



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR

IASMINY MACEDO

**Caracterização estrutural e avaliação microbiológica de 5-hidroxi-3,7,4'-
trimetoxiflavona: um flavonoide isolado de *Vitex gardneriana* Schauer**

CRATO – CE,
2019.

IASMINY MACEDO

**Caracterização estrutural e avaliação microbiológica de 5-hidroxi-3,7,4'-
trimetoxiflavona: um flavonoide isolado de *Vitex gardneriana* Schauer**

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. João Hermínio da Silva

Co-orientadores:

Prof. Dr. Hélcio Silva dos Santos

Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira

CRATO – CE,
2019.

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade Regional do Cariri – URCA
Bibliotecária: Ana Paula Saraiva CRB 3/1000

Macedo, Iasminy.

M141c Caracterização estrutural e microbiológica de 5-hidroxi-3, 7, 4 -trimetoxiflavona: um flavonoide isolado de *Vitex gardneriana* Schauer/ Iasminy Macedo. – Crato-CE, 2019

59p.; il.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA

IASMINY MACEDO

Caracterização estrutural e microbiológica de 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona: um flavonoide isolado de *Vitex gardneriana* Schauer

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, Aprovada no dia 13 de Junho de 2019, em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular. Área de concentração: Prospecção de Produtos Naturais.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. João Hermínio da Silva – Orientador
Universidade Regional do Cariri – URCA

Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira – Co-orientador
Universidade Regional do Cariri – URCA

Dr. Raimundo Nonato Pereira Teixeira – Avaliador Interno I
Universidade Regional do Cariri – URCA

Dr. Francisco Rodrigo de Lemos Caldas – Avaliador Externo I
Universidade Regional do Cariri – URCA

CRATO – CE,
2019

*Dedico este trabalho a minha mãe, por ser a
tradução da força e do amor para a minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que se faz presente em minha vida, dando-me a sabedoria necessária para a construção de minha carreira profissional, levantando-me a cada queda, dando-me a força que eu não pensava que tinha para suportar e vencer cada obstáculo de minha vida.

Agradeço, a minha mãe, o maior presente que Deus deu a minha vida. Mulher que mostrou-me que um laço de sangue não é a tradução da maternidade, mas sim o amor dedicou a mim por toda a vida. Obrigada por todas as vezes que você enxugou o meu pranto quando eu não aguentava mais seguir em frente, por todas as renúncias que fez para ficar ao meu lado, por todas as lutas que teve para conseguir dar-me uma vida digna, por todas as vezes que me mostrou que a educação é o maior tesouro que podemos construir. Tudo que sou hoje e que construirei daqui para à frente é a tradução de toda a sua luta e amor em favor de mim.

Agradeço a Jorge Washington Esmeraldo, por estar ao meu lado durante estes anos, sempre dando-me forças no momento em que pensava em desistir, em acreditar em meu potencial, em construir uma história ao meu lado e em me mostrar que toda dificuldade é apenas o degrau para o sucesso.

Ao meu orientador, prof. Dr. João Hermínio da Silva, muito agraçada pela dedicação, paciência e incentivo que me destes. Nesta caminhada não ganhei apenas um orientador, mas sim um grande amigo, que a muito estimo.

Ao meus co-orientadores, prof. Dr. Hércio Silva dos Santos e prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira, que tanto tiveram zelo em meu trabalho. Obrigada pela compreensão, atenção e carinho a mim dedicado.

A minha turma de mestrado, que Deus sempre os guie no caminho da perseverança, humildade e dedicação para com o próximo e para com a profissão. Que este seja apenas a continuidade de uma trajetória de sucesso pessoal e profissional.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular em especial aos Drs.(a) Henrique Douglas Coutinho, Galberto Martins, Diniz Maciel, Marta Kerntopf, Roseli Barbosa, Waltécio Almeida e Irwin Alencar. Obrigada pelos ensinamentos, incentivo e dedicação.

As Secretárias Anderciele Rolim e Manuela Fernandes pela disponibilidade e auxílios no decorrer do curso.

Aos membros do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM), pelo acolhimento, convivência e dedicação.

A Beatriz Gonçalves, do Laboratório de Simulações e Espectroscopia Molecular – LaSEMol da Universidade Regional do Cariri, pelos desenhos das estruturas químicas presentes neste trabalho.

**“Entrega o teu caminho ao Senhor; confia Nele, e Ele tudo fará”
Salmo 37:5.**

RESUMO

Às vezes temos a resistência bacteriana como uma das principais problemáticas na saúde pública, já que os antibióticos disponíveis não combatem de forma efetiva a proliferação de micro-organismos patogênicos à saúde, ocasionando altos índices de mortalidade e custo do manejo clínico. O uso de extratos vegetais para a modulação da resistência bacteriana à antibióticos, mostrou-se uma alternativa para fármacos já consagrados. O presente estudo avaliou os efeitos antimicrobiano e atividade modulatória de 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona (VG.EF.CLII) contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, como também a estrutura química do composto através da Ressonância Magnética Nuclear. Nesta perspectiva, o gênero *Vitex* já possui exemplares de drogas fitoterápicas consagradas em uso clínico, como vemos no *Vitex agnus-castus* L. usualmente utilizado para aliviar transtornos da síndrome pré-menstrual, o *Vitex negundo* L utilizado no tratamento da artrite reumatoide e a *Vitex trifolia* Vahl qual tem sua ação voltada a atividade anticancerígena e anti-tripanosômica. Por outro lado, quando tratamos do *Vitex gardneriana* Schauer, os trabalhos em sua área são escassos, não permitindo determinar seu potencial farmacológico. Neste aspecto, tem-se como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana e moduladora do flavonóide 5-hidroxi-3,7-dimetoxi-2-(4-metoxifenil)-4H-cromen-4-ona (*Vitex gardneriana* Schauer). Como também, investigar as propriedades estruturais e vibracionais utilizando as técnicas de espectroscopias Raman e infravermelho e cálculos computacionais de primeiros princípios. O efeito antibacteriano do *Vitex gardneriana* Schauer e a atividade modulatória antibiótica, foram determinadas a concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de placas de microdiluição. O VG.EF.CLII mostrou inibição do crescimento bacteriano em concentrações menores ou igual a 512 µg / mL e efeitos sinérgicos foram observados na modulação de duas classes distintas de antibióticos (fluoroquinolona-norfloxacina e aminoglicosídeo-gentamicina). Os dados de RMN indicaram que o composto isolado é a 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona da fórmula química C₁₈H₁₆O₆. Nossos testes microbiológicos demonstram que esta flavona, que foi obtida pela primeira vez no gênero *Vitex*, apresenta atividade antimicrobiana e potencial antimicrobiano contra as cepas multirresistentes *Staphylococcus aureus* 358 e *Escherichia coli* 27 quando associadas aos antibióticos norfloxacino e gentamicina. Portanto, este composto natural pode contribuir para o controle da resistência bacteriana.

Palavras-chave: *Vitex gardneriana*, Flavonoides, Atividade Antimicrobiana, Modulação de Atividade Antimicrobiana.

ABSTRACT

To date, bacterial resistance has been one of the main problems in public health since the available antibiotics do not effectively combat the proliferation of microorganisms that are pathogenic to health, causing high rates of mortality and cost of clinical management. The use of plant extracts for the modulation of bacterial resistance to antibiotics has proved to be an alternative to already established drugs. The present study evaluated the antimicrobial effect and modulatory activity of 5-hydroxy-3,7,4'-trimethoxyflavone (VG.EF.CLII) against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, as well as the chemical structure of the compound through Nuclear Magnetic Resonance. In this perspective, the genus *Vitex* already has specimens of herbal drugs consecrated in clinical use, as we see in *Vitex agnus-castus L.* usually used to relieve disorders of the premenstrual syndrome, *Vitex negundo L.* used in the treatment of rheumatoid arthritis and *Vitex trifolia Vahl* which has its action turned anticancer and anti-trypanosomic activity. On the other hand, when we deal with the *Vitex gardneriana* Schauer, the works in its area are scarce, not allowing to determine its pharmacological potential. In this aspect, the objective is to evaluate the antimicrobial and modulatory activity of the flavonoid 5-hydroxy-3,7-dimethoxy-2-(4-methoxyphenyl)-4H-chromen-4-one (*Vitex gardneriana* Schauer). As well, investigate the structural and vibrational properties using Raman and infrared spectroscopy techniques and computational calculations of first principles. The antibacterial effect of *Vitex gardneriana* Schauer on antibiotic modulatory activity, the minimum inhibitory concentration (MIC) by the microdilution plate technique was determined. O VG.EF.CLII showed inhibition of bacterial growth at concentrations less than or equal to 512 µg / mL and synergistic effects were observed in the modulation of two distinct classes of antibiotics (fluoroquinolone-norfloxacin and aminoglycoside-gentamicin). NMR data indicated that The isolated compound is 5-hydroxy-3,7,4'-trimethoxyflavone of the chemical formula C₁₈H₁₆O₆. Our microbiological tests show that this flavone, which was obtained for the first time in the genus *Vitex*, shows antimicrobial activity and antimicrobial potential against the multiresistant strains *Staphylococcus aureus* 358 and *Escherichia coli* 27 when associated with the antibiotics norfloxacin and gentamicin. Therefore, this natural compound may contribute to the control of bacterial resistance..

