



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR

BEATRIZ GONÇALVES CRUZ

**ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL E INVESTIGAÇÃO DE
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO 3 β , 6 β , 16 β -tri-hidroxilup-20(29)-eno**

CRATO - CE

2019

BEATRIZ GONÇALVES CRUZ

**ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL E INVESTIGAÇÃO DE
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO 3 β , 6 β , 16 β -tri-hidroxilup-20(29)-eno**

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-orientadores:

Prof. Dr. Hélcio Silva dos Santos

Prof. Dr. Diniz Maciel de Sena Júnior

CRATO - CE

2019

BEATRIZ GONÇALVES CRUZ

**ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL E INVESTIGAÇÃO DE
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO 3 β , 6 β , 16 β -tri-hidroxilup-20(29)-eno**

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: 31 / 07 / 2019.

RESULTADO: APROVADA

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Paulo Nogueira Bandeira - 1º Membro
Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho - 2º Membro
Universidade Regional do Cariri - URCA

Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa - Suplente
Universidade Regional do Cariri - URCA

Aos meus Pais, José Valdilon T. Cruz e Nilda G. Duarte Cruz

Ao meu avô Odilon Leite da Cruz (In Memoriam)

Ao meu Orientador Alexandre Magno Rodrigues Teixeira

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida e força espiritual, por sempre iluminar meu caminho e dar forças para seguir em frente.

Ao meu Orientador, o professor Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, pela confiança, por todos os ensinamentos e aprendizados que levarei sempre comigo. Pessoa generosa, sempre muito paciente, prestativo e incentivador. Muitíssimo obrigada.

Ao professor Dr. Hécio Silva dos Santos pela co-orientação e concessão da amostra utilizada nesta dissertação.

Ao professor Dr. Diniz Maciel de Sena Junior pela co-orientação e valiosos ensinamentos.

Ao professor Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho, pela colaboração e fornecimento da estrutura necessária para realização da atividade microbiológica.

Aos colegas do Laboratório de Simulações e Espectroscopia Molecular - LaSEMol da Universidade Regional do Cariri - URCA, por todos os momentos de descontração e aprendizagem.

Aos integrantes do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM), da Universidade Regional do Cariri (URCA), pelo auxílio na realização dos testes microbiológicos, amizade e acolhimento.

As minhas grandes amigas, pelas conversas, conselhos, brincadeiras, apoio e incentivo.

Aos meus colegas de mestrado, pela amizade, aprendizagem e momentos de estudo.

A banca examinadora pelas valiosas contribuições para melhoria deste trabalho, que possibilitou e auxiliou a concluir mais esta etapa.

A coordenadora do Programa de Mestrado em Bioprospecção Molecular à professora Dr. Maria Arlene Pessoa da Silva por sanar todas as dúvidas sobre o programa.

As Secretárias Anderciele Rolim e Francisca Brito por toda prestatividade e disposição.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri (URCA) pela valiosa contribuição na minha formação profissional e científica.

A Universidade Regional do Cariri (URCA) pelo espaço cedido durante minha permanência na instituição.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por ter colaborado financeiramente durante todo o desenvolvimento da pesquisa.

Em especial aos meus amores...

Aos meus pais José Valdilon Torquato Cruz e Nilda Gonçalves Duarte Cruz, meus maiores tesouros, principais responsáveis pela pessoa que sou. Grandes incentivadores, nunca mediram esforços para me ajudar e me dar o melhor. Obrigada por tudo, amor incondicional.

A minha irmã e companheira Alice Gonçalves Cruz, por todo apoio, pessoa que posso confiar e dividir os problemas, comemorando comigo cada conquista alcançada. Sou grata por ter-lhe.

Aos meus avós paternos Odilon Leite da Cruz (*in memorian*) e Valdenora Torquato Cruz e avós maternos João Pedro Duarte (*in memorian*) e Beatriz Gonçalves Duarte (*in memorian*). Pelo afeto, valiosos ensinamentos e por serem grandes exemplos de vida.

A Ítalo Gomes, pelo carinho, companheirismo, palavras de incentivo e por todo apoio emocional.

A todos os meus familiares, que sempre me motivaram nunca deixando que os obstáculos fossem maiores que a realização dos meus objetivos.

Enfim, a todos que estiveram presentes nesta etapa de minha vida, seja de forma direta ou indireta de alguma forma contribuíram para concretização deste trabalho, minha sincera gratidão.

*Há uma força motriz mais poderosa que o vapor,
a eletricidade e a energia atômica: a vontade.”*

- Albert Einstein.

RESUMO

O gênero *Combretum* (Combretaceae) possui aproximadamente 255 espécies, das quais 21 têm registros no Brasil, dentre estas, destaca-se o arbusto *Combretum leprosum* Mart. popularmente conhecido como “mufumbo” ou “cipoaba”, comumente encontrado na região Nordeste. Esta espécie é amplamente utilizada na medicina popular e algumas das substâncias isoladas têm se mostrado promissoras no desenvolvimento de fármacos. Neste trabalho, realizamos um estudo por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier por reflectância total atenuada (FTIR-ATR), cálculos teóricos de química quântica baseados na teoria do funcional da densidade (DFT) e uma análise da atividade antimicrobiana e moduladora do triterpeno 3 β , 6 β , 16 β -trihidroxilup-20 (29) - eno (TTHL) isolado das folhas de *C. leprosum*. O espectro de infravermelho foi registrado à temperatura ambiente nas regiões de 600 cm⁻¹ a 4000 cm⁻¹, adicionalmente, cálculos DFT foram realizados, as propriedades estruturais e vibracionais foram atribuídas, permitindo identificar pela primeira vez as principais bandas IR deste produto natural. Os testes microbiológicos foram realizados por ensaio de microdiluição para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do TTHL. Os resultados mostraram evidências de que o triterpeno lupano possui ação antibacteriana significativa com CIM 4 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ contra a bactéria *Staphylococcus aureus*. A atividade antimicrobiana moduladora revelou que este composto pode potencializar o efeito bactericida dos antibióticos gentamicina e amicacina contra as bactérias multirresistentes *S. aureus* 10 e *E. coli* 06. Portanto, podemos inferir que o TTHL pode ser útil para o desenvolvimento de drogas antibacterianas.

Palavras-Chave: Triterpeno lupano; Espectroscopia de Infravermelho; Teste Antibacteriano.

ABSTRACT

The genus *Combretum* (Combretaceae) has approximately 255 species, of which 21 have records in Brazil, among them, stands out the shrub *Combretum leprosum* Mart. popularly known as "mufumbo" or "cipoaba", commonly found in the Northeast region. The species is widely used in folk medicine and some of the isolated compounds have shown promise in the drugs development. In this work, we have carried out a study by attenuated total reflectance Fourier Transform infrared (FTIR-ATR) spectroscopy, theoretical calculations of quantum chemistry based Density Functional Theory (DFT) and an analysis of the antimicrobial activity and modulatory of the triterpene $3\beta,6\beta,16\beta$ -trihydroxylup-20(29)-ene isolated from the leaves *C. leprosum*. The infrared spectra was recorded at room temperature in the regions of 600 cm^{-1} to 4000 cm^{-1} , in addition, DFT calculations were performed, the structural and vibrational properties were assigned, allowing to identify for the first time the main IR bands of this natural product. In antimicrobial activity tests the minimal inhibitory concentration (MIC) of TTHL was determined in a microdilution assay. The results showed evidence that the lupane triterpene has significant antibacterial action with MIC $4\text{ }\mu\text{g/mL}^{-1}$ against strains of *Staphylococcus aureus*. The modulatory antimicrobial activity revealed that this compound may potentiate the bactericidal effect of gentamicin and amikacin antibiotics against multiresistant strains *S. aureus* 10 and *E. coli* 06. Therefore, we can infer that the TTHL can be useful to the development of antibacterial drugs.

Keywords: Lupane triterpene; Infrared Spectroscopy; Antibacterial Test

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Folhas da planta <i>Combretum leprosum</i>	22
Figura 2	Estruturas moleculares dos triterpenos tetracíclicos e pentacíclicos.....	24
Figura 2.1	Estruturas básicas dos três grandes grupos de triterpenos pentacíclicos.....	25
Figura 3	Estrutura molecular do TTHL.....	26
Figura 4	Tipos de vibrações moleculares.....	33
Figura 5	Reflectância total atenuada (ATR).....	40
Figura 6	Microplaca utilizada na determinação da CIM.....	48
Figura 7	Microplaca utilizada para ensaio de modulação.....	49
Figura 8	Estrutura molecular otimizada do triterpeno lupano.....	50
Figura 9	Espectro FT-IR da molécula TTHL.....	52
Figura 10	Gráfico da CIM do aminoglicosídeo gentamicina.....	55
Figura 11	Gráfico da CIM do aminoglicosídeo amicacina.....	55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Transição de energia em cada região do espectro eletromagnético.....	32
Quadro 2	Constantes de força aproximadas para os diferentes tipos de ligações moleculares.....	35
Quadro 3	Regiões espectrais do infravermelho.....	36
Quadro 4	Regiões de absorção que são comuns a vários tipos de ligações.....	38
Quadro 5	Classificação de intensidade das bandas de FT-IR obtidas experimentalmente.....	45
Quadro 6	Perfil de resistência das bactérias aos antibióticos.....	46

LISTA DE TABELA

Tabela 1	Atribuição das frequências experimentais do TTHL por ATR-IR.....	53
-----------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATR	<i>Attenuated total reflectance</i> (Reflectância total atenuada)
BHI	<i>Brain heart infusion broth</i> (Caldo de infusão de cérebro e coração)
B3LYP	Funcional de troca de 3 parâmetros de Becke (B3), funcional de correlação Lee-Yang-Parr (LYP)
DFT	<i>Density functional theory</i> (Teoria do funcional da densidade)
FT-IR	<i>Fourier transform infrared</i> (Infravermelho com transformada de Fourier)
IR	<i>Infrared</i> (Infravermelho)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TTHL	Triterpeno lupano 3 β ,6 β ,16 β -tri-hidroxilup20(29)-eno
ωscal	Posições do número de onda escalado
ω	Frequência
$\bar{\nu}$	Número de onda
λ	Fator de escala
sc	<i>Scissoring</i> (tesoura)
wag	<i>Wagging</i> (balanço)
δ	Deformação angular
γ	Deformação fora do plano
v	Estiramento
v_{as}	Estiramento assimétrico
v_s	Estiramento simétrico
τ	Torção
ρ	Posição espacial
r^{\rightarrow}	Coordenada dos núcleos atômicos
E	Energia total
vs	<i>Very strong</i> (banda com intensidade muito forte)
s	<i>Strong</i> (banda com intensidade forte)
m	<i>Mean</i> (banda com intensidade média)
w	<i>Weak</i> (banda com intensidade fraca)
vw	<i>Very weak</i> (banda com intensidade muito fraca)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE QUADROS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xiii
1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivo Específico.....	19
3 REFERENCIAL TEÓRICO	20
3.1 Plantas Medicinais e a Contribuição da Bioprospecção Molecular: A busca por novos fármacos.....	20
3.2 Considerações sobre o Gênero <i>Combretum</i>	21
3.3 Classe dos Terpenos.....	23
3.3.1 Atividades Biológicas dos Triterpenos.....	24
3.4 Microrganismos e Infecções.....	27
3.5 Antimicrobianos Utilizados para o Tratamento de Infecções.....	28
3.6 Resistência Microbiana.....	29
3.7 Espectroscopia Molecular.....	30
3.8 Vibrações Moleculares.....	32
3.9 Aproximação Harmônica: Vibrações em moléculas diatômicas.....	34
3.10 Espectroscopia no Infravermelho.....	35
3.10.1 Processo de Absorção no Infravermelho.....	35
3.10.2 Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	39
3.11 Reflectância Total Atenuada (ATR).....	39
3.12 Cálculos Computacionais de Primeiros Princípios.....	41
3.12.1 Teoria do Funcional de Densidade (DFT).....	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 Material Vegetal.....	43
4.2 Obtenção do Espectro ATR-IR.....	43

4.2.1	Análise do Espectro de Absorbância IR.....	44
4.3	Atividade Antibacteriana e Moduladora do TTHL.....	46
4.3.1	Preparo das Soluções.....	46
4.3.2	Microrganismos.....	46
4.3.3	Preparo dos Inóculos.....	47
4.3.4	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	47
4.3.5	Atividade Moduladora.....	48
4.3.6	Leitura dos Ensaio: Avaliação da atividade antimicrobiana e moduladora.....	49
4.3.7	Análise de Dados.....	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1	Análise Estrutural do TTHL.....	50
5.2	Análise Vibracional.....	51
5.3	Atividade Antibacteriana.....	54
6	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS	59
	APÊNDICE	72
	Apêndice A - Tabela A1 com a completa atribuição dos modos vibracionais do TTHL...	73
	ANEXO	80
	Anexo A - Artigo do triterpeno 3 β , 6 β , 16 β -trihidroxilup-20 (29) - eno aceito para publicação.....	81

1 INTRODUÇÃO

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, as quais podem ser utilizadas para a síntese de inúmeros fármacos. O crescente uso de terapias naturais pela medicina popular tem ocorrido de forma paralela ao progresso científico e tecnológico, despertando interesse da comunidade científica em estudá-las (SPADACIO et al., 2010).

A validação de novas substâncias vegetais através da pesquisa é o caminho para que se possam fazer o correto aproveitamento das plantas medicinais e seus fitoterápicos (TEÓFILO, 2012). Substâncias naturais têm sido testadas para demonstrar seu potencial antimicrobiano direto, e também como potencial de serem agentes modificadores da ação antibiótica (GIBBONS, 2004; GURIB-FAKIM, 2006).

As estratégias de bioprospecção molecular a partir da biodiversidade torna possível a descoberta de inúmeras substâncias que não venham desenvolver resistência microbiana, como também descobrir novas fórmulas para os mais variados fins (ASTOLFI-FILHO; SILVA; BIGI, 2014).

Antes de uma dada substância começar a ser explorada pela indústria farmacêutica, é fundamental que esta seja caracterizada para identificar suas principais propriedades químicas, físicas, biológicas e, eventualmente, farmacológicas, medicinais, entre outras. Conhecer as propriedades estruturais e espectroscópicas de uma molécula é de grande importância na indústria farmacêutica, visto que é possível, a partir disso: comparar a estrutura das moléculas, criando um índice de similaridade e correlacionar com a atividade farmacológica; modificar a molécula; ampliar a potência e segurança, garantindo assim, um melhor perfil farmacocinético e farmacodinâmico (RODRIGUES, 2001; SANTOS et al., 2007; GIL et al., 2008; GUIMARÃES, 2011).

Apesar de grandes avanços científicos e tecnológicos na indústria farmacêutica, a busca por novas substâncias ainda se faz necessária. A resistência antimicrobiana tornou-se um problema de saúde pública de grandes proporções, afetando todos os países (ROCA et al., 2015; SHARLAND et al., 2015). As bactérias apresentam capacidade genética para adquirir e transmitir resistência contra agentes antibacterianos hoje disponíveis (SAKAGAMI, 2002; ODONKOR, 2011; LEITE, 2014). Além disto, o uso indiscriminado de antibióticos é um

problema crescente e preocupante que pode aumentar o desenvolvimento de mecanismos de resistência de microrganismos (SHARLAND et al., 2015).

A bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* representa o agente etiológico mais comum para infecções purulentas (SANTOS et al., 2007). Seguida das bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* que é uma das principais causas de doenças infecciosas humanas, especialmente do trato urinário e a *Pseudomonas aeruginosa* responsável por uma variedade de infecções, principalmente pulmonares (ROWE et al., 2005).

Para o combate à disseminação de bactérias patogênicas resistentes a antibióticos, foram utilizadas combinações múltiplas de drogas com diferentes associações antibióticas testadas *in vitro* e aplicadas em clínicas; é o caso da combinação de penicilina com a gentamicina (STARLING; BISCOTTO, 2001). Essa combinação vem sendo utilizada também entre antibióticos e produtos naturais de origem vegetal que vão alterar a ação dos antibióticos, seja aumentando a atividade antibiótica ou revertendo à resistência (COUTINHO et al., 2008).

Diversos compostos químicos de origem sintética ou natural, além de apresentarem atividade antibacteriana direta, elevam a atividade de antibióticos específicos, revertendo à resistência de algumas cepas bacterianas a alguns antibióticos, sendo identificados como agentes modificadores da ação antibiótica (MOLNAR et al., 2004; WOLFART et al., 2006).

Dentre a grande diversidade de plantas medicinais destaca-se a espécie *Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae), popularmente conhecida no Brasil como “mufumbo” ou “cipoaba”, comumente encontrada na região Nordeste, entre os estados do Piauí e da Bahia (LIRA et al., 2002). Estudos etnofarmacológicos indicam que esta planta é amplamente utilizada como agente expectorante (AGRA et al., 2008; LORENZI; MATOS, 2008; NUNES et al., 2009), anti-inflamatória (HORINOUCI et al., 2013), analgésica e antiulcerogênica (NASCIMENTO-NETO et al., 2015). Diferentes partes desta planta, como caules, folhas e flores também são usadas como agente de cura para prevenir erupções cutâneas e para limpar feridas (NASCIMENTO-NETO et al., 2015).

Os terpenóides apresentam grandes propriedades biológicas, com ações anti-inflamatórias, antibacterianas, fungicidas, antivirais, analgésicas, cardiovasculares e antitumorais (SUSUNAGA, 1996; OTUKI et al., 2001; PATROČKA, 2003). Estruturas químicas baseadas em terpenóides também têm sido descritas como moléculas que possuem atividades antimicrobianas (REN et al., 2005; RAJA et al., 2011). Estudos envolvendo a

investigação da atividade biológica de triterpenos isolados de espécies de *C. leprosum* mostraram suas valiosas atividades farmacológicas (FACUNDO et al., 2005; PIETROVSKI et al., 2006; MEDEIROS et al., 2007; NASCIMENTO-NETO et al., 2015).

Trabalhos realizados com o triterpeno da classe dos lupanos mostraram atividade antileishmanial (TELES et al., 2011; LIMA et al., 2011; TELES et al., 2015), anti-inflamatória (LACOUTH-SILVA et al., 2015; HORINOUCI et al., 2017) apresentando citotoxicidade moderada (LACOUTH-SILVA et al., 2015) e testes de LC₅₀ mostraram atividade antibiofilme contra cepas Gram positivas de *Streptococcus mutans* e *S. mitis*, incluindo seus biofilmes associados (EVARISTO et al., 2014). Devido à sua diversidade, o estudo desde composto isolado tem despertado grande interesse na tentativa de novas e reais aplicabilidades.

Apesar desses trabalhos sobre atividades biológicas do triterpeno 3 β , 6 β , 16 β -trihidroxilup-20 (29)-eno (TTHL), trata-se de um terpenóide pouco relatado na literatura. Não há relatos da influência deste composto como modulador da atividade de antimicrobianos e antibióticos, também não há publicação com a identificação das propriedades vibracionais e estruturais, utilizando-se espectroscopia. Diante disto, neste trabalho foi realizado um estudo de espectroscopia infravermelha e avaliação da atividade antimicrobiana e moduladora do TTHL isolado da espécie *C. leprosum*. Assim, pretende-se contribuir com o desenvolvimento científico, buscando substâncias alternativas para a terapêutica contra agentes antimicrobianos resistentes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar as propriedades vibracionais do triterpeno 3β , 6β , 16β -tri-hidroxilup-20 (29)-eno isolado das folhas do *Combretum leprosum*, utilizando a técnica de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier por reflectância total atenuada (FTIR-ATR), cálculos teóricos de química quântica e verificar sua atividade antibacteriana e potencializadora frente a diferentes linhagens bacteriológicas.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar medidas de caracterização por técnica de espectroscopia de infravermelho (IR) no triterpeno lupano TTHL;
- Fazer cálculos computacionais de química quântica, usando a Teoria do Funcional da Densidade - DFT para otimização da geometria da molécula e obtenção dos modos normais de vibração;
- Comparar as frequências experimentais obtidas por espectroscopia IR com aquelas obtidas pelos cálculos computacionais e classificar os modos de vibração da molécula com base na visualização dos estiramentos e deformações angulares;
- Verificar a atividade antibacteriana do TTHL frente às bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, determinando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do composto;
- Avaliar o efeito exercido pela substância como potencializadora da atividade dos aminoglicosídeos gentamicina e amicacina, frente às linhagens bacterianas multirresistentes.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Plantas Medicinais e a Contribuição da Bioprospecção Molecular: A busca por novos fármacos

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos remotos como importante ferramenta nos procedimentos das terapias naturais (MACHADO; JUNIOR, 2011). Seu uso como recurso terapêutico está embasado em estudos etnofarmacológicos que, contribuem para a descoberta de princípios bioativos podendo ser validados cientificamente e utilizados como forma alternativa à medicina convencional (OLIVEIRA; MENINI NETO, 2012).

