



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



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA E
RECURSOS NATURAIS

MARIA REGIVÂNIA XAVIER

Caracterização estrutural do composto pectolarina e avaliação de sua atividade antibacteriana direta e potencializadora de antibióticos

CRATO - CE
2020

MARIA REGIVÂNIA XAVIER

Caracterização estrutural do composto pectolarina e avaliação de sua atividade antibacteriana direta e potencializadora de antibióticos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Recursos Naturais da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Diversidade Biológica e Recursos Naturais

Orientador:

Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira

Co-orientador:

Prof. Dr. Aluísio Marques da Fonseca

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

Xavier, Maria Regivânia.
X3c Caracterização estrutural do composto pectolinarina e avaliação de sua atividade antibacteriana direta e potencializadora de antibióticos/ Maria Regivânia Xavier. – Crato – CE, 2020.
50p.; il.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Recursos Naturais da Universidade Regional do Cariri – URCA

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira

Co-orientador: Prof. Dr. Alúcio Marques da Fonseca

1. Pectolinarina, 2. *Lantana camara* L., 3. Flavonoide, 4. Atividade antimicrobiana; I. Título.

CDD: 615.32

MARIA REGIVÂNIA XAVIER

Caracterização estrutural do composto pectolarina e avaliação de sua atividade antibacteriana direta e potencializadora de antibióticos

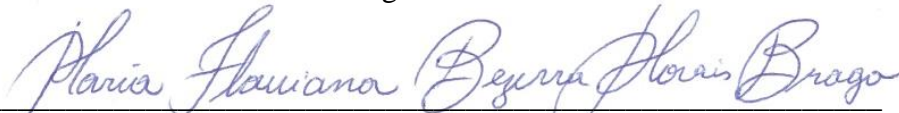
Dissertação de Mestrado submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Diversidade Biológica e Recursos Naturais da Universidade Regional do Cariri - URCA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em: Diversidade Biológica e Recursos Naturais. Área de concentração: Prospecção de Produtos Naturais.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADO EM: 17 / 07 / 2020.

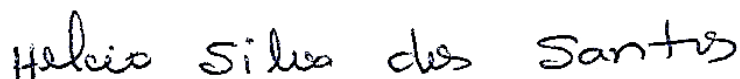
BANCA EXAMINADORA



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



Profa. Dra. Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga - I Membro
Universidade Regional do Cariri - URCA



Prof. Dr. Hécio Silva dos Santos - II Membro
Universidade Estadual Vale do Acaraú- UVA

CRATO - CE
2020

Dedico este trabalho a todos os professores e professoras, pelo compartilhamento e incentivo na busca do conhecimento e pelo exemplo de força e dedicação que sempre tiveram com a sua profissão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que se faz presente em minha vida, permitindo-me ter sabedoria ao tempo em que cresço como ser humano e como profissional, que em seus ensinamentos ou por meio de pessoas que vieram até mim, fez com que chegasse a lugares onde não pensei que fosse capaz de estar.

Agradeço, a minha família, tudo que sou hoje e que construirei daqui por diante deve-se a inspiração de toda a sua luta e amor em favor de mim.

Ao meu orientador, que muito estimo o Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira, muito obrigada pela dedicação, paciência e incentivo que sempre teve para comigo.

A Dra. Maria Flaviana Bezerra Morais Braga, ao Dr. João Hermínio da Silva, e a Dra. Marta Maria de Almeida Souza por terem aceitado compor a minha banca de avaliação de qualificação de mestrado.

Ao Dr. Aluísio Marque da Fonseca pela co-orientação e concessão da amostra utilizada nesta dissertação.

Ao Dr. Diniz Maciel de Sena Junior e a toda equipe do Laboratório de Simulações e Espectroscopia Molecular - LaSEMol, por terem me propulsionado momentos de aprendizagem das técnicas de espectroscopia e cálculos computacionais de química quântica, e também pelos momentos de descontração e amizade.

A M.^a Beatriz Gonçalves Cruz pela imensa ajuda nas correções deste trabalho e do artigo desta dissertação.

Ao Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho e a toda equipe do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM), pela colaboração e fornecimento da estrutura necessária para realização dos testes de atividade antibacteriana.

Ao Dr. Hércio Silva dos Santos e ao Dr. Paulo Nogueira Bandeira pelas valiosas contribuições dada na elaboração do artigo desta dissertação.

A minha turma de mestrado, no qual encontrei pessoas humildes, dedicadas e exemplo de profissionais competentes. Sou grata pelos momentos e conhecimentos compartilhados com vocês. Que este momento seja apenas a continuidade de uma trajetória de sucesso pessoal e profissional para todos nós.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por ter colaborado financeiramente durante todo o desenvolvimento da pesquisa.

RESUMO

Lantana camara L. da família Verbenaceae, é um arbusto com inflorescência, que no Brasil se distribui geograficamente em todas as regiões, ocupando os domínios fitogeográficos da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. Uso medicinal desta planta tem como indicação terapêutica para o tratamento a gripe, como antitérmico, dor de barriga. Dentre as diversas substâncias encontradas na espécie *L. camara*, destaca-se o flavonoide 5"-O- α -L-raminopiranosil-1'- β -D-glicopiranosil-4',6-dimetoxiflavona (C₂₉H₃₄O₁₅), também conhecido como pectolarina, a qual tem um potencial biológico considerável interesse, tanto do ponto de vista químico como farmacológico. Esta pesquisa tem por objetivo determinar a estrutura molecular por Ressonância Magnética Nuclear e espectrometria massas com ionização por eletronubilização de alta resolução do composto isolado da *Lantana camara* L., como também, avaliar a atividade antibacteriana direta do composto isolado pectolarina e em associação com os antibióticos norfloxacino, gentamicina e penicilina contra cepas padrão e multirresistentes de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Este composto foi isolado das folhas da *Lantana camara* L. e sua estrutura molecular foi determinada por ressonância magnética nuclear (RMN). A atividade antimicrobiana da pectolarina isoladamente e em combinação com antibióticos contra cepas padrão e multirresistentes de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foi investigada para conhecer o potencial antibacteriano deste produto natural. Os testes de atividade antibacteriana foram realizados utilizando o método de microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da pectolarina frente as bactérias *E. coli* e *S. aureus* e também para determinar do efeito modulador da atividade antibacteriana dos antibióticos penicilina, gentamicina e norfloxacino, frente as bactérias multirresistentes *E. coli* 27 e *S. aureus* 358. O MIC obtido para a pectolarina foi $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ para ambas as cepas padrão e multirresistentes de *E. coli* e *S. aureus*. Portanto, a pectolarina não tem atividade antibacteriana direta contra as bactérias nas concentrações testadas. No entanto, a pectolarina, quando combinada com o antibiótico gentamicina, potencializou sua ação contra cepas multiresistentes de *S. aureus*. Foi também observado um efeito antagônico com a pectolarina combinada com o antibiótico penicilina contra esta mesma cepa bacteriana. Esta pesquisa sugere que a pectolarina é um composto promissor com potencial aplicação como uma droga antibacteriana.

