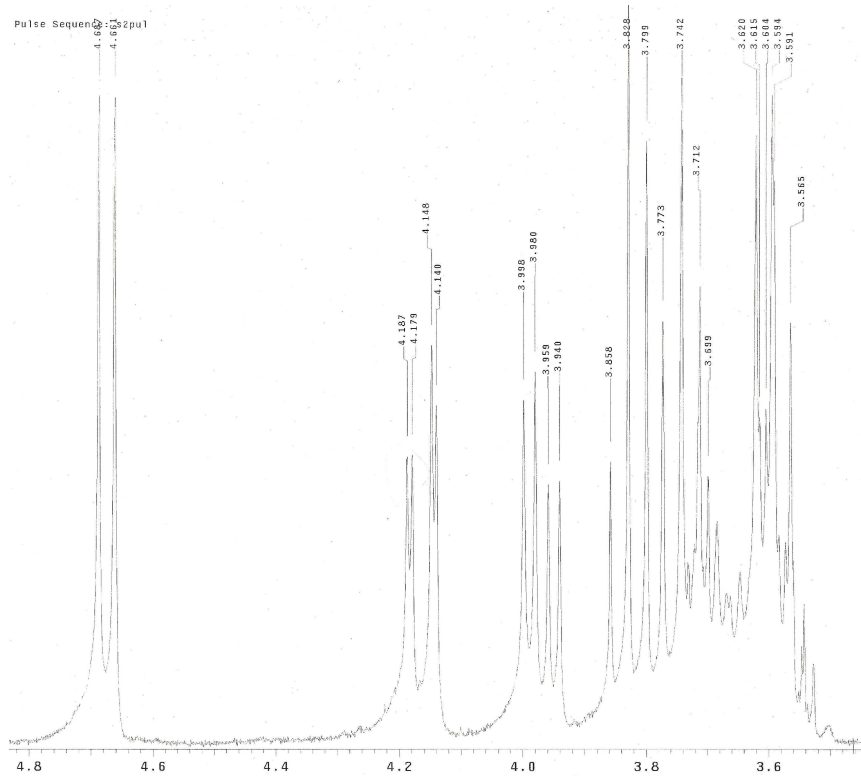


Figura 25: Ampliação do espectro de RMN ^1H do daucosterol, piridina- d_5 e CD_3OD , 300 MHz