O isolamento, purificação e caracterização de compostos bioativos oriundos do metabolismo secundário, como extratos e constituintes químicos isolados que possuem utilizações farmacológicas, têm impulsionado as pesquisas com plantas medicinais (MACIEL et al., 2002; NEWMAN; CRAGG, 2012). Os metabólitos secundários além de apresentarem diversas aplicações, tem grande importância ecológica para as plantas, principalmente no desenvolvimento de defesas químicas, também podem agir em alvos celulares funcionando no tratamento de doenças humanas (FERREIRA; PINTO, 2010; VERMA; SHUKLA, 2015), o que configura uma importante fonte de substâncias utilizadas na prospecção de novos medicamentos (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Estudos científicos que testam extratos, óleos essenciais e substâncias isoladas de diversas plantas têm sido essenciais para conhecer suas propriedades antimicrobianas, e a capacidade destas substâncias orgânicas de possuírem atividade antibiótica e moduladora frente a diferentes linhagens multirresistentes, demonstrando um efeito sinérgico ou antagônico (ANGÉLICO, 2011). A associação do produto natural com antibiótico contribui para diminuir a toxicidade dos medicamentos convencionais, pois a quantidade do fármaco será menor ao associá-lo a substância isolada da planta medicinal, diminuindo assim, a toxicidade dos antibióticos (FIGUEREDO et al., 2013).

O processo de exploração e desenvolvimento de fármacos é complexo, longo e de alto custo, estando profundamente conectados às inovações científicas e tecnológicas (GUIDO et al., 2008). Diante disto, destacam-se os procedimentos de bioprospecção e biotecnologia que

permitem descobrir novas substâncias e, destas, desenvolver novos bioprodutos que agregarão mais valor à biodiversidade.

A descoberta de novas moléculas fazendo aplicação de procedimentos de bioprospecção e biotecnologia tem avançado muito no desenvolvimento de novos fármacos (ASTOLFI- FILHO; SILVA; BIGI, 2014). O desenvolvimento de novas tecnologias e métodos de seleção de princípios ativos em moléculas naturais permite que a bioprospecção seja cada vez mais eficiente e competitiva, quando comparada a processos puramente sintéticos de criação de drogas (PATERSON; ANDERSON, 2005).

A bioprospecção consiste na busca e investigação de recursos provenientes da fauna e da flora, a fim de identificar princípios ativos para a obtenção de novos produtos e processos que sejam úteis para toda a humanidade. Surge como uma importante ferramenta que permite o acesso a novas possibilidades de uso medicinal da natureza (KHAFAGI; DEWEDAR, 2000; SHELLEY, 2009).

Estratégias de bioprospecção molecular a partir da biodiversidade tornam possível a descoberta de inúmeras substâncias que não venham provocar resistência, como também produzir novas fórmulas para os mais variados fins, como: novos fármacos; fitoterápicos e cosméticos; corantes e aromatizantes naturais; novos procedimentos de controle biológico de pragas e doenças; desenvolvimento de novas fontes de alimentação; novos biomateriais como plásticos biodegradáveis, sedas e diferentes tipos de fibras (ASTOLFI-FILHO; SILVA; BIGI, 2014).

Sendo, assim, o entendimento, isolamento, identificação e elucidação estrutural dos princípios ativos de uma planta medicinal um passo indispensável na compreensão do seu mecanismo de ação (HOSTETTMANN et al., 2003; CRAGG; NEWMAN, 2013).

3.2 Considerações sobre o Gênero *Combretum*

A família Combretaceae consiste de 14 gêneros, dos quais o maior é o gênero *Combretum* possuindo aproximadamente 255 espécies com distribuição nas regiões tropicais e subtropicais da África, América e Ásia (STACE, 2010). Das 29 espécies ocorrentes nas Américas, 21 tem registros no Brasil (STACE, 2010; MARQUETE, 2012) e nove no Ceará. Geralmente são utilizadas as folhas e raízes, sendo que os frutos são evitados por sua aparente toxicidade em humanos (MCGAW et al., 2001; FYHRQUIST, 2007).

Trabalhos envolvendo espécies do gênero *Combretum* têm evidenciado propriedades antimicrobianas, citotóxicas e antiproliferativas referentes a seus extratos e também aos compostos isolados (ANGEH et al., 2007; OJEWOLE, 2008). Estudos realizados por Angeh e colaboradores (2007) demonstraram que triterpenos isolados do extrato das folhas de *C. imberbe* apresentaram forte atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*; atividade anti-inflamatória ao inibirem a enzima 3 α -hidroxiesteróide desidrogenase e ainda, uma moderada atividade antiproliferativa e citotóxica contra células das linhagens K-562, L-929 e HeLa.

Em meio a diversas espécies desse gênero destaca-se o *C. leprosum* Mart. (Combretaceae), um arbusto ou pequena árvore conhecida popularmente pelos nomes de “mufumbo” ou “cipoaba” (Figura 1), encontrada nos estados do Norte e Nordeste brasileiros e também no Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, com grande potencial farmacológico (PIETROVSKI et al., 2006; CHAVES et al., 2007).

FIGURA 1. Folhas da planta *Combretum leprosum*.



Fonte: LOIOLA, 2014.

Na medicina popular os extratos de diferentes partes dessa espécie como caules, folhas e flores são utilizadas como agente de cura, para prevenir erupções cutâneas e para limpar feridas, função cicatrizante, contenção de hemorragias (PIETROVSKI et al., 2006;

NASCIMENTO-NETO et al., 2015), agente expectorante (AGRA et al., 2008; LORENZI; MATOS, 2008), ação analgésica (MEDEIROS et al. 2003), propriedades antimicrobiana (LIMAE et al., 2011; VARISTO et al., 2014), anti-inflamatória (HORINOUCI et al., 2013) e anti-ulcerogênicas (NUNES et. al., 2009; NASCIMENTO-NETO et al., 2015).

Trabalhos realizados por Facundo e colaboradores (1993; 2005) conseguiram isolar das folhas e raízes de *C. leprosum*, o ácido arjunólico, ácido mólico, ácidos graxos, o triterpeno 3 β , 6 β , 16 β -tri-hidroxilup-20 (29)-eno (TTHL), flavonóides glicosilados 3-O-metilquercetina e quercetina. Análises do extrato etanólico das folhas demonstraram que os monossacarídeos são os principais componentes (80%), seguidos dos triterpenos (10%), entre eles o ácido arjunólico e o TTHL (triterpenos pentacíclicos), além de apresentar 5% de oligossacarídeos e 3% de ácidos graxos.

3.3 Classe dos Terpenos

A grande variedade de metabólitos secundários, com base na via biossintética, é classificada em três grupos principais: terpenos (ou isoprenóides), compostos nitrogenados (alcalóides, glucosinolatos e glicosídeos cianogênicos) e compostos fenólicos (fenilpropanóides, flavonoides e taninos) (VIZZOTTO et al., 2010; FANG et al., 2011).

Os terpenos são biossintetizados por seres procariontes e eucariontes, possuem uma ocorrência generalizada na natureza e a maioria dos compostos bioativos tem sido encontrada em plantas superiores (MUFFLER et al., 2011). Sua aplicabilidade, a nível comercial, distribui-se por áreas diversas como corantes, perfumes, colas, ceras, polímeros, agroquímicos e fármacos.

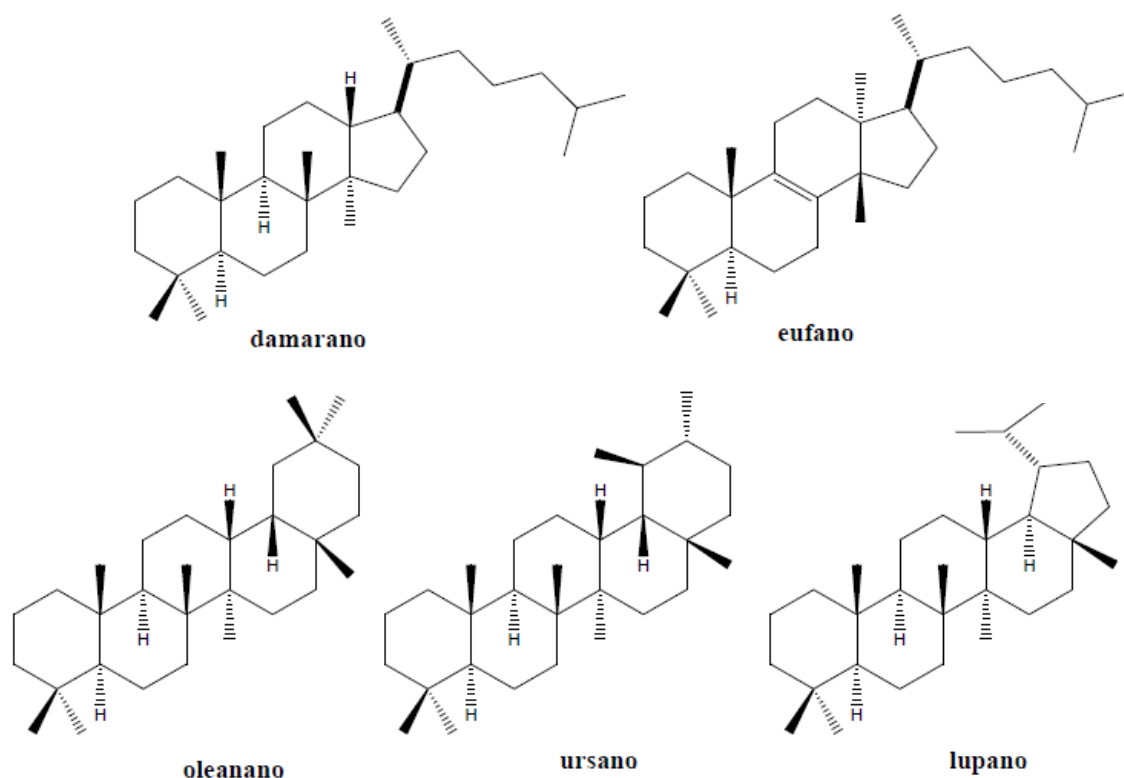
Os terpenóides são o grupo mais complexo e diversificado dos metabólitos secundários, sendo a diversidade tão grande que vários compostos não tiveram suas atividades elucidadas (DEWICK, 2009; FELIU, 2011). Estruturalmente constituídos por unidades de isopreno (C₅H₈) que se unem formando cadeias maiores, formam uma família de compostos orgânicos, de estrutura muito diversa (BAKKALI et al., 2008). Podem ser classificados em monoterpenos (2 unidades isopreno, 10 carbonos), sesquiterpenos (3 unidades, 10 carbonos), diterpenos (4 unidades, 20 carbonos), triterpenos (6 unidades, 30 carbonos), carotenoides (8 unidades, 40 carbonos) e esteroides, que são sintetizados a partir do triterpeno (DEWICK, 2009).

A forma final do esqueleto carbônico de cada terpeno dependerá da conformação adotada pela cadeia isoprenóide, sendo que a sua maioria apresenta forma cíclica com estruturas mono-, bi-, tri-, tetra- e penta-cíclicas (MUFFLER et al., 2011), obtidas por ciclizações sucessivas.

3.3.1 Atividades Biológicas dos Triterpenos

Os triterpenos são compostos muito difundidos na natureza, principalmente no reino vegetal e pertencem à classe dos terpenóides, suas moléculas são constituídas por pelo menos trinta átomos de carbono (seis unidades isopreno). Na perspectiva da sua atividade biológica, considera-se que as estruturas triterpênicas mais importantes são aquelas que possuem os esqueletos de carbono do damarano e eufano (triterpenos tetracíclicos) e do oleanano, ursano e lupano (triterpenos pentacíclicos) (PATROČKA, 2003; DZUBAK et al., 2006) (Figura 2).

FIGURA 2. Estruturas moleculares dos triterpenos tetracíclicos e pentacíclicos.

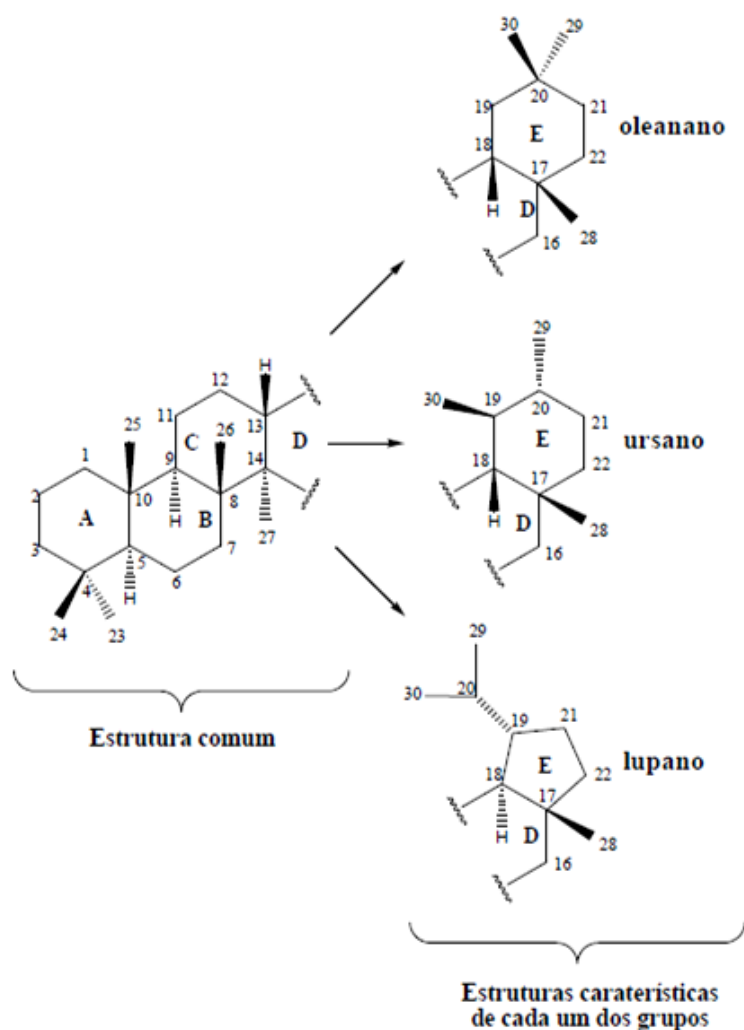


Os triterpenos podem ser encontrados na forma livre ou de derivados oxigenados, glicosilados (triterpenos saponinas) e esterificados pela hidroxila. Os triterpenos pentacíclicos

apresentam várias potencialidades medicinais, com ampla faixa de atividades biológicas incluindo propriedades anti-inflamatória, antibacterianos, fungicidas, antivirais, analgésicos e cardiovasculares (SUSUNAGA, 1996; OTUKI et al., 2001; PATROČKA, 2003).

Os triterpenos pentacíclicos, estruturas com trinta átomos de carbono e cinco anéis, (Figura 2.1) podem ser divididos em três grandes grupos: oleananos (β -amirin), ursanos (α -amirin) e lupanos. Os dois primeiros (oleananos e ursanos) apresentam cinco anéis hexagonais, com uma estereoquímica dos anéis D/E *cis*, diferenciando-se, entre si, apenas, na posição dos seus grupos metilo: nos oleananos situam-se os dois em C-20, enquanto nos ursanos um metilo encontra-se, também, em C-20 mas o outro está em C-19. Os lupanos, por outro lado, possuem uma estereoquímica *trans* dos anéis D/E, além de que o quinto anel é pentagonal (SIMÕES et al., 2007).

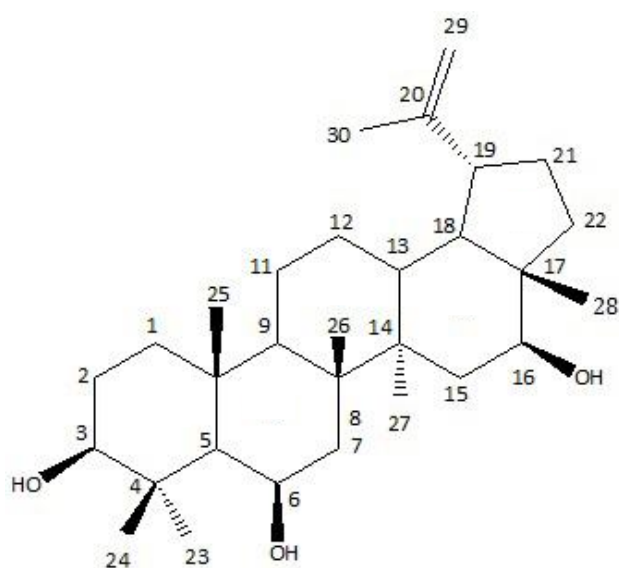
FIGURA 2.1. Estruturas básicas dos três grandes grupos de triterpenos pentacíclicos.



Alguns estudos mostraram que o ácido maslínico, um triterpeno pentacíclico natural tem capacidade anti-câncer em diferentes tipos de células, incluindo melanoma (PARRA et al., 2011), câncer de fígado (LIN et al., 2011) astrocitoma (MARTIN et al., 2007) e câncer de cólon (REYES et al., 2006). O ácido maslínico possui potente propriedade de diferenciação e antiproliferação, induzindo a parada do ciclo celular na fase G0 / G1 e apoptose em células de câncer de cólon sem afetar células não tumorais (REYES et al., 2006).

O triterpeno 3 β , 6 β , 16 β -tri-hidroxilup-20 (29)-eno (TTHL) foi isolado pela primeira vez de extratos etanólicos das folhas e raízes de *C. leprosum* e identificado como um triterpeno da classe dos lupanos (FACUNDO et al., 1993), mostrado na Figura 3. Estudos indicam que este composto apresenta efeito antinociceptivo e anti-inflamatório significativo em um modelo de camundongo de nocicepção induzida por glutamato e ácido acético, se apresentando útil para o tratamento de diversas doenças associadas com inflamação e dor (PIETROVSKI et al., 2006; LONGHI-BALBINOT et al., 2012). Mostra-se eficaz como modelo terapêutico para o tratamento de feridas cutâneas, pois melhora a formação de novos vasos sanguíneos, estruturando a matriz extracelular e forma de migração de queratinócitos, causando o fechamento efetivo da lesão (NASCIMENTO-NETO et al., 2015).

FIGURA 3. Estrutura molecular do TTHL.



Estudos realizados por Viau e colaboradores (2014) demonstram atividade antitumoral *in vitro* do TTHL em células humanas MCF-7 (adenocarcinoma da mama), que ao formar

adutos covalentes com macromoléculas celulares, interrompe potencialmente a função celular e desencadeia a apoptose, podendo ser eficaz na terapia do câncer de mama. Este composto também foi considerado um agente antimicrobiano através do teste LC₅₀ (concentração letal 50%), mostrando atividade antibiofilme para cepas Gram positivas de *Streptococcus mutans* e *S. mitis* inibindo sua biomassa e incluindo seus biofilmes associados, o mesmo teste não apresentou atividade para bactérias Gram negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella oxytoca* (EVARISTO et al., 2014). No Trabalho de Lima e colaboradores (2011) utilizando o método de difusão em Disco, não obtiveram formação de halo para *P. aeruginosa* e *Candida albicans*; halo inferior ou igual ao diluente (Etanol, 95%) para *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*; halo superior ao diluente para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, estes dados revelam que o triterpeno lupano fornece parcialmente ou não ação antibactericida.

Apesar de alguns estudos realizados com o composto triterpeno lupano (PIETROVSKI et al., 2006; LIMA et al., 2011; LONGHI-BALBINOT et al., 2012; EVARISTO et al., 2014; VIAU et al., 2014; NASCIMENTO-NETO et al., 2015), trata-se de um terpenóide pouco relatado na literatura não havendo estudos detalhados sobre suas propriedades espectroscópicas e vibracionais, bem como a avaliação da atividade antimicrobiana moduladora de drogas, além da atividade farmacológica.

3.4 Microrganismos e Infecções

As doenças infecciosas representam a principal causa de morbimortalidade entre humanos, com um índice considerável em países em desenvolvimento (CARVALHO et al., 2008). As bactérias que mais provocam mortes no mundo são *S. aureus* meticilina-resistente (MRSA), *S. aureus* vancomicina-resistente (VRSA), *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*. Os processos infecciosos causados por esses microrganismos geralmente estão associados com alta letalidade e altos custos de tratamento (ROCHA et al., 2011).

A bactéria *Staphylococcus aureus*, esférica e do grupo dos cocos Gram-positivos, é comumente o agente etiológico que causa infecções purulentas em diversos tecidos e órgãos, podendo provocar desde uma simples infecção até infecções graves (pneumonia, meningite, endocardite, miocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia e outras) (SANTOS et al., 2007; COUTINHO et al., 2010).

Escherichia coli possui formato bacilar, é aeróbia e anaeróbia facultativa, pertence ao grupo de bactérias Gram-negativas e produz enterotoxinas que podem estar envolvidas nas doenças diarreicas (MURRAY, 2004; MATIAS et al., 2011). Apesar de ser uma bactéria que está presente na microbiota normal do trato intrainestinal dos animais (incluindo o homem), linhagens patogênicas de *E. coli* têm sido evidenciadas como causa primária de infecções no trato urinário, meningite neonatal, e enterites em seres humanos. (SCHNEIDER et al., 2009).