Palavras-chave: 5''-O- α -L-raminopiranosil-1'- β -D-glicopiranosil-4',6-dimetoxiflavona ; *Lantana camara* L.; Flavonoide; atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Lantana camara L. of the family Verbenaceae, is a shrub with inflorescence, which in Brazil is geographically distributed in all regions, occupying the phytogeographic domains of the Amazon, Caatinga, Cerrado and Atlantic Forest. Medicinal use of this plant has as therapeutic indication for the treatment of flu, as antipyretic, belly pain. Among the several substances found in the *L. camara* species, we can highlight the flavonoid 5''-O- α -L-raminopyranosyl-1'- β -D-glicopyranosyl-4',6-dimethoxyflavone (C₂₉H₃₄O₁₅), also known as pectolinarin. This compound was isolated from the leaves of *Lantana camara* L. and its molecular structure was determined by nuclear magnetic resonance (NMR). The antimicrobial activity of pectolinarin alone and in combination with antibiotics against standard and multiresistant strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* was investigated to know the antibacterial potential of this natural product. The antibacterial activity tests were performed using the broth microdilution method for the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of pectolinarin against the *E. coli* and *S. aureus* bacteria and to determine the modulating antibacterial activity of the antibiotics norfloxacin, gentamicin and penicillin against the *E. coli* 27 and *S. aureus* 358 multiresistant strains. The MIC obtained for pectolinarin was ≥ 1024 $\mu\text{g/mL}$ for both standard and multi-resistant strains of *E. coli* and *S. aureus*. Therefore, the pectolinarin has no direct antibacterial activity against the bacteria tested. However, the pectolinarin, when combined with the antibiotic gentamicin, potentiated its action against multiresistant strains of *S. aureus*. An antagonistic effect has also been observed with pectolinarin combined with the antibiotic penicillin against this same bacterial strain. This research suggests that pectolinarin is a promising compound with potential application as an antibacterial drug.

Keywords: 5''-O- α -L-raminopyranosyl-1'- β -D-glicopyranosyl-4', 6-dimethoxyflavone; *Lantana camara* L. ; Flavonoid; antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	<i>Lantana camara</i> L. em seu habitat natural	17
Figura 2:	Estrutura química dos flavonoides	18
Figura 3:	Estado de spin de um núcleo na ausência de campo magnético e quando é afetado por um campo magnético aplicado	22
Figura 4:	Diferença de energia entre os estados de spin versus a força do campo magnético aplicado.	23
Figura 5:	Espectro de RMN de prótons mostrando como os elétrons que estão em volta de um núcleo afetam o campo magnético efetivo sentido pelo núcleo	23
Figura 6:	Estrutura molecular do Tetrametilsilano	25
Figura 7:	Espectro RMN ^1H do 1,1-dicloro-etano	25
Figura 8:	Mecanismos de resistência bacteriana	28
Figura 9:	Parede celular bacteriana Gram-positivas e Gram-negativas	29
Figura 10:	Estrutura molecular do norfloxacino	32
Figura 11:	Estrutura molecular da gentamicina	33
Figura 12:	Estrutura molecular da Penicilina	33

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1:** Valores aproximados de deslocamentos químicos (δ) para a RMN de ^1H . 24
- Quadro 2:** Valores aproximados da constante de acoplamento spin-spin (J) para alguns compostos orgânicos. 26

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Número quânticos de *spin* de vários núcleos

20

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATCC	American Type Culture Collection (ATCC) Coleção de micro-organismos Norte americana
UFC	Unidade Formadora de Colónias
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CIM	Concentração inibitória mínima
DIE	Doenças infecciosas emergentes
DMSO	Dimetilsulfóxido
HRESIMS	High-Resolution Electrospray Ionisation Mass Spectrometry (Espectrometria de massa com ionização por eletronubilização de alta resolução)
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
<i>J</i>	Constante de acoplamento spin-spin
PFTs	Toxinas formadoras de poros
ppm	Parte por milhão
RF	Radiofrequência
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SAGs	Superantígenos de <i>S. aureus</i>
δ	Deslocamento químico
TMS	Tetrametilsilano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 <i>Lantana camara</i> L.	17
2.2 Flavonoides	18
2.2.1 Técnicas de Caracterização Estrutural	19
2.2.1.1 Ressonância Magnética Nuclear	19
2.2.1.2 Número quântico de <i>spin</i> nuclear e estados de <i>spin</i>	20
2.2.1.3 Níveis de em um campo magnético	21
2.2.1.4 Deslocamento químico	23
2.2.1.5 Desdobramento spin-spin	26
2.3 Bactérias e resistência.....	27
2.3.1 Parede celular das bactérias	28
2.3.2 <i>Escherichia coli</i>	30
2.3.3 <i>Staphylacoccus aureus</i>	30
2.3.4 Antibióticos	31
3 RESULTADO E DISCUSSÃO	34
INTRODUCTION	35
MATERIALS AND METHODS	37
Plant material	37
Extraction and isolation of flavonoids.....	37
General	37
Antibacterial assays	37
Microorganisms.....	38
Drugs	38
Antimicrobial activity	39
Antibiotic potentiating activity of the flavonoid pectolinarin	39
Data analysis	39
RESULTS AND DISCUSSION	40
Strutural characterization	40
Antibacterial activity evaluation of the pectolinarin alone and in combination with antibiotics	41
CONCLUSION	43
REFERENCES	44
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

O Brasil por ter uma enorme biodiversidade com particularidades específicas possibilita a identificação de espécies de plantas que produzam algum tipo de constituinte possível de ser usado na produção de fármacos, cosméticos ou biocidas (Petrovska., 2012; Dewick., 2009; Foglio *et al.*, 2006).

Lantana camara L. da família Verbenaceae, é um arbusto com inflorescência, que no Brasil se distribui geograficamente em todas as regiões, ocupando os domínios fitogeográficos da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (Flora Brasil., 2020). *L. camara* é uma importante planta medicinal com diversos usos medicinais no sistema terapêutico popular e tradicional. As substâncias extraídas dessa planta podem ser utilizadas para o tratamento de vários distúrbios humano, tais como antiúlcera, analgésico, antiinflamatório, antimicrobiano, anti-helmíntico, antifúngico anticâncer, antibacteriano e cicatrização de feridas. O óleo de *Lantana* no usado tratamento de coceiras na pele, como anti-séptico para feridas e externamente para hanseníase e sarna (Ved *et al.*, 2018).

Dentre as diversas substâncias encontradas na espécie *L. camara*, destacam-se os flavonoides, com ações farmacológicas, como antioxidante, antienvhecimento, anti-inflamatório, imunomodulador, cardioprotetor, antimicrobiano, antiviral, antibacteriano, antiparasitário e antifúngico (Jucá *et al.*, 2020).