Keywords: *Vitex gardneriana*, Flavonoid, Antimicrobial activity, Modulatory antibiotic activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Vitex gardneriana</i>	26
Figura 2: <i>Vitex gardneriana</i> , inflorescência.	26
Figura 3: Fruto do <i>Vitex gardneriana</i>	27
Figura 4: Esqueleto básico dos flavonoides.	28
Figura 5: A separação de energia no estado de spin como função da intensidade do campo magnético aplicado.	30
Figura 6: Anisotropia magnética de um núcleo pela circulação de elétrons de valência.	30
Figura 7: Direção da varredura da RMN.	31
Figura 8: Estrutura molecular de 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona	39
Figura 9: Gráfico de resultados do extrato vegetal de <i>Vitex gardneriana</i> Schauer frente á antibióticos	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados Espectroscópicos de RMN para 5-Hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona (1H: 500 MHz; 13C: 125 MHz; em CDCl ₃)	42
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

B_0	Campo Magnético
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIM/8	Concentração subinibitória
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DMSO	Dimetilsulfóxido
E	Energia
HIA	<i>Heart infusion Agar</i>
IL-1	Interleucina
LDL	Proteína de Baixa Densidade
OMS	Organização Mundial de Saúde
Ppm	Partes por milhão
PMDD	Desordem Disforica Pré-Menstrual
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TCD 4	Linfócito auxiliar
TMS	Tetrametilsilano
TNF α	Fator de Necrose Tumoral
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
δ	Deformação angular
δ_{out}	Deformação fora do plano
μg	Micrograma
μL	Microlitro
v	Estiramento
v_{as}	Estiramento assimétrico
v_s	Estiramento simétrico
τ	Torção

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	19
3 REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1 INFECÇÕES BACTERIANAS	21
3.2 O USO DE PLANTAS MEDICINAIS EM PATOLOGIAS	21
3.3 A BUSCA POR NOVOS FÁRMACOS	23
3.4 O GÊNERO VITEX E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS	24
3.4.1 <i>Vitex gardneriana</i> Schauer	25
3.5 FLAVONÓIDES	27
3.6 ESPECTROSCOPIA EM SUBSTANCIAS ORGÂNICAS	28
3.6.1 ESPECTROSCOPIA DE RMN	29
3.6.2 DESLOCAMENTO QUÍMICO E BLINDAGEM	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 MATERIAL VEGETAL	33
4.2 OBTENÇÃO DO COMPOSTO ISOLADO	33
4.3 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DO COMPOSTO ISOLADO	33
4.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	33
4.4.1 MATERIAL UTILIZADO	33
4.4.2 PREPARO DA SOLUÇÃO INICIAL E DAS SOLUÇÕES DE TESTE	34
4.4.3 CEPAS MICROBIANAS	34
4.4.4 MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS	34
4.4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRA INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	34
4.4.5.1 PREPARO DOS INÓCULOS BACTERIANOS	35
4.4.5.2 EXECUÇÃO E LEITURA DOS ENSAIOS	35
4.5 MODULAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	36
4.5.1 EXECUÇÃO E LEITURA DOS ENSAIOS	36
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	36

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL POR RMN	38
5.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	39
5.2.1 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO FLAVONÓIDE V.G.EF.CL II	39
5.2.2 MODULAÇÃO DO FLAVONOIDE V.G.EF.CLII FRENTE À ANTIBIÓTICOS	39
6 CONCLUSÃO	42
7 ANEXOS	44
7.1 Publicação do Artigo	45
8 REFERÊNCIAS	51

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Há anos temos a resistência bacteriana como uma das principais problemáticas na saúde pública, já que os antibióticos disponíveis não combatem de forma efetiva a proliferação de micro-organismos patogênicos à saúde, ocasionando altos índices de mortalidade e custo do manejo clínico. Entende-se por resistência bacteriana, os micro-organismos que submetidos a concentrações usuais de um ou mais antibióticos, que não tem seu crescimento interferido. O combate a estes micro-organismos, o uso racional do antibiótico e as pesquisas de novos antibióticos hoje são a tríade da resolução desta problemática (ALENCAR, 2015).

Desde os primórdios das primeiras civilizações até hoje, as plantas medicinais constituem a alternativa, ou em alguns casos o único recurso terapêutico disponível. O uso destas retrata a evolução de pesquisas científicas, das quais encontram na natureza a cura ou o controle de diversas enfermidades. As plantas medicinais trazem hoje um viés de alternativa para o tratamento único e /ou conjugado de patologias como a resistência bacteriana (ALVES, 2014).

Neste contexto, o uso de produtos naturais para a modulação da resistência bacteriana à antibióticos, mostrou-se uma alternativa para fármacos já consagrados, que não obtém efetiva eficácia no tratamento de infecções bacterianas (ALENCAR, 2015). O risco do aumento de cepas resistentes, atrelada à baixa quantidade de medicamentos efetivos disponíveis, trazem às pesquisas uma necessidade urgente de novos compostos, já que a OMS (Organização Mundial da Saúde) reconheceu a resistência antimicrobiana como uma problemática de saúde pública mundial (PAIM, 2014).

De acordo com Paim (2014), diante da necessidade de novas práticas do uso racional dos antibióticos, elevado custo no tratamento e dos altos índices de agravos à saúde por infecções bacterianas, faz-se necessário a busca de novos fármacos bactericidas e/ou bacteriostáticos que sejam eficientes nestas patologias. Para tanto, o uso de plantas medicinais mostra-se uma alternativa promissora à antibioticoterapia. Geralmente a modulação de extratos vegetais com antibióticos, já utilizados na prática clínica, promovem ação sinérgica dos fármacos, ocasionando a diminuição da dosagem necessária ao efeito terapêutico do antimicrobiano (ALVES, 2014).

Para tanto, os produtos naturais inibem o crescimento bacteriano através de distintos mecanismos. Dentre estes, os flavonoides complexam-se com proteínas da matriz

extracelular, ocasionando interferências na expressão de genes bacterianos. Já os flavonoides lipofílicos ocasionam a lise da membrana plasmática bacteriana. Quando se trata de metabólitos secundários fenólicos, como os taninos, sua ação dá-se pela elevada toxicidade às enzimas e proteínas pertencentes a parede celular dos micro-organismos (ALENCAR, 2015).

Segundo Alencar (2015), a terapêutica combinada de produtos naturais com antibióticos resulta na diminuição de mudanças ocasionadas no sítio ativo do fármaco, o aumento da permeabilidade da membrana extracelular, inativação ou diminuição da atividade das bombas de efluxo. Assim, os metabólitos secundários são uma alternativa viável ao tratamento de infecções contra cepas multirresistentes.

Neste contexto, o gênero *Vitex* já possui exemplares de drogas fitoterápicas consagradas em uso clínico, como vemos no *Vitex agnus-castus* L. usualmente utilizado para aliviar transtornos da síndrome pré-menstrual, o *Vitex negundo* L utilizado no tratamento da artrite reumatoide e a *Vitex trifolia* Vahl a qual tem sua ação voltada a atividade anticancerígena e anti-tripanosômica (BARRETO, 2008). Por outro lado, com respeito a *Vitex gardneriana* Schauer, os trabalhos reportando atividade farmacológica são escassos, não permitindo avaliar seu potencial farmacológico (SÁ-BARRETO, 2008). Portanto o presente trabalho, realizou a caracterização estrutural e microbiológica de 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona: um flavonoide isolado de *Vitex gardneriana* Schauer. Este produto natural foi primeiramente obtido de *Aniba* sp., também conhecida como *Aniba canellila* (Kunth) (ROSSI, 2006). No entanto, esta é a primeira vez que este composto é encontrado no gênero *Vitex*.