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa e ubíqua ambiental, tem preferência por locais úmidos, sendo o trato gastrointestinal sua principal área de colonização (FERREIRA, 2010). Nos seres humanos é responsável pelas infecções crônicas pulmonares (ROWE et al., 2005), está entre as principais bactérias causadoras de infecções hospitalares (BONOMO; SZABO, 2006). Estudos indicam que a *P. aeruginosa* vem tendo redução da susceptibilidade aos antimicrobianos (RAJA, SINGH, 2007), de maior espectro de ação como os carbapenêmicos e as cefalosporinas antipseudomonas (NICOLETTI et al., 2006). Vale salientar que entre as mutações que provocam o aumento da resistência, está a produção de enzimas beta-lactamases e metallo-beta-lactamases (SADER et al., 2005).

3.5 Antimicrobianos Utilizados para o Tratamento de Infecções

Os antibióticos de fonte natural e seus derivados semi-sintéticos envolvem a maioria dos antibióticos em uso clínico e podem ser classificados em β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas, oxapeninas e monobactamas), tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, peptídeos cíclicos (glicopeptídeos, lipodepsipeptídeos), estreptograminas, entre outros (lincosamidas, cloranfenicol, rifamicinas, entre outros). Os antibióticos de origem sintética são denominados sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas (PATRICK, 2005; PUPO et al., 2006).

Os aminoglicosídeos possuem efeito, principalmente, sobre bactérias aeróbias do grupo bacilos Gram-negativas e sobre bactérias do grupo cocos Gram-positivas. A ação do aminoglicosídeo ocorre principalmente na inibição da síntese proteica em que as moléculas do antibiótico se ligam a subunidade 30S do ribossomo bacteriano, impedindo a tradução e ocasionando a morte celular (KOTRA et al., 2000). Outros efeitos no metabolismo da bactéria que podem ser considerados como efeitos secundários do antibiótico são: danos na membrana celular (alterando a composição e permeabilidade da membrana), alteração das concentrações

iônicas celulares e modificações na síntese do DNA e RNA (FOURMY et al., 1996).

Os aminoglicosídeos podem ser utilizados como agentes profiláticos e como agente antimicrobiano para o tratamento de diversas enfermidades. A gentamicina e amicacina são utilizadas para o tratamento das mesmas doenças (meningite, pneumonia e sepse), já a neomicina é utilizada em queimaduras, feridas, úlceras e dermatites (RYBAK; WHITWORTH, 2005). A gentamicina é escolhida, na maioria das vezes, por causa de seu baixo custo e por ser eficaz na inibição de bactérias aeróbias Gram negativas (ROUGIER et al., 2005). Já a amicacina é eficiente, quando aplicada em bactérias que são resistentes a outros aminoglicosídeos, pois a sua estrutura química é menos suscetível a inativação pelas enzimas bacterianas (TAVARES, 2001).

Os antibióticos são uma classe de medicamento essencial, sem eles haveria diminuição drástica na expectativa de vida conquistada ao longo de décadas. Porém a eficiência dos antibióticos está ameaçada (SANTOS FILHO et al., 2002; ZANOL et al., 2010; NEVES et al., 2011), há um aumento exorbitante de casos, não apenas de resistência a um fármaco, mas a muitos deles.

Diante dessa realidade, o uso combinado de múltiplas drogas está sendo considerado altamente eficiente no combate à disseminação de bactérias patogênicas resistentes a antibióticos. Os compostos que potencializam a atividade de uma droga ou que reverterem a resistência ao antibiótico são classificados como modificadores da atividade da droga ou moduladores (COUTINHO et al., 2010; MATIAS et al., 2011). Quando esses produtos naturais têm sua ação de forma positiva potencializando a atividade do antibiótico, desencadeia um efeito considerado sinérgico. Já o efeito antagônico ocorre quando há uma diminuição ou inativação da ação dos antibióticos frente ao produto natural (CANTON, ONOFRE, 2010).

3.6 Resistência Microbiana

O uso indiscriminado de antibióticos provoca, além da seleção de cepas de bactérias resistentes, maior incidência de efeitos colaterais (SANTOS, 2004). Esse acontecimento tem levado mais rapidamente pacientes hospitalizados a óbito, além de elevar significativamente os custos com relação ao tratamento da infecção (COUTINHO et al., 2009; MATIAS et al., 2010).

Os mecanismos de resistência adquiridos pelas bactérias podem ser intrínsecos ou adquiridos por transmissão de material genético ou mutação. A resistência natural é uma particularidade intrínseca de um microrganismo, que acontece sem uma exposição anterior ao antibiótico. Já a resistência adquirida com uso de antibióticos é observada principalmente através de quatro mecanismos: a alteração da permeabilidade, a alteração do local de ação, a bomba de efluxo e o mecanismo enzimático que altera a estrutura química do antibiótico (BONOMO, et al.; 2006).

No Brasil, a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 44/2010, que controla a venda de antibióticos, tende a contribuir tanto para a diminuição do consumo irracional desses medicamentos quanto para a redução da resistência bacteriana (BRITO; CORDEIRO, 2012). As infecções provocam 25% das mortes no mundo e 45% nos países menos desenvolvidos, o que, em parte, deve estar refletindo a inadequação das prescrições de antibióticos (NICOLINI et al., 2013).

Existem avanços empolgantes nos estudos da relação função-estrutura para a maioria das moléculas bacterianas que possuem papel de relevante importância na doença infecciosa. A reunião de técnicas moleculares, mutagênese, análise de epítomos e cristalografia por Raios X tem dado oportunidade de novas abordagens sobre a atribuição de certas moléculas na virulência (GOMES, 2013).

Vários compostos químicos, sintéticos ou semi-sintéticos e produtos naturais, estão sendo estudados por causa de suas propriedades antimicrobianas. A utilização de extratos de plantas e fitoquímicos com propriedades antifúngicas e antibacterianas tem apresentado grande importância para o tratamento terapêutico (FONTENELLE et al., 2007; MATIAS et al., 2011; MORAIS-BRAGA et al., 2013).

3.7 Espectroscopia Molecular

A espectroscopia é responsável por estudar a interação da radiação eletromagnética com a matéria, tendo como objetivo determinar a configuração dos diferentes níveis de energia (eletrônica, vibracional e rotacional) de átomos ou moléculas. Trata-se de uma técnica avaliativa altamente qualificada, permite obter informações sobre a estrutura molecular e condições de interações das ligações de hidrogênio presentes nos cristais de aminoácidos (TEIXEIRA et al., 2000).

A região espectral onde as transições moleculares são observadas depende do tipo de níveis envolvidos, podemos considerar que a energia de uma molécula é formada por componentes distintos associados com: o movimento dos elétrons na molécula, com as vibrações dos átomos constituintes e com as rotações da molécula como um todo (SALA, 2008).

Pode ser representado pela equação 1:

$$E_{\text{Total}} = E_{\text{Eletrônica}} + E_{\text{Vibracional}} + E_{\text{Rotacional}} \quad (1)$$

Nas transições eletrônicas praticamente não há mudança da posição dos núcleos da molécula, este tipo de transição é caracterizado pela passagem de um elétron de um estado de menor energia para um de maior energia, após a absorção da radiação. Nos outros tipos de transições ocorre a mudança da posição relativa dos átomos na molécula, nas vibracionais os núcleos dos átomos mudam de posição constantemente devido a mudanças nas distâncias de ligação ou nos ângulos de ligação; nas rotacionais os átomos da molécula mudam de posição devido a rotações sobre eixos definidos (centro de gravidade) e nas translacionais ocorre devido a movimentos de translação da molécula como um todo (OLIVEIRA, 2001).

Dentre as várias técnicas espectroscópicas utilizadas, destacam-se a espectroscopia na região do Infravermelho (IR), espalhamento Raman, Ultravioleta-Visível (UV-VIS), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas (EM) como os principais recursos para identificação e elucidação estrutural de substâncias orgânicas. Estas são importantes para determinação da pureza e quantificação de substâncias orgânicas, como no controle e acompanhamento de reações e processos de separação. A espectroscopia na região do infravermelho tem sido também, amplamente utilizada em linhas de produção, no controle de processos industriais (LOPES; FASCIO, 2004).

O resumo das regiões do espectro eletromagnético e dos tipos de interações e transições energéticas observadas em cada faixa espectral é mostrada a seguir no Quadro 1. Muitas das regiões, incluindo o infravermelho, fornecem informações fundamentais sobre as estruturas de moléculas (orgânicas ou inorgânicas).

QUADRO 1. Transição de energia em cada região do espectro eletromagnético.

Região do Espectro	Transições de Energia
Raios X	Quebra de ligações
Ultravioleta/Visível	Eletrônica/ Vibracional
Infravermelha	Vibracional
Micro-ondas	Rotacional
Ondas de Rádio/RMN	Spin eletrônico/ Spin nuclear

Fonte: PAVIA et al., 2010.

A interação da radiação eletromagnética com o movimento vibracional dos núcleos originam os espectros vibracionais no Infravermelho e no Raman, uma técnica analítica rápida, seletiva, sensível, de simples operação e baixo custo. Apresenta elevada velocidade analítica, possibilidades de uso em sistemas de controle *on-line* e constitui um método não destrutivo e não poluente, podendo ser utilizada em rotinas de análises químicas (RIBEIRO, 2012).

Os efeitos físicos envolvidos nas duas técnicas são distintos, assim os modos vibracionais ativos também serão diferentes, alguns modos normais da molécula podem aparecer somente no Infravermelho ou somente no Raman. Portanto, estas técnicas são consideradas complementares e para obter uma análise completa da estrutura vibracional de um sistema químico pode ser necessário avaliar os dois espectros (OLIVEIRA, 2001; SKOOG et al., 2002).

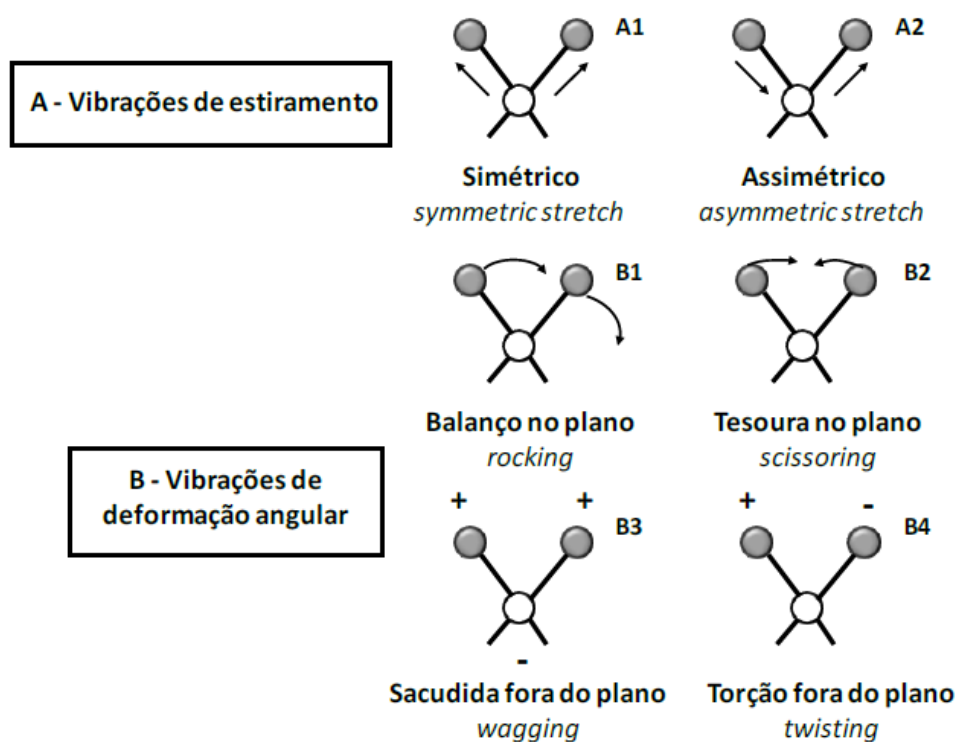
3.8 Vibrações Moleculares

Sob influência da radiação eletromagnética, os átomos podem movimentar-se nas três direções dos eixos cartesianos (x, y e z). A quantidade e a qualidade de movimentos efetuados pelos átomos que compõem a molécula são definidas, como graus de liberdade. Uma molécula com N átomos pode movimentar-se em três direções, o que implica em 3N modos distintos de movimentos, associados aos três tipos possíveis de transições. Os movimentos vibracionais são calculados pelo total de graus de liberdade (3N), menos a quantidade de movimentos translacionais e rotacionais presentes na molécula.

Quando uma molécula é linear os átomos estão dispostos sobre um dos eixos do sistema de coordenadas, havendo três (3) modos translacionais e apenas dois (2) movimentos rotacionais, pois não pode haver rotação sobre o eixo em que a molécula está definida, assim, uma molécula linear terá $3N - 5$ vibrações moleculares. Tratando-se de uma molécula não linear, ocorrerão todos os modos vibracionais, três (3) modos translacionais e (3) movimentos rotacionais, portanto, o número de modos vibracionais é definido por $3N - 6$ (SKOOG et al., 2002).

As vibrações moleculares podem ser classificadas de duas maneiras: vibração de deformação axial ou estiramento (*stretching*) e vibração de deformação angular ou dobramento (*bending*). As vibrações de estiramento são caracterizadas por uma variação contínua entre a distância interatômica ao longo do eixo da ligação e dois átomos, já as deformações angulares são caracterizadas pela variação do ângulo entre duas ligações (SKOOG et al., 2002; PAVIA, 2010). A representação das vibrações moleculares é mostrada na Figura 4.

FIGURA 4. Tipos de Vibrações Moleculares. A - vibrações de estiramento (A1 – estiramento simétrico, A2 – estiramento assimétrico); B - vibrações de deformação angular (B1 - scissoring/tesoura, B2 - rocking/balanço, B3 - wagging/sacudida, B4 - twisting/torção).



Nota: (+) indica movimento para fora da página e (-) indica movimento para dentro da página.

Fonte: adaptado de SKOOG et al. 2002; PAVIA et al. 2010.

Os estiramentos são classificados em: simétricos (v_s) e assimétricos (v_{as}); as vibrações de deformação angular podem ser de quatro tipos: simétrica no plano (*rocking* - r , balanço ou oscilação), assimétrica no plano (*scissoring* - sc , tesoura), simétrica fora do plano (*wagging* - wag , sacudida em fase) e assimétrica fora do plano (*twisting* - τ , torção fora de fase).

3.9 Aproximação Harmônica: Vibrações em Moléculas Diatômicas

O modelo do oscilador harmônico é uma aproximação muito utilizada para compreender a ciência da espectroscopia vibracional (LARKIN, 2011). O modelo mais simples para o estudo das vibrações de uma molécula é o de massas pontuais m_1 e m_2 (correspondentes aos núcleos atômicos) conectadas por uma mola de massa desprezível (correspondendo à ligação atômica).

A frequência vibracional clássica de uma molécula diatômica é mostrada na equação 2:

$$\bar{\nu} = \frac{1}{2c} \sqrt{k \left(\frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_2} \right)} = \frac{1}{2c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (2)$$

Onde μ é a massa reduzida do sistema, dada por:

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$$

Dependendo da frequência os átomos se deslocam em direções opostas e com amplitudes inversamente proporcionais a suas massas ($A_1/A_2 = -m_2/m_1$), executando movimento vibracional. Esta expressão foi derivada a partir da Lei de Hooke para sistema massa-mola em vibração. A constante de força k (dada em dinas/cm) varia de uma ligação para outra (SALA, 2008). O Quadro 2 apresenta valores aproximados das constantes de força k para cada tipo de ligação.

QUADRO 2. Constantes de força aproximadas para os diferentes tipos de ligações moleculares.

Tipos de Ligação	<i>k</i> (milidinas/ Ångström)
Simple	3-6
Dupla	10-12
Tripla	15-18

Fonte: SALA, 2008.

As ligações mais fortes apresentam constante de força k maior e vibram em frequências mais altas do que ligações mais fracas envolvendo as mesmas massas. As ligações entre átomos de massas maiores (massas reduzidas menores) vibram em frequências mais baixas do que ligações entre átomos mais leves envolvendo o mesmo tipo de ligação (PAVIA et al., 2010).

3.10 Espectroscopia no Infravermelho

A espectroscopia no infravermelho evidencia modos vibracionais característicos da presença de vários grupos funcionais na estrutura orgânica através da interação das moléculas com a radiação eletromagnética em um processo de vibração molecular.

3.10.1 Processo de Absorção no Infravermelho

A radiação infravermelha corresponde à parte do espectro eletromagnético entre as regiões do visível e das micro-ondas (BRUICE, 2006). Como a radiação infravermelha não dispõe de energia suficiente para produzir transições eletrônicas, para uma molécula absorver este tipo de radiação, ela deve sofrer uma variação no seu momento de dipolo durante o movimento rotacional ou vibracional. Somente sob estas circunstâncias o campo elétrico alternado da radiação pode interagir com a molécula e causar variações no momento de dipolo (SKOOG et al., 2009).

O momento de dipolo é determinado pela magnitude da diferença de carga e pela distância entre dois centros de carga. Somente nestas circunstâncias o campo elétrico alternado da radiação pode interagir com a molécula e causar variações na amplitude de um de seus movimentos. Para moléculas diatômicas homonucleares, tais como O_2 , N_2 ou Cl_2

nenhuma variação efetiva no momento de dipolo é observada durante a vibração ou rotação, impedindo que estas moléculas absorvam radiação no infravermelho (SKOOG et al., 2002; HOLLER et al., 2009).

O número teórico de vibrações fundamentais esperados para uma molécula linear ($3N - 5$) ou não linear ($3N - 6$), nem sempre corresponde à quantidade de bandas observadas no espectro, pois alguns modos terão momento de dipolo, ou sua variação, igual a zero (OLIVEIRA, 2001). Segundo Skoog e colaboradores (2002) existem quatro fatores que ocasionam uma visualização experimental de um número menor de bandas (modos normais de vibração) do que o teoricamente esperado:

- A simetria da molécula é muito alta que não ocorre variação no dipolo a partir de uma vibração particular;
- As energias de duas ou mais vibrações são idênticas ou semelhantes (degenerescência);
- A intensidade de absorção é tão baixa que não é detectada pelo espectrômetro;
- A energia vibracional está em uma região de comprimento de onda além da faixa do instrumento.

Absorções de fótons no Infravermelho (IR) correspondem a alterações de energia da ordem de 8 a 40 kJ/mol (PAVIA et al., 2010). Sua região espectral abrange uma radiação com número de onda de 12.800 a 10 cm^{-1} , ou com comprimentos de onda de 780 a $1,0 \times 10^6$ nm, comumente dividida de acordo com as aplicações de instrumentação em três regiões: radiação no Infravermelho próximo, médio e distante (SKOOG et al., 2002; LIMA, BAKKER, 2011). A radiação para cada região espectral de classificação do IR está descritas no Quadro 3.

QUADRO 3. Regiões espectrais do Infravermelho.

Região Espectral	Número de Onda (cm^{-1})	Comprimento de Onda (nm)	Frequência (Hz)
Próximo (NIR)	12.800 - 4.000	780 - 2.500	$3,8 \times 10^{14}$ - $1,2 \times 10^{14}$
Médio (MID)	4.000 - 200	2.500 - 50.000	$1,2 \times 10^{14}$ - $6,0 \times 10^{12}$
Distante (FAR)	200 - 10	50.000 - 1.000.000	$6,0 \times 10^{12}$ - $3,0 \times 10^{11}$

O número de onda é uma grandeza física inversamente proporcional ao comprimento de onda. Em se tratando de radiação eletromagnética, o número de onda é proporcional à frequência e à energia do fóton, ou seja, um número de onda maior corresponde a maior energia. Por esse motivo, os números de onda são usados como unidade de energia na espectroscopia. No Sistema Internacional de Unidades, o número de onda é dado em cm^{-1} (PAVIA et al., 2010).

Parâmetros como o comprimento de onda (λ), a frequência (ν) e o número de onda ($\bar{\nu}$) são essenciais em espectroscopia vibracional e relacionam-se pela equação 3:

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{(c/n)}, \quad (3)$$

Onde c representa a velocidade da luz e n o índice de refração do meio (LARKIN, 2011).

Considerando o caráter corpuscular da radiação e o processo de quantização, ondas eletromagnéticas são compostas por fótons com energia dada por:

$$E = h\nu = hc\bar{\nu},$$

Onde h é a constante de Plank.

A radiação na faixa de frequências do infravermelho médio (4000 cm^{-1} a 200 cm^{-1}) compreende uma faixa de energia que engloba frequências vibracionais de estiramento e dobramento das ligações, na maioria dos compostos mais covalentes. Esta faixa pode ser subdividida em duas regiões, a região de estiramento de 3600 a 1200 cm^{-1} , correspondente a bandas de absorção da maioria dos grupos funcionais e a região de impressão digital (*fingerprint region*) de 1200 a 600 cm^{-1} , que é característica de cada substância apresentando um espectro característico que na espectroscopia IR pode ser de transmitância ou absorbância (SKOOG et al., 2002).