Existe uma preocupação da comunidade científica mundial com a resistência bacteriana, e para enfrentar este grave problema de saúde pública tem se buscado descobrir novos antibióticos e/ou outros produtos antimicrobianos. Visto isso, o uso de substâncias naturais para a modulação da resistência bacteriana a antibióticos, mostra-se uma alternativa para fármacos existentes, que não apresentam mais tanta eficácia no tratamento de infecções bacterianas (Alencar *et al.*, 2015). Considerando o uso de substâncias químicas não antibióticas e a prevalência de bactérias resistentes a antibióticos, é necessário avaliar o potencial dessas substâncias em relação a resistência microbiana aos antibióticos (Lu *et al.*, 2018).

A resistência bacteriana está associada aos antibióticos e moléculas não antibióticas como indutoras dessa resistência, os antibióticos estão se tornando um dos principais mecanismos de

resistência bacteriana, o processo de evolução bacteriana no meio ambiente e em ambientes hospitalares é expressivamente notória e reque mais estudos e opções de medicamentos eficaz no tratamento das diversas infecções causadas por esses organismos patógenos e consequentemente a resistência bacteriana (Silva; Jesus; Taketani., 2020). Os perfis de resistência aos antibióticos alteram se em decorrência das rotinas hospitalares e domiciliares das infecções e como vem sendo de antibióticos nos serviços de saúde (Rodrigues *et al.*,2018).

Diante do exposto, esta pesquisa tem por objetivo determinar a estrutura molecular por Ressonância Magnética Nuclear e espectrometria massas com ionização por eletronubilização de alta resolução do composto isolado da *Lantana camara* L., como também, avaliar a atividade antibacteriana direta do composto isolado pectolinarina e em associação com os antibióticos norfloxacino, gentamicina e penicilina contra cepas padrão e multirresistentes de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Lantana camara* L.

Lantana camara L. (Figura 1), são arbustos encontrados em vários países, onde muitas vezes são cultivados como plantas ornamentais. Esta planta tem sido amplamente estudada quanto aos seus componentes fitoquímicos, dentre eles os terpenoides, flavonoides, glicosídeos feniletanóides, furanonaftoquinonas, glicosídeos iridóides e esteroides sendo os metabólitos secundários mais comumente isolados (DE Sousa *et al.*, 2018). *L. camara* apresenta atividades biológicas tais como, antimicrobiana, fungicida, inseticida, nematocida e farmacológicas em que raízes apresentam alto potencial antioxidante, anti-inflamatório e atividade diurética (bezerra *et al.*, 2016).

Figura 1: *Lantana camara* L. em seu habitat natural.



Fonte: Autora, 2018.

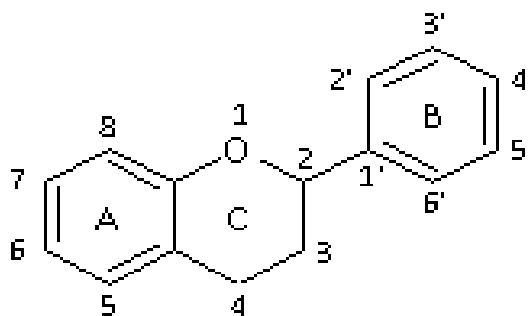
Dentre as diversas substâncias encontradas na espécie *L. camara*, destaca-se o flavonoide 5''-O- α -L-raminopiranosil-1'- β -D-glicopiranosil-4',6-dimetoxiflavona ($C_{29}H_{34}O_{15}$), conhecido

também como pectolinarina, a qual tem um potencial biológico considerável interesse, tanto do ponto de vista químico de produtos naturais como farmacológico (Foseca *et al.*, 2019). Ensaios de atividade antimicrobiana *in vitro* com óleo de *L. camara*, reveraram que este produto natural inibe o crescimento de muitas bactérias, entre elas a *P. vulgaris* e *E. coli*. No entanto a *S. aureus* mostrou ser resistente à ação sinérgica dos componentes químicos deste óleo (Costa *et al.*, 2009). Os extratos metanólicos e acetona brutos da *L. camara* apresentaram atividade antimicrobiana inibindo o crescimento de *Staphylococcus* (Saraf *et al.*, 2011).

2.2. Flavonoides

A estrutura química dos flavonoides (Figura 2), consiste em 15 carbonos organizados em dois anéis aromáticos, ligados por uma cadeia de três carbonos (Ferreira *et al.*, 2008). Sua ação biológica depende da sua estrutura química e da molécula como um todo, visto que, as estruturas básicas de uma dada substância ou constituintes isolados podem sofrer modificações (Huber *et al.*, 2008).

Figura 2: Estrutura química dos flavonoides



Fonte: Karak, 2019.

A determinação da ação dos flavonoides como antimicrobianos eficazes é importante, a sua atividade biológica, ocorre por meio de um transporte regulado e um sistema de acumulação que permite a entrada em diferentes compartimentos subcelulares (Górniak; Bartoszewski;

Króliczewski., 2019). Flavonoides apresentam muitas características biológicas, são fontes ricas de antioxidantes naturais propriedades benéficas para a saúde humana (Karak., 2019). Os flavonoides são substâncias naturais presentes nos vegetais, com funções de proteção como ação contra agentes oxidantes e raios ultravioleta. No organismo humano esta substância é adquirida por meio da alimentação, uma vez que ele não possui a capacidade de produzir essa substância, são encontrados em diferentes partes das plantas, nas frutas, e em legumes. Os flavonoides possuem a propriedade de modular atividades enzimáticas e alterar reações de sistemas celulares, promovendo benefícios ao organismo (Silva; Bieski., 2018).

2.2.1 Técnicas de Caracterização Estrutural

As técnicas de caracterização estrutural são de extrema importância para identificar compostos químicos em geral. Dentre as várias técnicas que podem ser usadas para se determinar a estrutura molecular de um determinado composto destacam-se as técnicas de ressonância magnética nuclear (Holzgrabe.,2010), e a espectrometria de massa com ionização por eletronebulização de alta resolução (Moraes; Lago., 2003). Essas duas técnicas foram usadas para se conhecer a estrutura molecular do constituinte isolado das folhas da planta camará de chumbo (*Lantana camara* L.). Por essa razão, nas seções subsequentes será apresentada uma breve discussão dos fundamentos teóricos destas duas poderosas técnicas, que juntas possibilitam determinar estruturas moleculares de compostos orgânicos de alto peso molecular.

2.2.1.1 Ressonância Magnética Nuclear

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica de determinação estrutural de substâncias químicas, das estruturas moleculares em solução e líquidos puros de substâncias, como também na determinação quantitativa de espécies absorventes. Ela baseia-se na medida de absorção da radiação eletromagnética na região de radiofrequência de aproximadamente 4 a 900 MHz (Holler *et al.*, 2009). A NMR é um fenômeno físico compreendidos pelas leis da mecânica quântica aplicadas ao movimento do spin nuclear. Essa técnica fornece informações de moléculas que permite sua identificação, ao observar o

número quântico de spin nuclear e estados de spin (Dieguez *et al.*, 2018), esse tópico será explicado na sessão seguinte.

