



**UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI-URCA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR**

**ANA CÁSSIA SALDANHA DE SOUZA BERNARDINO**

**Avaliação da atividade antimicrobiana e espectroscopia vibracional do diterpeno labdano 15,16-epóxi-4-hidroxi-labda-13 (16), 14-dien-3,12-diona isolado de *Croton Jacobinensis* Baill.**

CRATO – CE,  
2016

ANA CÁSSIA SALDANHA DE SOUZA BERNARDINO

**Avaliação da atividade antimicrobiana e espectroscopia vibracional do diterpeno labdano 15,16-epóxi-4-hidroxi-labda-13 (16), 14-dien-3,12-diona isolado de *Croton Jacobinensis* Baill.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular.

Orientador:

Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira

Co-orientador:

Prof. Dr. Hécio Silva dos Santos

ANA CÁSSIA SALDANHA DE SOUZA BERNARDINO

**Avaliação da atividade antimicrobiana e espectroscopia vibracional do diterpeno labdano 15,16-epóxi-4-hidroxi-labda-13 (16), 14-dien-3,12-diona isolado de *Croton Jacobinensis* Baill.**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular. Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

DISSERTAÇÃO APRESENTADA EM: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / 2016.

RESULTADO: \_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira – Orientador  
Universidade Regional do Cariri – URCA

---

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho  
Universidade Regional do Cariri – URCA

---

Prof. Dra. Jane Eire Silva Alencar de Menezes  
Universidade Estadual do Ceará – UECE

---

Suplente: Prof. Dr. Raimundo Nonato Pereira Teixeira  
Universidade Regional do Cariri – URCA

CRATO – CE  
2016

Dedico este trabalho a meus pais: Marinalva Saldanha  
F. Souza e Humberto Mendonça de Souza,  
por todo carinho e dedicação para minha educação.  
A meu esposo Crisóstomo de Souza Bernardino,  
pelo amor, apoio e compreensão,  
e a minha querida filhinha, Melissa Saldanha de S. Bernardino,  
por ser minha razão de viver.

## AGRADECIMENTOS

É para honra e glória de Deus que eu vivo, por isso, o meu agradecimento é primeiramente a Deus, por ter me dado força e coragem para conseguir essa conquista em minha vida profissional. Obrigada Senhor!

A minha amada mãe, pela dedicação, compreensão e incentivos para continuar na caminhada acadêmica e, por ter cuidado de minha filhinha com carinho em todos os momentos da minha jornada e na escrita deste trabalho.

Ao meu pai, pelo orgulho de minha pessoa e motivação para não desistir.

Ao meu esposo, que durante todo o tempo do mestrado, me incentivou e apoiou todas as minhas decisões ao meu lado. Amo você!

As minhas irmãs: Ana Sara Saldanha de Souza e Ana Lília Saldanha de Souza, por me ajudarem cuidando de minha filhinha.

Ao professor Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira, por ter me orientado neste trabalho, e de forma tão significativa, ter contribuído para o meu crescimento educacional, com apoio, ensinamentos e conselhos, que me servirão para toda vida. Muito obrigada professor, o senhor é dez!

Ao Dr. Hélcio Silva dos Santos, da Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA) pela Co-orientação e a Dra. Jane Eire Silva Alencar de Menezes, da Universidade Estadual do Ceará (UECE) pela concessão da amostra utilizada nesta dissertação.

Ao Dr. Paulo de Tarso Cavalcante Freire, da Universidade Federal do Ceará (UFC), pela disponibilização do equipamento para realização das medidas de espalhamento Raman.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular, em especial aos Drs.(a) Henrique Douglas Coutinho e Marta Kerntopf Imeuda Peixoto. Obrigada pelos ensinamentos, e tempo dedicado.

A banca de defesa Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho, Prof. Dra. Jane Eire Silva de Alencar Menezes e Prof. Dr. Raimundo Nonato Pereira Teixeira, pela disponibilidade.

Aos membros do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM), Saulo, Flaviana, Ana Raquel, Fábria e Socorro, pelo apoio e suporte durante as análises e testes microbiológicos.

A CAPES, por ter colaborado financeiramente durante todo o desenvolvimento da pesquisa.

*“Entristecidos, mas sempre alegre; pobres, mas enriquecendo a muitos; nada tendo, mas possuindo tudo.”*

*II Coríntios 6:10*

## RESUMO

O Brasil possui uma grande variedade de biomas de interesse científico e tecnológico. Entre os principais gêneros de plantas, destaca o gênero *Croton*, que compreende cerca de 1.300 espécies da família Euphorbiaceae. Uma dessas espécies é o *Croton jacobinensis*, popularmente conhecido como "Marmeleiro-branco". Encontrado exclusivamente no semi-árido do Brasil. Informações etnofarmacológicas referem-se a esta planta como possuindo propriedades antibacterianas, citotóxicas, anti-inflamatória e larvicida. No presente estudo, o produto natural 15,16-epóxi-4-hidroxi-labda-13 (16), 14-dien-3,12-diona (C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub>), um diterpenóide de esqueleto labdano, foi isolado a partir da raiz de *Croton jacobinensis* pela primeira vez. Portanto, até agora, nenhum estudo de espectroscopia vibracional e nem de atividade biológica para este composto, tenha sido publicado na literatura. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial biológico do diterpeno labdano 15,16-epóxi-4-hidroxi-labda-13 (16), 14-dien-3,12-diona e analisar suas propriedades vibracionais por meio de espectroscopia Raman com transformada de Fourier (FT-Raman – *Fourier Transform Raman*) e infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR - *Fourier Transform Infrared*), combinado com cálculos computacionais, usando a teoria do funcional da densidade (DFT – *Density Functional Theory*). A atividade antimicrobiana verificada pela substância diterpeno labdano, apresentou os mesmos valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente as bactérias padrão ATCC testados, sendo todos os valores observados  $\geq 1024$   $\mu\text{g/mL}$ . Observou-se sinergismo com o aminoglicosídeo gentamicina quando associado ao diterpeno labdano 15,16-epóxi-4-hidroxi-labda-13(16),14-dien-3,12-diona, por contato direto, frente às bactérias *P. aeruginosa* e *E. coli*, demonstrando significância com  $p < 0,05$ . Com respeito ao estudo de espectroscopia vibracional do cristal 15,16-epóxi-4-hidroxi-labda-13(16),14-dien-3,12-diona, foi possível obter a atribuição completa das bandas Raman e Infravermelho.

Palavras-chave: Atividade antibacteriana, *Croton jacobinensis*, diterpeno labdano, espectroscopia vibrational.

## ABSTRACT

Brazil has a large variety of biomes of scientific and technological interest. Among the main genera of plants stands out genus *Croton* which comprising around 1.300 species from Euphorbiaceae family. One of these species is *Croton jacobinensis*, popularly known as “Marmereiro-branco”, and found exclusively in Brazil’s semi-arid region. Ethnopharmacological information refers to this plant as possessing antibacterial and cytotoxic properties, anti-inflammatory and larvicide. In the present study, the natural product labdane diterpene 15,16-epoxy-4-hydroxy-labda-13(16),14-dien-3,12-dione (C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub>), a diterpenoid was isolated from the stems of *Croton jacobinensis* for the first time. Therefore, up to now, neither vibrational spectroscopy study nor a biological activity study for this compound has been published in the literature. In this work, we report the characterization of polycrystalline samples of labdane diterpene 15,16-epoxy-4-hydroxy-labda-13(16),14-dien-3,12-dione (C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub>) through Fourier Transform Raman and Fourier Transform Infrared spectroscopy combined with Density Functional Theory calculation. DFT calculations were performed with the purpose of obtaining information on the structural and vibrational properties of this organic compound. The assignment of the normal modes were carried out by means of visualization of the atomic displacement representations for each vibration. Additionally, the antimicrobial and modulatory activities of the compound towards *Escherichia coli* 06 and *Pseudomonas aeruginosa* 03 strains were assessed. The results of this work allowing the observation of normal modes in both infrared and Raman spectroscopy, and a significant activity was observed towards *Escherichia coli* 06 and *Pseudomonas aeruginosa* 03, with  $p < 0.05$  in association with with all antibiotics tested.

**Keywords:** Antibacterial activity, *Croton jacobinensis*, diterpene labdane, Vibrational spectroscopy.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Espectro eletromagnético e a excitação molecular.....	17
Figura 2	Representação da estrutura molecular do diterpeno labdano 15,16-epóxi-4-hidroxi-labda-13(16),14-dien-3,12-diona (C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub> ).....	22
Figura 3	Placas de microdiluição dos inóculos bacterianos.....	25
Figura 4	Estrutura molecular do diterpeno labdano 15,16-epóxi-4-hidroxi-labda-13(16),14-dien-3,12-diona (C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub> ).....	28
Figura 5	Espectro FT-Raman de amostra policristalina do diterpeno labdano 15,16-epóxi-4-hidroxi-labda-13(16),14-dien-3,12-diona (C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub> ) nas regiões 3600–2750 cm <sup>-1</sup> e 1900–400 cm <sup>-1</sup> .....	29
Figura 6	Espectro FT-IR de amostra policristalina do diterpeno labdano 15,16-epóxi-4-hidroxi-labda-13(16),14-dien-3,12-diona (C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub> ) nas regiões 3600–2750 cm <sup>-1</sup> and 1900–400 cm <sup>-1</sup> . .....	30
Figura 7	Deslocamentos atômicos correspondentes a dois modos normais de vibração selecionados da molécula do diterpeno labdano 15,16-epóxi-4-hidroxi-labda-13(16),14-dien-3,12-diona (C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub> ). (a) $\omega_{\text{FT-Raman}} = 579 \text{ cm}^{-1}$ ( $\omega_{\text{FT-IR}} = 577 \text{ cm}^{-1}$ ) e (b) $\omega_{\text{FT-Raman}} = 1507 \text{ cm}^{-1}$ ( $\omega_{\text{FT-IR}} = 1506 \text{ cm}^{-1}$ ).....	36
Figura 8	Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antibióticos na presença e na ausência da substância diterpeno labdano 15,16-epóxi-4-hidroxi-labda-13(16),14-dien-3,12-diona, em uma concentração CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ), frente a <i>P. aeruginosa</i> 03 e <i>E. coli</i> 06.....	38

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Número de onda calculado ( $\omega_{\text{calc}}$ ), número de onda escalado ( $\omega_{\text{scal}}$ ) pelos fatores de escala 0,9635 (abaixo de 1800 $\text{cm}^{-1}$ ) e 0,9556 (acima de 1800 $\text{cm}^{-1}$ ), posições das bandas Raman ( $\omega_{\text{FT-Raman}}$ ) e IR ( $\omega_{\text{FT-IR}}$ ) em unidades de $\text{cm}^{-1}$ e classificação para os modos vibracionais para o diterpeno labdano 15,16-epóxi-4-hidroxi-labdano 13 (16), 14-dien-3,12-diona ( $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_4$ ).....	31
----------	---	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Origem das linhagens bacterianas e perfil da resistência à antibióticos.....	24
----------	--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- $\omega_{\text{calc}}$  – Posições do número de onda calculado
- $\omega_{\text{FT-Raman}}$  – Posições das bandas Raman
- $\omega_{\text{IR}}$  – Posições das bandas infravermelho
- $\omega_{\text{scal}}$  – Posições do número de onda escalado
- Å – *Angstrom*
- ATCC – *American Type Culture Collection*
- ATR – *Attenuated total reflectance*
- BHI (IHB) – *Brain heart infusion*
- CCD – Cromatografia de Camada Delgada
- $\text{CDCl}_3$  – Clorofórmio Deuterado
- CIM – Concentração Inibitória Mínima
- CIM/8 – Concentração subinibitória
- DFT – *Density functional theory*
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DNA - *Deoxyribonucleic acid*
- EM – Espectrometria de Massas
- FT-IR – *Fourier transform infrared*
- FT-Raman – Espalhamento Raman com transformada de Fourier
- HMBC (CBMH) – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*
- HMQC (CQMH) – *Heteronuclear Multiple Quantum Correlation*
- HIA (AIH) – *Heart infusion Agar*
- IR – *Infrared*
- MM – Modelagem molecular
- OMS – Organização Mundial de Saúde
- DEP – Distribuição de energia potencial
- RMN – Ressonância Magnética Nuclear
- RMN  $^1\text{H}$  – Ressonância Magnética Nuclear do Hidrogênio 1
- RMN  $^{13}\text{C}$  – Ressonância Magnética Nuclear do Carbono 13
- sc – *scissoring* (tesoura)
- wag – *wagging* (balanço)

$\delta$ - deformação angular

$\delta_{out}$  - deformação fora do plano

$v$ - estiramento

$v_{as}$ - estiramento assimétrico

$v_s$ - estiramento simétrico

$\tau$  –torção

# SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	4
1.1 Objetivo geral.....	4
1.2 Objetivo específico.....	4
REFERENCIAL TEÓRICO.....	5
2.1 Plantas Medicinais.....	5
2.2 O gênero <i>Croton</i> .....	6
2.2.1 <i>Croton jacombinensis</i> .....	7
2.3 Diterpeno labdano.....	8
2.4 Microorganismos e infecções.....	9
2.5 Resistência Microbiana.....	11
2.6 Necessidade de Novos Antibióticos.....	13
2.7 Atividade Moduladora.....	15
2.8 Espectroscopia Vibracional.....	16
2.8.1 Espectroscopia de absorção no infravermelho.....	17
2.8.2 Espalhamento Raman.....	18
2.9 Modelagem molecular e o seu papel no desenvolvimento de novos fármacos.....	19
2.10 Mecânica Quântica.....	20
2.11 A equação de Schrödinger.....	20
2.11.1 A Teoria do Funcional de Densidade (DFT).....	21
MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Elucidação da estrutura molecular do material isolado.....	22
3.2 Atividade antimicrobiana e moduladora.....	23
3.2.1 Drogas e reagentes.....	23
3.2.2 Preparo da solução inicial e das soluções testes.....	23
3.2.3 Microorganismos.....	23
3.2.4 Perfil de resistência das bactérias.....	24
3.2.5 Meios de Cultura.....	24
3.2.6 Preparo e padronização dos inóculos bacterianos.....	24
3.2.7 Preparação da solução teste.....	24
3.2.8 Atividade antimicrobiana.....	25
3.2.9 Avaliação da interferência de diterpeno labdano 15,16-epoxy-4-hydroxy-labda-13(16),14-dien-3,12-dione sobre a resistência aos antibacterianos .....	25
3.3 Análise de dados.....	26
3.4 Espalhamento Raman e espectroscopia no infravermelho .....	26
3.5 Método computacional.....	27

RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1 Estrutura Molecular .....	28
4.2 Espectroscopia vibracional .....	29
4.3 Atividade Antimicrobiana.....	37
4.3.1 Concentração inibitória mínima e moduladora do diterpeno labdano (C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub> ).....	37
CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS.....	42

# INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma flora altamente diversificada, com grande variedade de biomas, favoráveis pelas zonas climáticas, que refletem em enorme riqueza da fauna e da flora brasileira. Esta, superestimada entre 40 mil a 55 mil espécies, sendo fonte de substâncias bioativas (DUARTE, 2006).

A biodiversidade, é resultante de milhões de anos em evolução genética, que tem sido área de investigação científica e tecnológica, à medida que se comprova como medicina natural alternativa, tanto em países desenvolvidos, como em desenvolvimento, ganhando larga escala no contexto (BALUNAS; DOUGLAS; KINGHORN, 2005).

É admitido que a medicina natural, já era empregada como terapia alternativa desde os tempos remotos, bastante utilizada pelos índios, chineses e povos egípcios, mas foi apenas no último século que a comunidade acadêmica e científica, intensificou os estudos na área, comprovando diversas atividades terapêuticas a partir de ervas. O histórico destas práticas pôde contribuir de forma significativa para o interesse e a descoberta de novos medicamentos para a área farmacêutica (CARNEIRO *et al.*, 2011).

Em reconhecimento ao potencial fitoterápico das plantas na medicina natural, vários planos governamentais tem sido criados e adotados como práticas intensivas, para o melhoramento na saúde da população brasileira ao Sistema Único de Saúde – SUS. Dentre as medidas que facilitem o acesso à práticas da medicina natural, destaca-se a Relação de Plantas Medicinais do interesse do SUS (RENISUS), evidenciando o interesse de mais pesquisas e estudos com as plantas para a produção de novos medicamentos, promovendo e buscando maior eficácia na integralidade do sistema, na sua atenção básica (RAMOS *et al.*, 2009).

Outro fator bastante influente, e também agravante para a busca de novos medicamentos, tem sido o alto índice de bactérias resistentes a diferentes classes de antibióticos. Estudos mostram que os principais contribuintes para o favorecimento de bactérias resistentes, tem sido o uso indiscriminado pela população de antibióticos e a falta de higiene dos funcionários na área da saúde, levando consequentemente a

infecção hospitalar e a bactérias multirresistentes, como é o caso da bactéria *pseudomonas aeruginosa* (AZEVEDO, 2005; MARTINS *et al.*, 2001).

Em consonância, visto que tornando-se o microorganismo resistente a dado antibiótico, o efeito da droga, todavia será inexistente, resultando em prolongamento do tempo da doença com maiores riscos de transmissão e mortes. Relativo ao tema, estudos revelam ainda, que bactérias que eram tratadas à décadas com antibióticos, agora são resistentes aos mesmos, tornando-se ameaça mundial (SANTOS, 2002).

Recentemente o gênero *Croton*, tem sido bastante estudado por influência de conhecimentos populares, onde foi apontada ao mesmo várias atividades biológicas. O gênero *Croton* pertence à família Euphorbiaceae e apresenta cerca de 1300 espécies. Este apresenta uma grande variedade de compostos bioativos, aos quais foi relatado atividade vaso-relaxante, tratamento de cancro, constipação, diabetes, problemas digestivos, disenteria, feridas, febre, hipercolesterolemia, hipertensão, inflamação, vermes intestinais, malária, dor, úlceras, e perda de peso (MATIAS *et al.*, 2010; LOPES *et al.*, 2004).

Uma dessas espécies, é o *Croton jacobinensis* Bail, popularmente conhecido como "Marmereiro-branco". Informações etnofarmacológicas referem-se a esta planta como possuindo propriedades antibacterianas, citotóxicos e acaricida contra *Tetranychus urticae*. (BIGHETTI *et al.*, 1999; HIRUMA-LIMA *et al.*, 2002).

Dentre seus componentes químicos, os diterpenóides em diferentes estudos mostrou atividades biológicas variadas, incluindo efeito de alterações ultra-estruturais de larvas do mosquito *Aedes aegypti*, propriedades anti-hipertensivas, redução da pressão sanguínea em diferentes espécies de animais através de um efeito vasodilatador, efeitos inotrópicos positivos no músculo cardíaco, efeitos broncodilatadores, antimicrobianos, antimaláricas, e atividade antimicobacteriana seletiva contra *Mycobacterium tuberculosis* (VIEGAS JR., 2003; VALOTTO *et al.*, 2011).