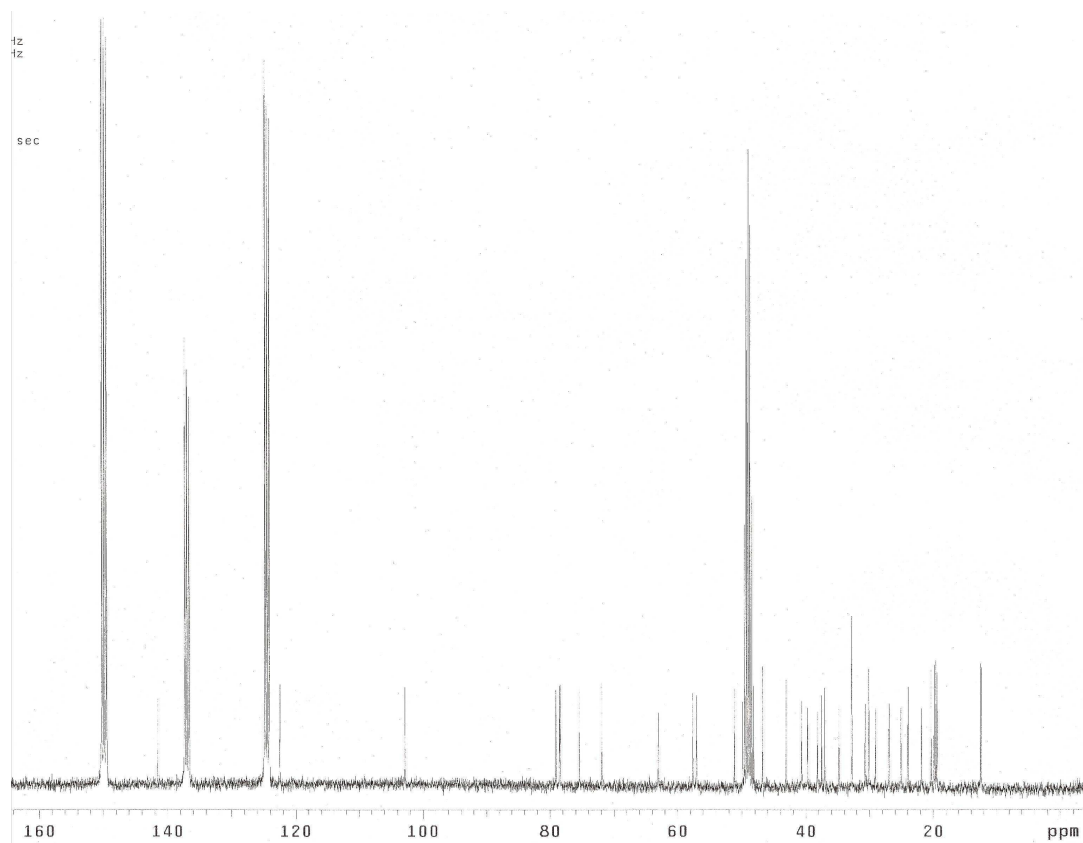


Figura 26: Espectro de RMN ¹³C do daucosterol, piridina-d₅ e CD₃OD, 75 MHz

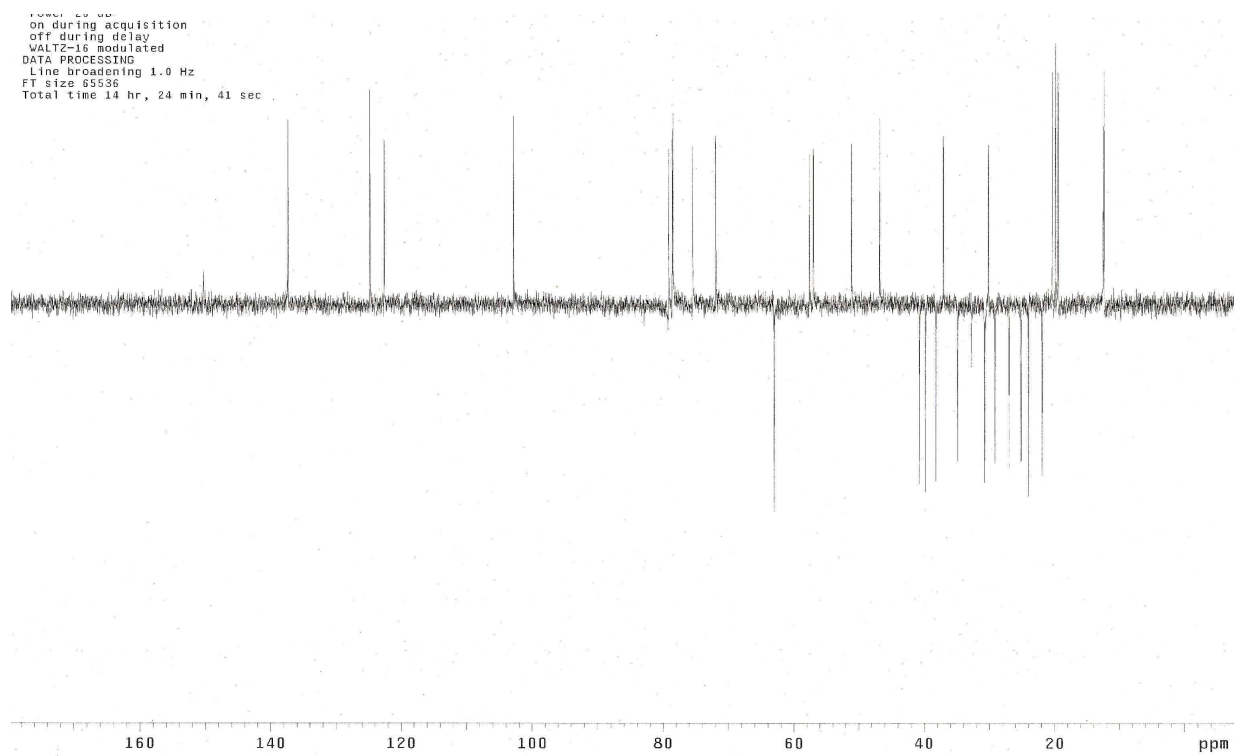


Figura 27: Espectro de DEPT 135 do daucosterol, piridina-d₅ e CD₃OD, 75 MHz

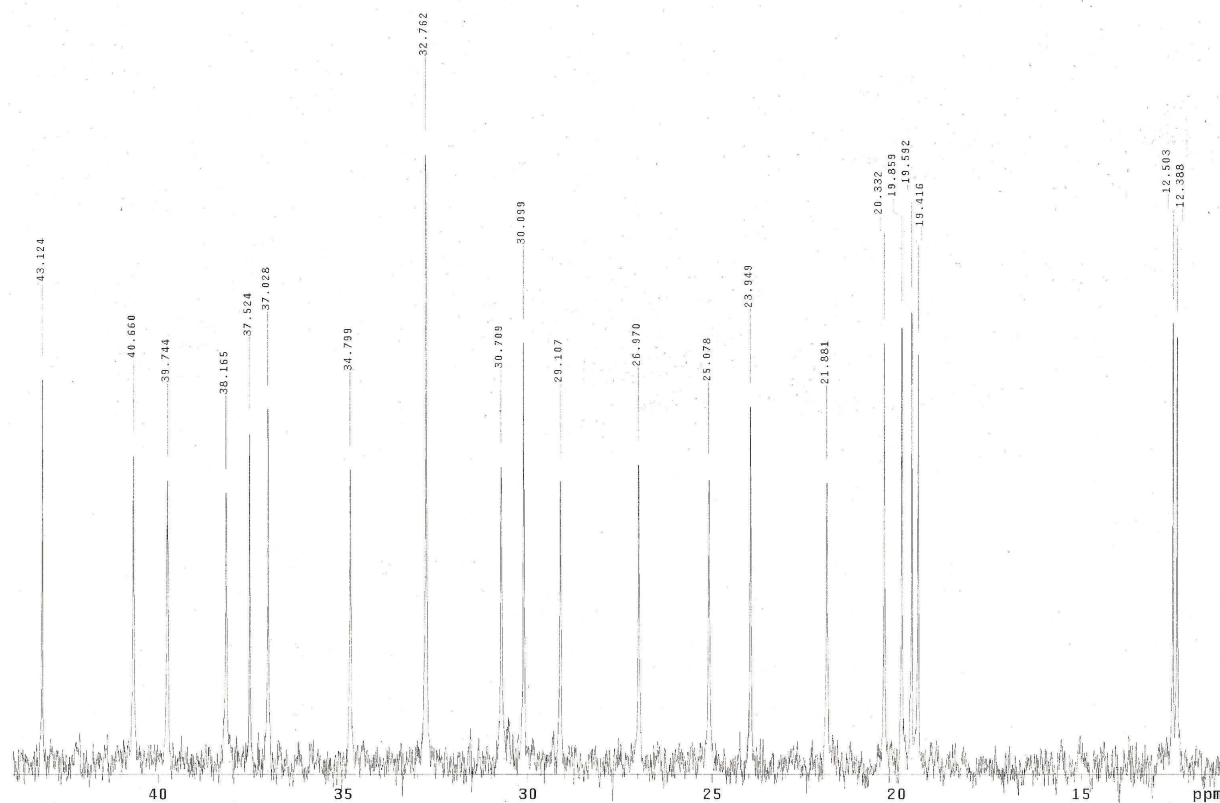


Figura 28: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C do daucosterol (0 a 45 ppm), piridina- d_5 e CD_3OD , 75 MHz