2.2.1.2 Número quântico de spin nuclear e estados de spin.

A propriedade *spin* de um núcleo se manifesta quando o núcleo gira. Qualquer núcleo atômico que tenha massa ímpar ou número atômico ímpar, vai ter um momento angular de *spin* e um momento magnético. Os núcleos que têm *spin* mais conhecidos são: ^1H , ^{13}C , ^{19}F , e ^{31}P (Tabela 1), com isso cada núcleo que contenha um *spin*, possui um número de estado de *spin* permitido que é quantizado e determinado pelo seu número quântico de *spin* nuclear (I). Para cada núcleo, o número quântico de *spin* nuclear é uma constante física, e há $2I + 1$ estados de *spin* permitidos, onde I pode assumir um número inteiro ou um número racional. O número quântico de spin dos núcleos ^1H , ^{13}C , ^{19}F , e ^{31}P é $I = 1/2$, assim, cada um desses núcleos tem dois estados de spin ver na tabela 1. Núcleos pesados têm número de spin que vão de $I=0$ (ausência de spin) até no mínimo $I = 9/2$ (Holler *et al.*, 2009).

Tabela 1: Número quânticos de *spin* de vários núcleos.

Elemento	^1_1H	^2_1H	$^{12}_6\text{C}$	$^{13}_6\text{C}$	$^{14}_7\text{N}$	$^{16}_8\text{O}$	$^{17}_8\text{O}$	$^{19}_9\text{F}$	$^{31}_{15}\text{P}$	$^{35}_{17}\text{Cl}$
Número quântico de spin nuclear	$\frac{1}{2}$	1	0	$\frac{1}{2}$	1	0	$\frac{5}{2}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{3}{2}$
Número de estados de spin	2	3	0	2	3	0	6	2	2	4

A atividade da magnetização do spin nuclear, produz campos magnéticos variantes no tempo, devido a influência do próprio spin nuclear, utilizando bobinas que medem as tensões causadas pela rotação da magnetização nuclear (Dieguez *et al.*, 2018).

2.2.1.3 Níveis de energia em um campo magnético

Os estados de *spin* não possuem a mesma energia para um campo magnético aplicado, em virtude de o núcleo ser uma partícula carregada, pois qualquer carga que venha a se deslocar irá gerar um campo magnético próprio. Desta maneira, o núcleo tem um momento magnético gerado por uma carga e por um *spin*. Quando um campo magnético é aplicado, os prótons terão seus momentos magnéticos alinhados com o campo ou opostos a ele. Portanto, na ausência de um campo magnético externo, os vários estados de *spin* de um certo núcleo têm energias idênticas, ou seja, apresentam estados degenerados. No entanto, quando um núcleo de spin é exposto a um campo magnético seu momento angular se orienta em uma das duas direções com respeito ao campo magnético, que dependerá do seu estado quântico magnético (Holler *et al.*, 2009; Bruice, 2006).

A energia potencial, E de um núcleo nas duas orientações, ou estados quânticos é dado por:

$$E = -\frac{\gamma m \hbar B_0}{2\pi} \quad \text{Equação 1}$$

onde γ é a razão giromagnética, \mathbf{m} é o momento magnético, \hbar é a constante de Planck e \mathbf{B}_0 é o campo magnético aplicado. O momento magnético nuclear pode assumir valores que vão de I, I-1, I-2, ..., -I.

Um núcleo com número quântico de spin, I=1/2, terá dois estados de energia, um com m= +1/2 e o outro com m=-1/2.

Para m=-1/2 (estado de spin β) a energia deste estado é:

$$E_{-\frac{1}{2}} = \frac{\gamma \hbar B_0}{4\pi} \quad \text{Equação 1.1}$$

Para m= +1/2 (estado de spin α) a energia deste estado é:

$$E_{+\frac{1}{2}} = -\frac{\gamma \hbar B_0}{4\pi} \quad \text{Equação 1.2}$$

Logo, a variação de energia entre esses estados é:

$$\Delta E = E_{-\frac{1}{2}} - E_{+\frac{1}{2}} = \frac{\gamma h B_0}{2\pi} \quad \text{Equação 1.3}$$

Mas esta variação de energia está relacionada com a frequência ν_0 da radiação necessária para levar a transição, que é dada por:

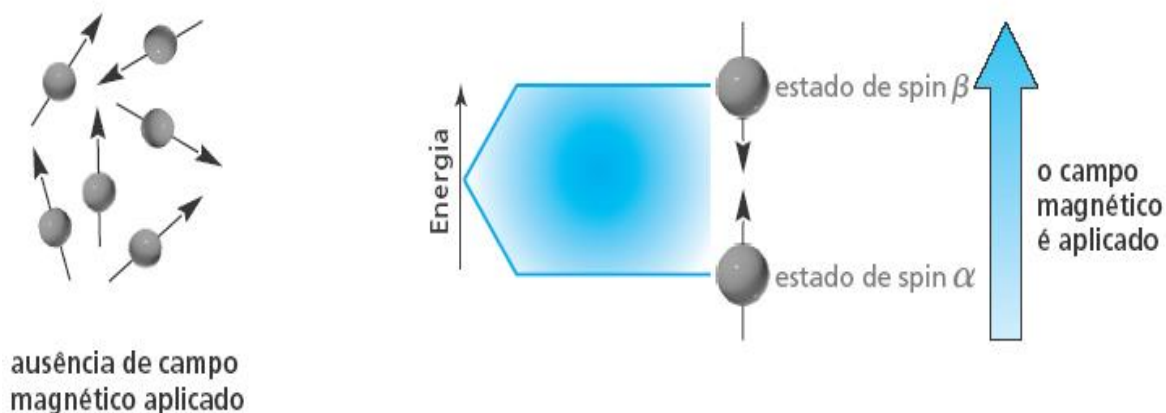
$$\Delta E = h \nu_0 \quad \text{Equação 1.4}$$

Portanto, a radiação de radiofrequência (RF) necessária para levar a transição de $m = +1/2$ para $m = -1/2$ é dada por:

$$\nu_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad \text{Equação 1.5}$$

A Figura 3 abaixo mostra o estado de spin de um núcleo na ausência de campo magnético e quando é afetado por um campo magnético aplicado.