Para que um novo derivado de um produto natural seja analisado corretamente, é imprescindível que se conheça sua estrutura química, assim como o conhecimento de como esta molécula se comporta, seus tipos de vibrações e como a mesma interage no organismo. O estudo da espectroscopia vibracional de substâncias ativas extraídas de plantas medicinais tem sido uma ferramenta essencial para fornecer informações

detalhadas sobre as suas propriedades estruturais e vibracionais (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

O diterpeno labdano 15,16-epóxi-4-hidroxi-labda-13 (16), 14-dien-3,12-diona (C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub>) foi isolado a partir da raiz de *Croton jacobinensis* pela primeira vez, e a sua estrutura foi elucidada por Ressonância magnética Nuclear (RMN) (TEIXEIRA *et al.*, 2014). Portanto, vale enfatizar que até agora, nenhum estudo de espectroscopia vibracional, nem estudos de atividade biológica para este composto foi publicada na literatura.

Neste trabalho, realizamos a caracterização de amostras policristalinas do diterpeno labdano, por meio de espectroscopia de infravermelho e Raman, combinado com cálculos computacionais usando a Teoria Funcional da Densidade (DFT). Os cálculos DFT foram realizados com o objetivo de obter informações sobre as propriedades estruturais e vibracionais do presente composto orgânico. A atribuição dos modos normais foram realizados por meio de visualização das representações dos deslocamentos atômicos para cada vibração molecular.

Indubitavelmente, em um País com riqueza de flora e fauna inestimáveis, com possibilidades de grandes avanços para a área da clínica médica, subsidiada a grande variabilidade genética, onde doenças causadas por bactérias, é a segunda maior causa de mortes no mundo, e com o aumento da resistência bacteriana à antibióticos que cresce constantemente, justifica-se a real necessidade da descoberta de novos antibióticos, e fármacos com diferentes mecanismos de ação, afim de obter tratamento eficaz contra infecções bacterianas, e ainda para impulsionar o crescimento científico e tecnológico (DELLIT, 2007).

# CAPÍTULO 1

## OBJETIVOS

### 1.1 Objetivo geral

Verificar a atividade antimicrobiana e moduladora do diterpeno lábdano 15,16-epóxi-4-hidroxi-labda-13 (16), 14-dien-3,12-diona isolado de *Croton jacobinensis* Baill., e investigar suas propriedades vibracionais utilizando as técnicas de espalhamento Raman e espectroscopia FT-IR, bem como por cálculos computacionais usando DFT.

### 1.2 Objetivos específicos

- Avaliar o espectro de ação e o grau de inibição do diterpeno lábdano, determinando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) sobre as linhagens bacterianas patogênicas;
- Verificar a eficácia do diterpeno lábdano na modulação da resistência bacteriana à diferentes classes de antibióticos.
- Realizar medidas de caracterização espectroscópica do diterpeno labdano por espalhamento Raman e espectroscopia FT-IR com o propósito de determinar os modos vibracionais;
- Utilizar a simulação computacional para auxiliar na análise dos modos normais de vibrações do composto diterpeno labdano observados experimentalmente pelas técnicas de espalhamento Raman e espectroscopia FT-IR;
- Classificar os modos normais de vibração do diterpeno labdano com base na visualização das representações dos deslocamentos atômicos para cada vibração molecular.

# CAPÍTULO 2

## REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Plantas Medicinais

Planta medicinal, é toda planta que, possui princípio ativo no combate a doenças, levando a cura do indivíduo (BRESOLIN, FILHO, 2003). São conhecidas mundialmente pelos seus registros históricos documentados pelo seu poder antibacteriano, antifúngico, anti-inflamatório e em usos diversos, desde febres até epilepsias (DUARTE, 2006).

A Organização Mundial de Saúde (OMS), conceitua planta medicinal, como sendo “todo e qualquer vegetal que possui em um ou mais órgãos substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos, ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos” (OMS, 2014).

O termo fitoterápico, está relacionado a terapêutica que utiliza medicamentos possuindo em sua constituição plantas ou derivados vegetais. A utilização de plantas pelo homem na busca constante pela cura de enfermidades é reportada desde a idade antiga, antecedida pela história escrita, registrada em cavernas e pântanos, bastante utilizadas pelos povos egípcios, indianos, chineses e mesopotâmicos (LAI; ROY, 2004).

Porém foi apenas no século XIX, que deu-se mais importância a este tema pela sociedade. No ano de 1873, o alemão Georg Ebers idealizou um importante papiro, conhecido mundialmente como papiro de Ebers, este com mais de 20 metros de comprimento, continha mais de 700 fórmulas de medicamentos a partir do uso de ervas, o que certamente contribuiu muito para a ciência (BALUNAS; DOUGLAS; KINGHORN, 2005).

Com base na história da medicina natural a partir de plantas, há registros de que a tradição da medicina chinesa contribuiu mundialmente na popularização dos medicamentos fitoterápicos. Dentre as ervas mais famosas, pode-se destacar a *Angelica polymorpha var. sinensis*, *Artemisia annua*, *Ephedra sínica*, *Paeonia lactiflora*, *Panax ginseng* e *Rheum palmatum* (CARNEIRO *et al.*, 2011). Muitas dessas ervas

apresentavam efeitos antibacterianos, antiinflamatórios, antifúngicos e antimicrobianos (DUARTE, 2006; ZACCHINO, 2001).

O Brasil é o país que possui a maior biodiversidade de plantas, estimado entre 40 mil a 55 mil espécies, chegando a 20% do número total de espécies vegetal do planeta. O comércio livre destas plantas nos mercados e em feiras favorece um crescente aumento de 6 a 7% ao ano no mercado de fitoterápicos (CARVALHO *et al.*, 2007; BOTSARIS, 2016). No entanto embora existam muitos estudos de atividade biológica de plantas medicinais ainda existe uma vasta quantidade de espécies que ainda não se conhece os seus componentes majoritários e os seus princípios ativos (SILVA, 2012).

Acreditando no potencial da floresta brasileira no campo da medicina, para a realização do tratamento de inúmeras doenças, a OMS cria um plano para incrementar práticas integrativas e complementares na atenção básica. Introduzida em 2002, este estimula a utilização da medicina tradicional nos seus programas nacionais, aumentando o acesso a estas práticas e no seu uso seguro e racional (RAMOS *et al.*, 2009).

Subsidiada as recomendações da ONU, em 2006, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (PNPIC) foi aprovada. Mais tarde, ganhando força popular aprovou-se também em instância federal, a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. O Ministério da Saúde através do Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos (DAF), órgão da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos (SCTIE), aprovou a Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), promovendo e buscando maior eficácia na integralidade do sistema na atenção básica, o melhor aproveitamento pela população brasileira, assim como o incentivo tecnológico e insumos estratégicos (FIGUEREDO; GURGE; JUNIOR., 2014).

## **2.2 O gênero *Croton***

O gênero *Croton* foi apresentado pela primeira vez em 1753, na primeira edição da obra *Species Plantarum*, por Charles Linnaeus, onde é descrito a identificação de plantas, quanto a seu gênero, classe e ordem, dando um ponto de arranque para área botânica. Daí por diante, o gênero *Croton*, recebeu importância de vários estudiosos (BAILLON, 1858, MUELLER, 1865, 1866, 1873; BENTHON, 1880). Nos anos

subgêntes (1992, 1993, 1994, 2001), Webster propôs a classificação mais atual para o gênero (SILVA; SALES; CARNEIRO-TORRES, 2009).

As espécies do gênero *Croton* são representadas por arbustos, subarbustos, árvores, ervas e lianas. As folhas apresentam-se com revestimento piloso inteiras ou trilobadas com estípulas. Possuem pêlos que podem ser do tipo estreladas, lepdotos ou escamosas. Suas flores são pequenas e esbranquiçadas, dispostas em racemos, e o seu fruto, é como uma cápsula triococa, que varia de diâmetro, estando entre 2 a 6 mm, possuindo sementes escuras e oleaginosas (CRAVEIRO, 1981).

Existem vários estudos associados ao gênero *Croton*, estes comprovaram atividade antiinflamatória, conferida ao *Cróton cuneatus* (SUÁREZ *et al.*, 2006), efeito cardiovascular e anti-helmíntico do *Croton zehntneri* (CAMURÇA-VASCONCELOS *et al.*, 2007), moluscicida do *Croton campestris* (BABILI *et al.*, 2006), antibacteriana *in vitro* de *Croton campestris* (MATIAS *et al.*, 2010), antinociceptiva de *Croton urucurana* (RAO *et al.*, 2007), anticancerígeno de *Croton flavens*, mutagênica e antioxidante de *Croton lechleri* (LOPES *et al.*, 2004), anti-hipertensivo, anti-úlcerogênico, inseticida e antiinflamatório do *Croton jacobinensis* (BIGHETTI *et al.*, 1999; HIRUMA-LIMA *et al.*, 2002).

O gênero *Croton* está incluído na família Euphorbiaceae e pertence a subfamília Crotonoidae e compreende aproximadamente cerca de 800 espécies distribuídas só no continente americano (BIGHETTI *et al.*, 1999).

No Brasil o gênero *Croton* está representado por cerca de 300 espécies, correspondendo para a região nordeste uma estimativa de 65 espécies, destacando-se principalmente sua maior concentração no estado de Pernambuco (HIRUMA-LIMA *et al.*, 2002). Muitas de suas espécies são utilizadas na medicina popular no tratamento de úlceras, hipertensão e recentemente, tem-se verificada a este gênero, propriedade inseticida (VIEGAS JR., 2003; VALOTTO *et al.*, 2011).

### **2.2.1 *Croton jacobinensis***

A espécie *Croton jacobinensis* Baill, cuja a sinonímia é *Croton auriculatus* Mull.Arg. É popularmente conhecida como "Marmeleiro-branco", tem sido pouco estudada até o presente momento. Informações etnofarmacológicas referem-se a esta

planta como possuindo propriedades antibacterianas, citotóxicos e acaricida contra *Tetranychus urticae* (RAMOS *et al.*, 2009).

As principais atribuições etnofarmacológicas atribuídas a essa espécie são as propriedades cicatrizantes, antioxidante, anti-inflamatória e vasodilatadora, o que tem motivado muitos pesquisadores a estudar esta planta e os seus constituintes químicos (OLIVEIRA, 2001).

### **2.3 Diterpeno labdano**

Diterpenos são metabólitos secundários compostos por 20 átomos de carbono correspondendo a quatro unidades de isopreno. Trata-se de uma substância natural bastante comum nas plantas possuindo uma ótima fonte de vitamina E e de vitamina K, além de ser precursor das giberelinas que regulam o crescimento das plantas (SAMUELSSON; BOHLIN, 2010).

As plantas produzem mais de 10.000 diferentes espécies de diterpenos especializadas na interação com o organismo humano, favorecendo efeitos farmacológicos diversos. Os diterpenos estão presentes em um largo grupo de plantas que possuem atividades biológicas variadas, caracterizadas por funções antibacterianas, antifúngicas, antiprotozoárias e anti-inflamatórias e por essa razão essa classe de substâncias tem despertado tanto interesse científico (VALOTTO *et al.*, 2011).

Alguns dos diterpenos labdanos são conhecidos por seu papel cicatrizante, antitumoral e antiinflamatório. Em estudos com ratos, demonstrou-se que possui além da atividade antiinflamatória, propriedades cardioprotetoras, com o decréscimo do processo de apoptose e atividade das caspases (CUADRADO-BERROCAL *et al.*, 2015).

Diterpenos do tipo labdano, também tem demonstrado efeito farmacológico sobre o músculo liso, proporcionando ação anti-espasmódica de 1,9 – dideoxiforscolina (VEDERNIKOV *et al.*, 2000), de jatrofone em útero de rata, atividade anti-hipertensiva de 13 – epi-9-deoxiforscolina (TANDON *et al.*, 1992), relaxante de aorta ,como também propriedades hipotensoras e vasorelaxantes (DUARTE; SANTANA; CALIXTO, 1992). Em geral os diterpenos tipo labdano possuem um largo espectro de atividades biológicas.

Diterpenos labdano são assim chamados “labdano”, porque são originados do labdano, uma resina secundária derivada de plantas. Um número muito grande de

diterpenos que possuem um esqueleto labdano ocorrem na natureza. O esqueleto básico em geral é constituído por pelo menos dois anéis conjugados de seis membros ligados a uma cadeia de carbono aberta ou fechada que inclui um átomo de oxigênio (VALOTTO *et al.*, 2011).

Recentemente, um outro estudo realizado no Chile, demonstrou a capacidade de um diterpeno labdano, em inibir a eclosão de ovos do crustáceo *Artemia salina*, realizando função protetora, evitando a incrustação da larva (SAN-MARTIN *et al.*, 2012).

O diterpeno labdano (C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub>) que é a substância estudada nessa dissertação, foi isolado a partir da raiz de *Croton jacobinensis* Baill, pela primeira vez, e a sua estrutura elucidada por Ressonância magnética Nuclear (RMN) (TEIXEIRA *et al.*, 2014). Portanto, nenhum dos estudos de atividade biológica para este composto foi publicada na literatura, até agora.

## **2.4 Microorganismos e infecções**

Pertencentes ao reino monera, as bactérias tratam-se de microorganismos unicelulares procariontes, vistos apenas ao microscópico, de tamanho variável, entre 0,2 a 1,5 µm de comprimento. Sua estrutura celular é bastante simples, podendo apresentar variações quanto o seu tamanho, forma ou virulência, dispostas em colônias ou isoladas (BRANDÃO, 2011).

São constituídas por uma rígida parede celular, envolvendo a membrana plasmática, composta basicamente de proteínas interligadas à polissacarídeos, formando um complexo, o peptídeoglicano, o qual confere a bactéria forma, proteção física e osmótica. Nas bactérias gram positivas (que coram em roxo), esta camada de peptídeoglicano encontra-se exposta, já na gram negativa (que coram em vermelho), encontra-se entre o espaço periplasmático. E esta característica, permite que o álcool descore as células gram-negativas, mas não as gram-positivas. Estas informações, são de suma importância na coloração de gram e na escolha do medicamento (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 2012).

As bactérias podem viver em diversos locais, como no ar, no solo, na água, ou até mesmo dentro de animais. De multiplicação rápida, muitas são inofensivas protegendo e favorecendo imunidade contra patógenos e doenças. Se o clima do

ambiente muda ficando desfavorável a sua reprodução, a bactéria produz um esporo, o que pode conferir a ela resistência por vários anos, até que o ambiente lhe fique favorável e ela venha a causar algum processo de doença no hospedeiro (NOSTRO *et al.*, 2004).

Dentre as bactérias patogênicas mais comuns, encontram-se o do gênero *Staphylococcus*. Esta bactéria, normalmente faz parte da microbiota da pele de humanos e de animais. Estudos apontam o gênero, como sendo um dos principais agentes etiológicos responsáveis por causar infecções oportunistas. Podendo-se destacar as espécies *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus haemolyticus*, como sendo os principais responsáveis por infecção hospitalar. Dentre outras espécies de bactérias que são agentes patógenos de doenças encontram-se a *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (COUTINHO *et al.*, 2009).

Classificada inicialmente como uma bactéria enteropatogênica, a *Escherichia coli* (*E. coli*) foi dividida em grupos, podendo ser do tipo enteropatogênicas, enterohemorrágicas, enterotoxigênicas, enteroagregativas, enteroinvasivas e as que aderem difusamente. São assim classificadas de acordo com seu mecanismo de infecção e virulência, estas referentes a proteínas de adesão, invasão ou tóxicas (ESPARIS *et al.*, 2003).

Pesquisas realizadas no Brasil e em outros países, mostraram que a bactéria *E. coli*, é a grande responsável por causar diarreia bacteriana infantil, sendo o tipo enteropatogênica responsáveis por 40% do total dessa patologia. Os principais sintomas são a desidratação e a diarreia intensa (CHEN; FRANKEL, 2004). Em outros estudos, a *E. coli* demonstrou presença em infecções do trato urinário de mulheres, superestimando um percentual de 70 a 85% dos casos (PEREIRA *et al.*, 2005).

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria do tipo gram negativa, aeróbica, baciliforme. Conhecida mundialmente pela sua facilidade à resistência natural com antibióticos, Ela se propaga como uma bactéria oportunista, responsável pelo elevado índice em causas de infecções hospitalares (NEVES *et al.*, 2011).

Entre os principais contribuintes para o favorecimento de bactérias multirresistentes e a consequente contaminação hospitalar, pode ser listado, como o uso incorreto de desinfetantes em limpezas, lenços usados mais de uma vez, resíduos de desinfetantes nas superfícies, diluições incorretas, e também a falta de higiene dos

funcionários. Estes fatores correlacionados a patologia de base e a baixa imunidade do paciente, favorecem a infecção hospitalar (OLIVEIRA; MARUYAMA, 2008).

Vários autores concordam que as infecções causadas por bactérias estão relacionadas com os serviços de saúde, especificamente quando o assunto é internação hospitalar. Este, segundo autores acontecem durante o atendimento ambulatorial, sendo a falta de higiene com as mãos o principal contribuinte (SANTOS, 2004).

A infecção hospitalar é uma das medidas preconizadas pela Lei Federal 8.080 do SUS, onde dispõem as medidas relacionadas ao controle de infecções no âmbito da epidemiologia, e as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde. Este tema é hoje um grave problema de saúde pública que vem se alastrando no Brasil e no mundo, apontada como a grande causa do aumento do índice de mortalidade de pessoas submetidas a procedimentos cirúrgicos nos últimos anos, a morbidade também, vem atingindo altos índices, o que tem preocupado muito a comunidade científica (SANTOS, 2006).

Com fito na multiplicidade de resistência das bactérias aos antimicrobianos, utilizados atualmente no mercado, e na significância para a contribuição à clínica médica, as linhagens bacterianas foram criteriosamente selecionadas para este trabalho.

## **2.5 Resistência Microbiana**

Resistência microbiana a um tipo de antibiótico, é referente a capacidade que o microorganismo adquire de não ser mais destruído a uma agressão, antes ocorrida com facilidade pelo antibiótico. Esta informação vem à conhecimento da sociedade científica, através de testes laboratoriais, onde são visualizados crescimento bacteriano *in vitro*, sob concentrações do antibiótico à ser testado (AZEVEDO, 2005).

Com o surgimento e introdução de novos antimicrobianos no ano de 1960, as infecções de ferida operatória e cateteres causadas pela *Staphylococcus aureus* diminuiu, porém mais tarde, um novo problema surgiu: as infecções por bactérias Gram-negativas (MARTINS *et al.*, 2001). Ainda neste ano, a meticilina foi lançada como alternativa para o tratamento das infecções causadas pelas bactérias Gram-positivas, já no mesmo ano, houve relato das primeiras bactérias *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SALADIN *et al.*, 2002). Nos anos subsequentes, mais precisamente em 1980, enterobactérias - *Klebsiella*, *E. coli*, *Proteus*, *Enterobacter* e

outras, produzem mecanismos que funcionavam como defesas à ação das drogas, com enzimas capazes de destruir o anel beta-lactâmico de certos antimicrobianos (COUTINHO *et al.*, 2009).

Por possuírem a capacidade de rápida multiplicação e adaptação, as bactérias adquirem resistência e suportam as variações do clima e do ambiente. Tal resistência pode acontecer de forma natural ou adquirida. A primeira, também chamada de intrínseca ocorre por herança genética das propriedades fenotípicas do microorganismo, não trazendo prejuízos terapêuticos, devido ao fato deste evento ser previsível, alterando-se por outro antibiótico acessível no mercado, com diferente mecanismo de ação (MARTINS *et al.*, 2001).