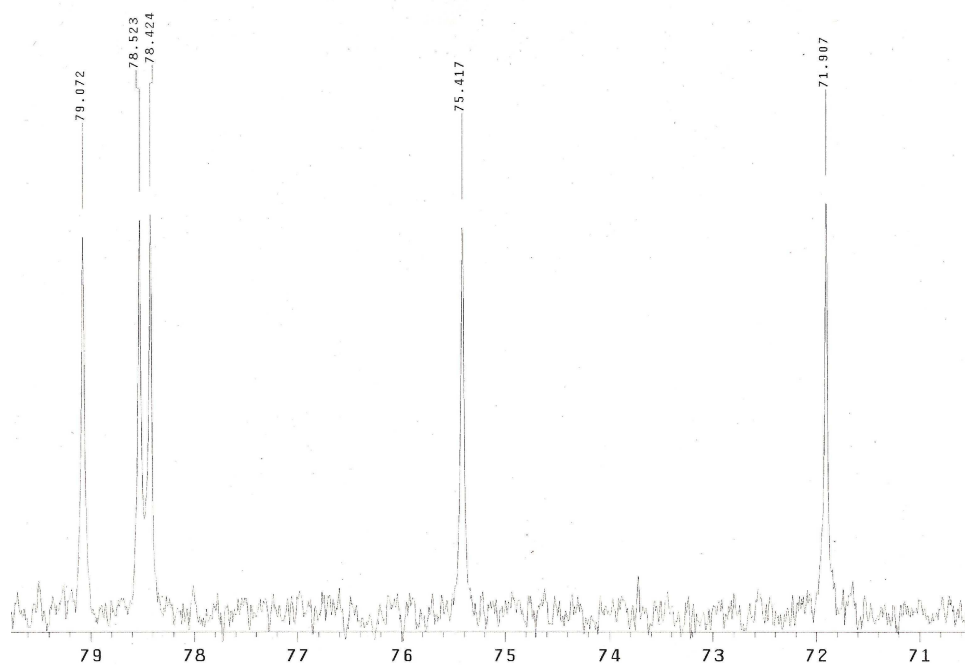


Figura 29: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C do daucosterol (71 a 80 ppm), piridina- d_5 e CD_3OD , 75 MHz

4.1.1.3. Identificação da Substância III: 2',4'-diidróxi-3',5'-dimetil-6'-metóxicalcona (Figura 30)

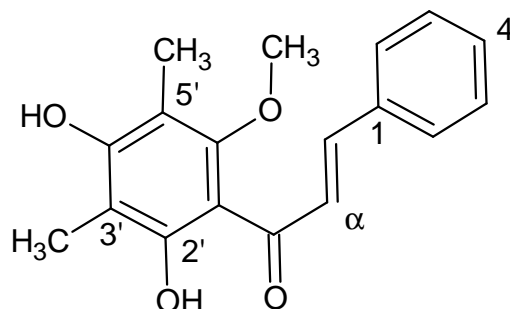


Figura 30: Estrutura da chalcona 2',4'-diidróxi-3',5'-dimetil-6'-metóxicalcona

A Substância III (2,29 g), um sólido amorfo cor laranja, solúvel em clorofórmio e com ponto de fusão na faixa de 122,7-123,6 °C, foi isolada do fracionamento da fase em diclorometano das folhas de *M. hiemalis* (p. 28 e p. 33).

O espectro de RMN ^1H (Figura 32, p. 60) apresentou sinais importantes para a identificação da substância III:

- Dois simpletos em 2,15 e 2,17 ppm, cada um integrando para três hidrogênios, sugerindo dois grupos metílicos;
- Simpleto em 3,70 ppm, integrando para três hidrogênios, sugerindo um grupo metoxílico;
- Dois multipletos entre 7,41 e 7,44 ppm e entre 7,64 e 7,67 ppm, integrando para três e dois hidrogênios respectivamente, sugerindo um grupo fenílico;
- Dois dupletos em 7,85 e 8,00 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 33, p. 60);
- Simpleto em 13,62 ppm, sugerindo a presença de um grupo hidroxílico fenólico, 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 (Figura 34, p. 61) apresentou sinais importantes na determinação da estrutura da Substância III:

- Sinal em 193,35 ppm atribuído a um carbono carbonílico α,β insaturado;
- Sinais em 126,61 e 142,89 ppm foram atribuídos aos carbonos insaturados por dupla ligação α e β à carbonila, respectivamente;
- Os sinais em 135,25, 130,19, 128,89 e 128,37 ppm, estes dois últimos com intensidade para dois carbonos cada, foram atribuídos a um grupo fenílico (anel A);
- Os sinais em 161,98, 159,30 e 158,78 ppm, foram atribuídos a carbonos oxigenados de anel aromático B;
- Os sinais em 108,95 ppm foi atribuído a dois carbonos do anel aromático B nas posições 3' e 5' ligados a grupos metílicos;
- O sinal em 106,60 ppm foi atribuído ao carbono 1' do anel aromático B, ligado a um carbono carbonílico;
- O sinal em 62,33 ppm foi atribuído a um carbono carbinólico e concluiu-se que trata-se de um grupo metoxílico ligado ao anel aromático B;
- Os sinais em 8,24 e 7,57 ppm foram atribuídos a dois carbonos metílicos ligados ao anel aromático B.

O experimento de NOE diferencial permitiu determinar as posições dos substituintes do anel aromático B. A irradiação dos hidrogênios do grupo metoxílico levou à intensificação dos sinais dos hidrogênios próximos (Figura 35, p. 61), que neste caso foram os seguintes sinais: um simpleto em 2,17 ppm, referente aos hidrogênios de um grupo metílico ligado ao anel aromático B, e um duplete em 8,0 ppm, referente ao hidrogênio olefínico ligado ao carbono β carbonílico. Sendo assim, conclui-se que o grupo metoxílico está na posição 6' do anel aromático B (Figura 31).