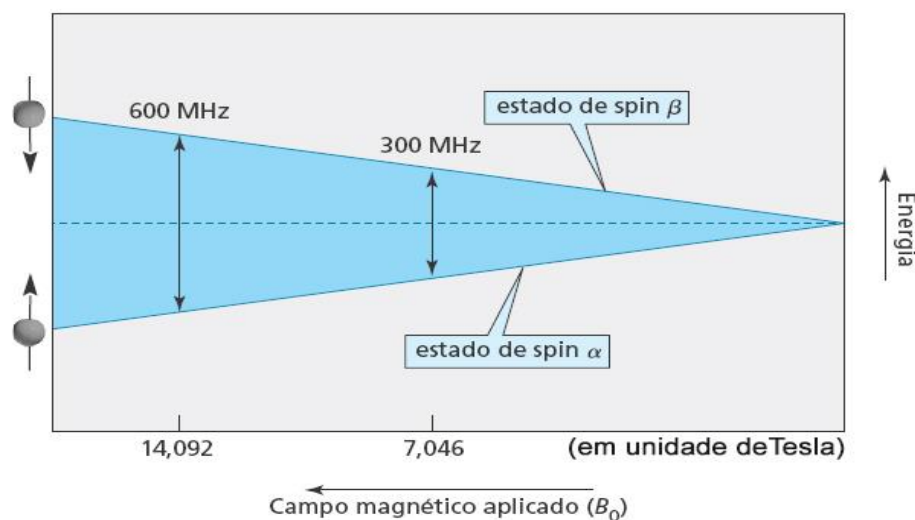
Figura 3: Estado de spin de um núcleo na ausência de campo magnético e quando é afetado por um campo magnético aplicado.



Fonte: Bruice, 2006.

A Figura 4 abaixo mostra que a diferença de energia entre os estados de spin depende da força do campo magnético aplicado.

Figura 4: Diferença de energia entre os estados de spin versus a força do campo magnético aplicado.

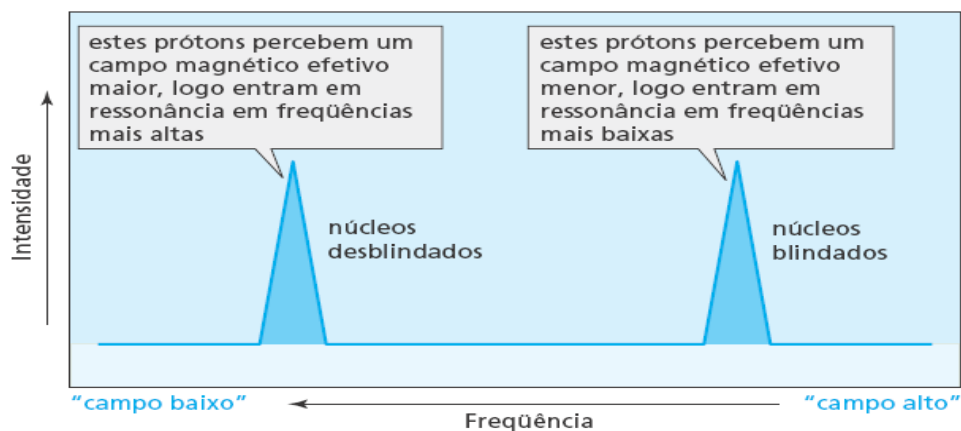


Fonte: Bruice, 2006.

2.2.1.4 Deslocamento químico δ

Os vários picos num espectro de RMN resultam das diferenças em seus ambientes químicos, isto é, pelos elétrons e núcleos vizinhos. A Figura 5 mostra como os elétrons que estão em volta de um núcleo afetam o campo magnético efetivo sentido pelo núcleo.


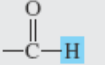
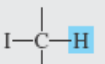
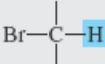
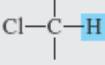
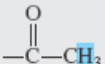
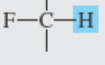
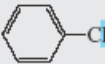
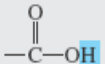
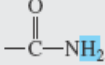
Figura 5: Espectro de RMN de prótons mostrando como os elétrons que estão em volta de um núcleo afetam o campo magnético efetivo sentido pelo núcleo.



Fonte: Bruice, 2006.

Os deslocamentos químicos (δ) são causados por pequenos campos magnéticos gerados pelos elétrons que circulam ao redor dos núcleos. Os deslocamentos químicos são usados na identificação de grupos funcionais e para a determinação de arranjos estruturais de grupos. Estas aplicações são baseadas em correlações empíricas entre estrutura e deslocamento. Os valores exatos de δ dependem da natureza do solvente como também da concentração do soluto, pois os efeitos são diretamente para prótons com ligações de hidrogênio (Holler *et al.*, 2009). O Quadro 1 mostra alguns valores aproximados de deslocamentos químicos (δ) para a RMN de ^1H .

Quadro 1: Valores aproximados de deslocamentos químicos (δ) para a RMN de ^1H .

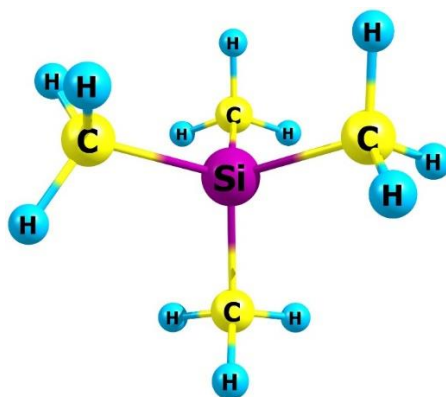
Tipo de próton	Deslocamento químico aproximado (ppm)	Tipo de próton	Deslocamento químico aproximado (ppm)
$(\text{CH}_3)_4\text{Si}$	0		6,5–8
$-\text{CH}_3$	0,9		9,0–10
$-\text{CH}_2-$	1,3		2,5–4
$-\text{CH}-$	1,4		2,5–4
$-\text{C}=\text{C}-\text{CH}_3$	1,7		3–4
	2,1		4–4,5
	2,3	RNH_2	Variável, 1,5–4
$-\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$	2,4	ROH	Variável, 2–5
$\text{R}-\text{O}-\text{CH}_3$	3,3	ArOH	Variável, 4–7
$\text{R}-\text{C}=\text{CH}_2$ R	4,7		Variável, 10–12
$\text{R}-\text{C}=\text{C}-\text{H}$ R R	5,3		Variável, 5–8

^a Os valores são aproximados porque são afetados pelos substituintes vizinhos.

Fonte: Bruice, 2006.

As posições dos picos na escala da abscissa nos espectros de RMN são medidos em parte por milhão (ppm). Este espectro é calibrado em relação à ressonância de uma substância padrão interna. O composto mais usado em RMN de prótons é o Tetrametilsilano (TMS), que tem fórmula molecular $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$. A estrutura molecular do TMS é mostrada na Figura 6.