Neste estudo foi realizada uma caracterização estrutural e microbiológica de 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona um flavonoide de *V. gardneriana*. A determinação estrutural deste flavonoide foi feita técnica pela Nuclear Ressonância Magnética Magnética (RMN) e um estudo para avaliar a atividade antimicrobiana e moduladora da resistência bacteriana foi realizado contra cepas bacterianas padrão e multirresistentes de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Determinar a estrutura molecular do flavonoide 5-hidroxi-3,7-dimetoxi-2-(4-metoxifenil)-4H-cromen-4-ona isolado da *Vitex gardneriana* Schauer pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e avaliar a atividade antimicrobiana e moduladora da resistência bacteriana deste composto contra cepas bacterianas padrão e multirresistentes de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a estrutura química do flavonoide 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona (*Vitex gardneriana* Schauer), a partir da Ressonância Magnética Nuclear.
- Avaliar o espectro de ação e o grau de inibição flavonoide 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona determinando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) sobre as linhagens bacterianas patogênicas;
- Verificar a eficácia do flavonoide 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona na modulação da resistência bacteriana à aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e beta-lactâmicos.
- Investigar a modulação da resistência bacteriana.

REFERENCIAL TEÓRICO

3 REFERENCIAL TEÓRICO

Neste capítulo iremos discutir argumentações que serviram de fundamentos para as discussões pertinentes aos resultados do presente estudo.

3.1 INFECCÕES BACTERIANAS

A resistência bacteriana é um grave problema de saúde pública, ocasionado por microorganismos que não respondem aos tratamentos convencionais de antibioticoterapia. Os fármacos antimicrobianos agem através da supressão do crescimento dos agentes patógenos ou ocasionando a morte destes. Por sua grande eficiência, os antibióticos são a chave do controle de infecções. Porém, o uso indiscriminado, os procedimentos invasivos, as internações hospitalares prolongadas e a má higiene ocasionaram o surgimento de cepas bacterianas resistentes aos antibióticos usados na prática clínica (PAIM, 2014).

De acordo com a OMS, cerca de 80% da população mundial utiliza de artifícios de extratos vegetais, isolados ou concomitante com outro fármaco, para tratar distintas patologias. Este retrato da realidade é também característico da tratativa para infecções bacterianas (ANIBIJUWON, 2018). *Staphylococcus aureus* é o microrganismo mais presente em infecções hospitalares graves por todo o mundo, em consequente da sua alta capacidade de resistência e formação de biofilmes (QUELEMES, 2015). Neste mesmo contexto, temos a *Escherichia Coli*, segunda maior causa de internações e agravos de infecções nasocomiais. Cerca de 5% dos homens e entre 40-50% das mulheres, adquirem algum tipo de infecção ocasionada por estes microrganismos durante uma internação, o que representa 100 mil novos casos por ano (KOMAL, 2018).

3.2 O USO DE PLANTAS MEDICINAIS EM PATOLOGIAS

As plantas medicinais tem seu uso consagrado no tratamento de enfermidades, desde as primeiras civilizações. A utilização destes recursos terapêuticos pela população trazem á ciência um norteamento de estudos farmacológicos para a descoberta de novos constituintes químicos (ALVES, 2014). A Organização Mundial de Saúde, divulgou no início da década de 1990 que entre 65 a 80% da população de países em desenvolvimento dependiam das plantas

medicinais como a única forma de acesso ao medicamento e/ou tratamento de saúde (JUNIOR, 2005).

O crescimento da farmacologia alopática a partir da segunda metade do século XX, trouxe grandes avanços da medicina apenas aos grandes centros urbanos e hospitalares, marginalizando à saúde para grande parcela populacional. Por este motivo, a fácil utilização na obtenção, atrelada a tradição no uso de plantas medicinais, consagraram seu uso no tratamento de enfermidades pela população de países em desenvolvimento (JUNIOR, 2005).

Neste contexto, o Brasil é constituído pela maior biodiversidade do planeta, possuindo cerca de 20% do total de exemplares de espécies do mundo. Estima-se entre 350.000 a 550.000 espécies habitem o nosso território, porém só temos catalogadas cerca de 55.000. Em detrimento deste grande número de espécies cadastradas, não temos nestas a investigação de todo o seu potencial terapêutico (RIBEIRO, 2014). Comumente encontramos no Brasil feiras livres, mercados populares, lojas de produtos naturais que oferecem as plantas medicinais como um recurso para cura e tratamento de enfermidades (MACIEL, 2002).

O uso de plantas medicinais em comunidades rurais retrata o único recurso de acesso ao “medicamento” que esta população possui. Porém, a inadequação da forma farmacêutica, o despreparo no manuseio e preparo, e o conhecimento escasso sobre as propriedades farmacológicas de cada planta medicinal trazem um alerta a este uso desregrado. A proporção que a população entra em contato com grandes centros urbanos, a troca de conhecimento é favorecida, transformando este saber empírico e informal no estopim de novas pesquisas e técnicas terapêuticas científicas (ROQUE, 2009).

É importante mencionar que, alguns fatores de obtenção dos constituintes químicos das plantas, metabólitos secundários, devem ser levados em conta para o manuseio e eficácia do tratamento com plantas medicinais. A taxa de metabólitos secundários sofre interferência a partir da sazonalidade, período do dia, fatores inter e intraplanta, ritmo circadiano, índice pluviométrico, altitude, temperatura e desenvolvimento. Estes fatores interferem drasticamente na quantidade de metabólitos secundários, como os óleos essenciais, flavanóides, cumarinas, saponinas, alcaloides, ácidos fenólicos, lactonas sesquiterpênicas, taninos, dentre outros (GOBBO-NETO, 2007).

As plantas medicinais utilizadas pela medicina popular no Brasil são o retrato de uma grave realidade, já que estas são utilizadas com pouca ou nenhuma comprovação científica de

suas propriedades farmacológicas. Os usuários comumente utilizam uma planta de forma errônea para um fim medicinal, sendo sua propriedade farmacológica usada para ação de outra patologia. Além disso, a toxicidade das plantas medicinais quando comparada aos medicamentos tradicionais é tratada como trivial, retratando mais um erro. A toxicidade de plantas medicinais causa graves danos à saúde. O efeito adverso de fito medicamentos bem como a interação com medicamentos alopáticos comumente trazem danos ao usuário (JUNIOR, 2005).

3.3 A BUSCA POR NOVOS FÁRMACOS

As plantas medicinais são amplamente utilizadas pela população como forma de tratamento de infecções, este achado chamara a atenção de grandes centros de pesquisa para o aprofundamento do conhecimento popular na criação de novas drogas. A partir destas plantas de uso consagrado pelas comunidades, podemos isolar novas moléculas, otimizar fármacos e/ou utiliza-los conjuntamente com outras drogas no tratamento antibacteriano (ALENCAR, 2015). Acredita-se que estes fitofármacos podem trazer a cura, o controle e o tratamento para diversas patologias futuramente (ALVES, 2014).

Segundo Paim (2014), nos países em desenvolvimento, como o Brasil, o risco de infecções e a exposição do paciente à risco de saúde é enormemente maior que nos países desenvolvidos. O risco de patologias associadas a infecções de países em desenvolvimento chega a ser 20 vezes maior que em países desenvolvidos. Para tanto, desde meados do século XX, a descoberta dos antibióticos salvaram milhões de pessoas destas infecções bacterianas. No entanto, a disseminação de bactérias super-resistentes, os poucos antibióticos disponíveis no mercado e a baixa eficiência na busca de novos fármacos nos trouxeram a este crítico cenário atual.

Diante deste quadro, a utilização de plantas medicinais tornou-se uma alternativa às pesquisas e ao tratamento de patologias infecciosas. Os extratos vegetais mostram-se eficientes no combate e controle de infecções por microrganismos. O uso destas plantas medicinais como agentes antimicrobianos, são seguros no que tangem a resistência bacteriana, já que estes são constituídos por uma complexa mistura de compostos fitoquímicos, dificultando a adaptação bacteriana (ALVES, 2014).

Infecções hospitalares graves, formação de biofilmes em válvulas cardíacas, próteses e gastroenterite causadas por alimentos contaminados, são algumas das patologias causadas por *Staphylococcus aureus* em todo o mundo. O *S. aureus*, tem como característica principal a capacidade de adquirir resistência aos antibióticos e formar biofilmes, isto demonstra a busca de agentes eficazes contra este por todo o mundo (QUELEMES, 2015). Como mostra nos estudos de Medeiros (2017), o principal mecanismo de resistência deste microrganismo é a bomba de efluxo, o qual por ejetar no meio extracelular o antibiótico, não permite a concentração adequada no meio intracelular bacteriano para ocasionar sua morte. Os metabolitos secundários, encontrados nos extratos vegetais, permitem uma modulação da atividade antibiótica nas bombas de efluxo, ocasionando a diminuição da CIM, consequentemente permitindo uma terapia segura ao tratamento.