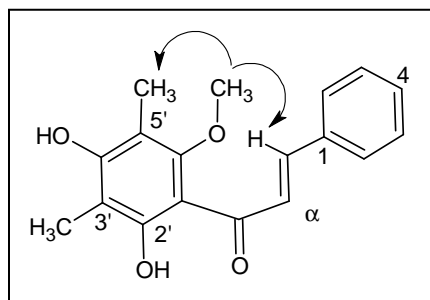


Figura 31: NOE diferencial observado pela irradiação dos hidrogênios do grupo metoxílico.

Através da análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C constatou-se que Substância III é a chalcona **2',4'-diidróxi-3',5'-dimetil-6'-metóxicalcona**.

A chalcona 2',4'-diidróxi-3',5'-dimetil-6'-metóxicalcona já foi isolada das espécies *Myrica gale* (Myricaceae) (ANTHONSEN *et al.*, 1971; MALTERUD *et al.*, 1977), *Syzygium samarangense* (Myrtaceae) (SRIVASTAVA *et al.*, 1995) e *Metrosideros species* (Myrtaceae) (MUSTAFA *et al.*, 2005).

Tabela 05: Dados de RMN ^{13}C (75 MHz) e ^1H (300 MHz) da 2',4'-diidróxi-3',5'-dimetil-6'-metóxicalcona, CDCl_3 , δ (ppm)

C / H	$\delta^{13}\text{C}$		H ; δ ; multiplicidade; J (Hz)
		Lit.*	
1	135,25	135,4	
2	128,89 ^a	128,9	1 H; 7,64-7,67; m
3	128,37 ^a	128,4	1 H; 7,41-7,44; m
4	130,19	130,2	1 H; 7,41-7,44; m
5	128,37 ^b	128,4	1 H; 7,41-7,44; m
6	128,89 ^b	128,9	1 H; 7,64-7,67; m
C = O	193,35	193,4	
α	126,61	126,8	1 H; 7,85; d; 15,6
β	142,89	142,9	1 H; 8,00; d; 15,6
1'	106,59	106,6	
2'	161,98	162,1	
3'	108,95	108,9	
4'	159,30	159,3	
5'	108,95	109,1	
6'	158,78	130,2	
HO - 2'			1 H; 13,63; s
CH ₃ - 3'	7,57	7,5	3 H; 2,15; s
CH ₃ - 5'	8,24	8,2	3 H; 2,17; s
MeO - 4'	62,33	62,3	3 H; 3,70; s

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

* SRIVASTAVA *et al.*, 1995

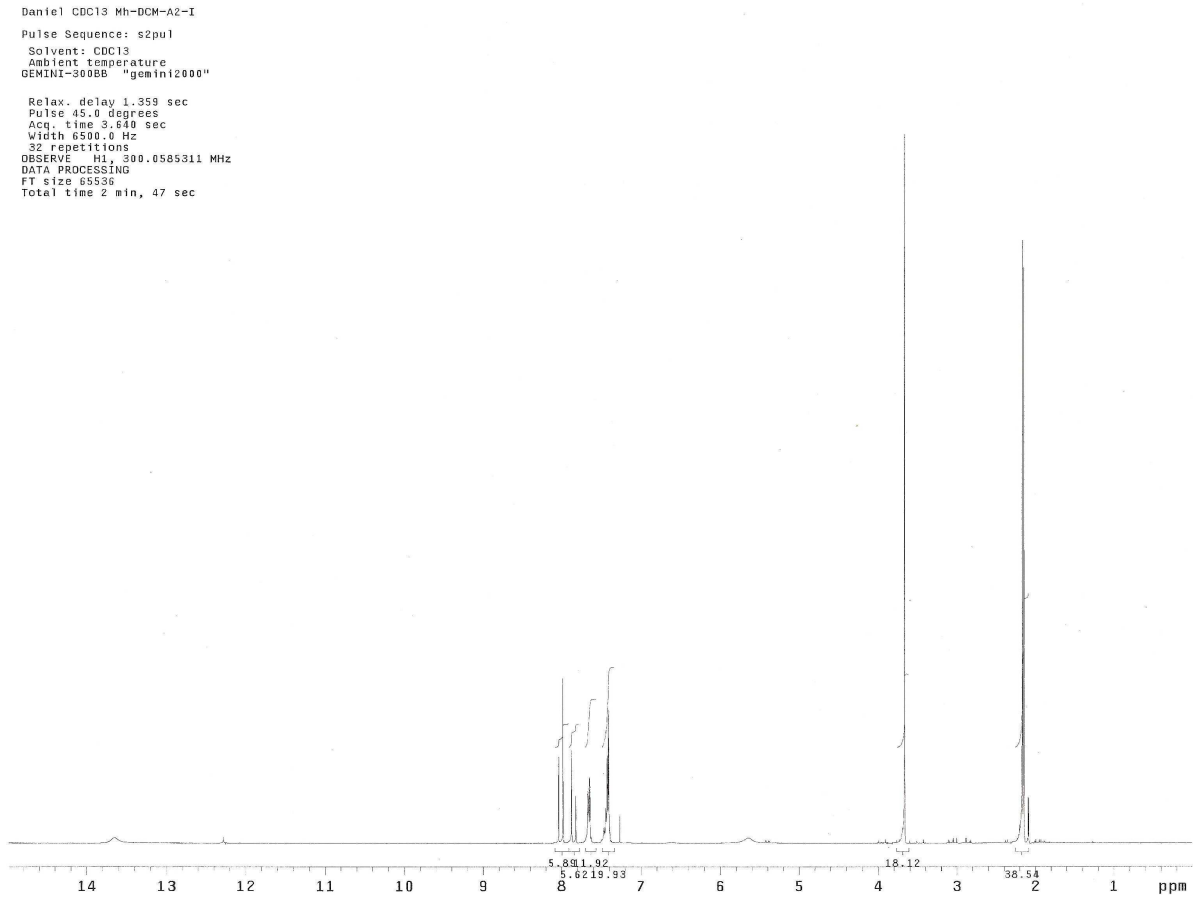


Figura 32: Espectro de RMN ^1H da 2',4'-diidróxi-3',5'-dimetil-6'-metóxicalcona, CDCl_3 , 300 MHz