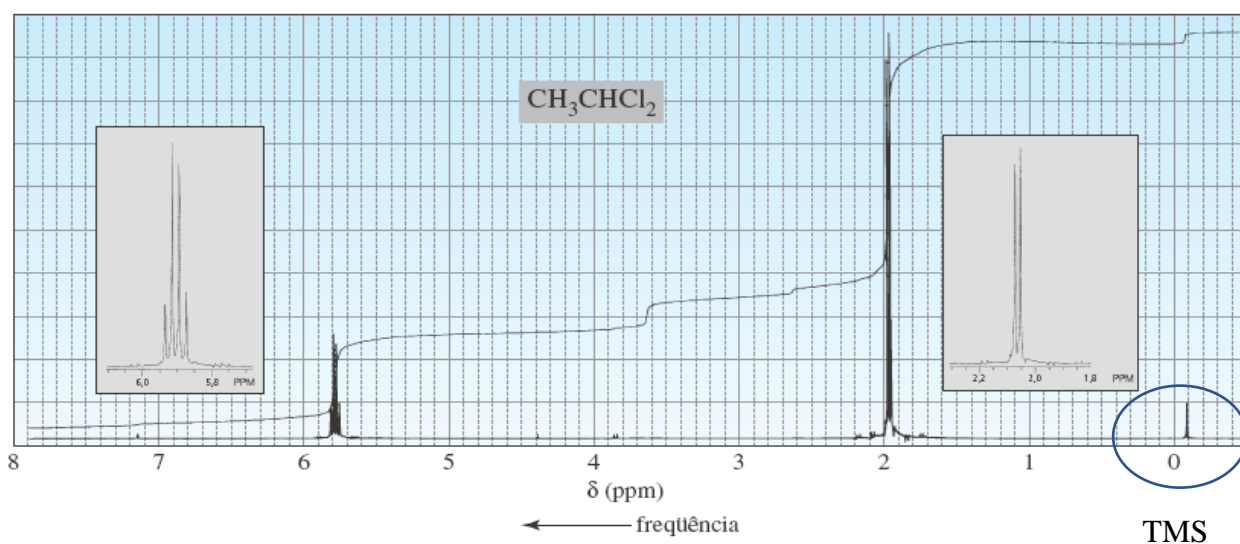
Figura 6: Estrutura molecular do Tetrametilsilano.



Fonte: Autora, 2019.

O Tetrametilsilano-TMS fornece um único pico e em geral aparece isolado dos picos observados do composto analisado, ele é tomado como pico de referência e encontra-se próximo a 0 ppm. Na Figura 7 é mostrado o espectro de próton (RMN ^1H) do 1,1-dicloro-etano.

Figura 7: Espectro RMN ^1H do 1,1-dicloro-etano.



Fonte: Bruice, 2006.

2.2.1.5 Desdobramento spin-spin

Um sinal de RMN de prótons de ^1H de um dado composto orgânico não se sobrepõe, ele é desdobrado em $N + 1$ picos, onde N é o número de prótons equivalentes ligados a carbonos adjacentes. O número de picos é denominado de multiplicidade. Assim, para a banda do metileno em etanol é determinado pelo número de prótons nos grupos metílicos adjacentes, e é igual a $3+1=4$ (Holler *et al.*, 2009).

O desdobramento de sinais, causando acoplamento *spin-spin*, ocorre quando tipos diferentes de prótons estão perto o bastante um do outro, de modo que ocorrem interações entre núcleos e elétrons ligantes e não através do espaço livre entre eles. Este efeito é medido pela constante de acoplamento spin-spin (J). A constante de acoplamento J é a distância, em hertz, entre dois picos adjacentes de um sinal de RMN desdobrado. No Quadro 2 é dado alguns valores aproximados da constante de acoplamento spin-spin (J) para alguns compostos orgânicos.

Quadro 2: Valores aproximados da constante de acoplamento spin-spin (J) para alguns compostos orgânicos.

Valor aproximado de J_{ab} (Hz)	Valor aproximado de J_{ab} (Hz)
 7	 15 (trans)
 0	 10 (cis)
 2 (acoplamento geminal)	 1 (acoplamento a longa distância)

Fonte: Bruice, 2006.

2.3 Bactérias e resistência

Com a ocorrência de doenças infecciosas emergentes (DIE) alterações no quadro de doenças com potencial para o aumento da incidência causadas por agentes infecciosos, e em virtude da exposição humana a novos e incomuns agentes patógenos em áreas que estão passando por mudanças ecológicas, como desmatamento e construção, essas DIES também podem desenvolver resistência antimicrobiana como por exemplo a *S. aureus* resistente à vancomicina. O crescente número de casos nos últimos anos ressalta a extensão do problema (Tortora *et al.*, 2017).

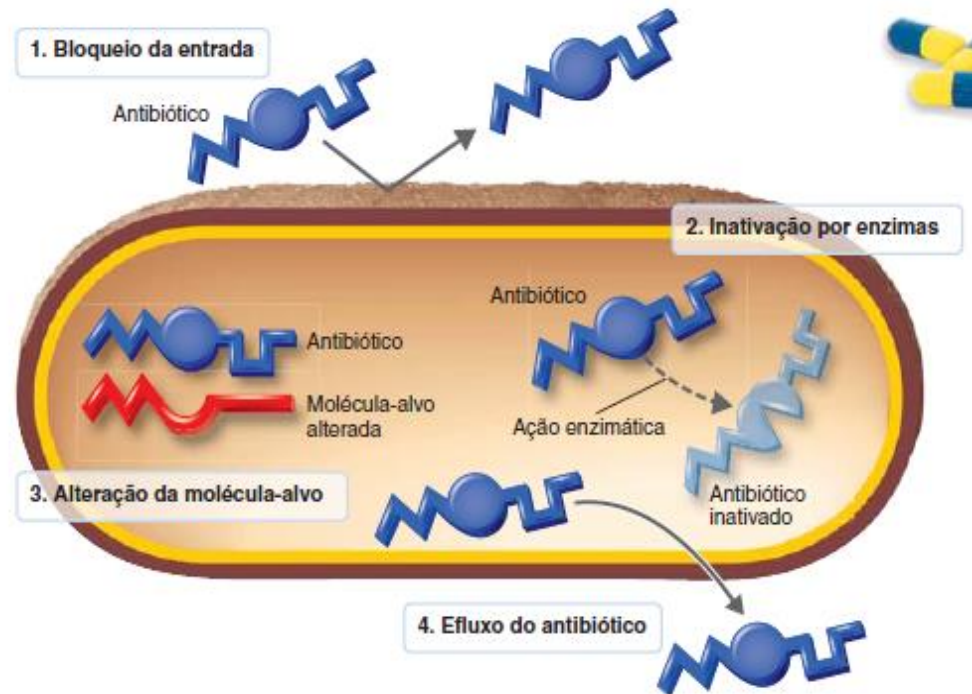
A resistência microbiana não se restringe ao ambiente clínico, os diferentes ecossistemas estão diretamente interligados à ecologia de genes de resistência aos antibióticos. Um dos ambientes mais estudados tem sido o solo, em busca de compreendermos a influência e os efeitos que a atividade humana pode ter no ecossistema desses organismos patógenos (Ospino *et al.*, 2018). A proliferação desses organismos ocorre de maneira rápida podendo ser encontrado contaminação em alimentos como em especiarias, estudos identificaram a presença de *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella* spp. Estes apresentam alto índice de resistência a diversos antimicrobianos um destes é β -lactâmicos (Costa *et al.*, 2020).