A *Escherichia coli* é a responsável por mais de 100.000 internações em UTI's por ano em todo o mundo. Este fato trás a *E. coli* como segunda maior causa de infecções no trato geniturinário em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Assim como o *S. aureus*, a *E. coli*, possui resistência a inúmeros fármacos, ocasionando um auto custo ao tratamento, maior tempo de permanência do enfermo no hospital e alto índice de mortalidade (KOMAL, 2018). De acordo com Anibijuwon (2018), os extratos vegetais, isolados ou associados à terapia antimicrobiana, são um uma alternativa a esta terapêutica, já que a indústria utiliza do artifício de modificações destas versões “naturais” para sintetizar um fármaco.

3.4 O GÊNERO VITEX E SUAS ATIVIDADE BIOLÓGICAS

Segungo Rani (2012), o gênero *Vitex* é o maior da família Verbenaceae. Este é constituído por mais de 250 espécies encontradas por todo o mundo. A espécie *V. agnus-castus* é comumente encontrada às margens dos rios do Mediterrâneo, Ásia Central e sul da Europa. Ainda no Mediterraneo, Ásia Central e Norte da China é encontrado o *V. rotundifolia* Linn. O *V. negundo* possui maior número de exemplares na Índia, Paquistão e Sri Lanka. Já o *V. trifolia* é encontrado nos países asiáticos e no Vietnã.

O gênero *Vitex* possui espécies com tratamentos específicos e consagrados na medicina tradicional. O *V. agnus-castus*, é amplamente utilizado em patologias de disfunções femininas (amenorreias, e dismenorreias), desordem disfórica pré-menstrual (PMDD), insuficiência do corpo-lúteo, hiperprolactinemia, infertilidade, fogachos ocasionados pela menopausa e lactação interrompida. O *V. negundo* é utilizado como vermífuga. O *V.*

rotundifolia, tem sua utilização nas patologias dolorosas, como dores de cabeça, enxaqueca, dor nos olhos e distúrbios hormonais femininos. Já o *V. trifólia*, é utilizado na inflamação, cefaleia, nevralgia, auxiliar no tratamento de câncer (RANI, 2012).

3.4.1 *Vitex gardneriana* Schauer

Vitex gardneriana Schauer, popularmente conhecida como “Jaramataia”, é um dos poucos exemplares do gênero *Vitex* que habitam a região do nordeste brasileiro, sendo mais comumente encontrada as margens dos rios de Recife, Paraíba e Ceará. *V. gardneriana* Schauer tem crescimento em formato de arbusto, atingindo de 6 a 7 metros, como pode-se observar na Figura 1. Possui suas folhas simples com inflorescência de coloração roxa claro, Figura 2. Já na Figura 3, vemos o fruto característico dupra carvosa, com aparência ovóide e coloração verde oliva (RIBEIRO, 2016).



Figura 1: *Vitex gardneriana*. Fonte: Próprio autor, 2018.



Figura 2: *Vitex gardneriana*, inflorescência. Fonte: Próprio autor, 2018.



Figura 3: Fruto de *Vitex gardneriana*. Fonte: Próprio autor, 2018.

A *Vitex gardneriana* Schauer (Verbenaceae) é uma espécie de arbustos arbóreos comumente encontrada nas margens de rios do nordeste brasileiro (BARRETO, 2007). Esta planta é conhecida popularmente como Jaramataia, sendo utilizada de forma empírica pela população por suas propriedades anti-inflamatórias e analgésicas, mesmo não existindo estudos significativos que demonstrem tais atividades (RIBEIRO, 2016). Esta espécie é utilizada pela população para diversas patologias, tais como: gripe, verminoses, dores abdominais, inflamação prostática, dor óssea, problemas renais, dor na coluna, dentre outros distúrbios inflamatórios (MONTEIRO, 2015). Mesmo a Jaramataia sendo largamente utilizada pela população em diversas patologias, não temos pesquisas aprofundadas sobre seu potencial farmacológico (SÁ-BARRETO, 2007).

Os trabalhos de Sá-Barreto (2007), demonstraram que a *V. gardneriana* Schauer possui em sua constituição fitoquímica, flavanóides, iridóides, monoterpénóides, sesquiterpenóides, triterpenóides, diterpenóides, esteróides, saponinas, fenilpropanoglicosídeos e açúcares redutores; demonstrando a congruência nos metabólitos secundários do gênero *Vitex sp.* Cabe destacar, a presença dos triterpenóides e esteróides: β -amirina e β -sitosterol. Fora visto que as maiores concentrações de metabólitos encontram-se nas folhas e cascas do caule.

Em estudos fitoquímicos, *Vitex gardneriana* Schauer demonstrou que seus metabólitos secundários encontram-se em maior concentração nas folhas e nas cascas do caule, em detrimento das outras partes do vegetal (BARRETO, 2007). Os estudos de Roque (2009), já

demonstravam que o uso das folhas por forma de xarope e infusão é comum em comunidades rurais para o tratamento de gastrite, inflamações e sinusite; demonstrando que neste cenário a parte da planta utilizada seria a mais viável.

Existem poucos estudos sobre *Vitex gardneriana* Schauer, que retratem a sua atividade biológica. Dentre estes, destacam-se o trabalho de Monteiro (2015), que demonstra o papel larvicida do *V. gardneriana* frente a larvas de *Aedes aegypti*. A atividade moluscicida em embriões de *Biomphalaria glabrata* realizado por Sá-Barreto (2007). Controle de Biofilmes de espécies de *Candida* a partir do óleo essencial do *Vitex gardneriana* Schauer (RIBEIRO, 2016).

3.5 FLAVONÓIDES

Os Flavonoides constituem uma importante classe de metabólitos secundários responsáveis por atividades biológicas como: anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral, antiviral, antifúngico dentre outras. Os flavonoides possuem um esqueleto base, formado por 15 átomos de carbono, dois grupamentos fenila ligados por uma cadeia de três carbonos (REGINATO, 2015). Os flavonoides são classificados de acordo com o nível de oxidação e as alterações promovidas na estrutura molecular através de reações de glicosilação, alquilação ou oligomerização. Os flavonoides são subclassificados de acordo com a presença de agliconas ou sob a forma de glicosídeos, os quais podem encontrar-se com derivações de acilados ou metilados. Podemos ainda classifica-los de acordo com as diferenciações sofridas no anel central, permitindo a classificação das flavanonas, chalconas, flavanóides, flavonas, flavanóis, antocianidinas, isoflavonas e flavan-3-ols. A estrutura dos flavonoides é encontrada na figura 4, da próxima página (COUTINHO, 2009).

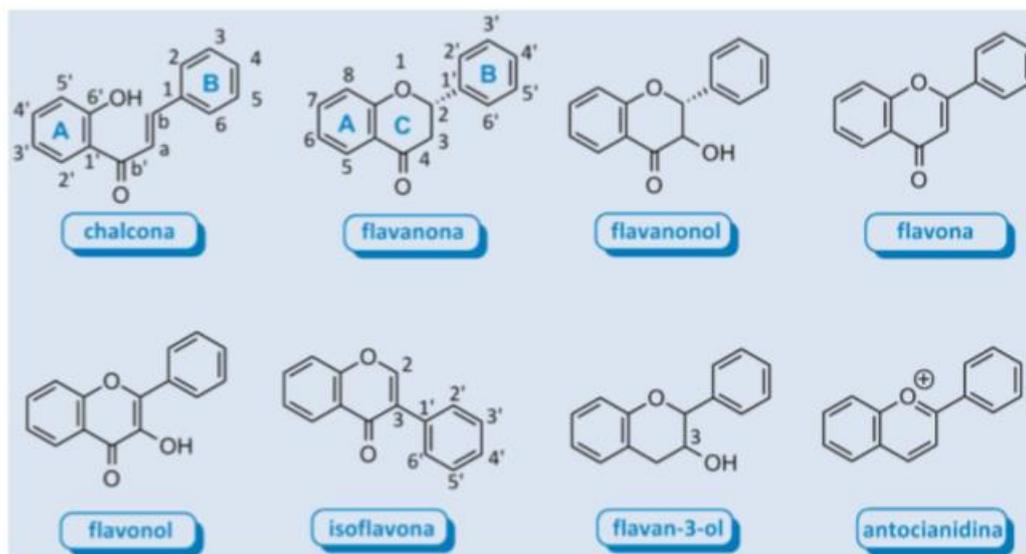


Figura 4: Esqueleto básico dos flavonoides. Fonte : Coutinho, 2009.