Na espectroscopia, transmitância é a fração da luz incidente com um comprimento de onda específico (λ), que atravessa uma amostra de matéria, consiste na passagem inalterada de radiação pela matéria. É um fenômeno relacionado diretamente à absorbância, pois Quando a absorbância de uma solução aumenta, a transmitância diminui. Absorbância é definida como:

$$A_{\lambda} = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right),$$

Onde I é intensidade da luz com um comprimento de onda específico que passa por uma amostra (intensidade da luz transmitida) e I_0 intensidade da luz antes que entre na amostra (intensidade da luz incidente) (VOET et al., 2014).

Cada molécula possui suas próprias frequências naturais de vibração, quando ocorre a ressonância entre a frequência da radiação infravermelha incidente e as frequências naturais de vibração do material, as moléculas absorvem ondas eletromagnéticas e geram um espectro de absorção característico (LEITE; PRADO, 2012).

Mesmo que as frequências absorvidas sejam exatamente as mesmas, quando comparamos dois espectros vibracionais, jamais os padrões de absorção de duas moléculas diferentes serão idênticos. Assim, o espectro IR pode servir para moléculas da mesma forma que impressões digitais servem para seres humanos. Porém, se os espectros coincidirem pico a pico (absorção a absorção), na maioria das vezes as duas substâncias serão idênticas (PAVIA et al., 2010).

As absorções de cada tipo de ligação (também chamados de grupos funcionais) são, em geral, encontradas em certas regiões do infravermelho vibracional (LARKIN, 2011). O Quadro 4 ilustra esquematicamente como as ligações estão distribuídas no infravermelho vibracional.

QUADRO 4. Regiões aproximadas de absorção que são comuns a vários tipos de ligações.

Tipos de Vibrações	Região do IR (cm⁻¹)
Estiramento C - H	2800-3300
Estiramento O - H	3100-3800
Estiramento C \equiv C, C \equiv N	2100-2500
Estiramento C = O	1600-1800
Estiramento C = C	1600-1700
Deformação angular C - H	1300-1500, 500-900
Deformação angular O - H	1200-1600
Estiramento C - O	900-1300
Estiramento C - C	800-1150

Fonte: LARKIN, 2011.

Uma pequena faixa de absorção pode ser definida para cada tipo de ligação, visto que, as vibrações desses grupos funcionais são, em geral, independentes do resto da molécula. Fora dessa faixa as absorções acontecem decorrentes de algum outro tipo de ligação.

3.10.2 Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

A técnica de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR: *Fourier Transform Infrared*) permite a aquisição de centenas de espectros de infravermelho em apenas alguns minutos. Os espectros isolados são combinados no computador, originando um espectro no qual os ruídos de fundo do equipamento podem ser bastante reduzidos, produzindo, portanto, um espectro limpo.

Os instrumentos interferométricos no Infravermelho com Transformada de Fourier são também caracterizados por resoluções maiores ($<0,1 \text{ cm}^{-1}$), determinações de frequências altamente exatas e reproduzíveis, fornecem um transporte de energia muito maior (uma ou duas ordens de magnitude) que os instrumentos dispersivos (SKOOG et al., 2009). Esse instrumento emprega o interferômetro de Michelson de dois feixes e explora o processo matemático da Transformada de Fourier.

No FT-IR a radiação emitida pela fonte depois de colimada por um espelho, é introduzida em um interferômetro e separada em dois feixes pelo divisor de feixes. Um dos feixes percorre uma distância fixa e o outro, uma distância variável (espelho móvel). No divisor de feixe, os dois raios são combinados opticamente, podendo gerar uma interferência construtiva (se estiverem em fase) ou destrutiva (se estiverem fora de fase), gerando um interferograma. Quando este feixe combinado de luz atravessa a amostra, é absorvido seletivamente e, dependendo das absorções apresentadas pela amostra, gera um novo interferograma. Este interferograma é tratado por meio de um processo matemático, denominado Transformada de Fourier, originando um espectro no infravermelho que pode ser tanto de transmitância quanto de absorbância (WARTEWIG et al., 2005).

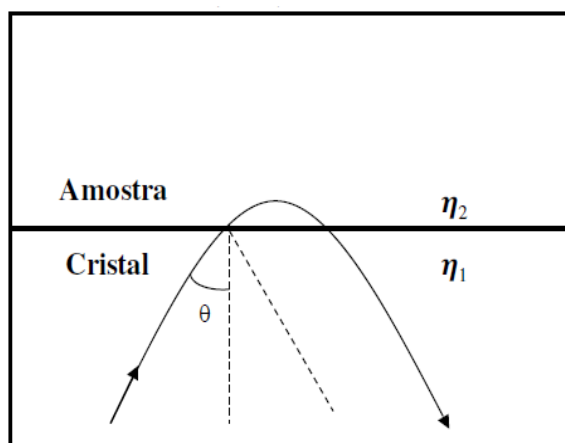
3.11 Reflectância Total Atenuada (ATR)

Uma das maiores vantagens da espectroscopia de Infravermelho do tipo Reflectância Total Atenuada com Transformada de Fourier (FTIR-ATR: *Fourier Transform Infrared*

Attenuated Total Reflectance) é ser um método não destrutivo que requer um mínimo preparo da amostra, facilitando e agilizando a obtenção dos espectros. Esse método também é escolhido quando a amostra possui limitações na manipulação, pois abrange uma ampla variedade de tipos de amostra. Podem-se analisar substâncias que são pouco solúveis, linhas, fios, tecidos, pós, pastas, filmes de polímeros e fibras, alimentos, borrachas, adesivos entre outros, pressionando-se a amostra contra um cristal denso. Soluções aquosas também podem ser analisadas, desde que o cristal utilizado no equipamento não seja solúvel em água (SKOOG et al., 2002; HOLLER et al., 2009).

A técnica de FTIR-ATR em espectroscopia é caracterizada pela reflexão que ocorre quando um feixe de radiação passa de um meio mais denso para um meio menos denso. Embora ocorra completa reflexão interna na interface cristal/amostra, a radiação penetra uma pequena distância dentro da amostra. Esta penetração chama-se onda evanescente. A amostra interage com a onda evanescente, resultando na absorção da radiação pela amostra, que corresponde ao espectro de transmissão dessa mesma amostra, conforme representação esquemática mostrada na Figura 5 (WARTEWIG et al., 2005; HOLLER et al., 2009).

FIGURA 5. Reflectância Total Atenuada (ATR).



Fonte: WARTEWIG et al., 2005.

A obtenção do espectro depende de diversos parâmetros, incluindo ângulo de incidência da radiação na amostra, comprimento de onda da radiação, índices de refração da amostra e do cristal do equipamento (cristais de ZnSe, BaF₂, CaF₂, KBr, KCl). A profundidade da

penetração efetiva (d_p) depende do comprimento de onda do feixe, dos índices de refração do cristal e da amostra, e do ângulo do feixe (WARTEWIG et al., 2005).

3.12 Cálculos Computacionais de Primeiros Princípios

O método de cálculos de primeiros princípios (*ab initio*) é um dos mais utilizados para fazer a identificação dos modos normais de vibração, descrevendo a natureza quântica dos elétrons. Para efetuar estes cálculos é necessário saber apenas os números atômicos e as posições dos átomos dentro do sistema.

Os cálculos de mecânica quântica não são exatos, pois são feitas algumas aproximações baseadas em dados empíricos (CARVALHO et al., 2003). Na mecânica quântica emprega-se a equação de Schrödinger para calcular as propriedades físicas de átomos e moléculas, a partir das interações entre os seus elétrons e núcleos (BARREIRO et al., 1997).

Uma aproximação utilizada para solucionar a equação de Schrödinger é a de Born-Oppenheimer. Nesta aproximação o movimento dos elétrons é considerado mais rápido e independente do núcleo, uma vez que os elétrons giram em torno do núcleo, é possível descrever o movimento eletrônico separado do movimento nuclear. A superfície de Born-Oppenheimer, conhecida como superfície de energia potencial, é caracterizada como multidimensional e descreve a energia de uma molécula em termos das posições nucleares (TOSTES, 1998; COELHO et al., 1999; CARVALHO et al., 2003).

Os cálculos *ab initio* fornecem a partir da solução da equação de Schrödinger (sob determinadas considerações), dos valores das constantes fundamentais, e do número atômico, vários resultados sobre o estado molecular, tais como: determinação da estrutura eletrônica, otimização geométrica, superfícies de energia potencial, dados de frequência vibracional, entre outros.

3.12.1 Teoria do Funcional de Densidade (DFT)

A Teoria do Funcional de Densidade (DFT - *Density Functional Theory*) foi desenvolvida nos anos 1960, por Walter Kohn, Pierre Hohenberg e Lu Sham (HOHENBERG; KOHN, 1964; KOHN; SHAM, 1965). Este método é bastante útil no estudo

de uma ampla variedade de materiais, tais como moléculas grandes, descrevendo-se realisticamente sistemas orgânicos, inorgânicos, metálicos e semicondutores (MORGON; CUSTODIO, 1995). Através da técnica DFT podem-se analisar as ligações químicas, calcular parâmetros geométricos e energia de ionização, afinidades eletrônicas, modos normais de vibração, a polarizabilidade e espectros de absorção e emissão de uma variedade de sistemas moleculares.

O método DFT tornou-se o método de cálculos teóricos de química quântica mais usado nos últimos anos. Ele surgiu como uma alternativa para os métodos tradicionais (*ab initio* e semi-empíricos) no estudo de propriedades do estado fundamental de sistemas moleculares. Walter Kohn, Pierre Hohenberg e Lu Sham (HOHENBERG; KOHN, 1964; KOHN; SHAM, 1965) reformularam a mecânica quântica, baseada na função de onda quântica de um sistema e apresentaram o modelo da densidade eletrônica, baseado na equação de Kohn-Sham, equação 4.

$$v_{ks}[\rho](r^{\vec{)}} = v_{ext}(r^{\vec{)}} + v_{Hartree}[\rho](r^{\vec{)}} + v_{xc}[\rho](r^{\vec{}}) \quad (4)$$

Onde:

$v_{ks}[\rho](r^{\vec{}})$ = potencial de Kohn-Sham

$v_{ext}(r^{\vec{}})$ = potencial externo

$v_{Hartree}[\rho](r^{\vec{}})$ = potencial de Hartree

$v_{xc}[\rho](r^{\vec{}})$ = potencial de troca e correlação

A metodologia DFT simplifica a resolução da equação de Schrödinger para sistemas complexos com uma precisão notável. Este método é empregado em programas de computador como Gaussian, Gamess, Vasp, Abinit e Pwscf. Sendo que, o programa Gaussian é o mais utilizado para realizar estes cálculos computacionais (MARQUES; BOTTI, 2006).

O funcional de troca-correlação B3LYP é o mais utilizado no método DFT. Este é um funcional híbrido que utiliza três parâmetros empíricos para compor o funcional (B3), no qual está incluso o funcional de correlação desenvolvido por Lee, Yang e Parr (LEE; YANG; PARR, 1988; PARR; YANG, 1989; BECKE, 1993; MARQUES; BOTTI, 2006).

Através das funções de base são construídos os orbitais moleculares e feita à predição da energia de ligação na molécula, para simplificar a matemática usada no algoritmo do programa, são utilizadas funções Gaussianas. A notação da base 6-31G, representada por cada orbital interno, é uma combinação de seis Gaussianas primitivas, com expansão ou contração dos orbitais atômicos, sem polarização e por uma combinação de 3 + 1 orbitais

atômicos de valência. As funções de polarização são fundamentais para a correção dos ângulos de ligação, as quais são descritas por uma letra entre parênteses ou por asteriscos. Por exemplo: 6-31G (d, p) ou 6-31G**, indica o uso da base 6-31G, com a inclusão de funções do tipo (p) no hidrogênio e funções do tipo (d) nos demais átomos (GUIMARÃES, 2011; ZHÃO; TRUHLAR, 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

A coleta da planta *Combretum leprosum*, bem como a extração e isolamento do triterpeno 3 β ,6 β ,16 β -tri-hidroxilup-20(29)-eno (TTHL) foram realizados pelo Prof. Dr. Hécio Silva dos Santos, da Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA), em Sobral-CE, Brasil. A determinação da estrutura molecular foi elucidada pelo Prof. Raimundo Braz-Filho da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro- UENF, utilizando Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^1H e ^{13}C), espectrometria de massa e comparação com os dados do Banco de Dados Estrutural de Cambridge (*Cambridge Structural Database - CSD*).

4.1 Material Vegetal

Amostras das folhas frescas de *C. leprosum* foram coletadas em agosto de 2013 em Salgado dos Machados, Sobral, Ceará, Brasil (3° 46'00.1 "S 40° 20'08.0" W). O material botânico foi devidamente identificado pelo Dr. Elnatan Bezerra de Souza (taxonomista de plantas da Universidade Estadual do Vale do Acaraú), cuja exsicata sob número #4573, encontra-se depositada no Herbário Francisco José de Abreu Mattos da Universidade Estadual do Vale do Acaraú (Sobral, Brasil).

4.2 Obtenção do Espectro ATR-IR

A caracterização do composto TTHL, utilizando a técnica de espectroscopia no infravermelho, foi realizada no Laboratório de Simulações e Espectroscopia Molecular (LaSEMol) da Universidade Regional do Cariri (URCA), Crato-CE, Brasil.

O espectro de absorvância por ATR-IR foi registrado à temperatura ambiente em um espectrômetro Cary 660 FT-IR, com uma resolução espectral de 4 cm^{-1} e realizando 64 varreduras na faixa de número de onda de 4000 a 600 cm^{-1} .

4.2.1 Análise do Espectro de Absorvância IR

A análise vibracional do espectro de absorvância de ATR-IR do triterpeno lupano foi feita usando cálculos computacionais de primeira princípios, realizado pelo método da teoria do funcional de densidade (DFT) no pacote de programas Gaussian 09 (FRISCH et al., 2009). A estrutura do TTHL utilizada como arquivo de entrada para o Gaussian foi desenhada no programa a partir dos dados obtidos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Para a realização dos cálculos computacionais, utilizou-se um híbrido B3LYP (funcional de correlação Lee-Yang-Parr) e o conjunto com a série de base 6-31 G (d, p) (LEE et al., 1988; PARR; YANG, 1989; BECKE et al., 1993).

Após a realização dos cálculos no Gaussian, é gerado um arquivo de saída que contém a estrutura otimizada e as frequências vibracionais da molécula TTHL. Os parâmetros geométricos foram verificados com o programa Chemcraft 1.6 que permite analisar os comprimentos, ângulos e diedros das ligações entre os átomos, e as atribuições dos tipos de modos vibracionais.

Os números de onda obtidos teoricamente (calculados pelo método DFT) foram ajustados às bandas experimentais de FT-Raman por um fator de escala (λ) apropriado, obtido por meio do procedimento de ajuste dos mínimos quadrados, que consiste em minimizar os resíduos de acordo com a equação 5 (SCOTT; RADOM, 1996):

$$\Delta = \sum_1^N (\lambda \omega_i^{\text{teórico}} - \omega_i^{\text{exp}})^2 \quad (5)$$

Onde i são os i -ésimos números de onda (em cm^{-1}), sendo $\omega_i^{\text{teórico}}$ o número de onda calculado, ω_i^{exp} o experimental e o N corresponde ao número de modos vibracionais que possui correspondência entre os números de onda calculados e os experimentais.

Após o ajuste entre os números de onda calculados e os experimentais, realiza-se o cálculo dos resíduos minimizados para cada modo de acordo com a equação 6.

$$\Delta_{\min} = (\lambda \omega_i^{\text{teórico}} - \omega_i^{\text{exp}})^2 \quad (6)$$

Em seguida calcula-se o erro quadrático total (rms_{tot}) que é obtido pela equação 7.

$$\text{rms}_{\text{tot}} = \sqrt{\frac{\sum_1^N \Delta_{\min}}{N}} \quad (7)$$

O cálculo do erro é feito pelo reajuste da combinação dos números de onda calculados e experimentais, repetidamente, até que o erro seja mínimo. Após a obtenção do fator de escala correspondente ao menor erro, é feita a classificação das vibrações moleculares e da intensidade quanto a força das bandas Infravermelho.

Para descrever as atribuições das vibrações moleculares das bandas infravermelho, utilizaram-se as seguintes categorias: estiramento (ν); estiramento simétrico (ν_s); estiramento assimétrico (ν_{as}); deformação angular (δ); deformações do tipo: sacudida (*wag - wagging*); tesoura (*sc - scissoring*); balanço (*r - rocking*); torção (τ - *twisting*).

A classificação da intensidade das bandas FT-IR foram: muito forte (ν_s), forte (s), média (m), fraca (w) e muito fraca (ν_w) feitas por meio de um teste lógico no programa Excel, seu intervalo de classificação é mostrado no Quadro 5.

QUADRO 5. Intensidade das bandas de FT-IR ($\omega_{\text{FT-IR}}$) obtidas experimentalmente.

Intensidade	Amplitude Normalizada (x)
Muito Forte (ν_s)	$50 < x \leq 100$
Forte (s)	$30 < x \leq 50$
Média (m)	$20 < x \leq 30$
Fraco (w)	$15 < x \leq 20$
Muito fraco (ν_w)	$x \leq 15$

Fonte: Autora.

4.3 Atividade Antibacteriana e Moduladora do TTHL

Os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da Universidade Regional do Cariri (URCA), Crato-CE, Brasil.

4.3.1 Preparo das Soluções

No preparo da solução inicial a amostra do triterpeno $3\beta,6\beta,16\beta$ -tri-hidroxilup-20(29)-eno (TTHL) foi solubilizada em Dimetilsulfóxido (DMSO- Merck, Darmstadt, Alemanha), sendo observadas as seguintes proporções: 10mg da amostra solubilizada em 1 mL de DMSO, para obter uma concentração inicial de 10mg/mL^{-1} . Em seguida, esta solução foi diluída em água destilada até chegar a concentração de $1024\mu\text{g/mL}^{-1}$ e a partir desta, efetuou-se diluições seriadas 1:2 obtendo-se as concentrações de 512 a $0,5\mu\text{g/mL}^{-1}$.

4.3.2 Microrganismos

Os microrganismos utilizados nos testes são provenientes da “*American Type Culture Collection*” (ATCC) obtidas por meio do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde. Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foram utilizadas as cepas bacterianas Gram-positiva: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; e Gram-negativas: *Escherichia coli* ATCC 10536 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. Para avaliar o efeito do triterpeno lupano como modificador da atividade dos antibióticos foram utilizadas as cepas bacterianas multirresistentes: *S. aureus* 10, *E. coli* 06 e *P. aeruginosa* 03. O perfil das linhagens multirresistentes de bactérias está descrito no Quadro 6.

QUADRO 6. Perfil de resistência das bactérias aos antibióticos.

BACTÉRIA	FONTE	PERFIL DE RESISTÊNCIA
<i>S. aureus</i> 10	Ferida Cirúrgica	Oxa.; Gen.; Tob.; Ami.; Can.; Neo.; Para.; But.; Sis.; Net.
<i>E. coli</i> 06	Ferida Cirúrgica	Ast.; Ax.; Ami.; Amox.; Ca.; Cfc.; Cf.; Caz.; Cip.; Chlo.; Im.; Kan.; Szt.; Tet.; Tob.
<i>P. aeruginosa</i> 03	Cultura de urina	Cpm.; Ctz.; Im.; Cip.; Ptz.; Lev.; Mer.; Ami.

Fonte: adaptado de MORAIS-BRAGA et al., 2013.

Ast: aztreonam; Ax: amoxicilina; Amp: ampicilina; Ami: amicacina; Amox: amoxicilina; Ca: cefadroxil; Cfc: cefaclor; Cf: cefalotina; Caz: ceftazidima; Cip: ciprofloxacina; Chlo: chloranphenicol; Im: imipenem; Kan: canamicina; Szt: sulfametrim; Tet: tetraciclina; Tob: tobramicina; Oxa: oxacilina; Gen: gentamicina; Neo: neomicina; Para: paramomicina; But: butirosina; Sis: sisomicina; Net: netilmicina; Com: Cefepime; Ctz: ceftazidima; Ptz: piperacilina-tazobactam; Lev: levofloxacina; Mer: meropenem.

Antes do ensaio, as linhagens bacterianas foram cultivadas por 24h a 35 ± 2 °C em Ágar infusão de coração (*Heart Infusion Agar* - HIA), os meios de cultura foram preparados segundo as especificações do fabricante.