Quanto na resistência adquirida acontece uma modificação bioquímica na estrutura da célula bacteriana, onde sua principal característica é conferida ao plasmídio, que outrora, era sensível a droga, levando a uma adaptação, resumindo em um elemento de mutação resistente, o que pode ocasionar inúmeras doenças (BAPTISTA, 2013).

Em consequência à habilidade de adaptação que possuem as bactérias, a resistência a antibióticos ocorre facilmente. Na resistência adquirida, quatro mecanismos de resistência podem ser listados, estes podendo ser por alteração da permeabilidade, por mecanismos enzimáticos, alteração do local de ação ou, por alteração na estrutura química do antibiótico (MARTINS *et al.*, 2001).

A resistência por processo de alteração da permeabilidade do antibiótico deve-se a alterações estruturais, da seletividade, do tamanho e número das porinas, o qual é o responsável por formar canais hidrofílicos por onde passam os fármacos, sendo que, a diminuição na função ou quantidade das porinas, diminuirá a quantidade do antibiótico na bactéria, levando a uma resistência ao antibiótico (GOODMAN; GILMAN'S, 2010).

Em consonância, a resistência por mecanismos enzimáticos, ocorre por produção pela bactéria de enzimas que destroem e inativam o antibiótico, fato este que pode ocorrer por hidrólise, transferência de um grupo ou por processo redox. O tipo de resistência por alteração do local de ação concretiza-se pela alteração da estrutura do peptideoglicano e interferências na síntese de ADN e proteínas, resultando na falta de afinidade do antibiótico no local de ligação (FIGUEREDO, 2009). A resistência bacteriana por alteração da estrutura química do antibiótico caracteriza-se como sendo uma bomba de efluxo, onde o antibiótico é levado do meio intracelular para o meio extracelular. Este tipo de resistência atinge todas as classes de antibióticos (BAPTISTA, 2013).

Santos (2002), menciona que o uso indiscriminado de antibióticos favorece a uma pressão seletiva, levando a mecanismos de resistência, se tornando um grave problema de saúde mundial. Estudos mostram que, à bactéria *enterococos* demonstrou resistência ao antimicrobiano vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, *Streptococcus pneumoniae* não susceptível à penicilina e *Enterobacteriaceae* produtoras de beta-lactamase, surtindo efeitos negativos nos hospitais, com aumento nas taxas de morbidade e mortalidade.

Indubitavelmente, este fenômeno tem preocupado a muitos, visto que, tornando-se o microorganismo resistente a um dado antibiótico, seu efeito será inexistente, levando a um prolongamento do tempo da doença, maior risco de transmissão, com maior número de mortes pela doença. Além do mais, os antibióticos de escolha, utilizados no equilíbrio de eventos como cirurgias, transplante de órgãos e tratamentos quimioterápicos, ficarão comprometidos (COUTINHO *et al.*, 2008).

Segundo a OMS, estima-se que as infecções causadas por bactérias, são responsáveis por 45% das mortes em países subdesenvolvidos e 25% em todo o mundo. Nos Estados Unidos, cerca de 50% a 60% das prescrições com antibióticos nos hospitais, quase sempre são de etiologia viral, fazendo-se uso desnecessário do mesmo (MARTINS, 2006).

Neste contexto, apesar das medidas de combate a este tema, da disponibilidade de vacinas contra muitas doenças bacterianas, e a presença de diversos antimicrobianos de amplo espectro de ação disponíveis no mercado, as bactérias continuam ganhando resistência e acarretando mortes em todo o mundo. Estas conjunturas clamam a sociedade acadêmica e científica pela necessidade da busca de novos antimicrobianos e pesquisas, no combate a esta emergente problemática resistência bacteriana (NEVES, *et al.*, 2011)

## **2.6 Necessidade de Novos Antibióticos**

Antibióticos são substâncias produzidas a partir de microorganismo, estes podendo ser bactérias ou fungos, que impedem o crescimento de outros microorganismos, ora patogênicos. Sua ação pode ocorrer de maneira bacteriostática ou bactericida, onde pode agir inibindo a síntese proteica, parando a sua multiplicação, ou destruindo-a, inibindo a replicação por ligação na DNA-girase (SANTOS, 2014).

A grande descoberta do antibiótico, como na maioria das descobertas, ocorreu por acaso. Evento este, onde o médico inglês Alexander Fleming, estudava uma maneira de acabar com o sofrimento dos soldados que enfrentavam a primeira guerra mundial, época esta, que muitos sofriam com infecções sistêmicas levando-as a morte. Alexander, dedicava-se ao estudo do *Stafylococcus aureus* no St. Mary's Hospital, em Londres 1928. E ao tirar férias, por um acaso esqueceu uma placa com meio de cultura em sua bancada, que quando retornou, viu que um outro microorganismo cresceu e inibiu o crescimento da bactéria, tratava-se do fungo *Penicilium*, surgindo assim o primeiro antibiótico, a penicilina (ISSN, 2009). Seu principal objetivo era tratar ou prevenir uma possível infecção, eliminando eficazmente os organismos patogênicos, e preservando a microbiota normal do indivíduo. Para tanto, era imprescindível que se tenha conhecimento de qual o microorganismo responsável por causar tal infecção e identificá-lo, para que assim seja tratada (SANTOS, 2014).

Identificada pela primeira vez em 1670 por Van Leeuwenhoek, as bactérias puderam ser visualizadas através da invenção do microscópico, porém só foi a partir do século XIX, que iniciaram os estudos para combater os mesmos. Através de experimentos realizados por Louis Pasteur foi demonstrado que algumas bactérias realizavam processos de fermentação e eram distribuídas amplamente no meio ambiente. No mesmo século, Robert Koch, identificou os microorganismos causadores da tuberculose, cólera e febre tifoide. Sucessivamente, conduziram-se pesquisas químicas na busca da atividade antibacteriana (ISSN, 2009).

A penicilina G, ou benzilpenicilina foi introduzida no mercado nos anos de 1940, onde já era estudada desde 1929. Após este avanço, cresceu a descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos, como os b-lactâmicos (cefalosporina), aminoglicosídeos (estreptomicina), tetraciclina (clortetraciclina), macrolídeos (eritromicina), peptídeos (vancomicina) dentre outros cloranfenicol, rifamicina, clindamicina e polimixina, sendo na sua maioria contra bactérias Gram positivas (PUPO, 2007).

Em razão a evolução natural das espécies, e uso discriminado de medicamentos que levam a resistência bacteriana, não é de se admirar a real necessidade de avanços científicos com este tema. Em 2008, um estudo realizado nos Estados Unidos, revelou que algumas bactérias necessitam urgentemente de novos fármacos, por apresentarem uma maior facilidade de resistência, como *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e

espécies de *Enterobacter*. No Brasil, não é diferente, onde vários autores concordam com esse ponto de vista (NEVES *et al.*, 2011; FIGUEIREDO *et al.*, 2009; SANTOS, 2002).

De fato, com o aumento da resistência de bactérias patogênicas, potencialmente perigosas, cresce a necessidade da descoberta de novos antibióticos. Para a OMS, este assunto tem-se tornado uma ameaça global à saúde pública, onde segundo estudos realizados em 114 países diferentes, este fator resistente ocorre em todo o planeta, e que no mais, suponha-se uma caminhada a era pós-antibiótico, em que pessoas morrem com infecções ora tratadas a décadas (OMS, 2014).

Em um mundo de grande variabilidade genética, onde doenças causadas por bactérias é a segunda maior causa de mortes no mundo, e com o aumento da resistência bacteriana à antibióticos que cresce constantemente, principalmente em ambientes hospitalares, justifica-se a real necessidade da descoberta de novos antibióticos, e fármacos com diferentes mecanismos de ação, afim de obter tratamento eficaz contra possíveis infecções (DELLIT, 2007).

## **2.7 Atividade Moduladora**

A grande procura por medicamentos fitoterapêuticos tem crescido consideravelmente nos últimos anos, no qual indústrias farmacêuticas investem na pesquisa por plantas que apresentem esta característica. Estudos mostram que antibióticos naturais, possuem estrutura molecular complexa, porém com afinidade de interação de alta especificidade (ROSA *et al.*, 2008). Pesquisas recentes têm demonstrado que em ensaios de atividade biológica, o efeito fitoterápico acontece com ação sinérgica entre outros compostos, o que possuem uma boa significância para a clínica-médica (CANTON; ONOFRE, 2010).

A associação de múltiplas drogas é considerada como eficiente de acordo com estudos realizados por Pinho e colaboradores (2012), onde o uso combinado de antibióticos com produtos naturais de origem vegetal contribui na ação do antibiótico, potencializando-o e/ou inibindo a resistência, com efeito antagônico ou sinérgico. Um efeito antagônico, é tido quando há inativação ou diminuição da ação do antibiótico frente ao produto natural. Já no caso do efeito sinérgico, o efeito da droga é potencializado frente ao produto natural, ocorrendo desse modo, um efeito positivo no tratamento (COUTINHO *et al.*, 2008).

Vários autores debatem o uso da associação da droga com produtos naturais, investigando seu papel fitoterápico no combate a várias doenças, onde foi demonstrado que além de atividades antibacterianas, verificou-se também ausência de efeitos tóxicos dos medicamentos convencionais, isso devido à diminuição dos sítios de ligação droga-receptor (FIGUEREDO *et al.*, 2013). Em outros testes de modulação, Coutinho e colaboradores (2009), relataram o uso do extrato etanoico das folhas de *Mormodica charantia*, o qual demonstrou resultados positivos com ação antibacteriana quando associada as drogas amicacina e neomicina de efeito sinérgico.

Diante de vários estudos que demonstram boas possibilidades de tratamento com a alternativa de atividade moduladora cresce as pesquisas e relatos na área, como por exemplo, o óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) com atividade moduladora comprovada, eficaz contra a resistência de cepas de *E.coli* e *Salmonella* spp. em associação com os antibióticos ampicilina, tetraciclina e nitrofurantoína (RIBEIRO *et al.*, 2012). O óleo essencial de *L. sidoides* (OELS) e timol em associação com a gentamicina frente à *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* permitiu observar a uma redução estatisticamente significativa (VERAS, 2011). Estes estudos presentes na literatura e tantos outros motivam pesquisadores de todo o mundo na busca de novos medicamentos a partir de produtos naturais (MATIAS *et al.*, 2010).

## 2.8 Espectroscopia Vibracional

A espectroscopia vibracional é uma técnica avaliativa altamente qualificada no que se refere a prestação de informações sobre a estrutura molecular e condições de interações das pontes de hidrogênio, presentes nos cristais de aminoácidos (TEIXEIRA *et al.*, 2000).

A técnica de espectroscopia foi utilizada pela primeira vez em 1671, por Isaac Newton, com o propósito de descrever a interação da radiação com a matéria. Neste experimento Newton utilizou um feixe de luz solar atravessando um prisma de vidro e observou a dispersão da Luz em função de sua frequência, comprimento de onda ou, energia de radiação absorvida ou emitida (BERBERAN; SANTOS, 2013).

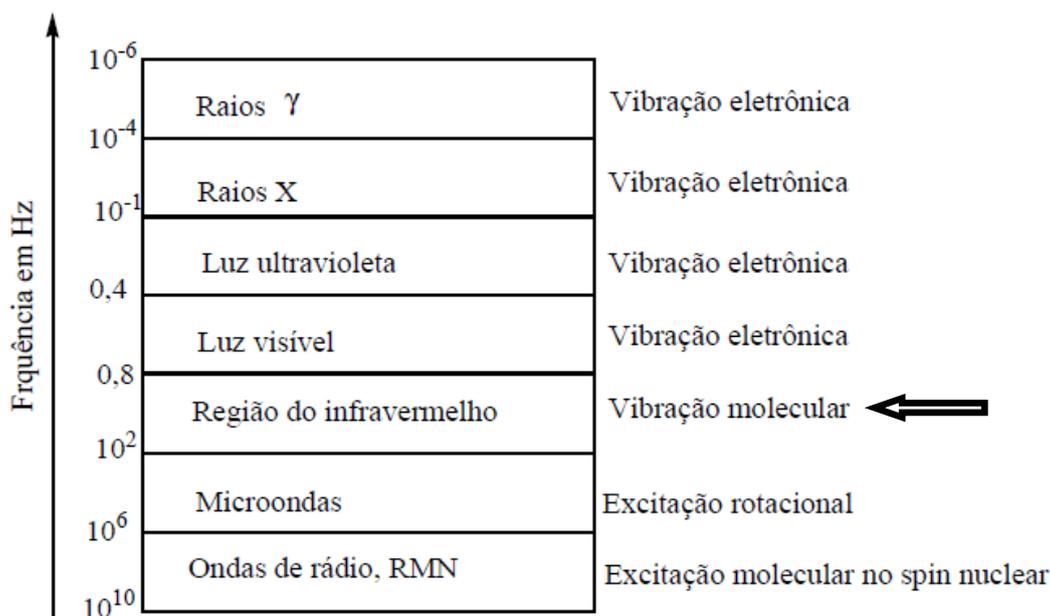
Pode-se dizer que o estudo da espectroscopia proporciona obter informações sobre a interação da radiação com a matéria. Portanto, técnicas de espectroscopia são ferramentas uteis para conhecermos propriedades da matéria como concentração, estrutura, dinâmica de interação, parâmetros físicos, químicos e a localização entre

átomos e moléculas, sob processos de absorção e emissão de radiação, sendo estes lineares e não lineares (OLIVEIRA, 2001).

### 2.8.1 Espectroscopia de absorção no infravermelho

Atribuída a uma radiação com comprimento de onda entre 0,78 a 300µm, a espectroscopia de absorção no infravermelho, evidencia características de vários grupos funcionais em sua estrutura orgânica através de um processo de interação entre átomos e moléculas em uma radiação eletromagnética, compreendendo-se as vibrações moleculares, que por sua vez, são transcritas por radiações no infravermelho, situadas entre a luz visível e a do micro-ondas, como é ilustrado na Figura 1 (BRUICE, 2006).

**Figura 1. Espectro eletromagnético e a excitação molecular. (Fonte: Bruice, 2006)**



Sabendo-se que a radiação infravermelha não dispõe suficientemente de energia para revelar transições eletrônicas, necessita-se que a molécula sofra uma modificação em um dado momento conhecido por dipolo, durante os movimentos vibracionais ou rotacionais. Todavia, a interação ressonante entre fótons absorvido ( $h\nu$ ), é igual a diferença de energia entre dois estados particulares (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009).

$$h\nu = E_2 - E_1$$

A interação da radiação no infravermelho com a matéria, proporciona obter informação sobre os modos normais de vibração de uma molécula. Tanto a radiação no infravermelho como a molécula, possuem energias características, cuja consequência é a propriedade de uma molécula absorver energia proveniente da radiação. O fenômeno, no entanto, não ocorre em todos os casos, mas somente naqueles onde ocorre variação de momento de dipolo da molécula e a energia do fóton for compatível com a energia da vibração molecular, de forma a proporcionar uma transição entre os níveis de energia vibracional (SMITH; HINSON-SMITH, 2003).

As vibrações moleculares podem ser classificadas em dois grandes grupos, as do tipo estiramento ou deformação angular. O tipo estiramento, pode ser dividido ainda entre simétricos e assimétricos. Já as vibrações de deformação, podem ser do tipo: deformação simétrica no plano (*scissoring*), deformação assimétrica no plano (*rocking*), deformação simétrica fora do plano (*wagging*), e deformação assimétrica fora do plano (*twisting*). Estas são assim classificadas, de acordo com os movimentos vibracionais de cada parte da molécula observada (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2005).

### **2.8.2 Espalhamento Raman**

Inicialmente estudado em 1923 por A. Smekal com base na mecânica quântica, só foi apenas em 1928 no encontro da Associação de Ciências do Sul da Índia, que o físico indiano Chandrasekhara Venkata Raman pode observar o efeito Raman. Em 1930, após ter se dedicado ao estudo do espalhamento da luz, com bandas e frequências, recebeu o prêmio Nobel de física (SILVA, 2012).

Semelhantemente à espectroscopia no infravermelho, a espectroscopia Raman fornece informações sobre níveis de energia, vibrações e estrutura da molécula, distinguindo-se fundamentalmente nos processos físicos, onde ocorre espalhamento de luz, onde os espectros Raman irradiam-se na amostra com um potente laser monocromático visível, o espectro é assim medido em um ângulo com um espectrômetro apropriado. Sendo assim, as duas metodologias completam-se (FERRARO; NAKAMOTO; BROWN, 2003).

Os tipos de espalhamentos Raman podem ser diferenciados de acordo com a energia de radiação de espalhamento e energia de radiação incidente. O espalhamento Raman anti-Stokes é conhecido quando a radiação espalhada é maior que a energia de

radiação incidente. Se a energia de radiação espalhada é menor que a energia de radiação incidente estamos diante de um espalhamento Raman Stokes. E por fim, o espalhamento Rayleigh, também conhecido por espalhamento elástico, onde nenhuma informação vibracional é obtida (McCREERY, 2000).

## **2.9 Modelagem molecular e o seu papel no desenvolvimento de novos fármacos**

Estipulado em um gasto entre 800 milhões a 1,4 bilhões de dólares, a produção de um novo fármaco, seguindo todas as normas da agência de vigilância sanitária (ANVISA), e de acordo com o Ministério da Saúde (MS) é um investimento altíssimo, o qual demanda bastante tempo, e muitas fases que variam entre 15 a 25 anos. A necessidade de novos métodos, que sejam mais rápidos analiticamente e que gastem menos recursos, aumenta a medida que cresce a população e o número de doenças infectocontagiosas, que garantam a qualidade da técnica e do fármaco utilizado (GELDENHUYS *et al*, 2006).

Para que uma droga surta efeitos benéficos à saúde humana é necessário que ocorra interação entre as moléculas e os receptores. Tais ligações formadas entre moléculas e receptores provocam respostas biológicas que dependem do reconhecimento e seletividade dos bioreceptores (SANTOS, 2001).

O reconhecimento molecular depende da estrutura química da substância, que muitas vezes comporta-se em enantioespecificidade, reconhecendo apenas um dos enantiômeros, chamado assim de distômero, e o que é reconhecido de eutômero. Esse reconhecimento, explica a especificidade droga-receptor e suas relações estruturais, onde faz-se necessário o conhecimento da estrutura molecular, com medidas de distância e ângulos de ligação e torção, definindo-se assim, sua conformação (BARREIRO; FRAGA, 2001).

Os métodos computacionais podem ser úteis no planejamento racional de fármacos facilitando um melhor entendimento do mecanismo de ação da droga e uma completa definição de suas propriedades materiais, diminuindo-se deste modo, as possibilidades de erros e facilitando o processo de desenvolvimento de compostos bioativos (SANT'ANA, 2009).

Dispõem-se atualmente de vários modelos computacionais, úteis na avaliação da estrutura molecular de substâncias, que possibilitam a análise das interações

farmacológicas com velocidade e precisão, somados aos recursos da computação gráfica e à crescente diminuição dos custos de máquinas, como por exemplo, os métodos da mecânica molecular, espectroscópicos de ressonância magnética nuclear e infravermelho. Este último possibilita informações tridimensionais de moléculas, observando as determinadas bioatividades (SANTOS, 2001).