Quando se trata da ação anti-inflamatória dos flavonoides, estes possuem mecanismo de ação bem definido, destacando-se que dentre os 40 fármacos desta classe 12 pertencem à derivados de flavonoides. Em sua atividade anti-inflamatória, os flavonoides modulam células inflamatórias (ex: diminuindo a proliferação de linfócitos TCD4), por conseguinte inibem as citocinas TNF- α e IL-1 (pró-inflamatórias), ocasionando a modulação das enzimas da via do ácido araquidônico, como a ciclo-oxigenase, fosfolipase A2 e lipo-oxigenase. Além disso, os flavonoides agem na modulação do óxido nítrico sintase induzida, enzima responsável pela formação de óxido nítrico, essencial no processo inflamatório (COUTINHO, 2009).

Os flavonoides tem importante papel na prevenção de patologias como o câncer, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (DUARTE, 2015). A ação anticancerígena dos flavonoides trouxe a tona grande números de pesquisas na última década. Nesta perspectiva, os flavonoides mostraram-se capazes de inibir metástases, serem antiangiogênicos, citotóxicos e antiproliferativos (SAK, 2017). Este último papel dá-se por sua atividade antioxidante a qual previne a oxidação das proteínas de baixa densidade (LDL), a agregação plaquetária e a migração de arranjos trombolíticos (DUARTE, 2015).

3.6 ESPECTROSCOPIA EM SUBSTÂNCIAS ORGÂNICAS

Estudos de espectroscopia molecular abrangem técnicas utilizadas na prática para identificação de compostos orgânicos e inorgânicos puros (MATOS, 2017). O termo espectroscopia é a designação para toda técnica de análise de substâncias químicas, baseados

na interação eletromagnética com a matéria. Modificações ocasionadas pelos distintos estados de transição dos átomos e moléculas e o valor da energia de radiação eletromagnética, dão origem aos diversos métodos espectroscópicos (SILVA, 2016).

3.6.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

A técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) consiste em um método espectroscópico preciso, de análise rápida e não destrutivo; assim permite que as amostras analisadas possam passar por outros processos analíticos (BIOSCI, 2011). Tendo em vista que a RMN permite a aplicabilidade em amostras simples e/ou complexas este método encontra-se amplamente difundido em estudos de determinação estrutural de sistemas químicos simples ou complexos, misturas de compostos orgânicos, biofluidos e extratos de tecidos (SOUZA, 2002).

A RMN permite identificar os níveis de transições energéticas através das distintas orientações espaciais emitidas pelo núcleo spin quando este encontra-se sujeito a uma força de um campo eletromagnético. Para tanto, é necessária uma diferença energética significativa para que haja a detecção pelo aparelho de RMN. Assim, o aparelho deve possuir um magneto que possua a capacidade de formar um campo eletromagnético robusto e homogêneo para a análise amostral. O RMN gera não apenas características do próprio núcleo referido, mas também permite a análise a partir das outras constantes de ligação relacionadas a ele, por esta razão o espectro de ressonância magnética nuclear gera informações dos compostos que estão integrados ao átomo em questão (GONSALVES, 2007).

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear encontra-se em constante avanço, já que é uma potente ferramenta de estudo principalmente para materiais no estado sólido. Análises por técnicas de RMN permitem informações adequadas e específicas para a caracterização de partículas (PASSOS, 2007). Para que ocorra o fenômeno da ressonância magnética nuclear os núcleos deverão estarem alinhados com o campo aplicado, assim este irá absorver energia, modificando sua orientação de spin em relação ao campo magnético em questão. O processo de absorção energética é quantificado, a partir da diferença de energia dos dois estágios envolvidos, como é demonstrado na Equação 1 abaixo (SOUZA, 2002).

$$E_{\text{absorvida}} = E_{-\frac{1}{2}\text{estado}} - E_{+\frac{1}{2}\text{estado}} = h\nu$$

Equação 1: Equação de absorção energética. Fonte: Souza, 2002.

Assim, essa diferença energética gerada no campo magnético, é resultante da intensidade aplicada no campo B_0 , como podemos observar na figura 5 abaixo:



Figura 5: A separação de energia no estado de spin como uma função da intensidade do campo magnético aplicado. Fonte: (GONSALVES, 2007).

3.6.2 Deslocamento químico e blindagem

Em espectros de RMN no estado sólido os espectros geram sinais amplos, por consequência da intensa relação dipolo entre os núcleos ^1H e ^{13}C , e a anisotropia gerada (SOUZA, 2002). Esta anisotropia é gerada pela blindagem que um próton adquire a partir da variabilidade de elétrons pela molécula, em consequência disto cada próton de uma dada molécula é blindado contra o campo magnético aplicado em uma amplitude que depende da força eletromagnética que foi aplicada. Ao observarmos a Figura 6, vemos que uma molécula cada próton difere em seu ambiente químico, resultando em uma frequência diferente, a qual irá fornecer espectros levemente diferente.

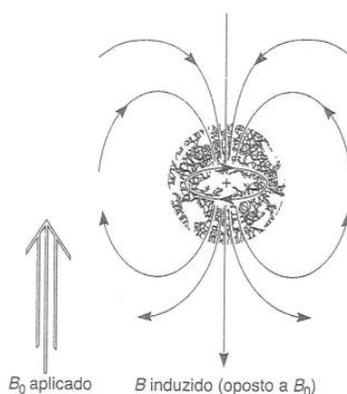


Figura 6: Anisotropia magnética de um núcleo pela circulação de elétrons de valência. Fonte: (GONSALVES, 2007).

Nesta perspectiva, as técnicas de RMN atuais possuem alta resolução e consequentemente consegue-se diminuir estes efeitos de blindagem sobre os espectros. Para tanto a amostra sofre uma rotação de $54,74^\circ$, conhecido como ângulo mágico, em combinação como o intenso desacoplamento do hidrogênio minimiza esta interação dipolar, como demonstrado na Equação 2 abaixo (PASSOS, 2007).

$$H_{CS} = \gamma \cdot \frac{h}{2\pi} \cdot IB_0 \sigma$$

Equação 2: Equação de efeito blindagem. Fonte: Passos, 2007.

O deslocamento químico refere-se a quanto um próton se deslocou em relação ao TMS (tetrametilsilano), substância utilizada como padrão. Desta maneira temos o deslocamento (δ) representado na seguinte Equação 3:

$$\delta = \frac{(\text{deslocamento em Hz})}{(\text{frequencia do espectrômetro em MHz})}$$

Equação 3: Equação de deslocamento químico. Fonte: Passos, 2007.

Para tanto, o espectro de RMN, inicia a varredura a partir dos valores mais elevados do deslocamento, como vemos na Figura 5. (GONSALVES, 2007).

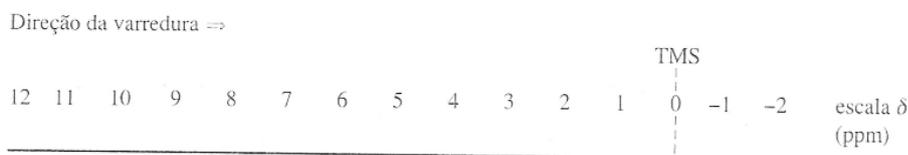


Figura 5: Direção da varredura da RMN. Fonte: (GONSALVES, 2007).

A RMN é portanto uma técnica poderosíssima para determinação estrutural de uma substância química.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAL VEGETAL

Vitex gardneriana Schauer foi coletada em abril de 2014 na fazenda experimental da Universidade Estadual do Vale do Acaraú, localizada a 11 km da cidade de Sobral, Ceará, Brasil. A autenticação da planta foi realizada pelo professor Elnatan Bezerra de Souza e um exemplar de comprovante (N ° 17.703) foi depositado no herbário Francisco José de Abreu Matos (Sobral, Brasil).

4.2. OBTENÇÃO DO COMPOSTO ISOLADO

O flavonoide 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona (daqui por diante denominado por VG.EF.CLII) foi isolado da *Vitex gardneriana* Schauer pelo Dr. Hécio Silva dos Santos da Universidade Estadual Vale do Acaraú-UVA.

4.3. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DO COMPOSTO ISOLADO

A determinação estrutural por Ressonância Magnética Nuclear do flavonoide VG.EF.CLII isolado da *Vitex gardneriana* Schauer foi realizada no Laboratório Multiusuário do Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREM) do Departamento de Química da Universidade Federal do Ceará. A estrutura molecular dessa substância foi elucidada por Ressonância Nuclear Magnética (RMN) pelo Dr. Raimundo Braz-Filho pertencente a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

Os espectros de ^1H e ^{13}C RMN foram registrados em um Bruker Avance DRX-500 (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C); os desvios químicos foram dados em ppm (^{13}C e ^1H).