4.3.3 Preparo dos Inóculos

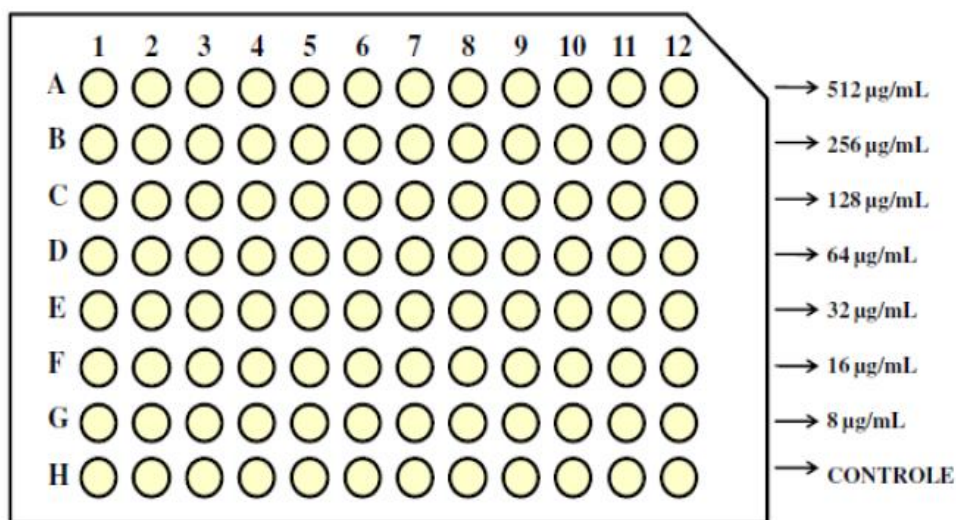
Uma alíquota dos microrganismos cultivados em HIA foram retirados com alça de Drigalski da cultura estoque e transferidos para tubos de ensaio contendo cada um 3 mL de solução salina estéril (0,9%). Usando a escala McFarland, a concentração do inóculo foi padronizada comparando-se sua turbidez com o padrão de 0,5 concentração final de 10^5 UFC/mL⁻¹ (unidades formadoras de colônia/mL) (NCCLS, 2000).

4.3.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para a determinação da CIM do triterpeno lupano foi realizado um ensaio de microdiluição em microplacas contendo 96 poços de fundo redondo de acordo com a Norma M7-A6 (CLSI, 2003). Foram Retirados 100 µL da suspensão do inóculo (10^5 UFC-mL⁻¹) e adicionado em 900 µL de caldo de cérebro de infusão e coração (*Brain Heart Infusion broth* BHI 10%, proporção 1:10).

A solução contendo as cepas bacterianas e o meio BHI foi distribuída no sentido numérico das placas, em cada poço adicionou 100 µL dessa solução. Em seguida, 100 µL do composto TTHL foi adicionado no primeiro poço, seguido de diluições seriadas (1:1) até o penúltimo poço da microplaca, obtendo-se as concentrações de 512, 256, 128, 64, 32, 16 e 8 µg/mL⁻¹ do composto (Figura 6). O último poço da microplaca é constituído apenas pelo inóculo e o meio BHI 10%, representando o controle para verificação da viabilidade das cepas. Após o procedimento experimental, as placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h.

FIGURA 6: Microplaca utilizada para determinação CIM do TTHL e controle de crescimento. Bactérias utilizadas: *E. coli* (Ec), *P. aeruginosa* (Pa) e *S. aureus* (Sa).



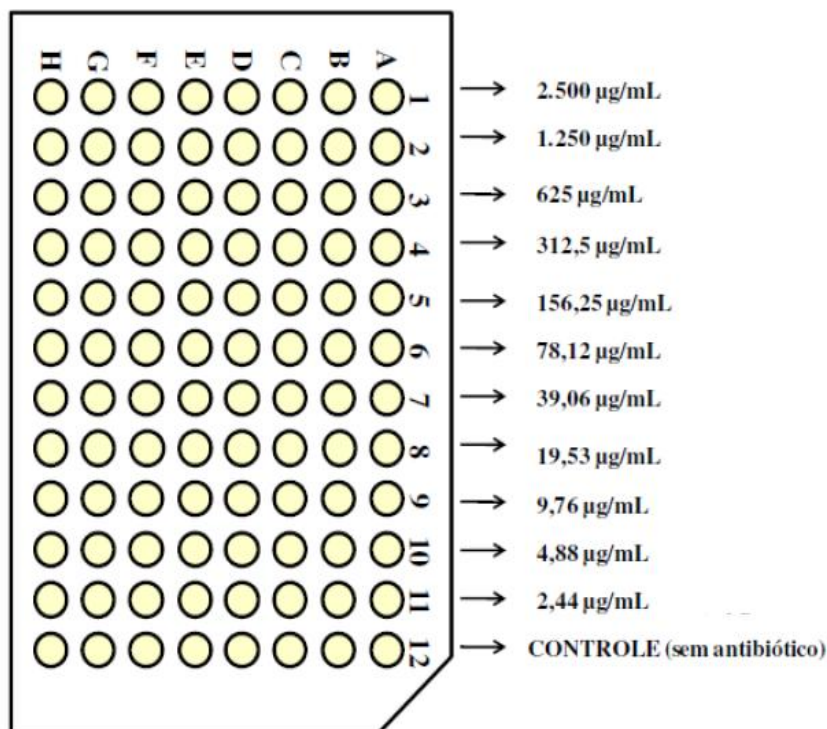
Fonte: autora, baseado em JAVADPOUR et al., 1996.

4.3.5 Atividade Moduladora

Na realização do teste que avalia o efeito da substância como modulador da atividade dos antibióticos foram utilizados os aminoglicosídeos gentamicina e ampicilina obtidos da Sigma-USA, com concentração de $5.000 \mu\text{g/mL}^{-1}$. A modulação foi realizada através de um ensaio de microdiluição em microplacas com 96 poços (COUTINHO et al., 2008). Com a obtenção da CIM, esse valor foi reduzido 8 vezes (CIM/8), resultando na concentração subinibitória do composto para ser utilizado no ensaio de modulação.

Em cada poço adicionou-se $100 \mu\text{L}$ de uma solução contendo: $150 \mu\text{L}$ do inóculo (10^5 UFC-mL^{-1}), o composto na concentração subinibitória de $0,5 \mu\text{g/mL}^{-1}$ (4/8) para a bactéria *S. aureus*, $128 \mu\text{g/mL}^{-1}$ (1024/8) para *E. coli* e *P. aeruginosa* e o meio BHI 10%. Em seguida, $100 \mu\text{L}$ do antibiótico foram adicionados no primeiro poço e realizaram-se diluições seriadas (1:1) até o penúltimo poço da microplaca. As concentrações dos antibióticos foram 2.500; 1.250; 625; 312,50; 156,25; 78,12; 39,06; 19,53; 9,76; 4,88; 2,44 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ (Figura 7). O último poço da microplaca não continha antibiótico, a fim de se verificar a viabilidade das cepas. No grupo controle não será adicionado o composto, apenas o inóculo, o meio BHI 10 % e o antibiótico. Depois do teste, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h.

FIGURA 7. Microplaca utilizada para ensaio de modulação do TTHL (antibióticos gentamicina e amicacina) e controle de crescimento. Bactérias utilizadas: *S. aureus* 10, *E. coli* 06 e *P. aeruginosa* 03.



Fonte: autora, baseado em COUTINHO et al. 2008.

4.3.6 Leitura dos Ensaios: Avaliação da atividade antimicrobiana e moduladora

Tanto para os ensaios da CIM como da modulação, a avaliação do crescimento microbiano foi realizado de forma similar. Para determinar se houve crescimento bacteriano realizou uma análise colorimétrica utilizando o corante resazurina 0,01% (p/v). Após o período de 24h de incubação, foi adicionado 20µL de resazurina em cada poço da microplaca, e após 1 h a 35°C realizou-se a leitura. A alteração na cor de azul para rosa indica que houve crescimento bacteriano e explica-se devido à redução da resazurina, já a permanência da coloração azul, indica ausência de crescimento (PALOMINO et al., 2002). A CIM será determinada pela menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento bacteriano.

4.3.7 Análise de dados

Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em média geométrica. Para análise estatística foi aplicado o One-way ANOVA tendo como teste post-

hoc o teste de Tukey, feito no programa GraphPadPrism 5.0, considerando significância com $p < 0,05$.

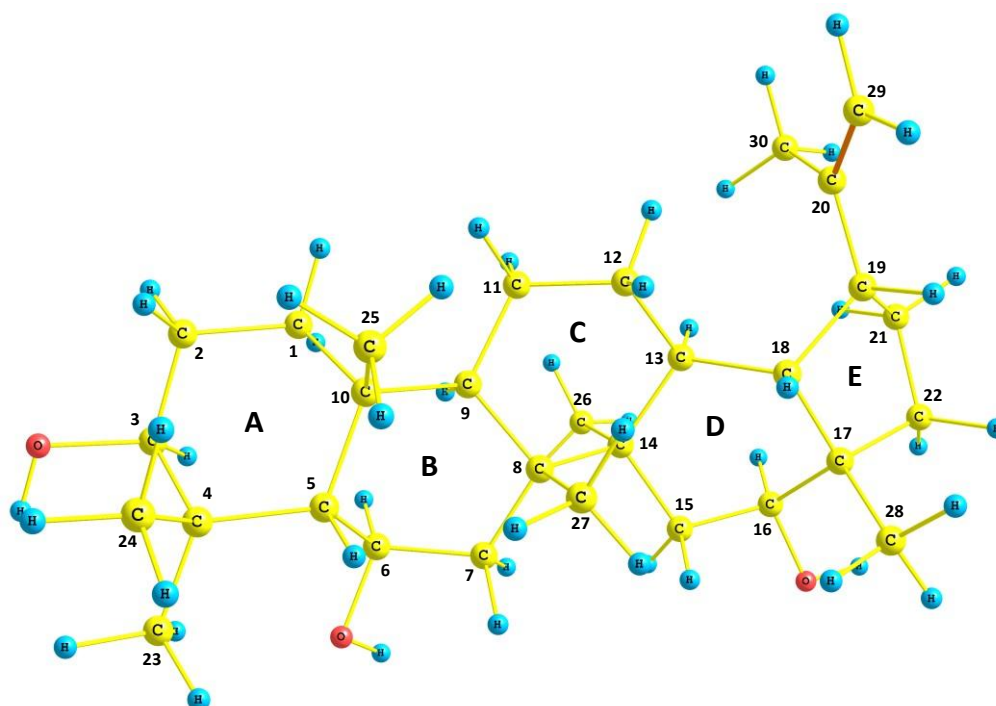
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise Estrutural do TTHL

O triterpeno 3β , 6β , 16β -trihidroxilup-20 (29) -eno (TTHL) isolado das folhas do *C. Leprosum*, é um sólido branco com fórmula molecular $C_{30}O_3H_{50}$. Essa estrutura confirmada por Ressonância Magnética Nuclear é compatível com o composto previamente isolado por Facundo e colaboradores (1993). Este é o primeiro relato sobre a atribuição das propriedades vibracionais e estruturais deste composto.

A estrutura básica do triterpeno lupano é caracterizada por cinco anéis fundidos identificados na Figura 8 como A, B, C, D, E. A numeração dos átomos nessa figura foi realizada de acordo com a nomenclatura recomendada pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC).

FIGURA 8. Estrutura molecular otimizada do triterpeno lupano ($C_{30}O_3H_{50}$) caracterizada por cinco anéis.



Fonte: Autora

5.2 Análise Vibracional

Através dos cálculos teóricos de química quântica foi possível otimizar a geometria da molécula para um mínimo de energia e o programa calculou todos os $3N-6$ modos normal de vibração molecular para o triterpeno lupano. A molécula $C_{30}O_3H_{50}$ possui 83 átomos, portanto existem 249 graus de liberdade ($3N$), excluindo-se os três modos rotacionais e os três movimentos translacionais, são esperados 243 modos vibracionais ($3N - 6$) para o TTHL.

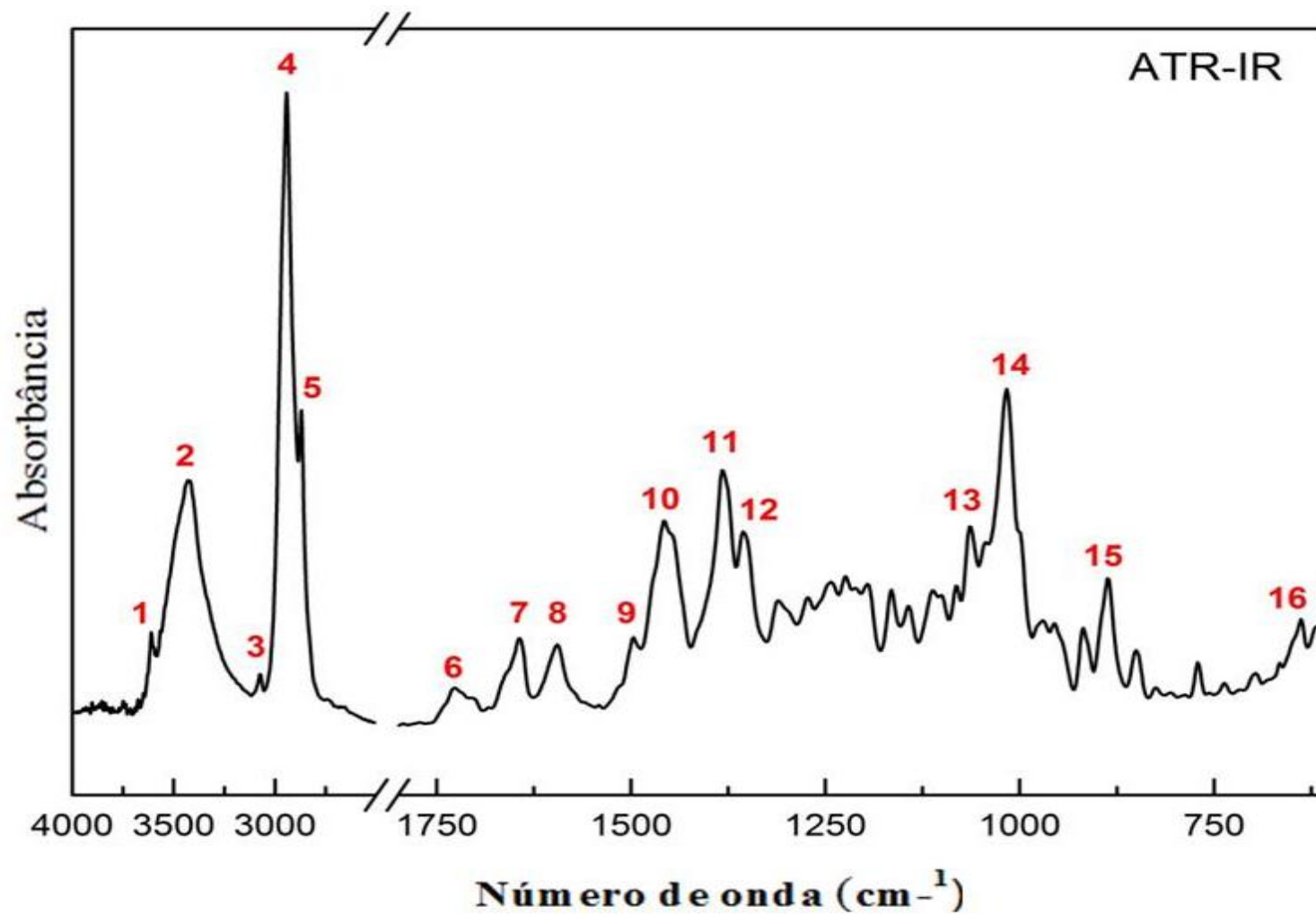
Os números de onda obtidos teoricamente (calculados pelo método DFT) foram ajustados por um fator de escala (λ) apropriado, 0,9669 para frequências abaixo de 2000 cm^{-1} , com erro quadrático total (rms) correspondente a 7 cm^{-1} e para frequências acima de 2000 cm^{-1} foi encontrado o fator de escala 0,9414, com erro quadrático igual a 24 cm^{-1} obtidos por meio do procedimento de ajuste dos mínimos quadrados, que consiste em minimizar os resíduos (SCOTT; RADOM, 1996).

Os valores do erro quadrático encontrados para a molécula do triterpeno lupano foram menores que os obtidos por Wong (1996), que prevê para o método DFT com funcional B3LYP e o conjunto de base 6-31(d, p) $\lambda = 0,9613$ e $\text{rms} = 34\text{ cm}^{-1}$. Isto pode ser explicado porque o fator de escala que obtivemos é específico para a molécula TTHL, quanto menor o valor do erro quadrático melhor será a aproximação entre os valores da frequência calculada e da frequência experimental.

Neste estudo foi possível realizar uma atribuição completa dos modos vibracionais do triterpeno $3\beta,6\beta,16\beta$ -tri-hidroxilup-20(29)-eno. Foi obtido 33 frequências experimentais no espectro IR, as bandas mais intensas foram identificadas como correspondendo às frequências de estiramentos e deformações angulares dos grupos CC e CH_3 .

A Figura 9 apresenta o espectro de absorção ATR-IR do triterpeno lupano à temperatura ambiente na região espectral de 4000 cm^{-1} a 600 cm^{-1} . As bandas no espectro experimental foram classificadas com intensidades fraca, muito fraca, média, forte e muito forte, normalizadas com um intervalo de amplitude [0,100]. Algumas bandas espectrais do infravermelho encontram-se destacadas para uma melhor apresentação dos resultados.

FIGURA 9 - Espectro FT-IR da molécula TTHL na região espectral de 4000 cm^{-1} a 600 cm^{-1} .



Abaixo segue o atribuição vibracional das 16 bandas destacadas no espectro experimental, realizada com ajuda dos cálculos da Teoria do funcional de Densidade - DFT listadas na Tabela 1.

TABELA 1. Frequências experimentais de ATR-IR ($\omega_{\text{ATR-IR}}$, em cm^{-1}), número de onda vibracional escalado (ω_{scal} em cm^{-1}) pelo duplo fator de escala 0,9669 (abaixo de 2000 cm^{-1}) e 0,9414 (acima de 2000 cm^{-1}) e atribuição para alguns dos modos vibracionais do triterpeno lupano ($\text{C}_{30}\text{O}_3\text{H}_{50}$) associado com o número das bandas do espectro de absorbância ATR-IR mostrados na Figura 9.

Bandas	EXP $\omega_{\text{ATR-IR}} (\text{cm}^{-1})$	DFT $\omega_{\text{scal}} (\text{cm}^{-1})$	Atribuição para algumas faixas de absorbância do triterpeno lupano $\text{C}_{30}\text{O}_3\text{H}_{50}$
1	3610w	3604	v (O-H) grupo hidroxila do anel A
2	3426s	3577	v (O-H) grupo hidroxila do anel B
3	3076vw	3040	ν_{as} ($\text{C}21\text{H}_2$)
4	2943vs	2942	ν_{as} ($\text{C}21\text{H}_2$)
5	2871s	2875	ν_{s} ($\text{C}30\text{H}_3$) + v ($\text{C}15\text{H}$)
6	1730vw	1662	v ($\text{C}21\text{C}22$) + sc ($\text{C}23\text{H}_3$) + δ ($\text{HC}21\text{C}23\text{C}24$)
7	1644w	-	Combinação de overtones
8	1595w	1495	δ_{as} (CH_3) anéis A, B e C
9	1498w	1486	δ_{as} (CH_3) anéis A e B
10	1457s	1456	[sc (CH_2) + δ_{as} (CH_3)] anéis A, B e C
11	1383s	1380	δ_{as} ($\text{C}24\text{H}_3$) + wag ($\text{C}28\text{H}_3$)
12	1064s	1064	δ (todos os anéis) + δ (CH_3) todos os anéis
13	1016vs	1016	δ (anel D) + δ (anel E) + δ (CH_3) anel E
14	887m	885	δ (CH_3) anel A
15	771vw	767	δ (anel B) + δ (anel C) + δ (anel D)
16	639w	639	δ (todos os anéis)

Nomenclatura: sc - scissoring = tesoura; wag = sacudida; δ = deformação; δ_{as} = deformação assimétrica; v = estiramento; ν_{as} = estiramento assimétrico; s = estiramento simétrico, vs = muito forte; s = forte; m = médio; w = fraco; vw = muito fraco.

As bandas de absorbância identificadas pelos números 1 e 2 estão associadas aos modos de estiramento dos grupos hidroxila observados nos anéis A e B, respectivamente. O modo a 3610 cm^{-1} de baixa intensidade é um estiramento do grupo hidroxila do anel A, a banda larga em 3426 cm^{-1} trata-se de um estiramento do grupo hidroxila do anel B. As bandas dos números 3 e 4 estão associadas ao estiramento assimétrico do grupo metila $\text{C}21\text{H}_3$, e a banda observada em 5 é originada das misturas do estiramento simétrico do grupo $\text{C}30\text{H}_3$ com o modo de estiramento dos átomos de $\text{C}15\text{H}$.

A banda de absorbância de número 6 está associada ao modo de estiramento ($\text{C}21\text{C}22$), que é combinado com o modo *scissoring* $\text{C}23\text{H}_3$ e a vibração de flexão dos átomos do $\text{HC}21\text{C}23\text{C}24$. As bandas de absorbância ATR-IR de números 7 e 8, observadas em 1644 e 1595 cm^{-1} , estão respectivamente associadas, a modos de tons combinados sobreposições e

deformação assimétrica dos anéis A, B e C. Essas bandas podem ocorrer por causa do grande número de bandas na região entre 600 cm^{-1} e 1500 cm^{-1} .

Modos de deformações são observados nas bandas de absorvância de números 9 a 14. A banda 1457 de intensidade forte apresenta deformação do tipo *scissoring* dos grupos CH_2 e deformação assimétrica dos CH_3 presentes nos anéis A, B e C. A banda a 1383 cm^{-1} corresponde à deformação assimétrica do grupo metila C_2H_3 e do modo de sacudida do grupo metileno C_2H_3 . As bandas de números 15 e 16 estão associadas a vibrações dos anéis.