Esta prerrogativa, sustentada pela inovação científica e tecnológica refletem em novos fármacos, de produção mais rápida e eficaz, fazendo-se uso da modelagem molecular, aliados a química quântica computacional, que fornecem dados promissores na descrição dos sistemas moleculares (NASCIUTTI, 2012).

## **2.10 Mecânica Quântica**

As grandes transformações na área da física resultaram na histórica explicação do espectro de radiação do corpo negro feita por Max Planck, que deu origem a Mecânica Quântica em meados de 1920. Planck assumiu que a energia das oscilações na cavidade de um corpo negro são quantificadas (FREIRE; PESSOA; BROMBERG, 2011).

A teoria quântica é de fundamental importância para obter entendimento das propriedades físicas e químicas dos átomos e moléculas tais como densidade eletrônica, cargas atômicas, parâmetros geométricos, energia, frequências de vibração e tantas outras (FREIRE; PESSOA; BROMBERG, 2011).

## **2.11 A equação de Schrödinger**

A equação de Schrödinger foi formulada em 1925 pelo físico austríaco Erwin Schrödinger. Esta equação que descreve como o estado quântico muda com o tempo, ou seja, o tempo de evolução da função de onda do estado proposto por Broglie para os núcleos e elétrons constituintes do sistema, que é representado na equação:

### **Equação 1: A equação de Schrödinger**

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 \Psi_i + U(\vec{r}) \Psi_i = E_i \Psi_i$$

Essa equação é facilmente resolvida para sistemas quânticos com poucos átomos. No entanto para sistemas que contém muitos átomos resolver a equação de Schrödinger pode ser bastante difícil. Neste caso é necessário empregar métodos de aproximação para uma completa compreensão do efeito de cada partícula sob o sistema. A primeira destas é a aproximação de Born-Oppenheimer (FREIRE; PESSOA; BROMBERG, 2011).

Uma das aproximações fundamentais da mecânica quântica é a aproximação de Born-Oppenheimer que separa o movimento nuclear do movimento eletrônico, em uma função de onda puramente eletrônica. A energia obtida é calculada através de equações conhecidas por equações de Hartree-Fock, onde se assume que a energia de um do elétron, depende do núcleo atômico e dos elétrons (SILVA, 2009).

### 2.11.1 A Teoria do Funcional de Densidade (DFT)

A Teoria do Funcional de Densidade (DFT) foi desenvolvida nos anos de 1960 por W. Kohn, P. Hohenberg e L. Sham. Essa teoria é utilizada para resolver a equação de Schrödinger para sistemas moleculares de muitos átomos, onde a ideia dos funcionais de densidade é empregar uma densidade eletrônica.  $E = E(\rho, \vec{r})$  (SOUZA; FERRÃO, 2006).

Com relação à densidade eletrônica total do sistema, assumi-se que a energia total possui um ponto mínimo local, onde pode-se chegar às Equações de Kohn-Shan:

#### Equação 2: Equação de Kohn-Shan:

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 \Psi_i + U(\vec{r}) \Psi_i + \mu_{xc}(\vec{r}) \Psi_i = E_i \Psi_i$$

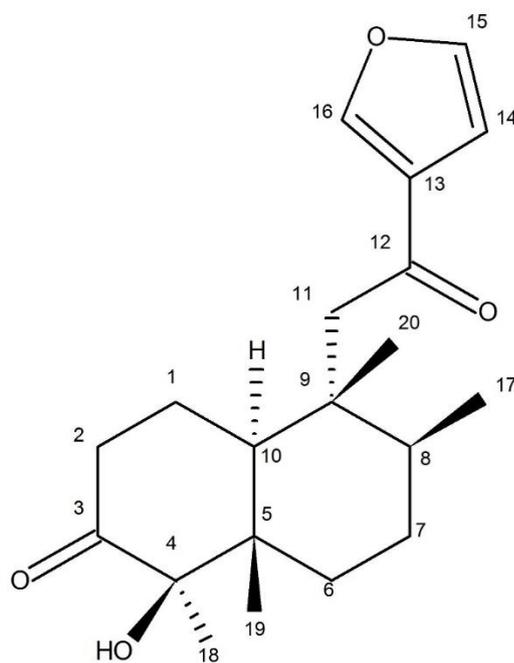
onde  $-\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2$  é o operador energia cinética monoelétrica,  $U(\vec{r})$  é o operador Coulombiano que inclui todas as interações eletrostáticas e  $\mu_{xc}(\vec{r})$  é o termo de troca e correlação eletrônica.

# CAPÍTULO 3

## MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Elucidação da estrutura molecular do material isolado

O diterpeno labdano 15,16-epóxi-4-hidroxi-labda-13 (16), 14-dien-3,12-diona foi isolado de *C. jacobinensis* pela Doutoranda do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia - Renorbio da Universidade Estadual do Ceará, Cleonilda Claita Carneiro Pinto. A estrutura molecular dessa substância foi elucidada por Ressonância Nuclear Magnética (RMN) pelo Dr. Raimundo Braz-Filho pertencente a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro-RJ, Brasil (TEIXEIRA *et al.*, 2014). A representação da estrutura molecular desse diterpeno labdano é mostrado na Figura 2.



**Figura 2.** Representação da estrutura molecular do diterpeno 15,16-epóxi-4-hidroxi-labda-13 (16), 14-dien-3,12-diona ( $C_{20}H_{28}O_4$ ).

Vale salientar que esta é a primeira vez que o diterpeno labdano 15,16-epóxi-4-hidroxi-labda-13 (16), 14-dien-3,12-diona foi isolado da espécie *C. jacobinensis*.

### 3.2 Atividade antimicrobiana e moduladora

#### 3.2.1 Drogas e reagentes

As substâncias utilizadas nos testes de atividade antimicrobiana e moduladora encontram-se listadas à baixo, com suas respectivas procedências.

<b>SUBSTÂNCIAS</b>	<b>ORIGEM</b>
Brain Heart Infusion (BHI)	HIMEDIA – Índia
Agar infusão de coração(HIA)	HIMEDIA – Índia
Dimetilsulfóxido (DMSO)	MERK – Alemanha
Rezasurina	Sigma – USA
Gentamicina	Sigma – USA
Benzilpenicilina	Sigma – USA
Cefalotina	Sigma – USA

#### 3.2.2 Preparo da solução inicial e das soluções testes

Amostras da substância diterpeno labdano, isolada de *C. jacobinensis*, foram solubilizadas em Dimetilsulfóxido (DMSO- Merck, Darmstadt, Alemanha), observando-se as seguintes proporções: 10mg da amostra solubilizada em 1mL de Dimetilsulfóxido DMSO, para obtenção de uma concentração inicial de 10mg/mL. Posteriormente, esta solução foi diluída para 1024µg/mL da mesma forma e a partir desta, efetuaram-se diluições seriadas 1:2 em água destilada, obtendo-se as concentrações de 512 a 0,5 µg/mL.

#### 3.2.3 Microorganismos

Os microrganismos utilizados neste estudo foram fornecidos pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, Brasil. Os microrganismos utilizados para a determinação das atividades antibacterianas foram *Escherichia coli* 06 e *Pseudomonas aeruginosa* 03. Em ensaios biológicos foram utilizados o seguinte meio de cultura: *Agar de Infusão de*

*Coração* - HIA (Disco Laboratories Ltd.), *Caldo de Infusão Cérebro Coração* - BHI concentração (indicado pela fabricante de 10%) (Acumedia Manufacturers, Inc.). Todas as estirpes foram mantidas a 4°C em agar HIA. Antes da realização dos ensaios, foram cultivadas durante 18 h a 35°C em caldo BHI.

### 3.2.4 Perfil de resistência das bactérias

**Tabela 01.** Origem das linhagens bacterianas e perfil da resistência à antibióticos

Bactéria	Origem	Perfil de Resistência
<i>Escherichia coli</i> 06	Urocultura	Cef, Ceflx, Cefad, Ceft, Com, Amps
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i> 03	Urocultura	Cpm,Ctz,Imi,Cip,Ptz,Lev,Mer,Ami

Ami-Amicilina; Cip-Ciprofloxacina; Imi-Imipenem; Cpm-Cefepime; Ctz-Ceftazidime; Ptz-Piperacillin-tazobactam; Lev-Levofloxacina; Mer-Meropenem; Cef-Cefalotina; Ceflx-Cefalexina; Cefad-Cefadroxil; Ceft-Ceftriaxona; Amps-Ampicilina-sulbactam

### 3.2.5 Meios de Cultura

Foram utilizados nos ensaios biológicos os seguintes meios de cultura: *Agar Heart Infusion* - HIA (Difco Laboratories Ltda.), *Caldo Brain Heart Infusion* – BHI (concentração indicada pelo fabricante e 10%) (Acumedia Manufacturers Inc.). Todos os meios de cultura foram preparados segundo as especificações do fabricante.

### 3.2.6 Preparo e padronização dos inóculos bacterianos

As culturas bacterianas foram mantidas a 4°C em *Heart Infusion Agar* (HIA). Anteriormente aos testes, as linhagens foram repassadas para o meio (HIA) e posteriormente incubadas a 35°C por 24 horas. As linhagens repicadas foram inoculadas em *Caldo Brain Heart Infusion* (BHI) e incubadas na mesma situação antes do teste. As suspensões com crescimento bacteriano, foram diluídas até a obtenção de  $10^5$  céls/mL (NCCLS, 2000).

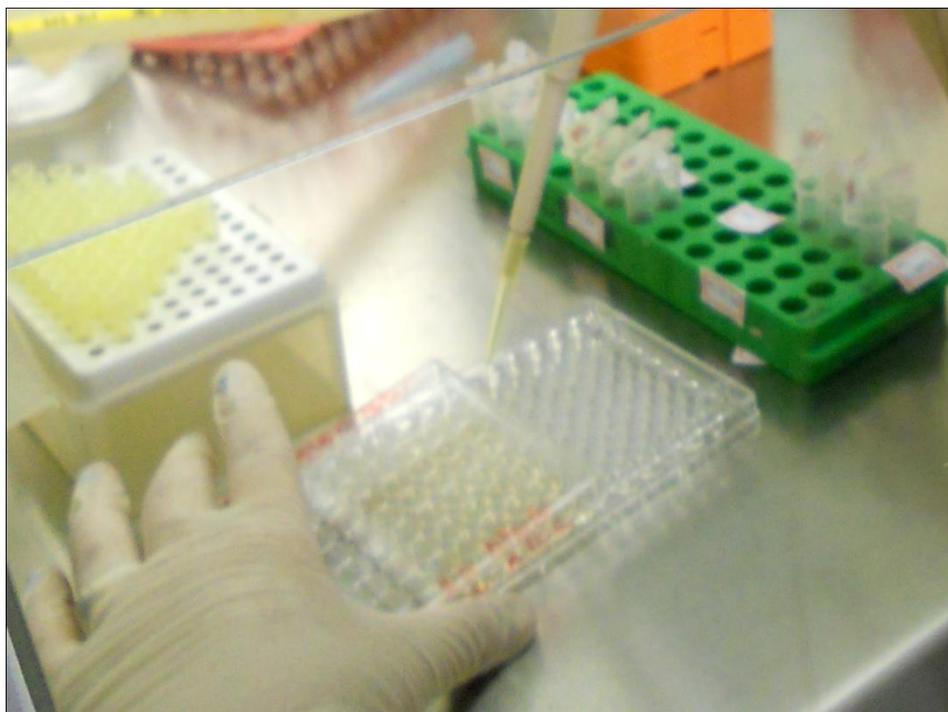
### 3.2.7 Preparação da solução teste

Para obtenção da solução teste no estudo, foram utilizadas amostra do diterpeno sob uma concentração de 10mg/mL, dissolvidos em DMSO (dimetil sulfóxido), diluídos posteriormente, com água destilada para uma concentração de 1024µg/mL.

### 3.2.8 Atividade antimicrobiana

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada num ensaio de microdiluição em caldo, utilizando um inoculo de 100µl de cada estirpe, suspensas em BHI com uma concentração de 10<sup>5</sup> UFC (unidades formadoras de colónias) / ml em placas de microdiluição com 96 poços, diluídos em série até 1: 2 (Figura 3). Cada poço recebeu 100µl de cada amostra, com concentrações finais do diterpeno labdano variando entre 1024-8,0µl / mL. Para os controles, foram utilizados os antibióticos padrões benzilpenicilina, cefalotina e gentamicina cujas concentrações finais variaram entre 512 µg/mL – 8,0 µl/mL, cuja as CIMs foram registradas como as menores concentrações para a inibição do crescimento.

**Figura 3. Placas de microdiluição dos inóculos bacterianos. FONTE: autor**



### 3.2.9 Avaliação da interferência do diterpeno labdano sobre a resistência aos antibacterianos

Para a avaliação da atividade biológica do diterpeno labdano como moduladora da resistência ao antibiótico foi utilizado a gentamicina, a cefalotina e o benzilpenicilina, bem como as estirpes bacterianas: *P. aeruginosa* 03 e *E. coli* 06. O

efeito antibacteriano do diterpeno labdano e a modulação da atividade antibiótica (ambos medidos pela CIM) foram realizados utilizando placas de microtitulação, utilizando a metodologia descrita por Coutinho e colaboradores (2008). A fim de avaliar o efeito modulatório deste composto, a CIM dos antibióticos foram avaliadas com e sem a solução teste em microplacas estéreis. A concentração dos antibióticos variaram entre 1024 e 8,0  $\mu\text{l} / \text{mL}$ . A solução do teste foi misturado com 10% de caldo BHI em concentrações sub-inibitórias (CIM / 8). A solução antibiótica foi preparada por adição de água destilada estéril até que uma concentração de 5000  $\mu\text{l} / \text{mL}$  fosse alcançada, então 100 mL foi diluído em série a 1: 1 em 10% de caldo de BHI. Cada poço foi cheio com 100  $\mu\text{l}$  de meio de cultura e a suspensão bacteriana diluída (1:10). As mesmas soluções de controle utilizadas na avaliação de CIM para os extratos, foram utilizados nos testes de atividade moduladora. As placas foram incubadas durante 24 h a 35 ° C e adicionou-se resazurina para a leitura.

### **3.3 Análise de dados**

Os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram dados como média geométrica. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de duas vias seguido por pós-teste de Bonferroni, considerando-se os resultados com  $p < 0,05$  significativos. Os resultados foram comparativamente os mesmos, com  $\text{CIM} \geq 1024 \mu\text{g} / \text{mL}$ . Um ensaio de teste usando apenas DMSO foi realizado mas nem uma atividade antibacteriana nem moduladora foi detectado, revelando-o como inativo contra os microrganismos testados.

### **3.4 Espalhamento Raman e Espectroscopia no Infravermelho**

As propriedades vibracionais do diterpeno labdano, foram caracterizadas por espalhamento Raman e espectroscopia infravermelho.

A medida de espalhamento Raman foi realizada no Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará. O espectro Raman do diterpeno labdano foi registrado usando o espectrômetro de Micro-Raman, modelo Jobin Yvon, T64000 que tem como fonte de excitação um laser de ion argônio que opera na linha 514,5 nm. O espectro

Raman foi registrado à temperatura ambiente a partir de amostra confinada na tampa de rosca em frascos cromatográficos de vidro padrão, com uma resolução nominal de  $4\text{ cm}^{-1}$ , registrando 60 acumulações por espectro e utilizando uma fonte de laser de 150 mW, na região espectral  $40\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ .

A medida de espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR), foi registrado usando o espectrômetro CARY 600 do Laboratório de Simulação e Espectroscopia da Universidade Regional do Cariri (URCA). O espectro de transmitância FT-IR, foi registrado à temperatura ambiente a partir de uma amostra em pastilha de KBr com número de onda no intervalo  $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ , com uma resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$  e acumulado 60 leituras por espectro.

### 3.7 Método computacional

Cálculos utilizando teoria funcional da Densidade (DFT) foram realizados utilizando o programa de Gaussian 09 (FRISCH *et al.*, 2008). O funcional B3LYP foi utilizado com o conjunto de base 6-31 G (d, p). Os cálculos foram realizados utilizando uma molécula isolada da célula unitária do cristal de 15,16-epóxi-4-hidroxi-labda-13 (16), 14-dien-3,12-diona. Esta estrutura foi otimizada e os números de onda e os deslocamentos atômicos para cada modo foram então calculados. Na estrutura otimizada da molécula, não foi obtido frequência imaginária, provando que um mínimo de energia potencial à superfície foi encontrado. Logo após, as frequências calculadas foram então escalados usando dois fatores de escala. Após ajustes sucessivos, foi encontrado o fator de escala 0,9935 com erro médio quadrado de  $13\text{ cm}^{-1}$  para frequências abaixo de  $1800\text{ cm}^{-1}$  e para frequências acima de  $1800\text{ cm}^{-1}$  foi encontrado o fator de escala 0,9556 com o erro médio quadrático de  $52\text{ cm}^{-1}$ .

A descrição dos modos normais de vibração foi realizada com base na visualização das representações de deslocamento atômica para cada vibração, utilizando o programa Chemcraft (ANDRIENKO, 2016). Os números de ondas vibracionais calculadas, foram ajustados para comparar com frequências experimentais Raman e IR.

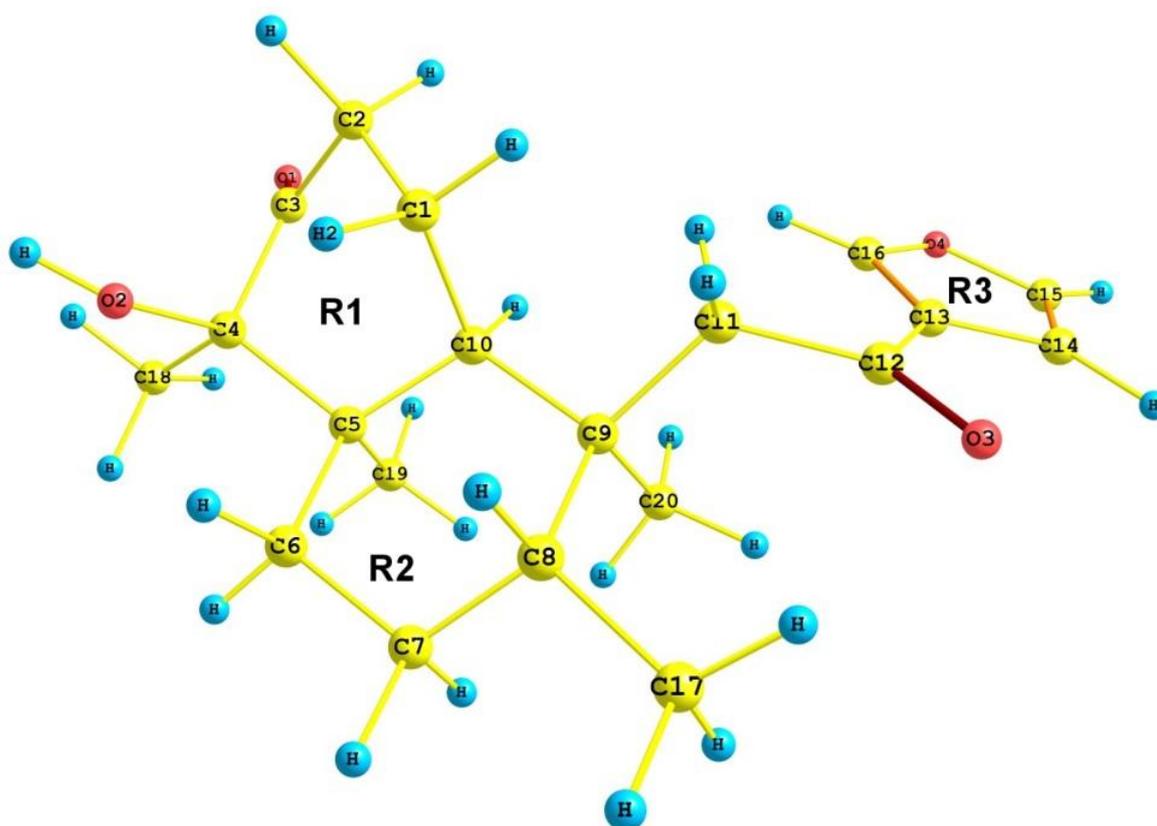
# CAPÍTULO 4

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Estrutura Molecular

A estrutura molecular do diterpeno labdano é mostrado na Figura 4. Essa estrutura é compatível com os dados de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (TEIXEIRA *et al.*, 2014).