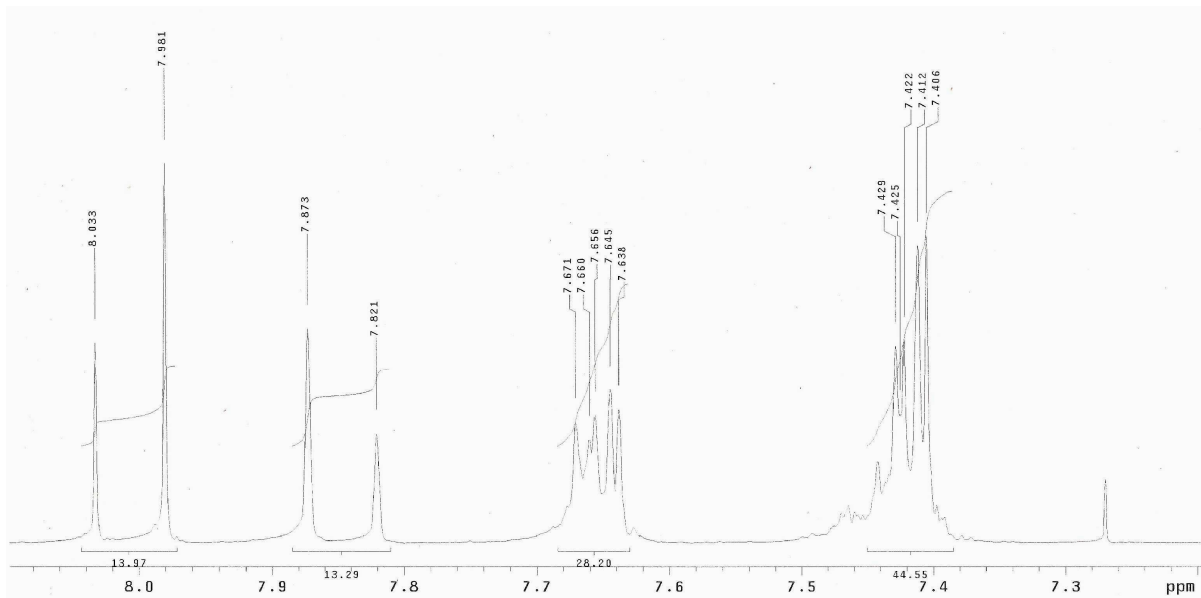


Figura 33: Ampliação do espectro de RMN ^1H da 2',4'-diidróxi-3',5'-dimetil-6'-metóxicalcona, CDCl_3 , 300 MHz

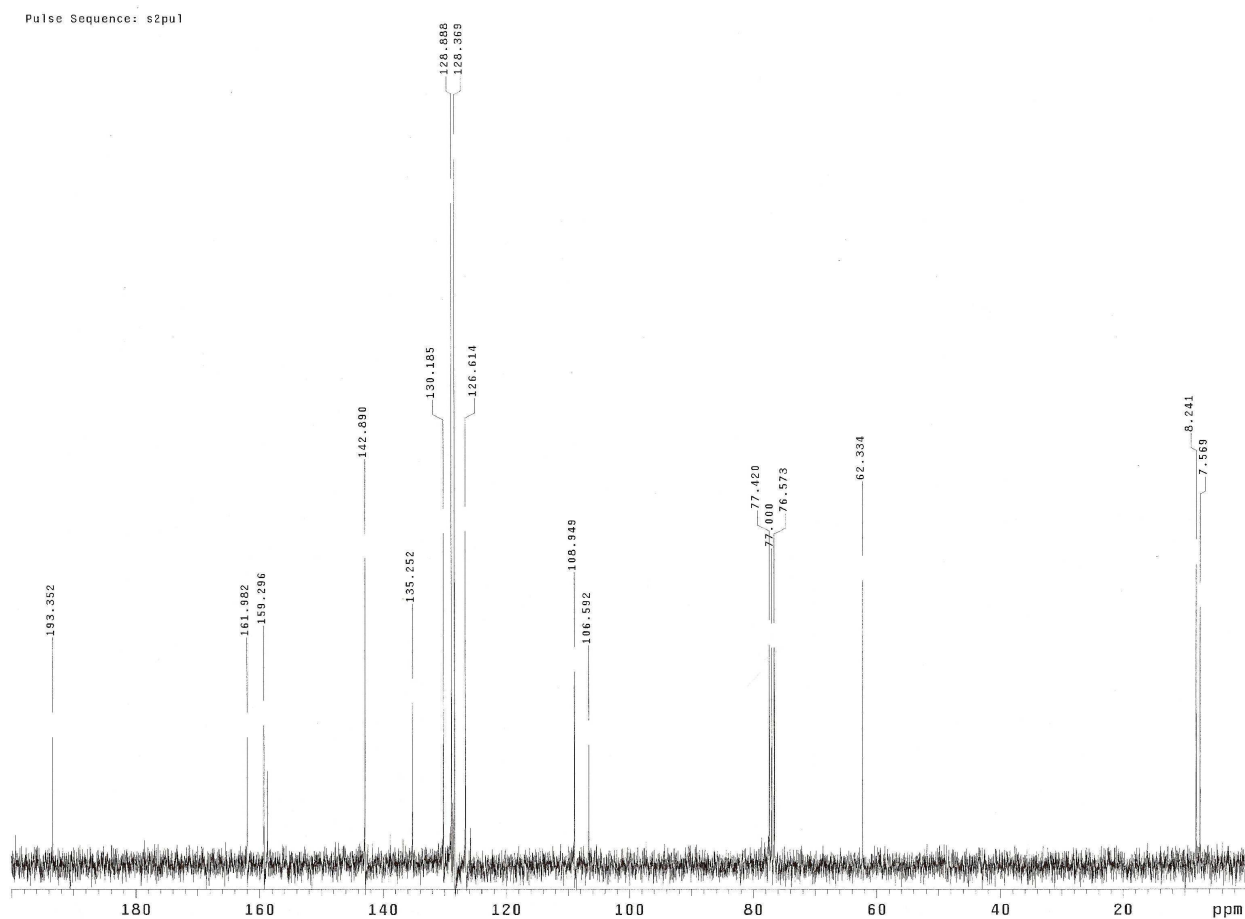


Figura 34: Espectro de RMN ^{13}C da 2',4'-diidróxi-3',5'-dimetil-6'-metóxicalcona, CDCl_3 , 75 MHz