4.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.4.1 Material utilizado

Foram utilizados nos ensaios microbiológicos os seguintes meios de cultura: Agar Heart Infusion - HIA (Difco Laboratories Ltda.), Caldo Brain Heart Infusion – BHI (concentração indicada pelo fabricante e 10%) (Acumedia Manufacturers Inc.). Os referidos meios, foram preparados de acordo com a especificação do fabricante.

4.4.2 Preparo da solução inicial e das soluções de teste

O preparo da solução do flavonóide VG.EF.CLII, utilizou-se 10mg desta a qual será solubilizada em 1mL de DMSO (Dimetilsulfoxido), para obtermos a concentração inicial de 10mg/mL. Posteriormente, esta solução será diluída em água destilada na proporção de 1: 2 para a obtenção de uma concentração de 1024µg/mL. Por fim, serão realizadas diluições seriadas até obtermos a concentração final de 512 a 0,5 µg/mL.

4.4.3 Cepas microbianas

As cepas bacterianas a serem utilizadas serão de *Escherichia coli* (EC-ATCC10536 e EC27) e *Staphylococcus aureus* (SA-ATCC25923 e SA358). As cepas bacterianas utilizadas, foram preparadas 24 horas antes dos testes, a 35°C em meio Heart Infusion Agar – HIA. As culturas bacterianas posteriormente foram armazenadas em meio HIA (Heart Infusion Agar) a uma temperatura de 4°C. As linhagens bacterianas testadas, foram replicadas nas mesmas condições das cepas anteriores, porém com inoculação em Caldo Brain Heart Infusion (BHI). As suspensões com crescimento bacteriano obtiveram diluição até a obtenção de 10⁵ céls/mL (NCCLS, 2000b). As cepas bacterianas preparadas, sofreram sucessivas diluições na proporção de 1:10, em Caldo Brain Heart Infusion (BHI) até obtermos a concentração final de de 10⁴ céls/mL (NCCLS, 2000b).

4.4.4 Meios de Cultura Utilizados

Os meios de cultura utilizados foram manipulados de acordo com as instruções do fabricante. Para tanto, utilizamos o Agar Heart Infusion - HIA (Difco Laboratories Ltda.), como também o Caldo Brain Heart Infusion – BHI (concentração padronizada - 10%) (Acumedia Manufacturers Inc.).

4.4.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é definida como a menor concentração na qual o antibiótico consegue paralisar em sua totalidade o crescimento bacteriano. Para tanto, a CIM é subdividida em três parâmetros de resultados, sendo estes: susceptível, intermediário e resistente. O primeiro, retrata um quadro em que o microrganismo é responsivo ao tratamento com o antibiótico, em posologia e dosagem específica. O resultado intermediário, demonstra

que a bactéria pode responder ou não ao tratamento com o referido antibiótico. Já, quando a bactéria é resistente, indica que esta não terá inibição de seu crescimento frente à um referido antibiótico (RAHMAN MM, 2018).

A verificação da Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) para o do flavonoide VG.EF.CLII foram determinadas a partir do Método de Microdiluição em Caldo, o qual avaliará as tais concentrações desde 1024 até 16µg/mL.

4.4.5.1 Preparo dos inóculos bacterianos

As cepas bacterianas sofreram sucessivas diluição na proporção de 1:10, em Caldo Brain Heart Infusion (BHI) até obtermos a concentração final de de 10^4 céls/mL (NCCLS, 2000b).

4.4.5.2 Execução e leitura dos ensaios

A microdiluição baseia-se em ensaios bacterianos, realizados em microplacas estéreis, na qual pequenos volumes dos meios de cultura serão acrescidos da amostra. As cepas bacterianas preparadas na concentração de 1024 µg/mL (dobro da concentração definida), com volume de 100 µL passarão por sucessivas diluições de 1:2 em caldo Brain Heart Infusion (BHI). Cada cavidades da microplaca deverá conter 100 µL do meio de cultura e uma alíquota de suspensão bacteriana, na proporção de 1:10. Neste contexto, os controles positivos, constituídos por meio de cultura com inóculo bacteriano e os controles negativos também deveram ser preparados e utilizados na mesma concentração, de: 1024 a 0,5 µg/mL. Tais placas devem ser incubadas por um período de 24 horas a 35°C.

As placas serão reveladas em solução indicadora de resazurina sódica em concentração de 0,01% (p/v). Posterior às 24 horas de incubação, 20 µL desta solução serão acrescidos em cada cavidade, a qual deve permanecer em contato com a amostra por 1 hora, para assim realizarmos a análise do teste. A resazurina possui coloração característica azul, assim quando temos o crescimento microbiano em sua solução, observamos a mudança de coloração para tonalidade rósea, característica da reação química reducional deste indicador. Assim, posteriormente cada cavidade da placa, com coloração inalterada, serão retiradas alíquotas e inoculação em meio HIA, por 24 horas a temperatura de 37°C. Por fim, o local em que não houve o crescimento bacteriano será indicativo da Concentração Bactericida Mínima (CBM).

4.5 MODULAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.5.1 EXECUÇÃO E LEITURA DOS ENSAIOS

A solução do composto flavonoide VG.EF.CLII foi diluída em Caldo BHI em concentrações sub-inibitórias. Para tanto a solução de antibiótico será realizada a partir da adição de água destilada, concentração inicial de 2048 µg/mL, o qual passará por sucessivas diluições em caldo BHI na proporção de 1:2. Cada cavidade da microplaca deverá conter o meio de cultura e a suspensão bacteriana na proporção de 1:10, com volume total de 100 µL. Devem ser preparados os controles, positivo e negativos, assim como realizados no teste de CIM. E as placas foram incubadas por 24 horas a 35°C e reveladas em resazurina.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios antibacterianos foram feitos em triplicata e os resultados expressos como média geométrica para avaliação da atividade antibacteriana. Uma estatística ANOVA unidirecional análise foi aplicada para a análise da atividade antimicrobiana e modulatória de flavonoide VG.EF.CLII, tendo como teste post-hoc o teste de Tukey para ambas as análises, o software GraphPadPrism 6.02.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL POR RMN

O composto VG.EF.CLII obtido no processo de isolamento da *Vitex gardneriana* Schauer foi um sólido verde. Os dados espectroscópicos de RMN que são reportados na Tabela 1 confirmam que a estrutura molecular deste composto é o flavonoide 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona. A representação da estrutura molecular do flavonoide VG.EF.CLII é mostrado na Figura 8. Vale a pena mencionar que está é a primeira vez que este composto natural é obtido no gênero *Vitex*.

Tabela 1: Dados Espectroscópicos de RMN para flavonoide 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona (VG.EF.CLII) (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; em CDCl_3)^a

	HSQC		HMBC	
	δC	Δh	2JCH	3JCH
C				
2	156.15			H-2'/H-6'
3	139.06			MeO-3
4	178.98			
5	161.88		H-6	
7	165.61		H-6; H-8	MeO-7
9	156.96		H-8	
10	106.25			H-6; H-8
1'	123.01			H-3'/H-5'
4'	161.22		H-3'/H-5'	H-2'/H-6'; MeO-4'
CH				
6	98.01	6.39 (s)		H-8
8	92.35	6.48 (s)		H-6
2'/6'	130.36	8.11 (d, 8.6)		
3'/5'	114.26	7.05 (d, 8.6)		
HO-5	-	12.69 (sl)		
MeO-3	60.33	3.91 (s)		
MeO-7	55.99	3.90 (s)		
MeO-4'	55.63	3.94 (s)		

^a número de hidrogénios ligados a cada átomo de carbono foi deduzido por análise comparativa dos espectros de RMN $\{^1\text{H}\}$ e DEPT- ^{13}C . Os desvios químicos e as constantes de acoplamento [J (Hz), entre parênteses)] foram obtidos a partir do espectro de ^1H -RMN de 1

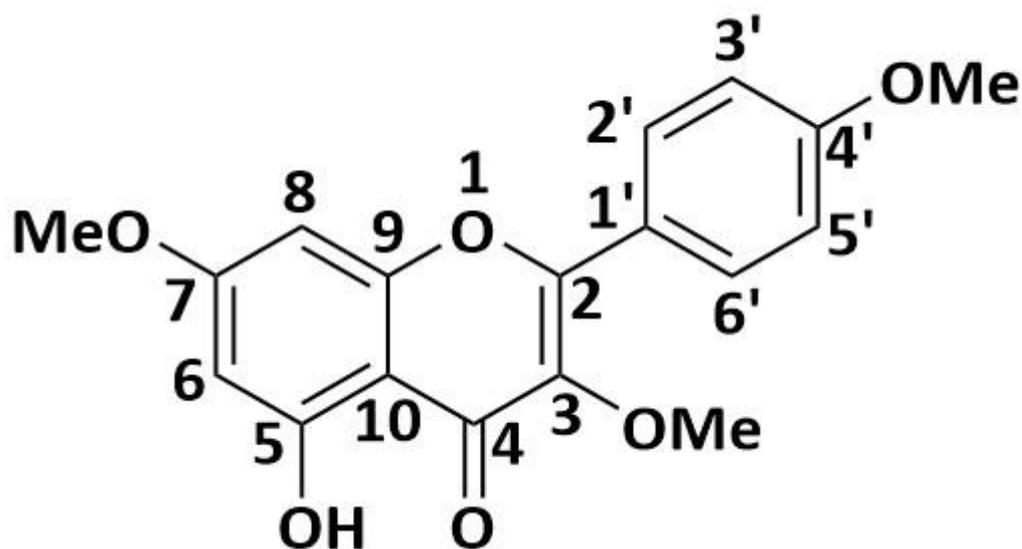


Figura 8: Estrutura molecular do flavonoide 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona (VG.EF.CLII).
Fonte: Próprio autor, 2018.