A análise vibracional descrita acima possibilitou a obtenção de informações de algumas bandas de absorvância infravermelho do triterpeno lupano. A completa atribuição dos modos vibracionais deste produto natural é apresentada no apêndice A tabela A1.

5.3 Atividade Antibacteriana

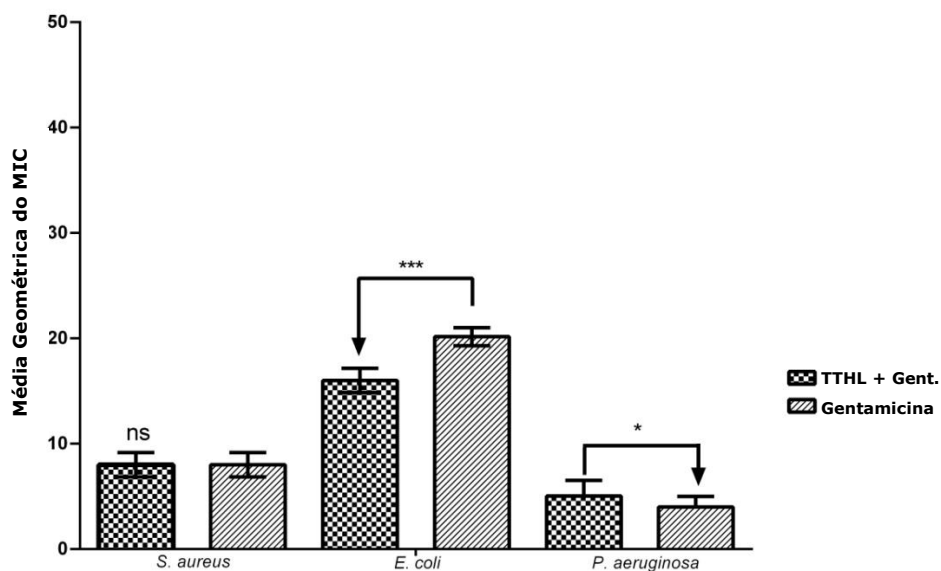
Este é o primeiro relato do triterpeno lupano como atividade de potencialização de aminoglicosídeos contra bactérias multirresistentes, até o momento, não há relatos da sua utilização como modulador de antibióticos, concomitantemente com outras drogas.

Os resultados dos testes de atividade antimicrobiana evidenciaram que o TTHL isolado das folhas do *C. leprosum* tem ação antibacteriana com relevância clínica para a bactéria *Staphylococcus aureus*. A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) contra *S. aureus* foi significativamente relevante com valor para CIM $4\text{ }\mu\text{g/mL}^{-1}$, mas para as bactérias *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* os testes não apresentaram valores significativos com $\text{CIM} \geq 1024\text{ }\mu\text{g/mL}^{-1}$.

Quando o composto triterpeno lupano foi associado aos antibióticos testados foram observados efeitos sinérgicos e antagonistas consideráveis. Os aminoglicosídeos gentamicina e amicacina, foram testados na presença e ausência do TTHL em associação com as bactérias multirresistentes *S. aureus* 10, *E. coli* 06 e *P. aeruginosa* 03.

O composto TTHL quando associado com o aminoglicosídeo gentamicina (Figura 10) no teste com a bactéria *E. coli* apresentou um efeito sinérgico considerável ($p < 0,001$) e um efeito de antagonismo foi observado com a bactéria *P. aeruginosa* ($p < 0,01$). Por outro lado, a atividade antimicrobiana modulatória do triterpeno lupano com a gentamicina não foi significativa para a bactéria *S. aureus*.

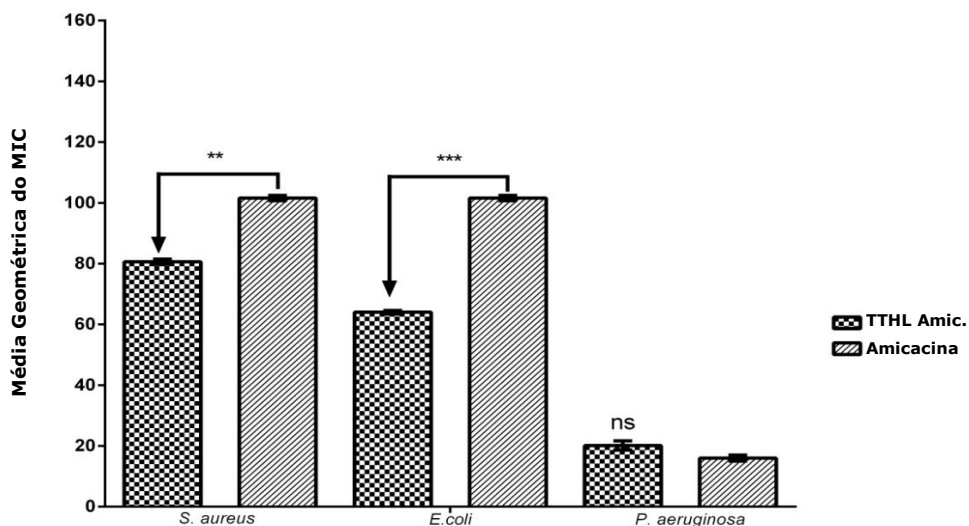
FIGURA 10. Gráfico CIM do aminoglicosídeo Gentamicina na presença e na ausência da substância TTHL com concentração ($0,5 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ para a *S. aureus*; $128 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ para *E. coli* e *P. aeruginosa*).



Valores estatisticamente significativos com * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ - Valores não significativos (ns) com $p > 0,05$.

Quando o composto TTHL foi associado ao aminoglicosídeo amicacina (Figura 11), um sinergismo considerável foi observado para as bactérias *S. aureus* ($p < 0,01$) e *E. coli* ($p < 0,001$). Por outro lado, a atividade antimicrobiana modulatória do triterpeno lupano com a amicacina não foi significativa para a bactéria *P. aeruginosa*.

Figura 11: Gráfico CIM do aminoglicosídeo Amicacina na presença e na ausência da substância TTHL com concentração ($0,5 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ para a *S. aureus*; $128 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ para *E. coli* e *P. aeruginosa*).



Valores estatisticamente significativos com * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ - Valores não significativos (ns) com $p > 0,05$.

Este estudo mostra que, embora o triterpeno lupano possa apresentar um efeito sinérgico com um antibiótico contra uma determinada bactéria, não apresenta este efeito com outras bactérias. Sugerindo que o sinergismo de determinada substância está mais relacionado com a bactéria em questão e seus mecanismos de resistência do que uma característica intrínseca do antibiótico.

A possível diferença de atividade do composto frente à linhagem de *S. aureus* associados à gentamicina e amicacina, provavelmente se deve as diferenças estruturais destes aminoglicosídeos que são moléculas hidrofílicas, formadas por um anel aminociclitol ligado a um ou mais amino açúcar através de ligação glicosídica (MAGNET, BLANCHAD, 2005).

Os mecanismos de ação do composto triterpeno lupano deve estar relacionados à sua hidrofobicidade. As diferenças observadas nos resultados entre as bactérias Gram positivas e Gram negativas podem ter sido principalmente devido à permeabilidade celular. Como as bactérias Gram-positivas e Gram negativas têm uma constituição de parede diferente, elas acabam exibindo diferentes capacidades das moléculas (SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010). As moléculas lipossolúveis tendem a apresentar maior facilidade de entrada em bactérias Gram negativa, pois possuem uma dupla membrana fosfolipídica e uma menor quantidade de peptidoglicano (HELANDER; MATTILA-SANDHOLM, 2000). Isto pode explicar os resultados favoráveis vistos na modulação para a *E. coli*, cujo triterpeno TTHL como molécula solúvel em lipídeos deve ter apresentado esse comportamento.

Mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos residem no ribossomo bacteriano (KOTRA; HADDAD; MOBASHERY, 2000). Quando essas drogas estão associadas a outras substâncias sub-inibitórias, espera-se que esses adjuvantes antibióticos em concentração não bactericida atuem sobre mecanismos de resistência (WRIGHT, 2016). No entanto, o efeito do adjuvante para este grupo pode depender em parte da sua capacidade de atravessar a membrana. Além disso, a própria membrana desempenha um papel de resistência dos aminoglicosídeos (DAMPER; EPSTEIN, 1981).

Apesar de várias estruturas químicas isoladas de produtos metabólicos secundários de plantas exercerem alguma ação antibacteriana, a maioria dessas moléculas tem atividade fraca e espectro de ação limitado quando usadas isoladamente. No entanto, quando são combinados

com antibióticos, podem servir como adjuvantes, modificando a resistência bacteriana através de certas drogas (SIMOES et al., 2009).

Há uma busca crescente por novas substâncias com atividade antimicrobiana. Nas últimas décadas, dentre as atividades farmacológicas, os antimicrobianos têm sido exaustivamente estudados, devido ao agravamento da resistência a antimicrobianos em populações bacterianas, principalmente de origem hospitalar (OLIVEIRA et al., 2006).

A partir dos resultados sobre a atividade antimicrobiana modulatória podemos inferir de alguma forma que o TTHL quando associado aos aminoglicosídeos testados pode modificar a estrutura bacteriana e, portanto, pode ser utilizado para o tratamento de bactérias *S. aureus* e *E. coli*, uma vez que sua associação pode levar a um efeito sinérgico e reduzir significativamente a CIM dessas drogas, diminuindo a dose necessária de antibióticos para um resultado eficaz.

6 CONCLUSÃO

O espectro ATR-IR do triterpeno lupano possibilitou obter informações sobre as frequências vibracionais associadas aos diferentes grupos funcionais deste produto natural, a qual as bandas mais intensas foram identificadas como estiramentos e deformações angulares dos grupos CC e CH₃. Os cálculos usando a Teoria do Funcional da Densidade - DFT permitiram uma descrição completa dos modos normais de vibração, cujos números de onda calculados foram bem correlacionados com os números de onda do espectro experimental. Esses dados são de relevância significativa para identificação estrutural do composto e de suas propriedades vibracionais.

O TTHL apresentou evidências de possuir atividade antibacteriana clinicamente relevante contra a bactéria *S. aureus* com CIM 4 µg/mL. Porém frente às cepas de *E. coli* e *P. aeruginosa* não apresentou valores significativos com CIM ≥ 1024 µg/mL. Os testes de atividade modulatória revelaram que este composto pode potencializar o efeito bactericida dos antibióticos gentamicina e amicacina, uma vez que, foram observados efeitos sinérgicos contra as bactérias multirresistentes *S. aureus* 10 e *E. coli* 06. Portanto, nossos resultados mostraram que o triterpeno lupano apresenta um efeito antibacteriano significativo quando associado aos antibióticos testados.

A atividade antibacteriana do TTHL depende de como um dado grupo funcional desta molécula interage com o antibiótico, e como essa interação afeta a estrutura molecular da bactéria. Como perspectiva, pretende-se no futuro próximo desenvolver um estudo detalhado da relação estrutura-atividade deste composto natural, de forma a possibilitar entender os mecanismos da ação antibacteriana do composto puro e quando associado aos antibióticos gentamicina e amicacina, frente às linhagens multirresistentes.

REFERÊNCIAS

- ADIL, Q. **Isolation and structure elucidation studies in the Chemical constituents of *Thevetia Nerifolia* Juss.** Karachi- Pakistan, 1994. Thesis (Doctor). Research Institute of Chemistry University of Karachi Pakistan, p. 21-37, 1994.
- AGRA, M. F.; BARACHO, G. S.; NURIT, K.; BASÍLIO, I. J.; COELHO, V. P. Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p. 383-95, 2007.
- ANGEH, J. E.; HUANG, X.; SATTLER, I.; SWAN, G. E.; DAHSE, H.; HÄRTL, A.; ELOFF, J. N. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of four known and one new triterpenoid from *Combretum imberbe* (Combretaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 56-60, 2007.
- ANGÉLICO, E. C. **Avaliação das atividades antibacteriana e antioxidante de *Croton heliotropifolius* Kuntze e *Croton blanchetianus* Baill.** Patos- PB: UFCG, 2011. (Dissertação-Mestrado em Zootecnia- Sistemas Agrossilvipastoris no Semi-árido), p. 24, 2011.
- ASTOLFI-FILHO, A.; SILVA, C. G. N.; BIGGI, M. F. M. Bioprospecção e biotecnologia. **Revista Parcerias Estratégica**, Brasília-DF, v. 19, p. 45-80, 2014.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BARREIRO, E. J.; RODRIGUES, C. R.; ALBUQUERQUE, M. G.; DE SANT'ANNA, C. M. R.; DE ALENCASTRO, R. B. Modelagem molecular: Uma ferramenta para o planejamento racional de farmacos em quimica medicinal1. **Química nova**, v. 20, p. 1, 1997.
- BECKE, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. **The Journal of chemical physics**, v. 98, p. 5648-5652, 1993.
- BONOMO, R. A.; SZABO, D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Infectious Diseases**, v.43, p.49–56, 2006.
- BRITO, M. A.; CORDEIRO, B. C. Necessidade de novos antibióticos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.48, p.247-249, 2012.
- BRUCE, P. Y. **Química Orgânica**, v. 1, 4ª Ed. Prentice Hall, 2006.
- CANTON, M.; ONOFRE, S. B. Interferência de extratos da *Baccharisdrá cunculifolia* DC., Asteraceae, sobre a atividade de antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 348-354, 2010.
- CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 314-319, 2008.

CARVALHO, A. F. U.; MELO, V. M. M.; CRAVEIRO, A. A.; MACHADO, M. I. L.; BANTIM, M. B.; RABELO, E. F. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 569-571, 2003.

CHAVES, E. M. F.; BARROS, R. F. M.; ARAÚJO, F. S. Flora Apícola do Carrasco no Município de Cocal, Piauí, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 555-557, 2007.

CLSI- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for bacteria that grow aerobically**, 6^a Ed. Wayne, PA: NCCLS Approved Standard M7-A6, 2003.

COELHO, L. W.; JUNQUEIRA, G. M. A.; HERRERA, J. O. M.; MACHADO, S. P. Aplicação de mecânica molecular em química inorgânica. **Química nova**, v. 22, n. 3, p. 396-404, 1999.

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**, v. 54, p. 328-330, 2008.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; SIQUEIRA, J. P. J. R.; LIMA, E. O. Effect of *Momordica charantia* L. in the resistance to aminoglycosides in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, p. 467-471, 2010.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; LIMA, E. O., FALCÃO-SILVA V. S.; SIQUEIRA, J. R. J. P. Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by *Turnera ulmifolia* L. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 9, 2009.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural Products: A Continuing Source of Novel Drug Leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, p. 3670-3695, 2013.

DAMPER, P. D.; EPSTEIN, W. Role of the membrane potential in bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 20, p. 803-808, 1981.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Product- **A biosynthetic approach**, 3^a Ed. Chichester: John Wiley e Sons Ltd, p. 546, 2009.

DZUBAK, P.; HAJDUCH, M.; VYDRA, D.; HUSTOVA, A.; KVASNICA, M.; BIEDERMANN, D. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. **Natural Product Reports**, v. 23, p. 394-411, 2006.

EVARISTO, F. F. V.; ALBUQUERQUE, M. J. R.; SANTOS, H. S.; BANDEIRA, P. N.; ÁVILA, F. N.; SILVA, B. R.; VASCONCELOS, A. A.; RABELO, E. M.; NASCIMENTO-NETO, L. G.; ARRUDA, F. V. S.; VASCONCELOS, M. A.; CARNEIRO, V. A.; CAVADA, B. S.; TEIXEIRA, E. H. Antimicrobial Effect of the Triterpene $3\beta,6\beta,16\beta$ -Trihydroxylup-20(29)-ene on Planktonic Cells and Biofilms from Gram Positive and Gram Negative Bacteria. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

FACUNDO, V. A.; ANDRADE, C. H. S.; SILVEIRA, E. R.; BRAZ-FILHO, R.; HUFFORD, C. D. Triterpenes and flavonoids from *Combretum leprosum*. **Phytochemistry**, v. 32, p. 411–415, 1993.

FACUNDO, V.A.; RIOS, K.A.; MEDEIROS, C.M.; MILITÃO, J.S.L.T.; MIRANDA, A.L.P.; EPIFANIO, R.A.; CARVALHO, M.P.; ANDRADE, A.T.; PINTO, A.C.; REZENDE, C.M. Arjunolic acid in the ethanolic extract of *Combretum leprosum* root and its use as a potential multi-functional phytomedicine and drug for neurodegenerative disorders: antiinflammatory and anticholinesterasic activities. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1309-1312, 2005.

FANG, X.; YANG, C. M. A. Q.; YANG, L.; CHEN, X. Genomics grand for diversified plant secondary metabolites. **Plant Diversity and Resources**, v. 33, p. 53–64, 2011.

FELIU, D. A. DE. **Análise de terpenóides de espécies de Croton sect. Lamprocroton (Mull. Arg) Pax (Euphorbiaceae)**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área Botânica)-Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2011.

FERREIRA, H.; LALA E.R.P. *Pseudomonas aeruginosa*: Um alerta aos profissionais de saúde. **Revista Panamericana Infectologia**, v. 12, p. 44-50, 2010.

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. **Química Nova**, v. 33, 2010.

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**, v. 1, n. 5, 2013.

FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; MONTGOMERY, J. A.; VREVEN, JR., T.; KUDIN, K. N.; BURANT, J. C.; MILLAM, J. M.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; COSSI, M.; SCALMANI, G.; REGA, N.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H. et al. **Gaussian 09**, Revision B.02, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 2009.

FONTENELLE, R.; MORAIS, S.; BRITO, E.; KERNTOPF, M.; BRILHANTE, R.; CORDEIRO, R.; TOMÉ, A.; QUEIROZ, M.; NASCIMENTO, N.; SIDRIM, J. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 934-940, 2007.

FOURMY, D.; RECHT, M. I., BLANCHARD, S. C.; PUGLISI, J. D. Structure of the A site of *E. coli* 16 S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. **Science**, v. 274, p. 1367-1371, 1996.

FYHRQUIST, P. **Traditional medicinal uses and biological activities of some plant extracts of African *Combretum* Loeffl., *Terminalia* L. and *Pteleopsis* Engl. Species (Combretaceae)**, 2007. Dissertação (Mestrado). Universidade de Helsinki, Helsinki, 2007.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural products reports**, v. 21, p. 263-277, 2004.

GIL, R. A. DA S. S.; ALBUQUERQUE, M. G.; ALENCASTRO, R. B. DE; PINTO, A. DA C.; GOMES, F. DO E. S.; DANTAS, T. N. DE C.; MACIEL, M. A. M. Solid-state ¹³C NMR and molecular modeling studies of acetyl aleuritolic acid obtained from *Croton cajucara* Benth. **Journal of Molecular Structure**, v. 885, p. 82-88, 2008.

GOMES, M. J. P. **Parasitismo e Patogenicidade**. Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul- AVET-UFRGS, 2013.

GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G. ANDRICOPULO, A. D. Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. **Current Medicinal Chemistry Curr**, v. 15, p. 37-46, 2008.

GUIMARÃES, C. **Espectroscopia Raman e Infravermelho na molécula (4E)-4((E)-3-fenilalilidenomanino)-1,2-dihidro-2,3-dimetil-1-fenilpirazol-5-ona**. 2011. Dissertação (Mestrado em Física)- Instituto de Física, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá-MT, 2011.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular aspects of Medicine**, v. 27, p. 1-93, 2006.

HELANDER, I. M.; MATTILA-SANDHOLM, T. Permeability barrier of the Gram-negative bacterial outer membrane with special reference to nisin. **Internat jour of food microbiol**, v. 60, p. 153-161, 2000.

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

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**, 6ª Ed. Porto Alegre-RS: Bookman, p. 1055, 2009.

HORINOUCI, C. D. D. S.; MENDES, D. A. G. B.; NOLTE, S.; BRITO, P. S. D.; SOLEY, B. D. S.; FAVERO, G. M.; FACUNDO, V. A.; SANTOS, A. R. S.; CABRINI, D. D. A.; OTUKI, M. F. Anti-proliferative and anti-inflammatory effects of 3 β ,6 β ,16 β -Trihydroxylup-20(29)-ene on cutaneous inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 195, p. 298-308, 2017.

HORINOUCI, C. D. D. S.; MENDES, D. A. G. B.; SOLEY, B. D. S., PIETROVSKI, E. F.; FACUNDO, V. A., SANTOS, A. R. S., CABRINI, D. A., OTUKI, M. F. *Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae): Potential as an antiproliferative and anti-inflammatory agent. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, p. 311-319, 2013.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores – Série de textos da escola de verão em química**. São Carlos: EDUFSCAR, v. 6, p. 152, 2003.

JAVADPOUR, M. M.; JUBAN, M. M.; LO, W. C.; BISHOP, S. M.; ALBERTY, J. B.; COWELL, S. M.; BECKER, C. L.; MCLAUGHLIN, M. L. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 39, p. 3107-3113, 1996.