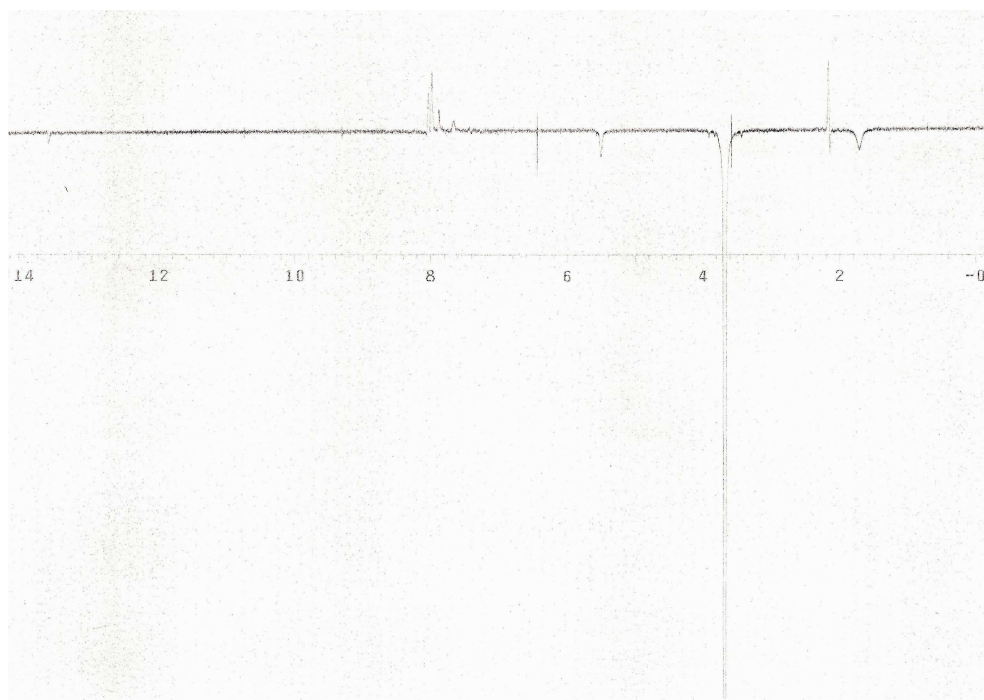


Figura 35: Espectro de NOE diferencial por irradiação dos hidrogênios do grupo metoxílico da 2',4'-diidróxi-3',5'-dimetil-6'-metóxicalcona, CDCl_3 , 300 MHz.

4.1.1.4. Identificação da Substância IV: 2',6'-diidróxi-3'-metil-4'-metóxichalcona (Figura 36)

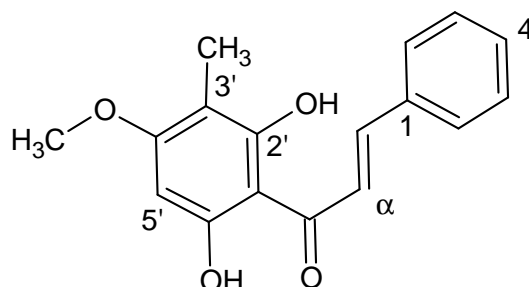


Figura 36: Estrutura da chalcona 2',6'-diidróxi-3'-metil-4'-metóxichalcona

A Substância IV (564 mg), cristais amarelos, solúveis em acetona e com ponto de fusão na faixa de 205,6-206,2 °C, foi isolada do fracionamento da fase em diclorometano das folhas de *M. hiemalis* (p. 28 e p. 34).

O espectro de RMN ^1H (Figura 39, p. 66) apresentou sinais úteis para a identificação da substância IV:

- Simpleto em 2,0 ppm, integrando para três hidrogênios, sugerindo um grupo metílico ligado a anel aromático;
- Simpleto em 3,93 ppm, integrando para três hidrogênios, sugerindo um grupo metoxílico;
- Simpleto em 6,16 ppm, integrando para um hidrogênio, sugerindo um hidrogênio ligado a um carbono do anel aromático;
- Dois multipletos entre 7,43 e 7,48 ppm e entre 7,70 e 7,78 ppm, integrando para três e dois hidrogênios respectivamente, sugerindo um grupo fenílico;
- Dois dupletos em 7,75 e 8,03 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 40, p. 66);
- Simpleto em 14,53 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 (Figura 41, p. 67) apresentou sinais importantes na determinação da estrutura da Substância IV:

- Sinal em 193,13 ppm atribuído a um carbono carbonílico α , β insaturado;
- Sinais em 128,63 e 142,35 ppm foram atribuídos aos carbonos insaturados por dupla ligação α e β à carbonila, respectivamente;
- Os sinais em 136,43, 130,85, 129,78 e 129,12 ppm, estes dois últimos com intensidade para dois carbonos cada, foram atribuídos a carbonos de um grupo fenílico não substituído (anel A);
- Os sinais em 166,53, 163,40 e 161,80 ppm, foram atribuídos a carbonos oxigenados do anel aromático B;
- O sinal em 106,04 ppm foi atribuído ao carbono 1' do anel aromático B, ligado a um carbono carbonílico;
- O sinal em 104,47 ppm foi atribuído a um carbono do anel aromático B ligado a um grupo metílico;
- O sinal em 91,47 ppm foi atribuído a um carbono do anel aromático B ligado a um hidrogênio;
- O sinal em 56,12 ppm foi atribuído a um carbono carbinólico, concluiu-se que trata-se de um grupo metoxílico ligado ao anel aromático B;
- O sinal em 7,50 ppm foi atribuído ao carbono do grupo metílico ligado ao anel aromático B.