5.2. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

5.2.1 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima do flavonoide VG.EF.CLII

O flavonoide VG.EF.CLII apresentou concentração inibitória mínima (CIM) frente à cepas bacterianas multirresistentes, menor ou igual a 512 $\mu\text{g} / \text{mL}$. O referido resultado, demonstra que este valor é relevante do ponto de vista clínico, já que será modulado à antibióticos padrões os quais possuem CIM congruentes com este resultado. De acordo com Alencar (2015) substancias que apresentam atividade antimicrobiana efetiva o CIM deve ser menor que 1mg/mL.

5.2.2 Modulação do flavonoide VG.EF.CLII frente à antibióticos

A Figura 9, mostra as diferentes condições de modulações de antibióticos do flavonoide VG.EF.CLII frente à cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. O efeito sinérgico da Norfloxacin junto ao flavonoide VG.EF.CLII, fora nítido para as duas linhagens de cepas multirresistentes, este fato é notório, quando observamos a concentração inibitória mínima (MIC), ser reduzido, quanto à junção do antibiótico ao extrato vegetal. Resultado semelhante, pode-se observar na modulação da gentamicina com o flavonoide VG.EF.CLII o qual também ocorrera diminuição significativa do MIC. Porém, efeito antagônico ocorrera com a modulação da Penicilina junto ao extrato

vegetal, como podemos observar no gráfico a concentração inibitória mínima fora severamente aumentada, mostrando que a cepa de *Staphylococcus aureus* poder-se-ia tornar-se mais resistente ao antibiótico em questão, caso este fosse administrado concomitantemente com o flavonoide VG.EF.CLII.

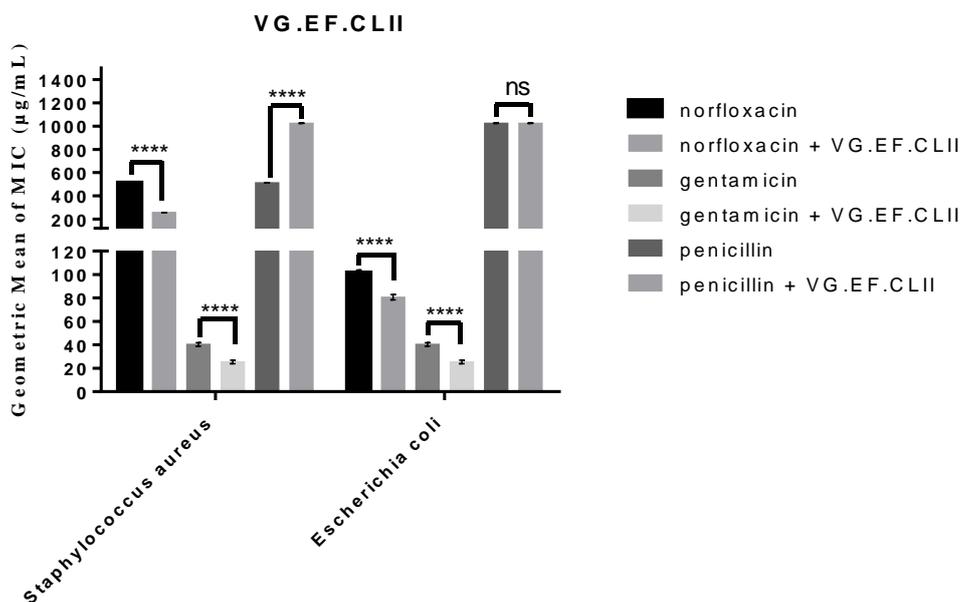


Figura 9: Gráfico de resultados do flavonoide VG.EF.CLII frente à antibióticos. Fonte: Próprio autor, 2018.

O flavonoide VG.EF.CLII demonstrou que isolado já conseguira inibir o crescimento bacteriano na concentração menor ou igual a 512 µg / mL. Tendo em vista este resultado inicial, os testes posteriores vinheram a comprovar a eficiência deste, já que na modulação de duas classes distintas de antibióticos (fluoroquinilona–norfloxacino; aminoglicosídeo–gentamicina) este apresentou ação sinérgica.

Segundo Sá-Barreto (2007), a *V. gardneriana* Schauer possui em sua constituição fitoquímica: flavanóides, iridóides, monoterpenóides, sesquiterpenóides, triterpenóides, diterpenóides, esteróides, saponinas, fenilpropanoglicosídeos e açúcares redutores; demonstrando a congruência nos metabólitos secundários do gênero *Vitex sp.* Cabe destacar, a presença dos triterpenóides e esteroides: β-amirina e β-sitosterol. Esta composição de distintos

metabólitos secundários, congruem para a eficiência do flavonoide VG.EF.CLII frente a atividade antibacteriana.

Dante da necessidade de novas práticas do uso racional dos antibióticos, elevado custo no tratamento e dos altos índices de agravos à saúde por infecções bacterianas, faz-se necessário a busca de novos fármacos bactericidas e/ou bacteriostáticos que sejam eficientes nestas patologias. Para tanto, o uso de plantas medicinais de forma empírica, pode nortear e isolar novas moléculas, otimizar fármacos e/ou utiliza-los conjuntamente com outras drogas no tratamento antibacteriano (PAIM, 2014).

A atividade antimicrobiana do norfloxacino e da gentamicina foram consideravelmente aumentadas com a modulação do flavonoide VG.EF.CLII, o que demonstra um efeito sinérgico promissor para a terapêutica de pacientes com infecções de cepas de distintas linhagens (*S. aureus*, *E. coli*- gram-positiva e gram-negativa respectivamente). Porém, em efeito antagônico, obtivemos a modulação do flavonoide VG.EF.CLII com a Penicilina, a qual aumento a concentração inibitória mínima; um fator que possa ter favorecido para este resultado negativo, possa ser a adaptação bacteriana à Penicilina a qual possui resposta terapêutica baixa, por razão da resistência bacteriana a esta.

Uma possível explicação para esta atividade antibacteriana do flavonoide VG.EF.CLII possa ser devido a interação deste composto com proteínas da matriz extracelular, ocasionando interferências na expressão de genes bacterianos. Sabe-se que os flavonoides lipofílicos ocasionam a lise da membrana plasmática bacteriana. Quando se trata de metabólitos secundários fenólicos, como os taninos, sua ação dá-se pela elevada toxicidade às enzimas e proteínas pertencentes a parede celular dos microrganismos (ALENCAR, 2015).

Nos países em desenvolvimento, como o Brasil, o risco de infecções e a exposição do paciente à risco de saúde é enormemente maior que nos países desenvolvidos. O risco de patologias associadas a infecções de países em desenvolvimento chega a ser 20 vezes maior que em países desenvolvidos. Em consequente, desde meados do século XX, a descoberta dos antibióticos salvaram milhões de pessoas destas infecções bacterianas. No entanto, a disseminação de bactérias super-resistentes, os poucos antibióticos disponíveis no mercado e a baixa eficiência na busca de novos fármacos nos trouxeram a este crítico cenário atual. Diante deste quadro, a utilização de plantas medicinais tornou-se uma alternativa às pesquisas e ao tratamento de patologias infecciosas (PAIM, 2014).