**Figura 4: Estrutura molecular do diterpeno labdano 15,16-epóxi-4-hidroxi-labdano-13(16),14-dien-3,12-diona (C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub>).**



Como pode ser visto a estrutura molecular do diterpeno labdano é composta por dois anéis de seis membros R1 e R2 formados por átomos C1-C2-C3-C4-C5-C10 e C9-C10-C5-C6-C7-C8, respectivamente, e por um anel tipo-furano R3 formado pelos

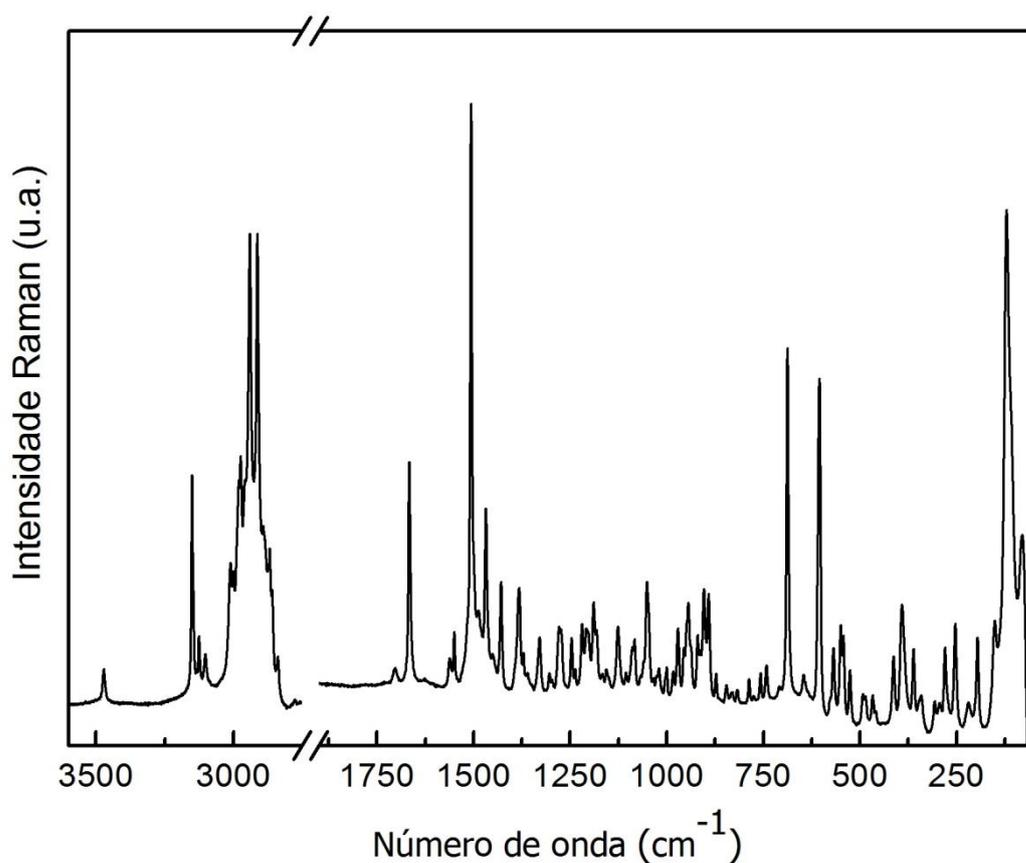
átomos de C13-C14-C15-C16-O4. É também interessante notar que o anel R3 está ligado por ligações zig-zag formadas pelos átomos C13C12C11C9.

#### 4.2 Espectroscopia vibracional

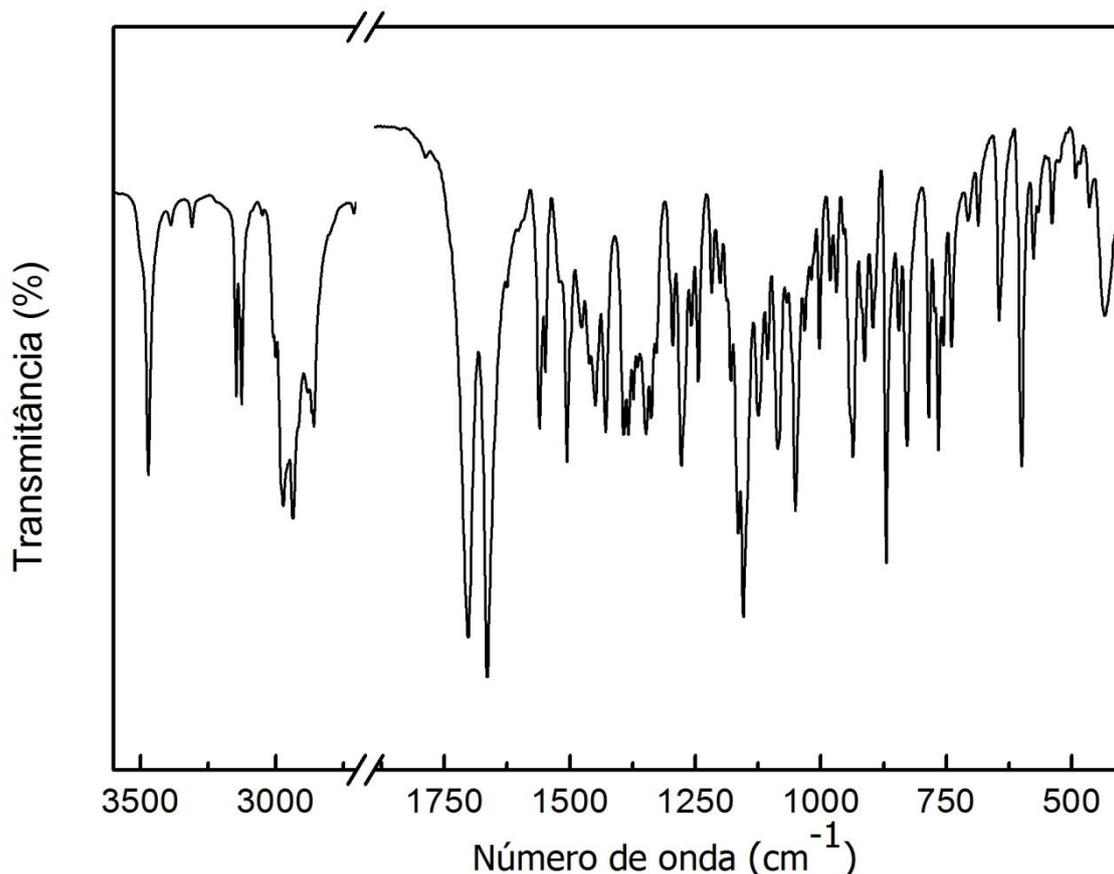
A molécula do diterpeno lábdano 15,16-epóxi-4-hidroxi-labda-13(16),14-dien-3,12-diona contém 52 átomos e, portanto, possui 150 modos normais de vibração.

Os espectros FT-Raman e FT-IR de amostras policristalinas da substância diterpeno labdano são apresentados nas Figuras 5 e 6, respectivamente. Eles foram registrados à temperatura ambiente nas regiões  $40\text{ cm}^{-1}$  a  $4000\text{ cm}^{-1}$  e  $400\text{ cm}^{-1}$  a  $4000\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente.

**Figura 5: Espectro FT-Raman de amostra policristalina do diterpeno labdano 15,16-epóxi-4-hidroxi-labda-13(16),14-dien-3,12-diona ( $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_4$ ) nas regiões  $3600\text{--}2750\text{ cm}^{-1}$  e  $1900\text{--}40\text{ cm}^{-1}$ .**



**Figura 6: Espectro FT-IR de amostra policristalina do diterpeno labdano 15,16-epóxi-4-hidroxi-labda-13(16),14-dien-3,12-diona (C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub>) nas regiões 3600–2750 cm<sup>-1</sup> and 1900–400 cm<sup>-1</sup>.**



As posições das bandas Raman e infravermelho das Figuras 5 e 6 são comparadas com os números de onda calculados e escalados, e as atribuições para cada modo de vibração feita com base na visualização das representações dos deslocamentos atômicos para cada vibração, utilizando o programa Chemcraft.

Os fatores de escala ( $\lambda$ ) obtidos foram 0,9635 (abaixo de 1800 cm<sup>-1</sup>) e 0,9556 (acima de 1800 cm<sup>-1</sup>), com o erro quadrático total (rms<sub>tot</sub>) de 13 cm<sup>-1</sup> e 52 cm<sup>-1</sup>, respectivamente.

Para descrever as atribuições das vibrações moleculares os seguintes símbolos foram usados:  $\tau$  = torção; r = rocking; sc= *scissoring*; wag = *wagging*,  $\delta$  = deformação;  $\delta_{as}$  = deformação anti-simétrica;  $\nu$  = estiramento;  $\nu_{as}$  = estiramento anti-simétrico;  $\nu_s$  = estiramento simétrico.

O Quadro 1 lista uma descrição detalhada das atribuições dos modos vibracionais do cristal diterpeno labdano (C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub>). Na primeira e na segunda coluna, encontram-se os valores das frequências calculadas e escalados, respectivamente. Os valores experimentais correspondentes ao número de onda para o cristal obtido por espectroscopias FT-Raman e FT-IR, são apresentados na terceira e quarta colunas, respectivamente. Na quinta coluna dá as atribuições dos modos vibracionais.

**Quadro 1: Número de onda calculado ( $\omega_{\text{calc}}$ ), número de onda escalado ( $\omega_{\text{scal}}$ ) pelos fatores de escala 0,9635 (abaixo de 1800 cm<sup>-1</sup>) e 0,9556 (acima de 1800 cm<sup>-1</sup>), posições da bandas Raman ( $\omega_{\text{FT-Raman}}$ ) e IR ( $\omega_{\text{FT-IR}}$ ) em unidades de cm<sup>-1</sup> e classificação para os modos vibracionais para o diterpeno labdano 15,16-epóxi-4-hidroxi-labda-13 (16), 14-dien-3,12- diona (C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub>).**

$\omega_{\text{calc}}$	$\omega_{\text{scal}}$	$\omega_{\text{FT-Raman}}$	$\omega_{\text{FT-IR}}$	Atribuição dos modos nomais de vibração do diterpeno laddano
27	26			$\delta$ (all structure)
38	37			$\delta$ (all structure)
56	54			$\delta$ (R3)
64	61			$\delta$ (all structure)
70	67			$\delta$ (all structure)
78	76	80		$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2)
130	125	120		$\delta$ (all structure)
166	160	152		$\delta$ (all structure)
176	170			$\delta$ (all structure)
192	185			$\tau$ (C17H <sub>3</sub> ) + $\tau$ (C19H <sub>3</sub> ) + $\tau$ (C20H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (R3)
207	199	196		$\delta$ (all structure)
222	214	219		$\delta$ (all structure)
232	224			$\tau$ (C6H <sub>2</sub> ) + $\tau$ (C19H <sub>3</sub> )
242	233			$\tau$ (C17H <sub>3</sub> ) + $\tau$ (C18H <sub>3</sub> ) + $\tau$ (C19H <sub>3</sub> ) + $\tau$ (C20H <sub>3</sub> )
249	240			$\tau$ (all CH <sub>3</sub> ) + $\tau$ (all CH <sub>2</sub> )
257	248			$\tau$ (all CH <sub>3</sub> ) + $\tau$ (all CH <sub>2</sub> )
267	257	253		$\tau$ (C17H <sub>3</sub> ) + $\tau$ (C18H <sub>3</sub> ) + $\tau$ (C2H <sub>2</sub> ) + $\tau$ (C11H <sub>2</sub> )
273	263			$\tau$ (all CH <sub>3</sub> )
290	279	279		$\tau$ (C17H <sub>3</sub> ) + $\tau$ (C18H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C4O2H)
297	287			$\tau$ (all CH <sub>3</sub> ) + $\tau$ (all CH <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C4O2H)
301	290	293		$\tau$ (C19H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C4O2H)
311	300	306		$\tau$ (all CH <sub>3</sub> ) + $\tau$ (C1H <sub>2</sub> ) + $\tau$ (C6H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C4O2H)
325	313			$\tau$ (all CH <sub>3</sub> ) + $\tau$ (C1H <sub>2</sub> ) + $\tau$ (C6H <sub>2</sub> )
328	317			$\tau$ (all CH <sub>3</sub> ) + $\tau$ (C1H <sub>2</sub> ) + $\tau$ (C2H <sub>2</sub> ) + $\tau$ (C6H <sub>2</sub> ) + $\tau$ (C7H <sub>2</sub> )
345	332	342		Breathing (R1) + $\delta$ (C2C3O1) + $\delta$ (C4O2H)
371	358	361		$\tau$ (all CH <sub>3</sub> ) + $\tau$ (all CH <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C2C3O1) + $\delta$ (C4O2H)
391	376			$\tau$ (all CH <sub>3</sub> ) + $\tau$ (all CH <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C2C3O1) + $\delta$ (C4O2H)
401	386	390		$\tau$ (all CH <sub>3</sub> ) + $\tau$ (all CH <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C13C12O3) + $\delta$ (C4O2H)
434	418	412		$\tau$ (all CH <sub>3</sub> ) + $\tau$ (all CH <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C13C12O3) + $\delta$ (C4O2H)
439	423			Breathing (R1) + Breathing (R2)
461	444		435	Breathing (R1) + Breathing (R2)
474	456	458		Breathing (R1) + Breathing (R2)
490	473	466	466	$\delta$ (all structure)
502	483	485	485	$\delta$ (all structure)
522	502	493	493	$\delta$ (all structure)
525	506			$\delta$ (all structure)

578	557	526	525	$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2) + $\delta$ (C2C3O1) + $\delta$ (C4O2H)
589	567	542	539	$\delta$ (all structure)
592	571	549		$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2)
606	584	569	567	Breathing (R1) + Breathing (R2) + $\delta$ (R3) + $\delta$ (C13C12O3)
618	596	579	577	$\delta$ (R3)
643	619	605	600	$\delta$ (R1)
660	636	645	645	$\delta$ (R3) + $\delta$ (C13C12O3) + $\delta$ (C9C11C12C13)
696	671	687	687	$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2)
702	676	709	707	$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2) + $\delta$ (C13C12O3) + $\delta$ (C9C11C12C13)
750	722	741	740	$\delta$ (R3)
764	737	757	757	$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2)
785	756		767	$\delta$ (R3) + $\delta$ (C13C12O3)
810	780	776	774	$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2) + $\delta$ (R3)
819	789	786	786	$\delta$ (R3)
840	809	817		$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2) + $\delta$ (R3)
862	831	831	829	$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2) + $\delta$ (R3)
888	855	845	845	$\delta$ (R3)
889	856			$\delta$ (R3)
896	863	863		$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2)
912	879	872	870	$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2) + $\delta$ (C9C11C12C13)
931	897	891	896	r (all CH <sub>3</sub> ) + r (C6H <sub>2</sub> ) + r (C11H <sub>2</sub> )
933	899	903		r (all CH <sub>3</sub> ) + r (all CH <sub>2</sub> )
944	910	913	913	r (C17H <sub>3</sub> ) + r (C20H <sub>3</sub> ) + r (C6H <sub>2</sub> ) + r (C7H <sub>2</sub> ) + r (C11H <sub>2</sub> ) + wag (C8H)
957	922	920		$\delta$ (R3) + $\delta$ (C9C11C12C13) + r (C20H <sub>3</sub> )
966	930	937	935	r (all CH <sub>3</sub> ) + r (all CH <sub>2</sub> ) + wag (C8H) + wag (C10H)
971	936	944	942	r (C17H <sub>3</sub> ) + r (C19H <sub>3</sub> ) + r (C20H <sub>3</sub> ) + r (C11H <sub>2</sub> )
991	955	956	955	r (C17H <sub>3</sub> ) + r (C19H <sub>3</sub> ) + r (C20H <sub>3</sub> ) + r (C1H <sub>2</sub> ) + r (C2H <sub>2</sub> ) + r (C11H <sub>2</sub> )
1008	971	971	970	r (C17H <sub>3</sub> ) + r (C19H <sub>3</sub> ) + r (C20H <sub>3</sub> ) + r (all CH <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C8H) + $\delta$ (C10H)
1025	987	983	981	$\delta$ (R3)
1030	993			r (all CH <sub>3</sub> ) + r (all CH <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C8H) + $\delta$ (C10H)
1044	1006	1001	1003	r (all CH <sub>3</sub> ) + r (all CH <sub>2</sub> ) + $\delta$ ag (C8H) + $\delta$ (C10H)
1053	1014	1020	1020	$\delta$ (R2)
1063	1025	1026		$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2) + $\delta$ (R3)
1082	1042	1034	1032	$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2) + Breathing (R3)
1087	1048			$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2) + Breathing (R3)
1089	1049	1051	1051	r (C18H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C4O2H)
1111	1071	1067	1067	$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2) + $\delta$ (C13C14H) + $\delta$ (O4C15H)
1114	1075			$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2) + $\delta$ (C13C14H) + $\delta$ (C13C16H) + $\delta$ (O4C15H)
1115	1075	1083	1085	$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2) + $\delta$ (C13C14H) + $\delta$ (C13C16H) + $\delta$ (O4C15H)
1143	1101	1089		$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2)
1151	1109	1105	1106	$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2) + $\delta$ (C13C14H) + $\delta$ (C13C16H) + $\delta$ (O4C15H)
1163	1121			$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2) + $\delta$ (C4O2H)
1176	1133	1126	1125	$\delta$ (R2) + r (C11H <sub>2</sub> )
1184	1141			$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2) + $\delta$ (C4O2H)
1200	1157	1155	1155	$\delta$ (R3) + $\delta$ (C2H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C11H <sub>2</sub> )
1205	1161	1166	1166	$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2) + $\delta$ (C4O2H) + $\delta$ (C11H <sub>2</sub> )
1217	1173	1181	1181	$\delta$ (all CH <sub>2</sub> )
1239	1194	1189	1187	$\delta$ (all CH <sub>2</sub> )
1256	1210	1206	1201	$\delta$ (all CH <sub>2</sub> )
1266	1220	1219	1217	$\delta$ (all CH <sub>2</sub> )
1269	1223			$\delta$ (C13C14H) + $\delta$ (C13C16H) + $\delta$ (O4C15H)
1280	1234	1237		$\delta$ (C11H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C10H) + $\delta$ (C1H) + $\delta$ (O4C15H)
1303	1255	1246	1244	$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2) + $\delta$ (C4O2H)
1319	1271		1258	wag (C11H <sub>2</sub> )
1327	1279	1278	1278	wag (all CH <sub>2</sub> ) + wag (C8H) + wag (C10H)
1335	1286			wag (C1H <sub>2</sub> ) + wag (C6H <sub>2</sub> ) + wag (C7H <sub>2</sub> ) + wag (C8H) + wag (C10H) + $\delta$ (C4O2H)
1344	1295	1296	1295	wag (C1H <sub>2</sub> ) + wag (C2H <sub>2</sub> ) + wag (C11H <sub>2</sub> ) + wag (C8H) + wag (C10H) + $\delta$ (C4O2H)
1351	1302	1304		wag (all CH <sub>2</sub> ) + wag (all CH) + $\delta$ (C4O2H)
1364	1314			wag (C1H <sub>2</sub> ) + wag (C6H <sub>2</sub> ) + wag (C11H <sub>2</sub> ) + wag (C8H) + wag (C10H) + $\delta$ (C4O2H)
1368	1318			wag (C1H <sub>2</sub> ) + wag (C2H <sub>2</sub> ) + wag (C11H <sub>2</sub> ) + wag (C8H) + wag (C10H)
1381	1331	1329	1329	wag (C1H <sub>2</sub> ) + wag (C6H <sub>2</sub> ) + wag (C7H <sub>2</sub> ) + wag (C11H <sub>2</sub> ) + wag (C8H) + wag (C10H)
1391	1340		1338	wag (C1H <sub>2</sub> ) + wag (C6H <sub>2</sub> ) + wag (C7H <sub>2</sub> ) + wag (C11H <sub>2</sub> ) + wag (C8H) + wag (C10H)
1399	1348		1349	wag (C1H <sub>2</sub> ) + wag (C6H <sub>2</sub> ) + wag (C7H <sub>2</sub> ) + wag (C11H <sub>2</sub> ) + wag (C8H) + wag (C10H)
1400	1349	1354		wag (C1H <sub>2</sub> ) + wag (C6H <sub>2</sub> ) + wag (C7H <sub>2</sub> ) + wag (C11H <sub>2</sub> ) + wag (C8H) + wag (C10H)