O experimento de NOE diferencial permitiu determinar as posições dos substituintes do anel aromático B. A irradiação do hidrogênio ligado ao carbono aromático do anel B levou a intensificação do sinal dos hidrogênios próximos (Figura 42, p. 67), que neste caso foi o simpleto em 3,93 ppm, referentes aos hidrogênios de um grupo metoxílico, respectivamente, ambos ligados ao anel aromático B (Figura 38-a, p. 64).

O NOE diferencial pela irradiação do hidrogênio olefínico ligado ao carbono β carbonílico apresentou apenas NOE negativo do sinal simpleto em 14,52 ppm, referente ao hidrogênio da hidroxila quelatogênica ligada ao anel aromático B (Figura 43, p. 67). O fato de não ocorrer intensificação do sinal do grupo hidroxílico na posição 2' pode ser

justificado pela troca rápida do hidrogênio da hidroxila, que pode não permanecer ligado ao oxigênio por tempo suficiente para ser detectado.

Também foi realizado NOE diferencial por irradiação dos hidrogênios do grupo metoxílico ligado ao anel aromático B, que levou a intensificação do sinal simpleto em 6,18 ppm, referente ao hidrogênio ligado ao anel aromático B (Figuras 38-b e 44, p. 68).

A confirmação das posições dos substituintes do anel B foi através do espectro de interação heteronuclear spin-spin a longa distância ($^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$) de átomos de carbono e hidrogênio (HMBC) (Figura 45, p. 68) revelou informações importantes para a determinação das posições dos substituintes do anel B:

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

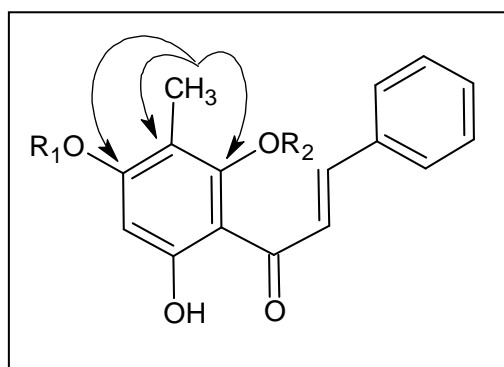


Figura 37: Correlação heteronuclear spin-spin a longa distância ($^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$) observada de átomos de carbono e hidrogênio (HMBC).

Sendo assim, concluiu-se que os dois grupos hidroxílicos estão nas posições 2' e 6' e o grupo metoxílico na posição 4'.

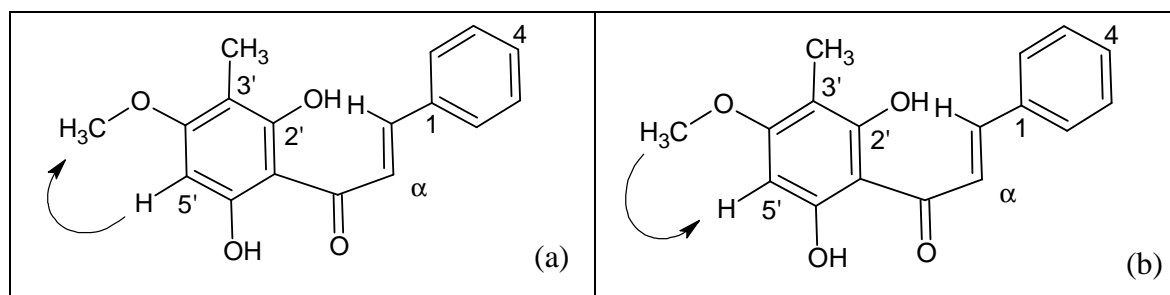


Figura 38: NOE diferencial observado (a) pela irradiação hidrogênio ligado ao carbono aromático do anel B e (b) pela irradiação dos hidrogênios do grupo metoxílico.

Através da análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , por comparação com a literatura (MUSTAFA *et al.* 2005), constatou-se que Substância IV é a **chalcona 2',6'-diidróxi-3'-metil-4'-metóxicalcona**.

O isolamento da 2',6'-diidróxi-3'-metil-4'-metóxicalcona já foi reportado na família Myrtaceae (MUSTAFA *et al.*, 2005).

Tabela 06: Dados de RMN ^{13}C (75 MHz) e ^1H (300 MHz) da 2',6'-diidróxi-4'-metóxi-3'-metilchalcona, Acetona- d_6 , δ (ppm)

C / H	$\delta^{13}\text{C}$		H; δ (ppm); multiplicidade; J (Hz)
		Lit.*	
1	136,43	137,2	
2	129,78 ^a	131,6	1 H; 7,70-7,78; m
3	129,12 ^a	129,9	1 H; 7,43-7,48; m
4	130,85	130,5	1 H; 7,43-7,48; m
5	129,12 ^b	129,9	1 H; 7,43-7,48; m
6	129,78 ^b	131,6	1 H; 7,70-7,78; m
C = O	193,13	194,5	
α	128,63	129,4	1 H; 7,75; d; 15,6
β	142,35	143,3	1 H; 8,03; d; 15,6
1'	106,04 ^c	106,9	
2'	166,53	162,1	
3'	104,47 ^c	105,3	
4'	161,80	165,7	
5'	91,47	92,2	1 H; 6,16; s
6'	163,40	161,9	
CH ₃ – 3'	7,50	8,1	3 H; 2,0; s
MeO – 4'	56,12	56,7	3 H; 3,93; s
HO – 6'			1 H; 14,53; s

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

* MUSTAFA *et al.*, 2005.