JESUS, J. A.; LAGO, J. H.; LAURENTI, M. D.; YAMAMOTO, E. S.; PASSERO, L. F. Antimicrobial activity of oleanolic and ursolic acids: an update. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2015.

KHAFAGI, I. K.; DEWEDAR, A. The efficiency of random versus ethno-directed research in the evaluation of Sinai medicinal plants for bioactive compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 365-376, 2000.

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

KOLODZIEJEK, A. M.; SCHNIDER, D. R.; ROHDE, H. N.; WOJTOWICZ, A. J.; BOHACH, G. A.; MINNICH, S. A.; HOVDE, C. J. Outer membrane protein X (Ail) contributes to *Yersinia pestis* virulence in pneumonic plague and its activity is dependent on the lipopolysaccharide core length. **Infection and Immunity**, v.78, p. 5233-5243, 2010.

KOTRA, L.P.; HADDAD, J.; MOBASHERY, S. Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, p. 3249-3256, 2000.

LACOUTH-SILVA, F.; XAVIER, C.V.; SETUBAL, S. D.; PONTES, A. S.; NERY, N. M.; DE CASTRO, O. B.; FERNANDES, C. F. C.; HONDA, E. R.; ZANCHI, F. B.; CALDERON, L. A.; STABELI, R. G.; SOARES, A. M.; SILVA-JARDIM, I.; FACUNDO, V. A.; ZULIANI, J. P. The effect of 3 beta, 6 beta, 16 beta-trihydroxylup-20(29)-ene lupane compound isolated from *Combretum leprosum* Mart. on peripheral blood mononuclear cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, 2015.

LARKIN, P. J. IR and Raman Spectroscopy: Principles and Spectral Interpretation. **Elsevier**, 2011.

LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. **Physical review B**, v. 37, p. 785, 1988.

LEITE, D. O.; PRADO R. J. Espectroscopia no infravermelho: uma apresentação para o Ensino Médio. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 34, p. 2504, 2012.

LEITE, L. H. I; TINTINO, S. R; FIGUEREDO, F. G; OLIVEIRA, C. D; OLIVEIRA, L; SIEBRA, A. L. A; SAMPAIO, R. S; BOLIGON, A. A; SOUZA, D. O; ATHAYDE, M. L; COUTINHO, H. D. M; COSTA, J. G. M; MENEZES, I. R. A; KERNTOPF, M. Composição química e estudo da atividade antibacteriana de *Bowdichia virgilioides* Kunth (Sucupira) – Fabaceae – Papilionoidae. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas – BLACPMA**, v. 13, p. 477-487, 2014.

LIMA, A.; BAKKER, J. Espectroscopia no infravermelho próximo para a monitorização da perfusão tecidual. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, p. 341-51, 2011.

LIMA, E. R.; MOREIRA, L. S.; FACUNDO, V. A.; SILVA-JARDIM, I.; TELES, C. B. G. Avaliação da bioatividade do extrato etanólico e triterpeno lupano obtidos de *Combretum leprosum* contra micro-organismos. **Saber Científico**, Porto Velho, v. 3, n. 1, p. 53-69, 2011.

LIN, C. C.; HUANG, C.Y.; MONG, M. C.; CHAN, C. Y.; YIN, M. C. Antiangiogenic potential of three triterpenic acids in human liver cancer cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 755–762, 2011.

LIRA, S. R. D.; ALMEIDA, R. N.; ALMEIDA, F. R. D.; OLIVEIRA, F. D.; DUARTE, J. C. Preliminary studies on the analgesic properties of the ethanol extract of *Combretum leprosum*. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, p. 213-215, 2002.

LOIOLA, M. I. B. *Combretum leprosum*. **Reflora**, 2014. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublica>. Acesso em 20 de jun. 2018.

LONGHI-BALBINOT, D. T.; LANZMASTER, D.; BAGGIO, C. H.; SILVA, M. D.; CABRERA, C. H.; FACUNDO, V. A.; SANTOS, A. R. S. Anti-inflammatory effect of triterpene 3b, 6b, 16b-trihydroxylup-20(29)-ene obtained from *Combretum leprosum* Mart & Eich in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p.59–64, 2012.

LOPES, W. A.; FASCIO M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**, 2ª Ed. Nova Odessa, SP: Plantarum, 2008.

MACHADO, B. F. M. T.; JUNIOR, A. F. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Cadernos Acadêmicos**, v. 3, p. 105-127, 2011.

MACIEL, M. A. M., PINTO, A. C., VEIGA JR., V. F., GRYNBERG, N. F., ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

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

MARQUES, M. A. L.; BOTTI, S. O que é e para que serve a teoria dos funcionais da densidade? **Gazeta de física**, v. 29, p. 10-15, 2006.

MARQUETE, N. F. S. 2012. **Combretaceae**. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000090>> Acesso em: 20 de agosto de 2018.

MARTIN, J. M. L., ALSENOY, C. V. **Gar2PED: A computer program for PED calculations**, University of Antwerp, Belgium, 2007.

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**, n. 29, p. 1049-1052, 2010.

MATIAS, E. F. F.; SANTOS, K. K. A.; ALMEIDA, T. S.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Phytochemical Prospection and Modulation of Aminoglycoside Antibiotic Activity by *Croton campestris* A. **Chemotherapy**, v.57, p. 305–309, 2011.

MCGAW, L. J.; RABE, T.; SPARG, S. G.; JÄGER, A. K.; ELOFF, J. N.; VAN STADEN, J. An investigation on the biological activity of Combretum species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, p. 45-50, 2001.

MEDEIROS, C.M.; CARVALHO, A.T.; FACUNDO, V.A.; REZENDE, C.M.; PINTO, A.C.; MIRANDA, A.L.P. **Atividade analgésica e antiinflamatória do extrato etanólico da raiz de *Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae)** (06.032). XXXV Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, v. 1. p. 134, 2003.

MEDEIROS, R.; OTUKI, M. F.; AVELLAR, M. C.W.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene α -amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **European Journal of Pharmacology**, n. 559, p. 227-235, 2007.

MOLNAR, J.; MOLNAR, A.; SPENGLER, G.; MANDI, Y. Infectious plasmid resistance and efflux pump mediated resistance. **Acta microbiologica et immunologica Hungarica**, v. 51, p. 333-349, 2004.

MORAIS-BRAGA, M. F. B.; SOUZA, T. M.; SANTOS, K. K. A.; GUEDES, G. M. M.; ANDRADE, J. C.; TINTINO, S. R.; COSTA, J. G. M.; MENEZES, I. R. A. SARAIVA, A. Á. F.; COUTINHO, H. D. M. Atividade antibacteriana, antifúngica e moduladora da atividade antimicrobiana de frações obtidas de *Lygodium venustum* SW. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v.12, p.38-43, 2013.

MORGON, N. H.; CUSTODIO, R. Teoria do funcional de densidade. **Química nova**, v. 18, n. 1, p. 44-55, 1995.

MUFFLER, K.; LEIPOLD, D.; SCHELLER, M. C.; HAAS, C.; STEINGROEWER, J.; BLEY, T.; NEUHAUS, H. E.; MIRATA, M. A.; SCHRADER, J.; ULBER, R. Biotransformation of triterpenes. **Process Biochemistry**, v. 46, p.1-15, 2011.

MURRAY, P. R. Microbiologia Médica. 4ª Ed. [S.l.]. **Elsevier**, 2004.

NASCIMENTO-NETO, L. G.; EVARISTO, F. F. V.; ALVES, M. F. A.; ALBUQUERQUE, M. J. R.; SANTOS, H. S.; BANDEIRA, P. N.; ARRUDA, F. V. S.; TEIXEIRA, E. H. Effect of the triterpene 3 β , 6 β , 16 β -trihydroxylup-20(29)-ene isolated from the leaves of *Combretum leprosum* Mart. on cutaneous wounds in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 171, p. 116–120, 2015.

NCCLS – NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 5 ed. Villanova- PA: NCCLS approved standard M7-A5, v. 20, 2000.

NEVES, P. R. et al. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, p. 409-20, 2011.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311-335, 2012.

NICOLINI, P.; NASCIMENTO, J. W. L.; GRECO, K. V.; MENEZES, F. G. Fatores relacionados à prescrição médica de antibióticos em farmácia pública da região Oeste da cidade de São Paulo. **Ciência saúde coletiva**, Rio de Janeiro, 2013.

NUNES, P. H. M.; CAVALCANTI, P. M. S.; GALVÃO, S. M. P.; MARTINS, M. C. C. Antiulcerogenic activity of *Combretum leprosum*. **Pharmazie**, v. 64, p.58–62, 2009.

ODONKOR, S.; ADDO, K. Bacteria resistance to antibiotics: recent trends and challenges. **International Journal of Biological & Medical Research**, v. 2, p. 1204-1210, 2011.

OJEWOLE, J. A. Analgesic and antiinflammatory effects of mollic acid glucoside, a 1 alpha-hydroxycycloartenoid saponin extractive from *Combretum molle* R. Br. ex G. Don (Combretaceae) leaf. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 30-35, 2008.

OLIVEIRA, D. R.; LEITAO, G. G.; SANTOS, S. S.; BIZZO, H. R.; LOPES, D.; ALVIANO, C. S.; ALVIANO, D. S.; LEITAO, S. G. Ethnopharmacological study of two Lippia species from Oriximiná, Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 108, p. 103-108, 2006.

OLIVEIRA, E. R.; MENINI NETO, L. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pelos moradores do povoado de Manejo, Lima Duarte – MG. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, p. 311-320. Botucatu, São Paulo, 2012.

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, 2001.

OTUKI, M. F.; LIMA, F. V.; MALHEIROS, A.; CECHINEL-FILHO, V.; DELLE MONAC, F.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B.; Evaluation of the antinociceptive action caused by ether fraction and a triterpene isolated from resin of *Protium kleinii*. **Life Science**, v. 69, p. 2225-2236, 2001.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and unexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 2720-2722, 2002.

PARR, R. G.; YANG, W. **Density-functional theory of atoms and molecules**. Oxford university press, 1989.

PARRA, A.; RIVAS, F.; MARTIN-FONSECA, S.; GARCIA-GRANADOS, A.; MARTINEZ, A. Maslinic acid derivatives induce significant apoptosis in b16f10 murine melanoma cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 5991-6001, 2011.

PATERSON, I.; ANDERSON, E. A. The renaissance of natural products as drug candidates. **Science**, v. 310, p. 451-453, 2005.

PATOČKA, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine Signification. **Journal of Applied Biomedicine**, v.1, p.7-12, 2003.

PATRICK, G. L.; **An Introduction to Medicinal Chemistry**. Oxford University Press: New York. cap.16, 2005.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**. Tradução de: BARROS, Pedro, 4ª Ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PIETROVSKI, E. F.; ROSA, K. A.; FACUNDO, V. A.; RIOS, K.; MARQUES, M. C.; SANTOS, A. R. Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3beta,6beta,16beta-trihidroxilup-20(29)-ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 83, p.90-99, 2006.

PUPO, M. T.; GUIMARÃES, D. O.; FURTADO, N. A. J. C.; BORGES, W. S. Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry; Taft, C. A. **Research Signpost: Kerala**. cap. 4, 2006.

RAJA, A. F.; ALI, F.; KHAN, I. A.; SHAWL, A. S.; ARORA, D. S.; SHAH, B. A.; TANEJA, S. C. Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of acetyl-11-keto- β -boswellic acid from *Boswellia serrata*. **BMC Microbiology**, v. 11, 2011.

REN, D.; ZUO, R.; GONZALEZ BARRIOS, A. F.; BEDZYK, L. A.; ELDRIDGE, G. R.; PASMORE, M. E.; WOOD, T. K. Differential gene expression for investigation of *Escherichia coli* biofilm inhibition by plant extract ursolic acid. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, p. 4022-4034, 2005.

REYES, F. J.; CENTELLES, J. J.; LUPIÁÑEZ, J. A.; CASCANTE, M. (2 α ,3 β)-2,3-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid, a new natural triterpene from *Olea europea*, induces caspase dependent apoptosis selectively in colon adenocarcinoma cells. **FEBS Lett**, v. 580, p. 6302–6310, 2006.

RIBEIRO, L. F. **Uso de espectroscopia no infravermelho e análise multivariada para previsão de ácidos graxos em linhaça dourada e marrom**. 2012. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2012.

ROCA, I.; AKOVA, M.; BAQUERO, F.; CARLET, J.; CAVALERI, M.; COENEN, S.; COHEN, J.; FINDLAY, D.; GYSSENS, I.; HEURE, O. E.; KAHLMETER, G.; KRUSE, H.; LAXMINARAYAN, R.; LIÉBANA, E.; LÓPEZ-CERERO, L.; MACGOWAN, A.; MARTINS, M.; RODRÍGUEZ-BAÑO, J.; ROLAIN, J. M.; SEGOVIA, C.; SIGAUQUE, B.; TACCONELLI, E.; WELLINGTON, E.; VILA, J. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. **New Microbes and New Infections**, v. 6, p. 22-29, 2015.

ROCHA, D. P.; PINTO, G. F.; RUGGIERO, R.; OLIVEIRA, C. A.; GUERRA, W. Coordenação de metais e antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 34, p. 111-118, 2011.

RODRIGUES, C. R. Processos Modernos no Desenvolvimento de Fármacos: Modelagem Molecular. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 3, p. 43-49, 2001.

ROUGIER S., BORELL D., PHEULPIN S., WOEHLÉ F. & BOISRAMÉ B. A comparative study of two antimicrobial/anti-inflammatory formulations in the treatment of canine otitis externa. **Veterinary Dermatology**, v. 16, p. 299-307, 2005.

ROWE, S. M.; MILLER, S.; SORSCHER, E. J. Cystic fibrosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 1992–2001, 2005.

RYBAK, L. P., WHITWORTH, C. A. Ototoxicity: therapeutic opportunities. **Drug Discovery**, v. 10, p. 1313–1321, 2005.

SADER, H.S.; CASTANHEIRA, M.; MENDES, R.E.; et al - Dissemination and diversity of metallo-beta-lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, p. 57-61, 2005.

SAKAGAMI, Y.; KAJIMURA, K. Bactericidal activities of disinfectants against vancomycin-resistant enterococci. **Journal of Hospital Infection**, v. 50, n. 1404, 2002.

SALA, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**, 2ª Ed. São Paulo: Unesp, p. 276, 2008.

SANTOS FILHO, L. et al. Determinação da produção de metalo- β -lactamases em amostras de *Pseudomonasaeruginosa* isoladas em João Pessoa, Paraíba. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 4, p. 291-6, 2002.

SANTOS, J. L.; BLAU, L.; MENEGON, R. F.; OLIVEIRA, H. P.; BUELONI, R. H.; BOFFO, E.; MACHADO, R. G. P.; LONGO, M. C.; CHUNG, M. C. Síntese e modelagem molecular do novo derivado indolinônico como candidato a antiinflamatório COX-2 seletivo. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 28, p. 235-240, 2007.

SANTOS, N. Q. **A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar**. Texto contexto - enferm., Florianópolis, v. 13, 2004 .

SARTORI, M. R. K. **Atividade antimicrobiana de frações e extratos e compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* Spreng (*Wedelia paludosa*) (Asteraceae)**. 2005. MSc. Thesis - Universidade Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

SCHNEIDER, C.; LEUNG, E.; BROWN, J.; TOLLERVEY, D.; SCHNEIDER, C. The N-terminal PIN domain of the exosome subunit Rrp44 harbors endonuclease activity and tethers Rrp44 to the yeast core exosome. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 1127-40, 2009.

SCOTT, A. P.; RADOM, L. Harmonic Vibrational Frequencies: An Evaluation of Hartree-Fock, Møller-Plesset, Quadratic Configuration Interaction, Density Functional Theory, and Semiempirical Scale Factors. **Journal Physical Chemistry**, v. 100, p. 16502-16513, 1996.

SHARLAND, M.; SAROEY, P.; BEREZIN, E. N. The global threat of antimicrobial resistance - The need for standardized surveillance tools to define burden and develop interventions. **Jornal de Pediatria**, v. 91, p. 410-412, 2015.

SHELLEY, B. C. L. Ethnobotany and the process of drug discovery: A laboratory exercise. **The American Biology Teacher**, v. 71, p. 541-547, 2009.

SILIPO, A.; MOLINARO, A. The Diversity of the Core Oligosaccharide in Lipopolysaccharides, in: X. Wang, P.J. Quinn (Eds.), Endotoxins: Structure, Function and Recognition. **Springer Netherlands, Dordrecht**, p. 69-99, 2010.

SILHAVY, T. J.; KAHNE, D.; WALKER, S. The bacterial cell envelope. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, p. 414, 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 6ª Ed., UFSC, 2007.

SIMOES, M.; BENNETT, R.N.; ROSA, E. A. S. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. **Natural Product Reports**, v. 26, p. 746-757, 2009.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**, 5ª Ed. Porto Alegre-RS: Bookman, p. 836, 2002.

SKOOG, D. A.; HOLLER, J. F.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**, 6ª Ed., Porto Alegre, cap.16 e 27, 2009.

SPADACIO, C.; CASTELLANOS, M. E. P.; BARROS, N. F.; ALEGRE, S. M.; TOVEY, P.; BROOM, A. Medicinas Alternativas e Complementares: uma metassíntese. **Caderno de Saúde Pública**. Rio de Janeiro, v. 26, p.7-13, 2010.

STACE, C. A. **Combretaceae**. Flora Neotropica 107. The New York Botanical Garden Press, New York, p. 369, 2010.

STARLING, C. E. F.; BISCOTTO, C. R. **Associação antimicrobiana**. In: Pedrosa ERP, Rocha MOC. Clínica médica. São Paulo: Medsi Editora Médica e Científica Ltda. v. 1, 2001.

SUSUNAGA, G. S.; **Estudo químico e biológico da resina produzida pela espécie *Protium heptaphyllum* March. (Burseraceae)**. 1996. Tese (Doutorado), Universidade do Amazonas. Manaus, Brasil, p.155, 1996.

TAVARES W. **Aminociclítóis aminoglicosídeos**. In: Tavares W. Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos. São Paulo: Atheneu, p. 573-626, 2001.

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.

TELES, C. B. G.; MOREIRA, L. S.; SILVA, A. D. E.; FACUNDO, V. A.; ZULIANI, J. P.; STABELI, R. G.; SILVA-JARDIM, I., 2011. Activity of the Lupane Isolated from *Combretum leprosum* against *Leishmania amazonensis* Promastigotes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 936, 2011.

TELES, C. B. G.; MOREIRA-DILL, L. S.; SILVA, A. D.; FACUNDO, V. A.; DE AZEVEDO, W. F.; DA SILVA, L. H. P.; MOTTA, M. C. M.; STABELI, R.G.; SILVA-JARDIM, I. A lupane-triterpene isolated from *Combretum leprosum* Mart. fruit extracts that interferes with the intracellular development of *Leishmania (L.) amazonensis* in vitro. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, 2015.

TEÓFILO, T. M. N. G. **Óleo essencial de *Lippia sidoides* e seus principais constituintes**. 2012. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza – CE, 2012.

TOSTES, J. G. **Estrutura molecular: o conceito fundamental da química**. Química nova na escola, n. 7, p 17-20, 1998.

VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M.; COSTA, M. M.; SILVA, M. S.; VIANA, L. R. Atividade antimicrobiana “*in vitro*” de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, v. 34, p. 159–63, 2004.

VERMA, N.; SHUKLA, S. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 2, p. 105-113, 2015.

VIAU, C. M.; 1,2, MOURA, D. J.; FACUNDO, V. A.; SAFFI, J. The natural triterpene 3 β ,6 β ,16 β -trihydroxy-lup-20 (29)-ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* induces apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 280, 2014.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A.C.R.; WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. **Embrapa Clima Temperado-Documentos (INFOTECA-E)**, 2010.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica**, 4ª Ed. A Vida em Nível Molecular. Artmed Editora, 2014.

WARTEWIG, S.; NAUBERT, R.H.H. Pharmaceutical Applications of Mid-IR and Raman Spectroscopy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1144-1170, 2005.

WOLFART, K.; SPENGLER, G.; KAWASE, M.; MOTOHASHI, N.; MOLNAR, J.; VIVEIROS, M.; AMARAL, L. Interaction between 3,5-diacetyl-1,4-dihydropyridines and ampicillin, and erythromycin on different *E. coli* strains. **In vivo**, v, 20, p. 367-372, 2006.

WONG, M. W. Vibrational frequency prediction using density functional theory. **Chemical Physics Letters**, v. 256, p. 391-399, 1996.

WRIGHT, G. D. Antibiotic adjuvants: rescuing antibiotics from resistance. **Tre in microbiol**, v. 24, p. 862-871, 2016.

ZANOL, F. M.; PICOLI, S. U.; MORSCH, F. Detecção fenotípica de metalobetalactamase em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* de hospitais de Caxias do Sul. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, p. 309-14, 2010.

ZHAO, Y.; TRUHLAR, D. G. Density functionals with broad applicability in chemistry. **Accounts of chemical research**, v. 41, p. 157-167, 2008.