1419	1367	1360	1365	$\delta$ (R3) + wag (C11H <sub>2</sub> )
1422	1370	1370	1374	wag (C18H <sub>3</sub> )
1429	1377			wag (all CH <sub>3</sub> )
1436	1383	1382	1383	wag (all CH <sub>3</sub> )
1441	1388		1394	wag (C17H <sub>3</sub> ) + wag (C19H <sub>3</sub> ) + wag (C20H <sub>3</sub> )
1466	1413	1428	1428	sc(C2H <sub>2</sub> )
1494	1439			$\delta_{as}$ (all CH <sub>3</sub> ) + sc (C6H <sub>2</sub> ) + sc (C7H <sub>2</sub> )
1497	1442			$\delta_{as}$ (all CH <sub>3</sub> ) + sc (C6H <sub>2</sub> ) + sc (C7H <sub>2</sub> )
1498	1443			$\delta_{as}$ (all CH <sub>3</sub> ) + sc (C6H <sub>2</sub> ) + sc (C7H <sub>2</sub> )
1503	1448			sc (C11H <sub>2</sub> )
1509	1454	1450	1450	$\delta_{as}$ (C18H <sub>3</sub> ) + $\delta_{as}$ (C19H <sub>3</sub> ) + $\delta_{as}$ (C20H <sub>3</sub> ) + sc (C6H <sub>2</sub> ) + sc (C7H <sub>2</sub> )
1518	1463			$\delta_{as}$ (all CH <sub>3</sub> ) + sc (C1H <sub>2</sub> ) + sc (C6H <sub>2</sub> ) + sc (C7H <sub>2</sub> ) + sc (C11H <sub>2</sub> )
1520	1465			$\delta_{as}$ (all CH <sub>3</sub> ) + sc (C1H <sub>2</sub> ) + sc (C6H <sub>2</sub> ) + sc (C7H <sub>2</sub> )
1527	1471	1468	1462	$\delta_{as}$ (all CH <sub>3</sub> ) + sc (C1H <sub>2</sub> )
1528	1473		1477	$\delta_{as}$ (all CH <sub>3</sub> ) + sc (C7H <sub>2</sub> )
1530	1474	1487	1497	sc (C1H <sub>2</sub> ) + sc (C6H <sub>2</sub> )
1532	1476	1507	1506	$\delta_{as}$ (C18H <sub>3</sub> ) + $\delta_{as}$ (C19H <sub>3</sub> ) + $\delta_{as}$ (C20H <sub>3</sub> ) + sc (C7H <sub>2</sub> )
1553	1496		1521	$\delta_{as}$ (C19H <sub>3</sub> ) + $\delta_{as}$ (C20H <sub>3</sub> )
1555	1499	1550	1549	$\delta$ (R3) + $\delta_{as}$ (C19H <sub>3</sub> ) + $\delta_{as}$ (C20H <sub>3</sub> )
1614	1555	1562	1561	$\delta$ (R3)
1757	1693	1666	1663	$\nu$ (C12O3)
1810	1744	1703	1704	$\nu$ (C3O1)
2977	2845	2839		$\nu$ (C10H)
2999	2866	2860	2857	$\nu$ (C8H)
3035	2900	2866	2864	$\nu_s$ (C17H <sub>3</sub> ) + $\nu_s$ (C6H <sub>2</sub> ) + $\nu_s$ (C7H <sub>2</sub> )
3043	2908	2890		$\nu_s$ (C17H <sub>3</sub> ) + $\nu_s$ (C6H <sub>2</sub> )
3047	2912	2912		$\nu_s$ (C17H <sub>3</sub> ) + $\nu_s$ (C18H <sub>3</sub> ) + $\nu_s$ (C6H <sub>2</sub> ) + $\nu_s$ (C7H <sub>2</sub> )
3050	2915			$\nu_s$ (C2H <sub>2</sub> )
3052	2916			$\nu_s$ (C18H <sub>3</sub> )
3058	2922	2939	2937	$\nu_s$ (C11H <sub>2</sub> )
3060	2924			$\nu_s$ (C19H <sub>3</sub> ) + $\nu_s$ (C20H <sub>3</sub> ) + $\nu_s$ (C11H <sub>2</sub> )
3065	2929			$\nu_s$ (C19H <sub>3</sub> ) + $\nu_s$ (C20H <sub>3</sub> ) + $\nu_s$ (C11H <sub>2</sub> )
3068	2932	2956		$\nu_{as}$ (C6H <sub>2</sub> ) + $\nu_{as}$ (C7H <sub>2</sub> )
3093	2956	2973	2972	$\nu_{as}$ (C1H <sub>2</sub> ) + $\nu_{as}$ (C2H <sub>2</sub> )
3100	2962	2981		$\nu_{as}$ (C17H <sub>3</sub> )
3111	2973			$\nu_{as}$ (C1H <sub>2</sub> ) + $\nu_{as}$ (C2H <sub>2</sub> ) + $\nu_{as}$ (C11H <sub>2</sub> )
3112	2974			$\nu_{as}$ (C1H <sub>2</sub> ) + $\nu_{as}$ (C11H <sub>2</sub> )
3119	2981			$\nu_{as}$ (C18H <sub>3</sub> ) + $\nu_{as}$ (C6H <sub>2</sub> )
3121	2982	3000	3000	$\nu_{as}$ (C18H <sub>3</sub> ) + $\nu_{as}$ (C6H <sub>2</sub> )
3127	2988			$\nu_{as}$ (C20H <sub>3</sub> )
3130	2991	3010		$\nu_{as}$ (C18H <sub>3</sub> ) + $\nu_{as}$ (C19H <sub>3</sub> )
3154	3014			$\nu_{as}$ (C1H <sub>2</sub> )
3159	3019			$\nu_{as}$ (C17H <sub>3</sub> )
3166	3025			$\nu_{as}$ (C19H <sub>3</sub> ) + $\nu_{as}$ (C20H <sub>3</sub> )
3173	3032	3101		$\nu_{as}$ (C18H <sub>3</sub> )
3198	3056	3124	3123	$\nu_{as}$ (C19H <sub>3</sub> ) + $\nu_{as}$ (C20H <sub>3</sub> )
3284	3138	3150	3147	$\nu$ (C14H) + $\nu$ (C15H)
3292	3146		3309	$\nu$ (C14H) + $\nu$ (C16H)
3306	3159		3386	$\nu$ (C14H) + $\nu$ (C15H) + $\nu$ (C16H)
3806	3637	3470	3470	$\nu$ (O2H)

A atribuição para o cristal do diterpeno labdano mostra que a maioria das bandas nos espectros Raman e FT-IR correspondem a misturas de modos de vibração. A mistura de modos é comum em moléculas de simetria C<sub>1</sub>. A sobreposição de modos dificulta uma identificação direta das bandas, No entanto, uma descrição pormenorizada das atribuições de modos vibracionais deste cristal foi realizada.

Para região de números de onda muito baixos ( $<150\text{ cm}^{-1}$ ) são esperados bandas associadas aos modos externos (modos de vibração da rede), e alguns modos internos (modos associado as vibrações presente na molécula) também estão presentes. É importante salientar que no Quadro 1 não há nenhuma atribuição aos modos externos. Os cálculos DFT mostram que em baixos números de onda toda a estrutura sofre deformação  $\delta$  (all structure). Porém, nesta região, também é esperado encontrar modos externos. Isto se deve em razão do cálculo ter sido realizado em uma molécula isolada de diterpeno labdano, o que significa que não nesta condição somente, vibrações relacionadas com modos internos são observados.

Na região de número de onda entre  $557$  e de  $1161\text{ cm}^{-1}$ , observa-se principalmente deformações dos anéis. No entanto, as vibrações de deformação de grupos carbonila  $C2C3O1$  e  $C13C12O3$  e grupo hidroxila  $C4O2H$ , bem como, a respiração modos de anéis e as vibrações de deformação dos átomos  $C9C11C12C13$  também aparecem dentro desta região.

Os modos de deformação dos grupos metil e metileno aparecem em quatro regiões espectrais distintas. Vibrações de torção são observadas na região de número de onda entre  $224$  e  $443\text{ cm}^{-1}$ , vibrações do tipo *rocking* aparecem entre  $897$  e  $1006\text{ cm}^{-1}$ , as vibrações *wagging* surge entre  $1255$  e  $1388\text{ cm}^{-1}$  e vibrações tipo *scissoring* e deformação assimétrica aparecem na região entre  $1433$  e  $1499\text{ cm}^{-1}$ . Uma banda de Raman forte associada a uma mistura de modos vibracionais é observada a  $1507\text{ cm}^{-1}$  ( $\omega_{\text{scal}} = 1476\text{ cm}^{-1}$ ), correspondente a deformações assimétricas dos grupos ( $C18H_3$ ,  $C19H_3$  e  $C20H_3$ ) e uma vibração tipo *scissoring*, SC ( $C7H_2$ ).

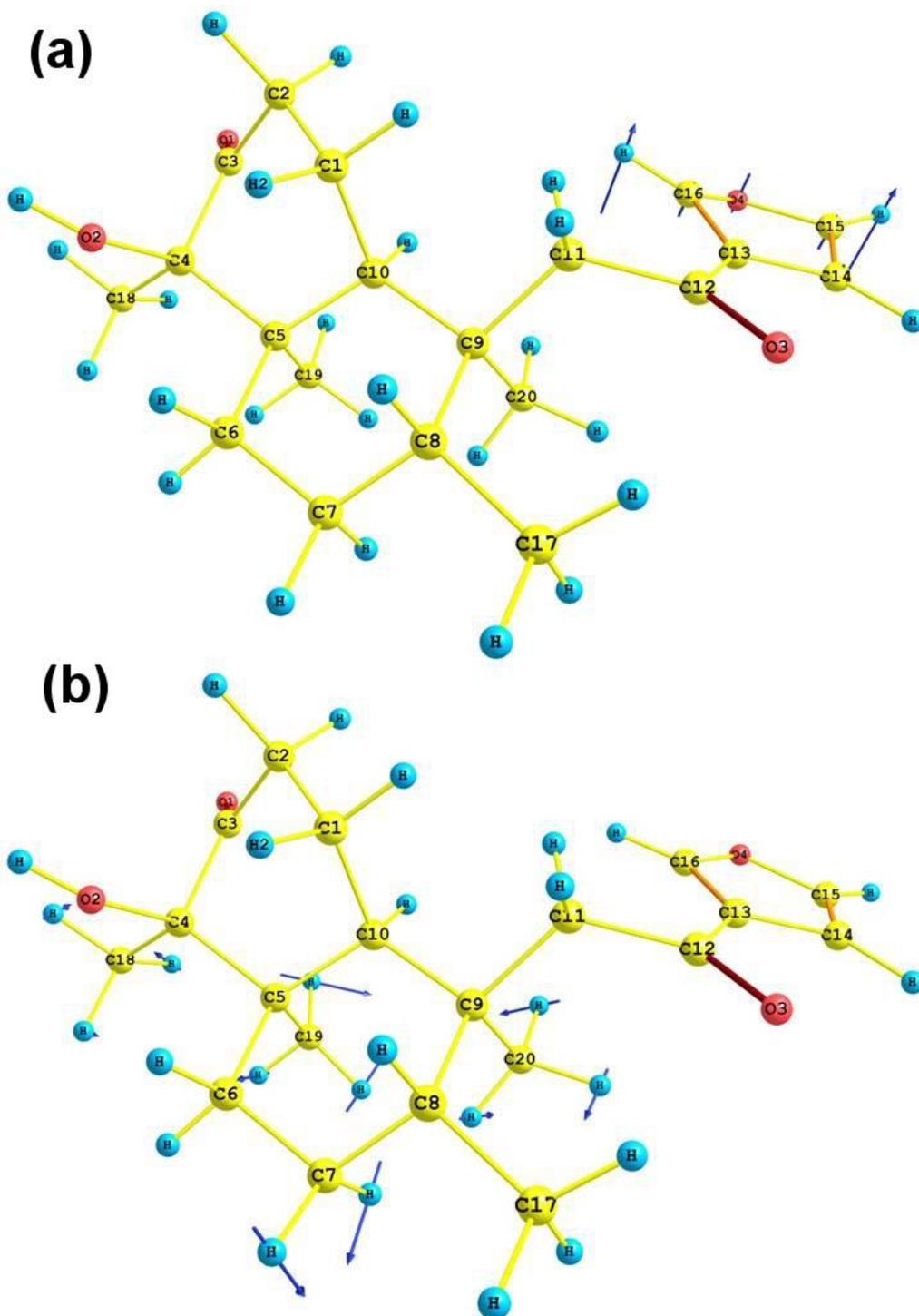
Os espectros Raman e Infravermelho mostram duas bandas associadas a presença dos modos de estiramento dos grupos carbonila do diterpeno labdano. Duas bandas no espectro Infravermelho muito fortes, são observadas em  $1704$  e  $1663\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao estiramento  $C = O$  associado com os grupos carbonila  $C3O1$  e  $C12O3$ , respectivamente. É interessante notar que a banda associada ao grupo carbonila  $C3O1$ , é muito mais intensa no espectro Infravermelho do que no espectro Raman. Em geral, as bandas  $C = O$  tendem a serem mais fortes no espectro infravermelho, enquanto que no espectro Raman elas são consideravelmente mais fraca (DEL ZOPPO *et al.*, 1998; LIN-VIEN *et al.*, 1991; TOMMASINI *et al.*, 1999).

A região entre  $2800\text{ cm}^{-1}$  e  $4000\text{ cm}^{-1}$  contém bandas originadas a partir de estiramento dos grupos funcionais  $CH$ ,  $CH_2$   $CH_3$  e  $OH$ . No diterpeno labdano as vibrações de estiramento dos grupos  $CH$ ,  $CH_2$ ,  $CH_3$  aparecem na região espectral de

2839 - 3386  $\text{cm}^{-1}$ , e a vibração de estiramento do grupo OH aparece em 3470  $\text{cm}^{-1}$ . Observa-se também que a amostra policristalina do diterpeno labdano não contém água, uma vez que as vibrações de estiramento das moléculas de água surgem em torno de 3400  $\text{cm}^{-1}$  e nenhuma banda nem no espectro Raman e nem no espectro Infravermelho foram observadas nas proximidades desta região.

Os deslocamentos atômicos correspondentes a alguns modos normais selecionados da molécula do diterpeno labdano 15,16-epóxi-4-hidroxi-labdano-13(16),14-dien-3,12-diona ( $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_4$ ) são apresentados na Figura 7. Na Figura 7.a é mostrado a representação dos deslocamentos atômicos associado a banda de Raman observadas em 579  $\text{cm}^{-1}$  (observada no espectro Infravermelho em 577  $\text{cm}^{-1}$ ), que corresponde à vibração da deformação do anel furano,  $\delta$  (R3). Por outro lado, na Figura 7.b mostra-se a representação das vibrações atômicas, associada à banda de Raman observada em 1507  $\text{cm}^{-1}$  (observada no espectro Infravermelho a 1506  $\text{cm}^{-1}$ ), que corresponde a deformações assimétricas dos grupos ( $\text{C}_{18}\text{H}_3$ ,  $\text{C}_{19}\text{H}_3$  e  $\text{C}_{20}\text{H}_3$ ) e uma tesoura vibração, *sc* ( $\text{C}_7\text{H}_2$ ).

Figura 7: Deslocamentos atômicos correspondentes a dois modos normais de vibração selecionados da molécula do diterpeno labdano 15,16-epóxi-4-hidroxi-labda-13(16),14-dien-3,12-diona ( $C_{20}H_{28}O_4$ ). (a)  $\omega_{FT-Raman} = 579\text{ cm}^{-1}$  ( $\omega_{FT-IR} = 577\text{ cm}^{-1}$ ) e (b)  $\omega_{FT-Raman} = 1507\text{ cm}^{-1}$  ( $\omega_{FT-IR} = 1506\text{ cm}^{-1}$ ).



### 4.3 Atividade Antimicrobiana

#### 4.3.1 Concentração inibitória mínima e moduladora do diterpeno labdano (C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub>).