Diferentes linhagens bacterianas apresentam diferentes perfis de resistência aos antibióticos disponíveis no mercado, um fator preocupante, pois há uma alta prevalência de cepas resistentes a múltiplos antibióticos, submetendo a população a opções terapêuticas muito restritas. Essa resistência aos fármacos geralmente se dá por meio dos plasmídeos ou por segmentos de DNA, os transposons, que podem saltar de um pedaço de DNA para outro transmitido as informações necessárias para o desenvolvimento da resistência. Adquiridas as informações, as mutações são transmitidas através da reprodução e a patogenicidade passa ser a característica genética dos micróbios parentais. Considerando à alta taxa de reprodução bacteriana, em um curto período é possível que uma população bacteriana passe a ser resistente ao novo antibiótico (Trabulsi *et al.*, 2016).

Os principais mecanismos de resistência são associados a destruição ou inativação enzimática do fármaco, prevenção da entrada no sítio-alvo dentro do micróbio, alterações no

sítio-alvo do fármaco, efluxo rápido do antibiótico e das variações dos mecanismos de resistência (Tortora *et al.*, 2017). A Figura 8 ilustra o mecanismo de resistência bacteriana.

Figura 8: Mecanismo de Resistencia bacteriana.

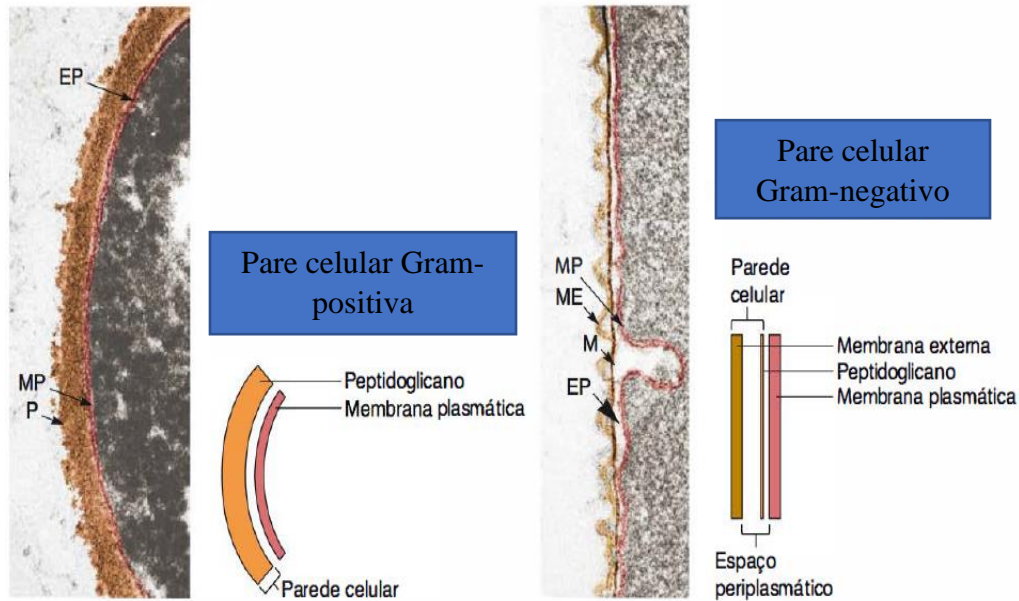


Fonte: Tortora *et al.*, 2017.

2.3.1 Parede celular das bactérias

Nos componentes característicos da parede celular das bactérias Gram-positivas, elas são menos complexas que as Gram-negativas. As paredes são compostas de 70 a 75% de Peptideoglicano, as proteínas e ácidos teicóicos podem representar até 50% da massa seca de sua parede. Os Componentes característicos da parede das bactérias Gram-negativas são mais complexas. Esta é formada por uma ou poucas camadas de peptideoglicano com uma membrana externa. O espaço periplasmático separa a membrana citoplasmática da membrana externa da célula (Brooks *et al.*, 2014). A Figura 9 mostra a parede celular bacteriana Gram-positivas e Gram-negativas.

Figura 9: Parede celular bacteriana Gram-positivas e Gram-negativas.



Fonte: Brooks *et al.*, 2014.

A membrana externa em bactérias Gram-negativas lhe dá características importantes quando comparadas com a membrana das bactérias Gram-positivas. O polissacarídeo tem uma forte carga positiva na membrana externa, fator esse que está associado na ação de evasão de células fagocitárias bacterianas como também na invasão de um hospedeiro. Esta membrana funciona como uma barreira adicional para impedir à entrada de algumas substâncias como os antibióticos, metais pesados, enzimas digestivas e alguns corantes (Trabulsi *et al.*, 2016).

A identificação de diferenciação entre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas é de grande relevância em ambiente hospitalar, pois as respostas a tratamentos das infecções destas são diferentes, as bactérias gram-positivas possuem uma parede celular mais espessa, no entanto, mais simples já as gram-negativas sua estrutura é complexa com uma parede envolta por uma membrana externa com proteínas específicas que realizam a difusão seletiva com o ambiente, impedindo a permeabilidade de alguns antibióticos. Como exemplo de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas pode-se citar *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, respectivamente (Maranni; Cena, 2019). A *S. aureus* e a *E. coli* apresentam perfil de resistência aos antibióticos Azitromicina; Amoxicilina; Ampicilina; Amicacina; Amoxilina, Cefalexina; cefaclor; Cefalotina; Ceftazidima; Ciprofloxacino; Clorafenicol; Imipenem; Canamicina;

Sulfametoxazol; Tetraciclina; Tobramicina; Oxacilina; Gentamicina; Neomicina; Paramomicina; Butirosine; Sis-Sisomicina; Netilmicina (Cruz *et al.*, 2016). Essas bactérias serão melhor abordadas nos próximos tópicos.

2.3.2 *Escherichia coli*

Pertencente à família Enterobacteriaceae da ordem Enterobacteriales, a *E. coli* é um organismo que pode ser encontrado no intestino humano (Tortora, 2004). *E. coli* também é causadora de prejuízos para a indústria alimentícia por ser um importante agente etiológico de infecções urinárias dos suínos uma vez que, estes e outros animais podem ser infectados e posteriormente serem comercializados (Brito *et al.*, 2004). *E. coli* demonstrou ter fatores de virulência que causam diarreia neonatal bovina (Klaus *et al.*, 2020).

Escherichia coli possui vários componentes bem identificados que contribuem para sua capacidade de causar infecções: o pili, uma cápsula, endotoxina e três exotoxinas (enterotoxinas). A espécie como agente infeccioso de humanos e animais é encontrada na própria microbiota deste, considerando quantidade de hospedeiros e os diferentes ambientes nos quais se encontram, a proliferação dessa bactéria ocorre com certa facilidade, sendo responsável por causar várias infecções como a meningite neonatal, em que a criança tem contato no canal de parto materno com a bactéria (Levinson., 2010). Responsável também por infecções do trato urinário (Tavares *et al.*, 2020).