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

O flavonoide isolado de folhas de *V. gardneriana* foi estruturalmente caracterizado usando RMN. Os dados de RMN indicaram que o composto isolado é a 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona (VG.EF.CLII) possui fórmula química $C_{18}H_{16}O_6$. Nossos testes microbiológicos demonstram que esta flavona, que foi obtida pela primeira vez no gênero *Vitex*, apresenta atividade antimicrobiana e potencial antimicrobiano contra as cepas multirresistentes *Staphylococcus aureus* 358 e *Escherichia coli* 27 quando associadas aos antibióticos norfloxacino e gentamicina. Portanto, este composto natural pode contribuir para o controle da resistência bacteriana.

ANEXOS

7 ANEXOS

7.1 PUBLICAÇÃO DO ARTIGO

Artigo publicado na revista Microbial Drug Resistance, Volume 25 (3), 2019.
Intitulado: Structural and Microbiological Characterization of 5-Hydroxy-3,7,4 ϕ -
Trimethoxyflavone: A Flavonoid Isolated from *Vitex gardneriana* Schauer Leaves. DOI:
10.1089/mdr.2018.0359. Disponível em:
<https://www.liebertpub.com/doi/pdf/10.1089/mdr.2018.0359>.

REFERÊNCIAS

8 REFERENCIAS

- ALENCAR, L.C.B; CHAVES, T.P.C.; SANTOS, J.S.; **Efeito modulador do extrato de plantas medicinais do gênero *Spondias* sobre a resistência de cepas de *Staphylococcus aureus* à Eritromicina.** Revista Ciência Farmacêutica Básica e Aplicada. 2015; 36(1):111-116.
- ALVES, E.F; SANTOS, B.S; MATIAS, E.F.F.; **Avaliação da atividade antibacteriana e modulatória da fração hexânica do extrato hexânico de *Cordia verbenacea* DC.** Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia. 2014; 2(5).
- ANIBIJUWON I.; GBALA I.; ABIOYE J. **Susceptibility of Selected Multi-Drug Resistant Clinical Isolates to Leaves of *Carpolobia lutea*.** Ethiop J Health Sci. 2018 Mar; 28(2): 117–124.
- BARRETO, L.C.L.S.; CARVALHO E.F.N.B.; CUNHA-FILHO M.S.S.; **Atividade Moluscicida de Extratos e de Aucubina de *Vitex gardneriana* Schauer (Verbenaceae) em Embriões da *Biomphalaria glabrata*.** Latin American Journal of Pharmacy. 2007; 26(3): 339-43.
- BARRETO, L.C.L.S.; XAVIER, H.S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; Braz-Filho R.; **Ecdisteróide e iridóide glicosilado de *Vitex gardneriana* Schauer (Verbenaceae).** Revista Brasileira de Farmacognosia. 2005; 15(1): 51-54.
- BERNARDINO A.C.S.S., TEIXEIRA A.M.R., DE MENEZES J.E.S.A., PINTO C.C.C., SANTOS H.S., FREIRE P.T.C., COUTINHO H.D.M., SENA JR. D.M., BANDEIRA P.N., AND BRAZ-FILHO R. 2017. **Spectroscopic and microbiological characterization of labdane diterpene 15,16-epoxy4-hydroxy-labda-13(16),14-dien-3,12-dione isolated from the stems of *Croton jacobinensis*.** Journal of Molecular Structure 1147(5): 335-344.
- CAVALCANTE A.K. ; SOUSA L.B. ; HAMAWAKI O.T. ; **Determinação e avaliação do teor de óleo em sementes de soja pelos métodos de ressonância magnética nuclear e soxhlet.** Biosci. J. Uberlândia, 2011; 27 (1):8-15.

COUTINHO, M.A.S.; MUZITANO, M.F.; COSTA, S.S.; **Flavonoides: Potenciais Agentes Terapêuticos para o Processo Inflamatório**. 2009. Revista Virtual de Química. 2009; 1(3): 241-256.

DUARTE, J.; PÉREZ-VIZCAÍNO F.; **Protección cardiovascular con flavonoides. Enigma farmacocinético**. Ars Pharmaceutica. 2015; 56(4): 193-200.

FERRARI, A. C.; **Raman Spectroscopy of graphene and graphite: Disorder, electron-phonon coupling, doping and nonadiabatic effects**. Solid State Communication. 2007; 143(1):47-57.

GONSALVES A.R.; MELO T.P.; **Espectroscopia de Ressonância Magnética e Nuclear**. Coimbra, 2007.

GOBBO-NETO, LOPES, P.N.; **Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários**. Revista Química Nova. 2007; 30(2): 374-381.

JUNIOR, V.F.V.; PINTO, A.C.; **Plantas medicinais: cura segura?**. Revista Química Nova. 2005; 28(3): 519-528.

KOMAL S.;KAZMII S.A.J.;; KHAN J.A.; GILANI M.M. ; **Antimicrobial activity of *Prunella Vulgaris* extracts against multi-drug resistant *Escherichia Coli* from patients of urinary tract infection**. Pak J Med Sci. 2018 May-Jun; 34(3): 616–620.

MACIEL M.A.M.; PINTO, A.C.; JUNIOR, V.F.V.; **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares**. Revista Química Nova. 2002; 25(3): 429-438.

MEDEIROS V. M.; NASCIMENTO Y. M.; SOUTO A. L.; **Chemical composition and modulation of bacterial drug resistance of the essential oil from leaves of *Croton grewoides***. Microbial Pathogenesis. 2017; 111(1): 468-471.

MONTEIRO, L.C.C. F.; OLIVEIRA, A. M. S.; ALVES, L. A. **Atividade antioxidante, teor de fenóis e atividade larvicida frente ao aedes aegypti de *Vitex gardneriana* Schauer.** Bluecher Chemmistry Proceedings. 2015; 3(1).

NIX, A.; PAULL, C.; COLGRAV, M.; **Flavonoid Profile of the Cotton Plant, *Gossypium hirsutum*: A Review.** Journal Plants. 2017; 6 (43).

PAIM, R.S.P.; LORENZINI, E.; **Estratégias para prevenção da resistência bacteriana: contribuições para a segurança do paciente.** Revista Cuidarte. 2014. 5(2): 757-64.

PASSOS A.A.; TAVARES M.I.B.; NETO R.C.P.; MOREIRA L.A.; **Obtenção de Nanocompósito de EVA/SÍLICA e Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear no Estado Sólido.** Centro de Tecnologia, Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Polímeros. 2017; 10 (1).

QUELEMES PV, PERFEITO ML, GUIMARÃES MA, SANTOS RC.; **Effect of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) leaf extract on resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation and *Schistosoma mansoni* worms.** J Ethnopharmacol. 2015; 4 (1):287-294.

RAHMAN MM, *et al.* **Investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among clinical isolates from humans and animals by culture methods and multiplex CR.** BMC Vet Res. 2018;14(1):300.

RANI, A.; SHARMA,A.; **The genus *Vitex* : A review.** Pharmacognosy Reviews. 2013; 7(14).

REGINATO, F.Z.; SILVA, A.R.H.; BAUERMAN, L.F.; **Avaliação do uso de flavonoides no tratamento da inflamação.** Revista Cubana de Farmácia. 2015; 49(3): 569-582.

RIBEIRO, L.H.F.; [TESE]. **Potencial biotecnológico do óleo essencial de *Vitex gardneriana* na prevenção e controle de biofilmes de espécies de *Candida* de importância clínica.** Universidade Federal do Ceará. 2016.

RIBEIRO, D.A.; MACÊDO, D.G.; OLIVEIRA, L.G.S.; SARAIVA, M.E.; OLIVEIRA, S.F.; SOUZA, M.M.A.; MENEZES, I.R.A. **Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. 2014; 16 (4): 912-930.

ROQUE, A.A.; ROCHA, R.M.; LOIOLA, M.I.B. **Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil).** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. 2010; 12(1): 31-42.

ROSSI, M.H.; YOSHIDA, M.; MAIA, J.G.S.; **Neolignans, styrylpyrones and flavonoids from aniba species.** Phytochemsfr.1997; 45(6): 1263-1269.

SÁ-BARRETO, L.C.L.; CUNHA-FILHO, M.S.S.; SOUZA, I.A. **Avaliação Preliminar da Atividade Biológica e Toxicidade Aguda de *Vitex gardneriana* Schauer (Verbenaceae).** Latin American Journal of Pharmacy. 2008; 27(6): 909-13.

SAK, K.; **Epidemiological Evidences on Dietary Flavonoids and Breast Cancer Risk: A Narrative Review.** Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2017; 18 (9): 2309-2328.

SOUZA A.A.; LAVERDE A.; **Aplicação da espectroscopia de ressonancia megnética nuclear para estudos de divisão molecular em líquidos: técnica dosy.** Química Nova. 2002; 25(6):1022-1026.