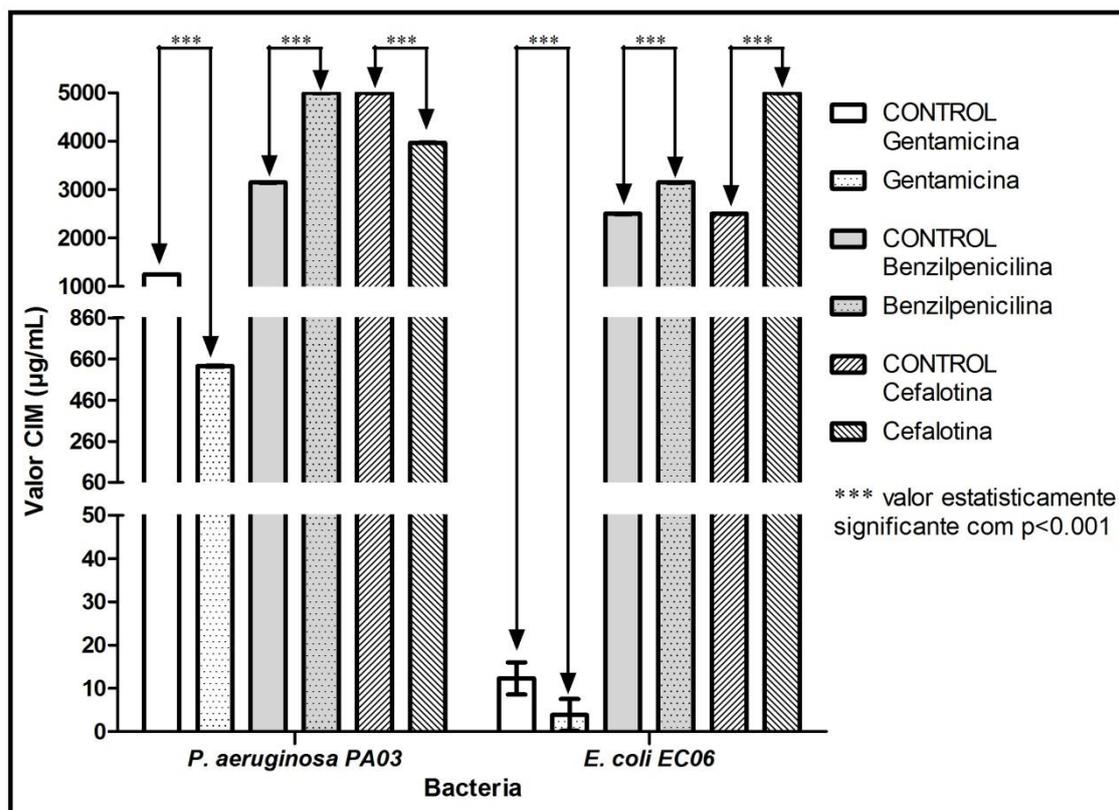
Este é o primeiro estudo da atividade antibacteriana e moduladora da substância diterpeno labdano isolado da espécie *Cróton jacobinensis*.

Foi realizada a determinação da CIM da substância diterpeno labdano 15,16-epóxi-4-hidroxi-labda-13(16),14-dien-3,12-diona, frente às linhagens bacterianas padrões (*Escherichia coli* E06 e *Pseudomonas aeruginosa* PA03) em uma concentração de 1024µl. Vale ressaltar que um ensaio piloto utilizando apenas o DMSO foi realizado, onde não mostrou-se nenhuma atividade antibacteriana e/ou moduladora, bem como, ausência de toxicidade.

Na determinação das CIMs, um efeito é tido como sinérgico quando observa-se uma contribuição favorável na ação do antibiótico, com diminuição da sua concentração inibitória mínima. Já o efeito antagônico, ocorre justamente o oposto, com diminuição ou inativação no efeito do antibacteriano (CONTON; ONOFRE, 2010).

Em contrapartida, as drogas na presença e na ausência da substância diterpeno labdano, apresentaram efeito sinérgico quando associado as drogas gentamicina e cefalotina frente a bacteria *P. aeruginosa*, onde foi estatisticamente significativa quando adotado um  $p < 0,05$ , porém apresentou efeito antagônico quando modulado com o antibiotico benzilpenicilina. Comparativamente, a bacteria *E. coli* apenas demonstrou efeito sinérgico, quando o antibiótico de escolha foi a gentamicina. Em associação da substância com as drogas benzilpenicilina e cefalotina, houve um efeito antagônico (Figura 8).

**Figura 8. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antibióticos na presença e na ausência da substância diterpeno labdano 15,16-epóxi-4-hidroxi-labdano-13(16),14-dien-3,12-diona (C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub>), em uma concentração CIM ( µg/mL), frente a *P. aeruginosa* 03 e *E. coli* 06.**



A combinação da substância diterpeno a antibióticos, atua de maneira positiva no estudo, aumentando a atividade do antibiótico. Este efeito é principalmente devido à substância possuir finalidades lipofílicas, permitindo deste modo que ocorra alterações na membrana bacteriana, ora desinstabilizando-a, facilitando a entrada do antibiótico na célula bacteriana, com posterior efeito bactericida (ANDRADE *et al.*, 2014).

Segundo autores, a composição de substâncias lipofílicas, resultam em danos na membrana bacteriana, como por exemplo, perda de tons, proteínas, citocromo C, redução do potencial de membrana e ATP (TURINA *et al.*, 2006; HIRAYAMA *et al.*, 2006). De caráter lipossolúvel, a substância com rica fonte de vitamina K e E, pode modificar ou alterar a permeabilidade da membrana plasmática de diferentes microorganismos facilitando a entrada do antibacteriano (TORTORA, 2008).

Sabendo-se que as bactérias não possuem colesterol nem ergosterol, e por possuírem cadeias polissacarídeas na sua composição, estas, funcionam como uma

barreira para substâncias hidrofóbicas, ocorre uma ação lipofílica nos envoltórios celulares, com posterior desequilíbrio na estrutura mosaico fluido da bactéria, facilitando a entrada do antibacteriano na célula (NOSTRO *et al.*, 2004).

Com base em estudos anteriores, a atividade sinérgica observada em diferentes estudos, está associada à constituição de metabólitos secundários tipo taninos, flavanoides e terpenos da espécie do gênero *Croton*, em resposta a infecções microbianas (KUETE, *et al.*, 2011). Estes, segundo autores, possuem a capacidade de destruir a membrana plasmática da bactéria ou até mesmo alterá-la, facilitando deste modo, a absorção das drogas (TSACHEVA *et al.*, 2004). O que pode-se inferir que tal substância testada no presente estudo, pode modificar a estrutura bacteriana, facilitando e potencializando a ação dos antimicrobianos.

A linhagem bacteriana *P. aeruginosa*, mostrou-se nos experimentos ser mais sensível aos antibióticos se comparada com a *E. coli*. Esta possível diferença, provavelmente está ligada as diferenças estruturais de cada composto químico, onde o aminoglicosídeo utilizado é uma molécula hidrofílica, composta por um anel aminococlitol, em sua maioria 2-desoxi-estreptamina, ligado a um açúcar agindo na solubilidade e na absorção da droga (MAGNET; BLANCHAD, 2005).

Ainda na análise dos resultados, a linhagem da *E. coli* demonstra ser mais resistente à ação de produtos naturais, como relatado em outros experimentos (VERAS, 2011). Esta conjuntura, também pode estar relacionada aos mecanismos de resistência bacteriana, como bomba de efluxo, produção de enzimas que clivam o anel  $\beta$ -lactâmico ( $\beta$ -lactamases), dentre outros (EURIGHT *et al.*, 2002).

Os antibióticos utilizados no presente estudo possuem características distintas, com diferentes mecanismos de ação para a resposta microbiana (SILVEIRA *et al.*, 2006).

A gentamicina que foi a droga que apresentou melhor resultado, atua por produção de proteínas defeituosas, ou inibindo a síntese proteica das bactérias, ligando-se a função 30S dos ribossomos. Em função de seu amplo espectro contra bactérias gram negativas e positivas, em vários estudos demonstrou sinergismo em associação a outras drogas, possuindo assim, um amplo uso clínico (DORMAN; DEANS, 2000).

Segundo Figueredo e colaboradores (2013), o uso concomitante de antibióticos, principalmente os da classe de aminoglicosídeos são comuns em causar efeitos tóxicos, sendo verificada principalmente a nefrotoxicidade, ototoxicidade e bloqueio neuromuscular. A combinação do composto diterpeno labdano à antibióticos pode ser

uma alternativa para potencializar o efeito terapêutico do medicamento, uma vez que tal conjuntura atua como um efeito sinérgico quando associado as drogas gentamicina e cefalotina, diminuindo assim as possibilidades de efeitos tóxicos e a dose terapêutica.

Associada a um crescente desenvolvimento de métodos que garantam a caracterização de fármacos com extrema rapidez, a espectroscopia aliada a processadores digitais e técnicas computacionais, permitem a análise de medicamentos e outras estruturas complexas, de maneira mais rápida, segura e eficaz (SOUZA; FERRÃO, 2006).

## CONCLUSÃO

- A atividade antimicrobiana verificada pelo diterpeno lábdano 15,16-epóxi-4-hidroxi-labda-13 (16), 14-dien-3,12-diona apresentou os mesmos valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente as bactérias padrão ATCC testados, sendo todos os valores observados  $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ .
- Observou-se sinergismo com o aminoglicosídeo gentamicina quando associado ao diterpeno labdano por contato direto, frente às bactérias *P. aeruginosa* e *E. coli*.
- O composto 15,16-epóxi-4-hidroxi-labda-13 (16), 14-dien-3,12-diona por possuir características lipossolúveis, pode modificar a estrutura mosaico fluido da parede bacteriana, facilitando a entrada do antibiótico na célula bacteriana.
- A geometria estável da molécula do diterpeno labdano e os modos normais de vibração esperados para essa substância foram obtidos por cálculos teóricos de química quântica, usando a Teoria do Funcional da Densidade (DFT);
- Quando as frequências calculadas da molécula diterpeno labdano foram ajustadas pelos fatores de escala 0,9635 (abaixo de  $1800 \text{ cm}^{-1}$ ) e 0,9556 (acima de  $1800 \text{ cm}^{-1}$ ) apresentou-se uma relação bem próxima entre os valores escalados e os obtidos nos espectros FT-Raman e FT-IR. Devido à boa concordância entre os resultados experimentais e teóricos, foi possível obter a atribuição completa das bandas Raman e Infravermelho deste novo produto natural.

## REFERÊNCIAS

ADIKWU, M.; JACKSON, C.; ESIMONE, C. **Evaluation of in vitro antimicrobial effect of combinations of erythromycin and Euphorbia hirta leaf extract against Staphylococcus aureus.** Research in Pharmaceutical Biotechnology, v. 2, n. 2, p. 22-24, 2010.

ANDRADE, J. C; MORAIS-BRAGA, M. F. B; GUEDES, G. M. M; TINTINO, S. R; FREITAS, M. A; MENEZES, I. R. A; COUTINHO, H. D. M. **Enhancement of the antibiotic activity of aminoglycosides by alpha-tocopherol and other cholesterol derivates.** Biomedicine & Pharmacotherapy 68,1065–1069, 2014.

ANGÉLICO, E. C. **Avaliação das atividades antibacteriana e antioxidante de *Croton heliotropiifolius* Kunt e *Croton blanchetianus* Baill.** Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2011.

ARAÚJO, A. M; CARNEIRO, V. A; BANDEIRA, P. N; ALBUQUERQUE, M. R. J. R; TEIXEIRA, E. H; CAVADA, B. S; PEREIRA, M. O; HENRIQUES, M; LEMOS, T. L. G; SANTOS, H. S. **Atividade antimicrobiana, bactericida, bacteriostática e antibiofilme do diterpeno isolado de *Croton nepetaefolius*.** 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008.

ARAÚJO, M.E.M. **Química analítica aplicada aos produtos naturais.** Mestrado em Química Analítica Aplicada, Universidade Federal do Pará, 2005.

ARRAIS, L.G.<sup>1</sup>; LYRA, H.F.S.<sup>1</sup>; BATISTA, D.C.A.<sup>3</sup>; COUTINHO, F.N.<sup>3</sup>; SARAIVA, A.M.<sup>3</sup>; PEREIRA, R.C.A.<sup>4</sup>; PISCIOTTANO, M.N.C.<sup>3</sup>; XAVIER, H.S.<sup>2</sup>; MELO, S.J.<sup>1</sup> **Atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos da raiz, caule e folhas de *Croton pulegioides* Baill.** (Zabelê). Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v.16, n.2, supl. I, p.316-322, 2014.

AZEVEDO, F.M. Microrganismos multirresistentes. In: Oliveira A.C. **Infecções hospitalares: epidemiologia, prevenção e controle.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 341-47, 2005.

BABILI, F; FABRE, N; MOULIS, C; FOURASTE, I. **Molluscicidal activity against *Bulinus truncatus* of *Croton campestris*.** Fitoterapia,77(5): 384-7, 2006.

BALUNAS, M. J.; DOUGLAS KINGHORN, D. **Drug discovery from medicinal plants.** Life Sciences 78 : 431 – 441, 2005.

BAPTISTA, M. G. F. M. **Mecanismos de resistência aos antibióticos.** Tese apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas ao Curso de

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, 2013.

BARREIRO, E.D; FRAGA, C.A.M. **Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos** . Artmed Editora. Porto Alegre, 2001.

BASTOS, M. L. A. **Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro e in vivo e estudo químico biomonitorado de Piper hayneanum C.CD.(Piperaceae) e Zeyheria tuberculosa (Vell.) Bur. (Bignoniaceae)**. 2008. 254f. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) - Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, 2008.

BERBERAN, M.N.; SANTOS. **ESPECTROSCOPIA: Princípios de Química - Física**. Técnico Lisboa, março de 2013.

BIGHETTI, E.J; HIRUMA-LIMA,C.A;GRACIOSO, J.S; BRITO, A.R. **Anti-inflammatory and antinociceptive effects in rodents of the essential oil of *Croton cajucara* Benth.** *J Pharm Pharmacol* 51:1447-53, 1999.

BOTSARIS, A. **Cresce o interesse pela fitoterapia**. Disponível em [http://www.nucleoalquimico.com.br/pdf/artigos/cresce\\_interesse\\_pela\\_fitoterapia.pdf](http://www.nucleoalquimico.com.br/pdf/artigos/cresce_interesse_pela_fitoterapia.pdf). >>Acesso em 10 de março de 2016.

BRANDÃO, A. **Bactérias, essas velhas, perigosas e benéficas conhecidas**, Pharmacia Brasileira nº 83 - Setembro/Outubro/Novembro 2011 .

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos Formulário Terapêutico Nacional: Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS RENISUS. Fev 2009. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/bvs> >> Acesso em 23 de fevereiro de 2015.

BRESOLIN, T.M.B.; FILHO, V.C., **Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Editora: UNIVALI-SC, p. 11-18, 2003.

BRUICE, P. Y. Química Orgânica. São Paulo: Pearson Prentice Hall, v. 1, 2006.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M.; MACIEL, M.V.; COSTA, C.T.; MACEDO, I.T.; OLIVEIRA, L.M.; BRAGA, R.R.; SILVA, R.A.; VIEIRA, L.S. **Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils**. *Veterinary parasitology*, 148: 288-294, 2007.

CANTON, M.; ONOFRE, S.B. **Interferência de extratos da *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae, sobre a atividade de antibióticos usados na clínica**. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v 20(3), 348-354, 2010.

CARNEIRO, V.A.; SANTOS, H.S.; ARRUDA, F.V.S.; BANDEIRA, P.N.; ALBUQUERQUE, M.R.J.R.; PEREIRA, M.O.; HENRIQUES, M.; CAVADA, B.S.;

TEIXEIRA, E.H. **Casbane diterpene as a promising natural antimicrobial agent against biofilm-associated infections.** *Molecul.*16, 190-201, 2011.

CARVALHO, A.C.B.; NUNES, D.S.G.; BARATELLI, T.G.; SHUQAIR, N.S.M.; NETTO, E.M. **Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos.** *T&C Amazônia*, v.5, n.11, p. 26-32, 2007.

CHEN, D. H.; & FRANKEL, G.; **Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis.** *FEMS Microbiology Reviews* 29: 83-98. 2004.

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; LIMA, E.O.; FALCAO-SILVA, V.S.; SIQUEIRA-JUNIOR. **Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine.** *Chemotherapy*.54, 328-330, 2008.

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; LIMA, E.O., FALCÃO-SILVA V.S.; SIQUEIRA JR, J.P. **Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by *Turnera ulmifolia* L.** *BMC Complement Altern Med.* 9:13, 2009.

CRAVEIRO, A.A. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste.** Fortaleza. UFC, 1981.

CUADRADO,I; FERNANDES-VELASCO,M; BOSCA,L; HERAS,B. **Labdane diterpenes protect against anoxia/reperfusion injury in cardiomyocytes: involvement of AKT activation.** *Cell Death and Disease*, 229, 2011.

CUADRADO-BERROCAL, I.; GÓMEZ-GAVIRO, M. V.; BENITO, Y.; BARRIO, A.; BERMEJO, J.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.E.; SÁNCHEZ, P. L.; DESCO, M.; FERNÁNDEZ-AVILÉS, F.; FERNÁNDEZ-VELASCO, M; BOSCA, L.; HERAS, B. **A labdane diterpene exerts ex vivo and in vivo cardioprotection against post-ischemic injury: involvement of AKT-dependent mechanisms.** *Biochem. Pharmacol.* 93(4): 428-439, 2015.

DEL ZOPPO, M.; TOMMASINI, M.; CASTIGLIONI, C.; ZERBI, G. **A relationship between Raman and infrared spectra: the case of push-pull molecules.** *Chemical Physics Letters*, v. 287, n. 1-2, p. 100-108, 4/24/ 1998.

DELLIT, T.H. **Infectious disease society of america and the society for healthcare epidemiology of America guidelines for developing an institutional program to enhance antimicrobial stewardship.** *Clin. Infect. Dis.* Chicago, v. 44, p. 159-177, 2007.

Departamento de Microbiologia Instituto de Ciências Biológicas Universidade Federal de Minas Gerais <http://www.icb.ufmg.br/mic.>>> Acesso em 26 de março de 2016.

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. **Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils.** *Journal of Applied Microbiology*.88, 306-318, 2000.

DREWS, J. **Drug Discovery: A Historical Perspective.** *Science*.287, 1960-1964. 2000.

DREWS, J. **Strategic trends in the drug industry.** *Drug Discovery Today.* 8 (9), 411-420, 2003.

DUARTE, D.F.P; SANT'ANA, A.E.G; CALIXTO, J.B. 1992. **Analysis of the vasorelaxant action of jatrophone in the isolated aorta of the rat: influence of potassium channel blockers.** *Eur J Pharmacol* 215: 75-81.

DUARTE, M.C.T. **Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil.** Multiciência, outubro de 2006.

ENRIGHT, M.C.; ROBINSON, D.A.; RANDLE, G.; FEIL, E.J.; GRUNDMANN, H.; SPRATT, B.G. **The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 7687-7692, 2002.

ESPARIS, C. M; TEIXEIRA, L. M.; IRINO, K.; GIL, P. F.; ALMEIDA, M. M. T. B.; FERRARO, J. R.; NAKAMOTO, K.; BROWN, C. W. **Introductory Raman Spectroscopy,** 2nd Ed., San Diego: Academic Press, 2003.

FIGUEIREDO, D.Q. *et al.* **Detecção de metalo-betalactamases em amostras hospitalares de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*.** *J Bras PatolMed Lab,* v. 45, n. 3, p. 177-84, 2009.

FIGUEREDO, C. A; GURGE, I. G.D; JUNIOR, G. D. G. **A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios.** *Revista de Saúde Coletiva,* Rio de Janeiro, 24 [ 2 ]: 381-400, 2014.