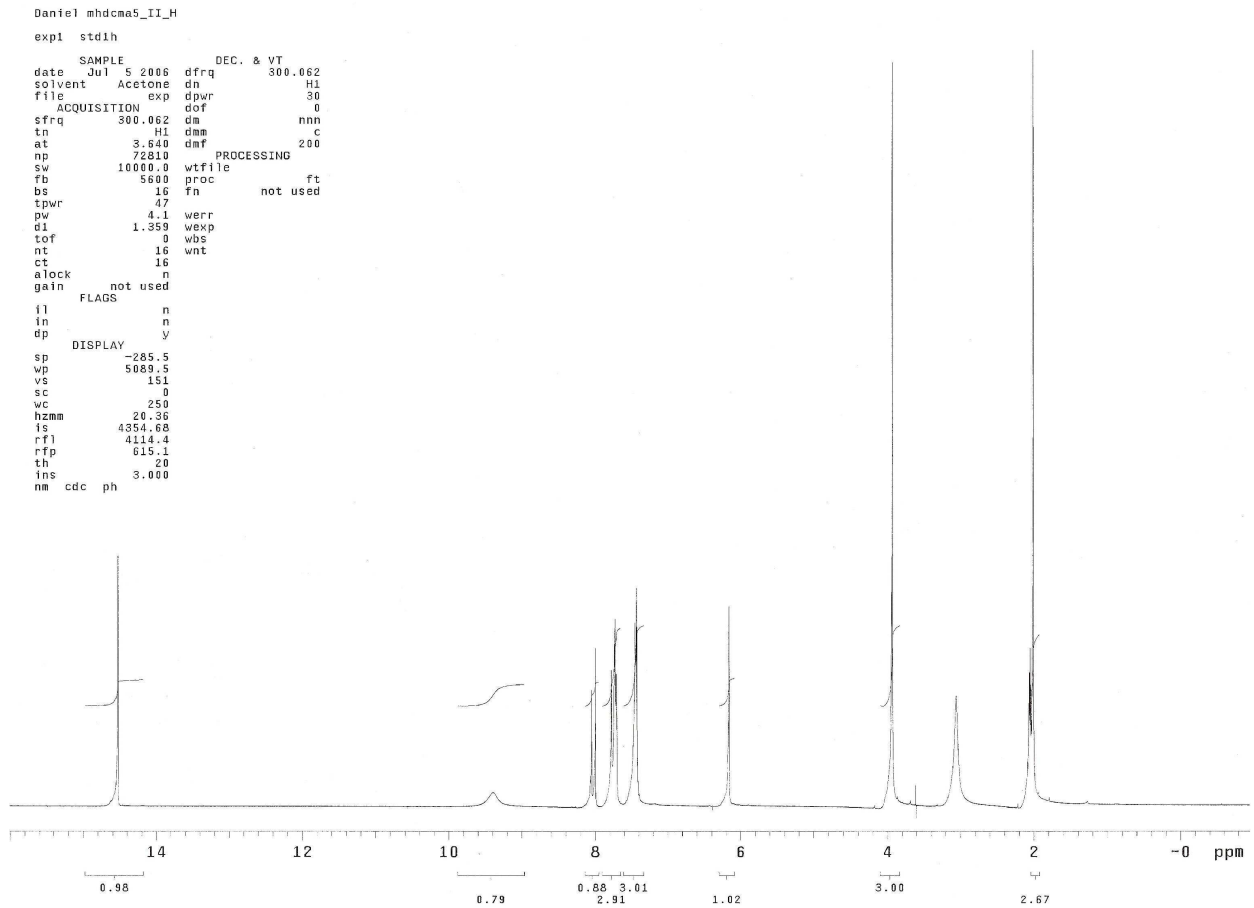


Figura 39: Espectro de RMN ^1H da 2',6'-diidróxi-3'-metil-4'-metóxicalcona, acetona- d_6 , 300 MHz

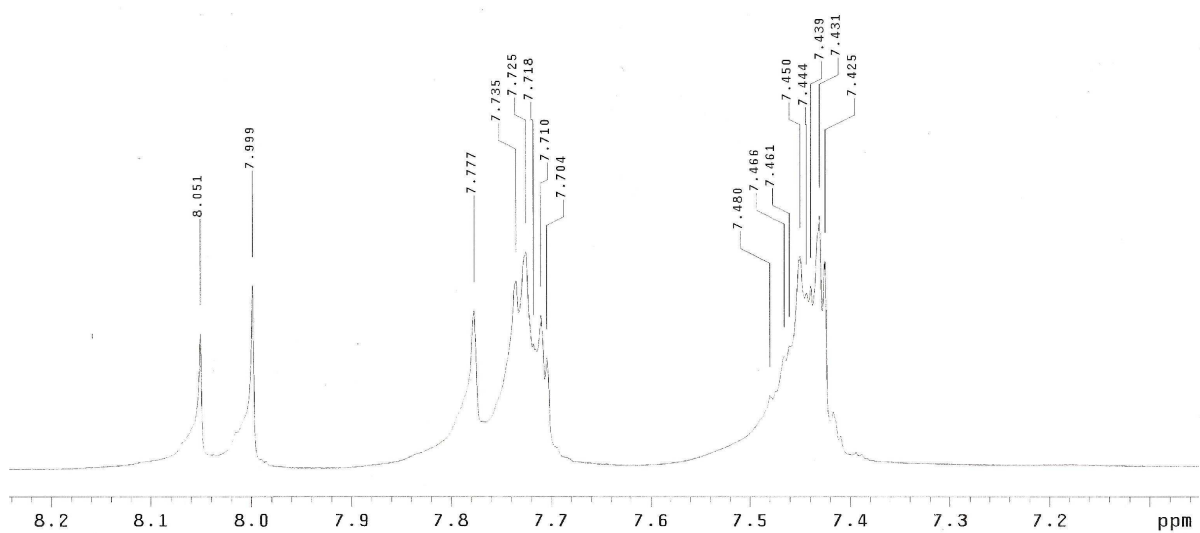


Figura 40: Ampliação do espectro de RMN ^1H da 2',6'-diidróxi-3'-metil-4'-metóxicalcona, acetona- d_6 , 300 MHz