APÉNDICE

APÊNDICE A - TABELA A1. Número de onda calculado (ω_{calc} em cm^{-1}), número de onda vibracional escalado (ω_{scal} em cm^{-1}) pelo duplo fator de escala 0,9669 (abaixo de 2000 cm^{-1}) e 0,9414 (acima de 2000 cm^{-1}) e atribuição dos modos vibracionais do triterpeno lupano ($\text{C}_{30}\text{O}_3\text{H}_{50}$) associado com o número das bandas do espectro de absorvância ATR-IR.

$\omega_{\text{cal}} (\text{cm}^{-1})$	$\omega_{\text{scal}} (\text{cm}^{-1})$	$\omega_{\text{ATR-IR}} (\text{cm}^{-1})$	Classificação dos modos vibracionais
26	25		δ (todos os anéis)
34	33		δ (anel D) + δ (anel E)
56	54		δ (todos os anéis)
58	56		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) todos os anéis
76	73		δ (todos os anéis)
92	89		δ (todos os anéis)
104	101		δ (todos os anéis)
121	117		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) todos os anéis
125	121		δ (todos os anéis)
138	133		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) anel A
150	145		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) anel E
156	151		δ (CH_3) todos os anéis + δ (CH_3) anel B
170	164		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) todos os anéis
183	177		δ (todos os anéis)
205	198		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) anel E
209	202		δ (E) + δ (CH_3) anel E
214	207		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) anel A
232	224		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) todos os anéis
236	228		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) todos os anéis
243	235		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) anel A
245	237		δ (todos os anéis)
255	247		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) anéis A e E
263	254		δ (todos os anéis)
272	263		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) todos os anéis
277	268		δ (todos os anéis)
289	279		δ (todos os anéis)
296	286		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) anéis C, D e E
298	288		δ (CH_3) anel A + δ (anel B)
299	289		δ (todos os anéis)
305	295		δ (todos os anéis)
311	301		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) todos os anéis
312	302		δ (todos os anéis)
316	306		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) todos os anéis
319	308		δ (todos os anéis)
331	320		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) todos os anéis
332	321		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) anéis A, B e C
341	330		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) anel C
344	333		δ (todos os anéis)
365	353		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) anel A

Continuação

APÊNDICE A - TABELA A1. Número de onda calculado (ω_{calc} em cm^{-1}), número de onda vibracional escalado (ω_{scal} em cm^{-1}) pelo duplo fator de escala 0,9669 (abaixo de 1800 cm^{-1}) e 0,9414 (acima de 1800 cm^{-1}) e atribuição dos modos vibracionais do triterpeno lupano ($\text{C}_{30}\text{O}_3\text{H}_{50}$) associado com o número das bandas do espectro de absorbância ATR-IR.

$\omega_{\text{cal}} (\text{cm}^{-1})$	$\omega_{\text{scal}} (\text{cm}^{-1})$	$\omega_{\text{ATR-IR}} (\text{cm}^{-1})$	Classificação dos modos vibracionais
368	356		δ (todos os anéis)
375	363		δ (todos os anéis)
382	369		δ (todos os anéis)
392	379		δ (todos os anéis)
410	396		δ (todos os anéis)
413	399		δ (todos os anéis)
423	409		δ (todos os anéis)
436	422		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) todos os anéis
443	428		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) anéis A, B e C
451	436		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) todos os anéis
468	453		δ (todos os anéis)
469	453		δ (todos os anéis)
483	467		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) anel A
499	482		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) anel A
502	485		δ (todos os anéis)
519	502		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) anel A
525	508		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) anel E
532	514		δ (todos os anéis)
546	528		δ (todos os anéis)
551	533		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) anel E
564	545		δ (todos os anéis)
597	577		δ (todos os anéis)
625	604	615w	δ (todos os anéis)
643	622		δ (todos os anéis)
661	639	639w	δ (todos os anéis)
675	653		δ (todos os anéis)
688	665		δ (todos os anéis)
716	692	698vw	δ (anel A) + δ (anel B) + δ (anel C)
728	704		δ (todos os anéis)
743	718		δ (anel C) + δ (anel D) + δ (anel E)
757	732	738vw	δ (todos os anéis)
768	743		δ (todos os anéis)
793	767	771vw	δ (anel B) + δ (anel C) + δ (anel D)
819	792		δ (anel C) + δ (anel D) + δ (anel E)
831	803		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) anel A
855	827		δ (todos os anéis)
861	833		δ (todos os anéis)
863	834		δ (todos os anéis)
871	842	851vw	δ (todos os anéis) + δ (CH_3) anel E

Continuação

APÊNDICE A - TABELA A1. Número de onda calculado (ω_{calc} em cm^{-1}), número de onda vibracional escalado (ω_{scal} em cm^{-1}) pelo duplo fator de escala 0,9669 (abaixo de 1800 cm^{-1}) e 0,9414 (acima de 1800 cm^{-1}) e atribuição dos modos vibracionais do triterpeno lupano ($\text{C}_{30}\text{O}_3\text{H}_{50}$) associado com o número das bandas do espectro de absorbância ATR-IR.

$\omega_{\text{cal}} (\text{cm}^{-1})$	$\omega_{\text{scal}} (\text{cm}^{-1})$	$\omega_{\text{ATR-IR}} (\text{cm}^{-1})$	Classificação dos modos vibracionais
894	864		δ (anel C) + δ (anel D) + δ (anel E) + δ (CH_3) anel E
915	885	887m	δ (CH_3) anel A
923	892		δ (todos os anéis)
925	894		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) anel A
935	904		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) todos os anéis
938	907		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) anel E
941	910		δ (CH_3) anel A
943	912	918w	δ (CH_3) anel A
951	920		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) todos os anéis
961	929		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) anéis A e E
966	934		δ (CH_3) anel A e C
972	940		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) todos os anéis
978	946		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) todos os anéis
984	951	955w	δ (todos os anéis)
997	964		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) anéis A e E
1001	968	970w	δ (CH_3) anel A
1007	974		δ (CH_3) anel E
1019	985		δ (CH_3) anel A e E
1022	988		δ (CH_3) anel A
1024	990		δ (anel A) + δ (anel B) + δ (CH_3) anel A
1033	999		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) anel E
1042	1008		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) anel E
1049	1014		δ (anel D) + δ (anel E) + δ (CH_3) anel E
1051	1016	1016vs	δ (anel D) + δ (anel E) + δ (CH_3) anel E
1057	1022		δ (anel A) + δ (anel B) + δ (CH_3) anel A
1066	1031		δ (anel A) + δ (anel B) + δ (CH_3) anel A
1069	1034		δ (todos os anéis) + δ (todos os anéis)
1076	1040		δ (todos os anéis)
1079	1043		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) todos os anéis
1083	1047		δ (todos os anéis)
1089	1053		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) todos os anéis
1093	1057		δ (todos os anéis)
1100	1064	1064s	δ (todos os anéis) + δ (CH_3) todos os anéis
1104	1067		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) todos os anéis
1113	1076		δ (todos os anéis)
1119	1082	1081m	δ (todos os anéis) + δ (CH_3) todos os anéis
1122	1085		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) anel A
1130	1093		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) todos os anéis
1143	1105	1113m	δ (todos os anéis) + δ (CH_3) todos os anéis

Continuação

APÊNDICE A - TABELA A1. Número de onda calculado (ω_{calc} em cm^{-1}), número de onda vibracional escalado (ω_{scal} em cm^{-1}) pelo duplo fator de escala 0,9669 (abaixo de 1800 cm^{-1}) e 0,9414 (acima de 1800 cm^{-1}) e atribuição dos modos vibracionais do triterpeno lupano ($\text{C}_{30}\text{O}_3\text{H}_{50}$) associado com o número das bandas do espectro de absorbância ATR-IR.

$\omega_{\text{cal}} (\text{cm}^{-1})$	$\omega_{\text{scal}} (\text{cm}^{-1})$	$\omega_{\text{ATR-IR}} (\text{cm}^{-1})$	Classificação dos modos vibracionais
1158	1120		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) todos os anéis
1159	1121		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) todos os anéis
1174	1135		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) anel C
1175	1136	1143w	δ (todos os anéis)
1195	1155		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) anel E
1197	1157		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) anel A
1206	1166	1166m	δ (todos os anéis) + δ (CH_3) anéis A e E
1214	1174		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) anel A
1217	1177		δ (CH_3) anel A
1228	1187		δ (todos os anéis)
1238	1197	1196m	δ (todos os anéis) + δ (CH_3) anel E
1241	1200		δ (todos os anéis)
1244	1203		δ (todos os anéis)
1249	1208		δ (todos os anéis) + δ (CH_3) todos os anéis
1262	1220	1224m	δ (anel D) + δ (anel E) + δ (anel CH)
1272	1230		δ (CH) + δ (OH)
1278	1236		δ (todos os anéis) + δ (CH)
1284	1241	1244m	δ (CH)
1292	1249		δ (anel A) + δ (CH)
1295	1252		δ (todos os anéis)
1305	1262		δ (anel E) + ν (CC)
1310	1267	1273m	ν (CC)
1320	1276		δ (anel D) + δ (anel E) + ν (CC)
1321	1277		δ (anel D) + δ (anel E)
1325	1281		δ (CH)
1338	1294		ν (CC)
1343	1299		δ (CH)
1355	1310	1310m	δ_{as} ($\text{C}22\text{H}_2$) + δ_{as} ($\text{C}21\text{H}_2$)
1360	1315		δ_{as} (CH)
1363	1318		δ_{s} ($\text{C}1\text{H}_2$) + δ_{as} ($\text{C}2\text{H}_2$)
1373	1328		$[\delta$ (CH) + δ (CC)] anéis B e C
1376	1330		$[\delta$ (CH) + δ (CC)] todos os anéis
1379	1333		δ_{as} ($\text{C}2\text{H}$ + $\text{C}6\text{H}$) + δ (CC) anel B
1382	1336		wag ($\text{C}24\text{H}_3$) + δ (CH) anéis A e B
1385	1339		sc ($\text{C}29\text{H}_2$) + δ_{as} (CH) anéis D e E
1386	1340		δ (CH) anéis A, B e C
1389	1343		δ (CH) anéis B e C
1390	1344		wag ($\text{C}28\text{H}_3$) + δ (CH) anéis A e D
1394	1348	1356s	δ_{as} ($\text{C}11\text{H}_2$ + $\text{C}12\text{H}_2$) anel C

Continuação

APÊNDICE A - TABELA A1. Número de onda calculado (ω_{calc} em cm^{-1}), número de onda vibracional escalado (ω_{scal} em cm^{-1}) pelo duplo fator de escala 0,9669 (abaixo de 1800 cm^{-1}) e 0,9414 (acima de 1800 cm^{-1}) e atribuição dos modos vibracionais do triterpeno lupano ($\text{C}_{30}\text{O}_3\text{H}_{50}$) associado com o número das bandas do espectro de absorbância ATR-IR.

$\omega_{\text{cal}} (\text{cm}^{-1})$	$\omega_{\text{scal}} (\text{cm}^{-1})$	$\omega_{\text{ATR-IR}} (\text{cm}^{-1})$	Classificação dos modos vibracionais
1408	1361		wag (C23H ₃ + C24H ₃) anel A
1409	1362		wag (C25H ₃) + δ (CH) anéis A, B e C
1412	1365		δ_{as} (C13H + C18H) anel D
1419	1372		δ (CH) anéis B e C
1424	1377		wag (C30H ₃ + C28H ₃) anel E
1427	1380	1383s	δ_{as} (C24H ₃) + wag (C28H ₃)
1431	1384		wag (C26H ₃ + C27H ₃ + C28H ₃ + C23H ₃)
1435	1388		wag (C27H ₃ + C23H ₃ + C24H ₃)
1438	1390		wag (C26H ₃ + C27H ₃)
1439	1391		wag (C25H ₃ + C23H ₃ + C24H ₃)
1446	1398		δ_{as} (CC) anel D
1447	1399		δ_{s} (CO + CC) anel A
1456	1408		δ_{as} (CO + CC) anel B
1465	1417		sc (C29H ₂ + C30H ₃) anel E
1489	1440		sc (CH ₂) anéis A, B, C e D
1493	1444		sc (CH ₂) anéis E
1495	1446		sc (CH ₂) todos os anéis
1499	1449		sc (CH ₂) todos os anéis
1501	1451		sc (CH ₂) todos os anéis
1502	1452		sc (C22H ₂ + C21H ₂) anel E
1503	1453		sc (CH ₂) anéis A e B
1504	1454		sc (C29H ₂ + C30H ₃)
1506	1456	1457s	[sc (CH ₂) + δ_{as} (CH ₃)] anéis A, B e C
1509	1459		sc (CH ₂) anéis B, C e E
1514	1464		sc (CH ₂) todos os anéis
1515	1465		[sc (CH ₂) + δ_{as} (CH ₃)] anéis A, C e E
1516	1466		[sc (CH ₂) + δ_{as} (CH ₃)] anéis C, D e E
1517	1468		sc (CH ₂) anéis C e E
1518	1468		sc (C22H ₂ + C28H ₃) anel E
1522	1472		[sc (CH ₂) + δ_{as} (CH ₃)] todos os anéis
1523	1473		[sc (CH ₂) + δ_{as} (CH ₃)] anéis A e C
1530	1479		sc (CH ₂) anel C
1531	1480		sc (CH ₂) anéis A e B
1534	1483		sc (C7H ₂) + δ_{as} (CH ₃) anéis A e C
1537	1486	1498w	δ_{as} (CH ₃) anéis A e B
1546	1495	1595vw	δ_{as} (CH ₃) anéis A, B e C
-	-	1644w	Combinação de overtones
1719	1662	1730vw	ν (C22C21) + sc (C23H ₂) + δ (HC24C21C23)
2950	2777		ν (C3H + C6H)
2965	2791		ν (C16H)

Continuação

APÊNDICE A - TABELA A1. Número de onda calculado (ω_{calc} em cm^{-1}), número de onda vibracional escalado (ω_{scal} em cm^{-1}) pelo duplo fator de escala 0,9669 (abaixo de 1800 cm^{-1}) e 0,9414 (acima de 1800 cm^{-1}) e atribuição dos modos vibracionais do triterpeno lupano ($\text{C}_{30}\text{O}_3\text{H}_{50}$) associado com o número das bandas do espectro de absorvância ATR-IR.

$\omega_{\text{cal}} (\text{cm}^{-1})$	$\omega_{\text{scal}} (\text{cm}^{-1})$	$\omega_{\text{ATR-IR}} (\text{cm}^{-1})$	Classificação dos modos vibracionais
2984	2809		ν (C3H + C6H)
3014	2837		ν (C13H + C19H)
3017	2840		ν_s (C1H ₂)
3019	2842		ν (C13H + C19H)
3029	2852		ν_s (C22H ₂ + C21H ₂)
3036	2858		ν_s (C30H ₃)
3037	2859		ν_s (C22H ₂ + C21H ₂ + C30H ₃)
3038	2860		ν (C5H + C14H)
3039	2861		ν_s (C23H ₂)
3041	2863		ν_s (C7H ₂)
3042	2864		ν_s (C21H ₂ + C30H ₃ + C28H ₃)
3048	2869		ν_s (C28H ₃)
3054	2875	2871s	ν_s (C30H ₃) + ν (C15H)
3055	2876		ν_s (C2H ₂ + C24H ₃) + ν_{as} (C1H ₂)
3056	2877		ν_s (C2H ₂ + C28H ₃) ν (C18H)
3058	2879		ν_s (C24H ₃)
3066	2886		ν_s (C25H ₃ + C26H ₃)
3067	2887		ν_s (C2H ₂ + C12H ₂) + ν_{as} (C1H ₂)
3068	2888		ν_s (C15H ₂ + C25H ₃)
3069	2889		ν_{as} (C22H ₂)
3072	2892		ν_s (C12H ₂ + C25H ₃) + ν_{as} (C1H ₂)
3076	2896		ν (C9H) + ν_s (C12H ₂ + C25H ₃)
3081	2900		ν_s (C26H ₃)
3083	2902		ν_{as} (C7H ₂)
3090	2909		ν_{as} (C30H ₃)
3091	2910		ν_{as} (C2H ₂ + C11H ₂) + ν (C9H)
3094	2913		ν_{as} (C22H ₂ + C21H ₂)
3096	2915		ν_{as} (C1H ₂ + C2H ₂)
3113	2931		ν_{as} (C27H ₂ + C28H ₂)
3114	2932		ν_{as} (C27H ₃ + C28H ₂)
3120	2937		ν_{as} (C23H ₃ + C24H ₃)
3121	2938		ν_{as} (C15H ₂ + C28H ₂)
3125	2942	2943vs	ν_{as} (C25H ₂ + C30H ₃)
3128	2945		ν_{as} (C25H ₂ + C23H ₂ + C24H ₂)
3132	2948		ν_{as} (C28H ₂)
3137	2953		ν_{as} (C12H ₂)
3140	2956		ν_{as} (C25H ₃ + C26H ₃)
3142	2958		ν_{as} (C30H ₃)
3147	2963		ν_s (C23H ₃)

Continuação

APÊNDICE A - TABELA A1. Número de onda calculado (ω_{calc} em cm^{-1}), número de onda vibracional escalado (ω_{scal} em cm^{-1}) pelo duplo fator de escala 0,9669 (abaixo de 1800 cm^{-1}) e 0,9414 (acima de 1800 cm^{-1}) e atribuição dos modos vibracionais do triterpeno lupano ($\text{C}_{30}\text{O}_3\text{H}_{50}$) associado com o número das bandas do espectro de absorvância ATR-IR.

$\omega_{\text{cal}} (\text{cm}^{-1})$	$\omega_{\text{cal}} (\text{cm}^{-1})$	$\omega_{\text{cal}} (\text{cm}^{-1})$	$\omega_{\text{cal}} (\text{cm}^{-1})$
3149	2964		ν_{as} (C26H ₃)
3156	2971		ν_{as} (C23H ₃)
3176	2990		ν_{as} (C26H ₃)
3186	2999		ν_{as} (C24H ₃)
3229	3040	3076vw	ν_{as} (C21H ₂)
3799	3577	3426s	ν (O-H) grupo hidroxila do anel B
3807	3584		ν (O-H) grupo hidroxila do anel D
3828	3604	3610w	ν (O-H) grupo hidroxila do anel A

Nomenclatura: sc – scissoring = tesoura; wag = sacudida; δ = deformação; δ_{as} = deformação assimétrica; ν = estiramento; ν_{as} = estiramento assimétrico; ν_{s} = estiramento simétrico; ν_{vs} = muito forte; s = forte; m = médio; w = fraco; vw = muito fraco.

ANEXO

ANEXO A – Artigo Aceito para Publicação







Journals ▾ Information for Authors ▾ Microbiology Soc

JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY


Research Article

Antimicrobial activity of the lupane triterpene $3\beta,6\beta,16\beta$ -trihydroxylup-20(29)-ene isolated from *Combretum leprosum* Mart.

Beatriz Gonçalves Cruz¹, Alexandre Magno Rodrigues Teixeira¹, Priscila Teixeira da Silva², Francisco Flávio Vasconcelos Evaristo², Mayron Alves de Vaconcelos^{3,4}, Edson Holanda Teixeira³ , Hécio Silva dos Santos² , Paulo Nogueira Bandeira², Diniz Maciel de Sena-Júnior¹, Veruscka Pedrosa Barreto⁵, Henrique Douglas Melo Coutinho¹ 

 View Affiliations

<https://doi.org/10.1099/jmm.0.001056>

 Info  Sections

 Get Access  Tools  Share

Introduction. *Combretum leprosum* (Combretaceae) is commonly found in the Northeast Region of Brazil and is known for several bioactivities, including antimicrobial ones. Because of increasing bacterial antibiotic resistance, natural products from several plants have been studied as putative adjuvants to antibiotic activity, including products from *C. leprosum*.

Aims. This study was carried out to investigate the structural properties, bactericidal activity and antibiotic modifying action of the lupane triterpene $3\beta,6\beta,16\beta$ -trihydroxylup-20(29)-ene (CLF1) isolated from *C. leprosum* Mart. leaves.

Methods. The CLF1 was evaluated by the Fourier transform infrared spectroscopy method and the antibacterial activity of this compound was assayed alone and in association with antibiotics by microdilution assay.

Results. Spectroscopic studies confirmed the molecular structure of the CLF1 and permitted assignment of the main infrared bands of this natural product. Microbiological assays showed that this lupane triterpene possesses antibacterial action with clinical relevance against *Staphylococcus aureus*. The CLF1 triterpene increased antimicrobial activity against the multidrug-resistant *Escherichia coli* 06 strain when associated with the antibiotics gentamicin and amikacin. Synergistic effects were observed against the *S. aureus* 10 strain in the presence of the CLF1 triterpene with the antibiotic gentamicin.

Conclusion. In conclusion, the CLF1 compound may be useful in the development of antibacterial drugs against the aforementioned bacteria.

Received: 23/04/2019 Accepted: 23/07/2019 Published Online: 06/08/2019

Keyword(s): lupane triterpene , infrared spectroscopy and antimicrobial

© 2019 The Authors