FIGUEREDO, F.G.; FERREIRA, E.O.; LUCENA, B.F.F.; TORRES, C.M.G.; LUCETTI, D.L.; LUCETTI, E.C.P.; SILVA, J.M.F.L.; SANTOS, F.A.V.; MEDEIROS, C.R.; OLIVEIRA, G.M.M.; COLARES, A.V.; COSTA, J.G.M.; COUTINHO, H.D.M.; MENEZES, I.R.A.; SILVA, J.C.F.; KERNTOPF, M.R.; FIGUEIREDO, P.R.L.; MATIAS, E.F.F. **Modulation of the Antibiotic Activity by Extracts from *Amburana cearensis* A. C. Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan.** *BioMed Research International.* 1-5, 2013.

FILHO, J. M. **Potencial de atividade antimicrobiana in vitro de extratos vegetais do cerrado frente estirpes de *Staphylococcus aureus*.** Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2010.

FREIRE JR, O; PESSOA JR, O; BROMBERG, JL. **Teoria Quântica: estudos históricos e implicações culturais** [online]. Campina Grande: EDUEPB; São Paulo: Livraria da Física, 2011. 456 p. ISBN 978-85-7879-060-8. Available from SciELO Books .

GELDENHUYS, W.J.; GAASCH, K.E.; WATSON, M.; ALLEN, D.D.; VAN DER SCHYF, C. J. **Optimizing the use of open-source software applications in drug discovery.** *Drug Discovery Today.* 11(3/4), 127-132, 2006.

GOODMAN, L.S. GILMAN, A. As bases farmacológicas da terapêutica. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2010.

HIRAYAMA, Karin Brocanelli; SPERIDIÃO, Patrícia G. L.; FAGUNDES NETO, Ulysses. **Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa.** The Electronic Journal of Pediatric Gastroenterology, Nutrition and Liver Diseases.v. 10 (3), 2006.

HIRUMA-LIMA, C.A; GRACIOSO, J.S; BIGHETTI, E.J; GRASSI-KASSISSE, D.M; NUNES, D.S; BRITO, A.R. **Effect of essential oil obtained from *Croton cajucara* Benth. on gastric ulcer healing and protective factors of the gastric mucosa.** Phytomedicine, Sep;9(6):523-9, 2002.

HOHENBERG, P.; KOHN, W. **Inhomogeneous Electron Gas.***Physical Review B*, 136, B864, 1964.

ISSN. Alexander Fleming e a descoberta da penicilina. Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial, volume 45, n5, out. 2009.

JAMMER, M. **The Conceptual Development of Quantum Mechanics.** New York, McGrawHill, 1966.

JARBAS S. RORIZ-FILHO, J. S.; VILAR, F. C.; MOTA, L. M.; LEAL, C. L.; PISI, P. C. B.; **Infecção do trato urinário.** Simpósio: Condutas em enfermagem de clínica médica de hospital de média complexidade - Parte 1 Capítulo III. Medicina (Ribeirão Preto) 43(2): 118-25, 2010.

JAWETZ; MELNICK; ADELBERG. **Microbiologia médica.** 25.ed. Rio de Janeiro : McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda, 2012.

KOHN, W.; SHAM, L. J. **Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects.** *Physical Review*, vol. 140, Issue 4A, p. 1133-1138, 1965.

KUETE, V.; KAMGA, J.; SANDJO, L.P.; NGAMENI, B.; POUMALE, H.M.P.; AMBASSA, P.; NGADJUI, B.T. **Antimicrobial activities of the methanol extract, fractions and compounds from *Ficus polita* Vahl.(Moraceae).**BMC Complementary and Alternative Medicine, v. 11, n.06, p. 01-06, 2011.

LAI, P. K; ROY, J. **Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices.** *Curr. Med. Chem.* [S.l.: s.n.] 11 (11): 1451-60, 2004.

LAMBERT, P.A. **Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria.** J Appl Microbiol Symposium Supplement.92, 46-54, 2002.

LIN-VIEN, D.; COLTHUP, N. B.; FATELEY, W. G.; GRASSELLI, J. G. CHAPTER 9 - **Compounds containing the carbonyl group.** In: GRASSELLI, D. L.-V. B. C. G. F. G. (Ed.). The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules. San Diego: Academic Press, 1991. p.117-154. ISBN 978-0-12-451160-6.

LOPES E LOPES, M.I.; SAFFI, J.; ECHEVERRIGARAY, S.; HENRIQUES, J.A.; SALVADOR, M. **Mutagenic and antioxidant activities of *Croton lechleri* sap in biological systems.** Journal of ethnopharmacology, 95: 437-445, 2004.

LOPES, G. S.; BRAVO, V. L. R.; PACHECO, R. S.; REGUA-MANGIA, A. H. **Aspectos biológicos e moleculares de amostras uropatogênicas de *Escherichia coli* isoladas na Cidade do Rio de Janeiro.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 39(6):573-576, nov-dez, 2006

MAGNET, S.; BLANCHAD, J.S. Molecular Insights into aminoglycosides Action and Resistance. *Chemica Reviews*.105, 477-497, 2005.

MARTINS, M.A.; AZEVEDO, F.M.; ROCHA, L.C.M.; ROSÁRIO, P.W.S. Drogas antibacterianas: antibióticos. In: MARTINS, M.A. **Manual de infecção hospitalar: epidemiologia, prevenção e controle.** 2ª ed. Belo Horizonte: Medsi. p. 451-72, 2001.

MARTINS, P. **Epidemiologia das infecções hospitalares em centro de terapia intensiva de adulto.** Dissertação apresentada ao curso de PósGraduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre. Belo Horizonte-MG, 2006.

MATIAS, E.F.F.; SANTOS, K.K.A.; ALMEIDA, T.S.; COSTA, J.G.E.; COUTINHO, H.D.M. **Atividade antibacteriana *In vitro* de *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia verbenacea* DC.** Rev. Bras. Bioci., Porto Alegre, v. 8, n. 3, p. 294-298, jul./set. 2010.

MATIAS, E.F.F.; SANTOS, K.K.A.; ALMEIDA, T.S.; COSTA, J.G.M.; COUTINHO, H.D.M. **Enhancement of Antibiotic Activity by *Cordia verbenacea* DC.** Latin American Journal of Pharmacy.29, 1049-1052, 2010.

MCCREERY, R. L. **Raman Spectroscopy for Chemical Analysis,** New York: Wiley, 2000.

NASCIUTTI, P. R. **Desenvolvimento de novos fármacos.** Seminários aplicados do programa de pós-graduação em ciência animal da escola de veterinária e zootecnia da Universidade Federal de Goiás para nível de mestrado, goiânia 2012.

Neves, I.A.; da Camara, C.A.G. **Acaricidal Activity against *Tetranychus urticae* and Essential Oil Composition of Four *Croton* Species from Caatinga Biome in Northeastern Brazil,** Natural Product Communications, 6 :893-899, 2011.

NEVES, P. R.; MAMIZUKA, E. M.; LEVY, C. E.; LINCOPAN, N. ***Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil.** Jornal Brasileiro de Patologia Medicina Labarotorial, v. 47 , n. 4 , p. 409-420, agosto 2011.

NOSTRO, A.; BLANCO, A.R.; CANNATELLI, M.A.; ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I. **Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol.** FEMS Microbiol Lett.230:191–5, 2004.

OLIVEIRA, G.A.; OKADA, S.S.; GUENTA, R.S.; MAMIZUKA, E.M. **Avaliação da tolerância à vancomicina em 395 cepas hospitalares de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina.** Jornal Brasileiro de Patologia, v. 37, n. 4, 2001.

OLIVEIRA, I.M.M.; SANTOS, H.S.; SENA, JR. D.M.; CRUZ, B.G.; TEIXEIRA, A.M.R.; FREIRE, P.T.C.; BRAZ-FILHO, R.; SOUSA, J.W.; ALBUQUERQUE, M.R.J.R.; BANDEIRA, P.N.; BERNARDINO, A.C.S.S.; GUSMAO, G.O.M.; BENTO, R.R.F. **Vibrational spectra and DFT calculations of sonderianin diterpene,** Journal of Molecular Structure, 1099 (2015) 226-231.

OLIVEIRA, L. F. S. **Avaliação in vivo do efeito hipocolesterolêmico do extrato metanólico de *Aleurides moluccana*, xantoxilina e seus derivados.** Dissertação de Mestrado, UFSC, 2001.

OLIVEIRA, R.; & MARUYAMA, S. A. **Controle de infecção hospitalar: histórico e papel do estado.** Revista Eletrônica de Enfermagem, 10(3):775-83, 2008.

OMS. **ANTIMICROBIAL RESISTANCE Global Report on Surveillance.** 2014. Acessado em 9 de junho de 2016

PEREIRA, M. S.; SOUZA, A. C. S.; TIPPLE, A. F. V.; PRADO, M. A.; **A infecção hospitalar e suas implicações para o cuidar da enfermagem.** Texto Contexto Enfermagem, 14(2):250-7, 2005.

PINHO, L.; SOUZA, P. N. S.; SOBRINHO, E. M.; ALMEIDA, A. C.; MARTINS, E. R.; **Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi.** Ciência Rural, v.42, n.2, p. 326-331, 2012.

PUPO, M.T. **Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais.** Química Nova, v.30, n.6, p. 1446-1455, 2007.

RAMOS, S.C.R.; OLIVEIRA, J. C.S; CÂMARA, C. A. G; CASTELAR, I. CARVALHO, A. F. F. U; LIMA-FILHO, J. V. **Antibacterial and cytotoxic properties of some plant crude extracts used in Northeastern folk medicine.** Revista Brasileira de Farmacognosia, 19(2A): 376-381, 2009.

RAO, V. S.; GURGEL, L.A.; LIMA-JÚNIOR, R.C.P.; MARTINS, D.T.; CECHINEL-FILHO, V.; SANTOS, F.A. **Dragon's blood from *Croton urucurana* (Baill.) attenuates visceral nociception in mice.** Journal of ethnopharmacology, 113: 357-360, 2007.

RIBEIRO, D.S.; MELO, D.B.; GUIMARÃES, A.G.; VELOZO, E.C. **Avaliação do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como modulador da resistência bacteriana.** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 33, n. 2, p. 687-696, abr, 2012

RIBEIRO, L. A. A.; TAVARES, J. F; ANDRADE, N. C; SILVA, M. S; SILVA, B. A. **O Ácido (8)17,12E,14-labdatrieno-18-óico (labdano302), diterpeno tipo labdano isolado de *Xylopia langsdorffii* ana St. Hil. & Tul. (Annonaceae) relaxa a traquéia isolada de cobaia.** Revista Brasileira de Farmacognosia, 17(2):197-203, 2007.

ROSA, D. D.; BASSETO, M. A.; FELICIANO, F.; NEVES, M. B.; BALDIN, E. L. L. **Ocorrência de *Dictyla monotropidia* Stål (Hemiptera: Tingidae) em *Cordia verbenacea* Al. DC no Brasil.** Neotropical Entomology, v. 37, n. 2, p. 236-238, 2008.

SALADIN, M; CAO, V. T. B; LAMBERT, T; DONAY, J. L; HERRMANN, J.L; OULD-HOCINE, Z; VERDET, C; DELISLE, F; PHILIPPON, A; ARLET, G. **Diversity of CTX-M  $\beta$ -lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three parisian hospitals.** FEMS Microbiology Letters, v209, p 161-168, 2002.

SAMUELSSON, G.; BOHLIN, L. **Drugs Of Natural Origin: A Treatise of Pharmacognosy.** 6th ed., Stockholm, Swedish Pharmaceutical Press, 2010.

SAN-MARTÍN, A.; ROVIROSA, J.; BACHO, M.; GAETE, K.; AMPUERO, J. **A New Labdane Diterpene from the limpet *Trimusculus peruvianus*** *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, vol. 11, núm. 6, pg. 520-525, novembro, 2012.

SANT'ANNA, C.M.R. **Métodos de Modelagem Molecular para Estudos e Planejamento de Compostos Bioativos. Uma introdução.** Revista Virtual Química (1), 49-57, Fevereiro de 2009.

SANTOS, A.A.M. **O modelo brasileiro para o controle das infecções hospitalares: após vinte anos de legislação, onde estamos e para onde vamos?** Dissertação, Belo Horizonte, 2006.

SANTOS, C. D. S. M. **Visão e futuro para produção de antibióticos: tendências de pesquisa, desenvolvimento e inovação.** Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências, D.Sc. Rio de Janeiro, 2014.

SANTOS, H.F. **O Conceito Da Modelagem Molecular.** Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola, Num. 4 – maio de 2001.

SANTOS, N. Q. **A Resistência Bacteriana no Contexto da Infecção Hospitalar.** Texto Contexto Enfermagem, 13(n.esp):64-70, 2004.

SANTOS, N. Q. **O uso indiscriminado de antibióticos na ecologia das bactérias-antibiótico-resistentes associadas à problemática da infecção hospitalar: conhecimento e prática de profissionais de saúde, a luz da ética da responsabilidade de Hans Jonas [Tese de Doutorado]**. Florianópolis (SC): Programa de PósGraduação em Enfermagem/ UFSC; 2002.

SERRANO, R.; HERNÁNDEZ, T.; CANALES, M.; GARCÍA-BORES, A. M.; ROMO, A.; Carlos, L. V.; CÉSPEDES, J. G. A. **Ent-labdane type diterpene with antifungal activity from *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less. (Asteraceae)**. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, vol. 8, núm. 5, pg. 412-418, set. 2009.

SILVA, A.N.A.A. **Propriedades Vibracionais no Composto Aurivellius  $\text{Bi}_3\text{Fe}_{0,5}\text{Nb}_{1,5}\text{O}_9$** . Dissertação de Mestrado- UFMA. São Luís do Maranhão, 2012.

SILVA, D. L. **Atividade antifúngica de extratos de plantas medicinais em amostras de *Candida albicans* isoladas de mucosa bucal**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

SILVA, J.S.; SALES, F.; CARNEIRO-TORRES, D.S. **O gênero *croton* (euphorbiaceae) na Microrregião do Vale do Ipanema**, Pernambuco, Brasil. *Rodriguésia*, v. 4: 879-901. 2009.

SILVEIRA, G.P.; NOME, F.; GESSER, J.C.; SÁ, M.M. e TERENCEZI. H. **Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana**. *Química Nova*, v. 29, n. 4, p. 844-855, 2006

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, D. K.; **Spectrometric identification of organic compounds**, 7th Ed., chap.2, New York: Wiley, 2005.

SKOOG, D.A.; HOLLER, J.F.; CROUCH, S.R. **Principios de Análise Instrumental**, 6ª ed., Porto Alegre, (Capítulo 16 e 27), 2009.

SMITH, J. P. & HINSON-SMITH. *Ana. Chem.*, 75, 37A, 2003.

SOUZA, J. S; FERRÃO, M. F. **Aplicações da espectroscopia no infravermelho no controle de qualidade de medicamentos contendo diclofenaco de potássio. Parte I : Dosagem por regressão multivariada**. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. vol. 42, n. 3, jul./set., 2006.

STEFANOVIĆ, O. & COMIC, L. Synergistic antibacterial interaction between *Melissa officinalis* extracts and antibiotics. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2 n. 01, p. 01-05, 2012.

SUÁREZ, A.I.; BLANCO, Z.; COMPAGNONE, R.S.; SALAZAR-BOOKAMAN, M.M.; ZAPATA, V.; ALVARADO, C. **Anti-inflammatory activity of *Croton cuneatus* aqueous extract**. *Journal of ethnopharmacology*, 105: 99-101, 2006.

TANDON J.S.;ROY, R.; BALACHANDRAN, S.; VISHWAKARMA, R.A. **Epi-deoxycoleonol, a new antihypertensive labdane diterpenoid from *Coleus forskohlii***. Bioorg Med Chem Lett 2: 249-254, 1992.

TAPSELL, L. C; HEMPHILL, I; COBIAC, L. **Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future**. Medicine Journal Australe [S.l.: s.n.] 185, 2006.

TEIXEIRA, A. M. R., FREIRE, P. T. C., MORENO, A. J. D., SASAKI, J. M., AYALA, A. P., MENDES F, J., MELO, F. E. A. **Polarizes Raman of L-Valine crystal** In: ICORS 2000 - XVII International Conference on Raman Spectroscopy, 2000.

TEIXEIRA, D. P; MELO, D. S; VASCONCELOS, J. P. C; MORAIS, S. M; COSTA, S. M. O; MENEZES, J. E. S. A; BRAZ-FILHO, R; SANTOS, H. S; **Diterpeno labdano isolado de *Croton jacobinensis***. 34º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2014.

TOMMASINI, M.; CASTIGLIONI, C.; DEL ZOPPO, M.; ZERBI, G. **Relationship between infrared and Raman intensities in molecules with polarized  $\pi$  electrons**. Journal of Molecular Structure, v. 480–481, n. 0, p. 179-188, 5/4/ 1999.

TORTORA, GJ; FUNKE, BR; CASE, CL. **Microbiologia**, 8 ed. Porto Alegre, Artmed, 2008.

TSACHEVA, I.; ROSTAN, J.; IOSSIFOVA, T.; VOGLER, B.; ODJAKOVA, M.; NAVAS, H.; KOSTOVA, I.; KOJOHAROVA, M.; KRAUS, W. **Complement Inhibiting Properties of Dragon's Blood from *Croton draco***. Z. Naturforsch., C: J. Biosci. 59, 528-532, 2004.

TSUCHIYA, H.; SATO, M.; MIYAZAKI, T.; FUJIWARA, S.; TANIGAKI, S.; OHYAMA, M.; TANAKA, T.; JINUMA, M. **Comparative study on the antibacterial Activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. Journal of Ethnopharmacology.50, 27–34, 1996.

TURINA, A.V.; NOLAN, M.V.; ZYGADLO, J.A.; PERILLO, M.A. **Natural terpenes: selfassembly and membrane partitioning**. Biophysical Chemistry, v. 122, p. 101-113, 2006.

VALOTTO,C.F.B; SILVA, H.H.G; CAVASIN,G; GERIS,R; FILHO,E.R; SILVA,I.G. **Alterações ultraestruturais em larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao diterpeno labdano, isolado de *Copaifera reticulata* (leguminosae), e a uma fração rica em taninos de *Margonia pubescens* (sapindaceae)**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 44(2):194-200, 2011.

VEDERNIKOV, Y.P; SYAL, A.S; OKAWA, T; SAADE, G.R; GARFI ELD, R.E. **Adenylate cyclase and potassium channels are involved in forskolin and 1,9-dideoxyforskolin induced inhibition of pregnant rat uterus contractility**. Am J Obstet Gynecol 182: 620-624, 2000.

VERAS, H.N.H. **Caracterização química e avaliação da atividade antimicrobiana e antiinflamatória tópica do óleo essencial de *Lippia sidoides* CHAM. (VERBENACEAE).** Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri- URCA, 2011.

VIEGAS-JÚNIOR, C. **Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos.** Química Nova 26: 390-400, 2003.

ZACCHINO, S. **Estratégias para descoberta de novos antifúngicos.** In: Yunes, R. A; Calixto, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. Chapecó: Argos, p 237- 296, 2001.