2.3.3 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus pertence à família Staphylococaceae da ordem Bacillales (Paradisi., 2001). Entre as bactérias mais resistentes, as espécies *Staphylococcus aureus* pode ser considerado como um dos principais agentes infecciosos causando diferentes infecções aos hospedeiros nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (Rodrigues *et al.*, 2018). Quando *S. aureus* torna-se agente etiológico de diferentes infecções características, elas são pertencentes a três categorias de doença: As Infecções superficiais consistem de infecções supurativas resultando na formação de pus nos tecidos moles superficiais; as Infecções profundas onde ocorre

a disseminação por bacteremia das células bacterianas e a sua instalação em sítios distantes do local de entrada na via sistêmica e as síndromes toxigênicas, constituindo-se como síndromes associadas à produção de toxinas, muitas vezes com ação sistêmica ou à distância (Trabulsi *et al.*, 2016).

Os agravos da saúde causadas por *S. aureus* ocorrem em virtude da presença e da expressão de genes que codificam os fatores de virulência na cepa. No entanto, a linhagem dessa espécie possui a mesma constituição devido a sua maleabilidade genômica e a prevalência desses genes que levam à patogênese varia nas subpopulações. Por nem todas as cepas de *S. aureus* possuem a capacidade de causar algum tipo de infecção ou intoxicação, é o conjunto de genes acessórios de virulência presentes e ativos na cepa que são expressos apenas em determinadas condições e a instalação do processo infeccioso depende da resposta do hospedeiro à infecção (Trabulsi *et al.*, 2016). Quando *S. aureus* é um agente infeccioso expressa Superantígenos SAg e toxinas PFTs, interrompendo o sistema imunológico inato e adaptativo do hospedeiro (Miller *et al.*, 2020).

2.3.4 Antibióticos

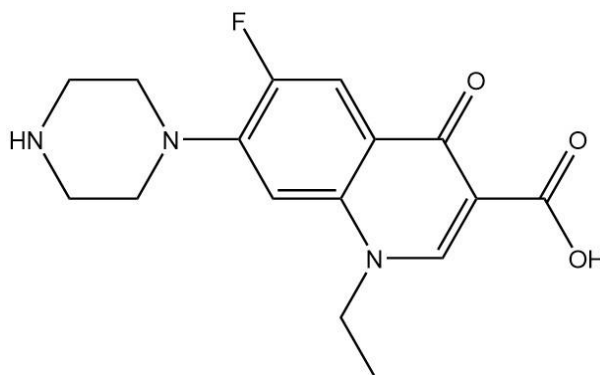
A necessidade de produzir antibióticos surgiu em meio a II Guerra Mundial para tratamento dos soldados, os investimentos feitos permitiram a determinação estrutural da penicilina o primeiro antibiótico a ser produzido (Calixto; Cavalheiro., 2012).

Os avanços conquistados na identificação e caracterização de novos alvos macromoleculares é relevante na compreensão dos mecanismos de ação de antibióticos em associação com outras substâncias, onde os diversos efeitos podem ser responsáveis pela potencialização da mesma, a partir dessa interação que ocorrem as contribuições de maneira diferenciada para a atividade antibacteriana, surgindo assim a possibilidade do desenvolvimento de novos agentes bactericidas (Silveira., 2006). Em estudos a associação entre antibióticos demonstrou sinérgismo e diminuição da resistência microbiana fato pelo qual alguns antibióticos ação em alvos diferentes, melhorando a capacidade antimicrobiana (Coutinho *et al.*, 2015).

Os antibióticos Norfloxacin, Gentamicina e Penicilina descritos abaixo foram utilizados nesta pesquisa em associação com um composto onde pode ser observado se essas substâncias inibiram ou não o crescimento de bactérias multirresistentes.

A Norfloxacin (Figura 10) é classificada terapeuticamente como antimicrobiano da classe das fluoroquinolonas. Seu uso está associado ao tratamento de infecções complicadas ou não do trato urinário causadas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas suscetíveis (INFINITYPHARMA, 2019a).

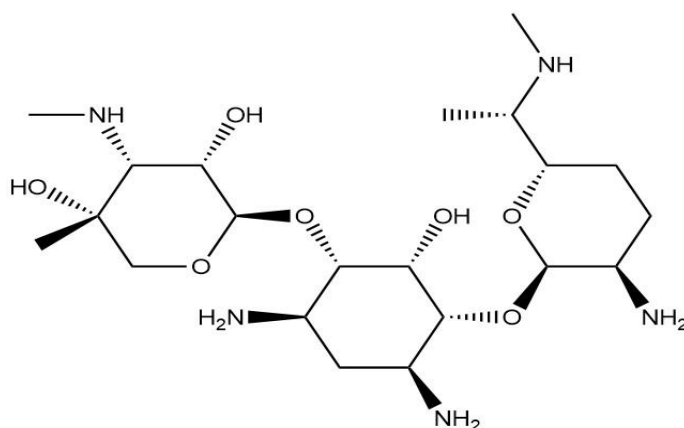
Figura 10: Estrutura molecular do norfloxacin.



Fonte: AUTORA, 2019.

Gentamicina (Figura 11) é um antibiótico da classe dos aminoglicosídeos eficaz contra muitos micro-organismos Gram-negativos e Gram-positivos aeróbicos. Pode ser utilizado no tratamento de diversos tipos de infecções bacterianas, particularmente àquelas causadas por bactérias Gram negativas, sendo é capaz de eliminar as infecções bacterianas no pulmão, pele, articulações, estômago, sangue e do trato urinário. Os aminoglicosídeos são mais amplamente utilizados contra os microrganismos entéricos Gram-negativos (Infinitypharma, 2019b). É um dos antibióticos mais consumidos devido ao seu baixo custo, amplo espectro de ação antibacteriano e solubilidade em água. Age ligando-se aos componentes da célula bacteriana e induzindo a produção de proteínas anormais, extremamente letais para elas (Virto *et al.*, 2003).

Figura 11: Estrutura molecular da gentamicina.

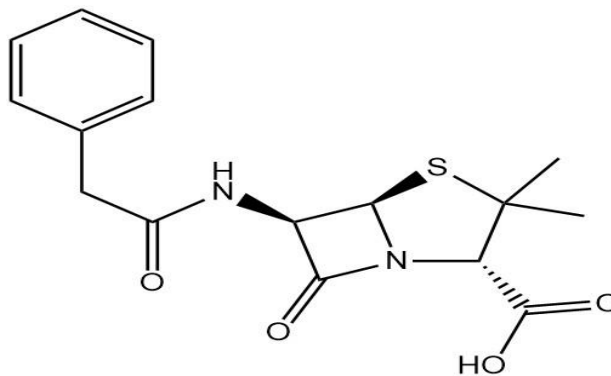


Fonte: Autora, 2019.

A Penicilina foi o primeiro antibiótico a ser desenvolvido e utilizado contra bactérias patogênicas no ser humano. Pela descoberta da penicilina e pelos seus efeitos curativos em diversas doenças infecciosas, Fleming, Chain e Flory recebem em 1945 o Prêmio Nobel da Medicina (Calixto; Cavalheiro.,2012).

Penicilinas (Figura 12) o grupo dos antibióticos β -lactâmicos são caracterizados por três aspectos estruturais em comum: estrutura blactama condensada; Carboxila livre e um ou mais grupo amino substituídos na cadeia lateral. Todas as penicilinas possuem a mesma estrutura geral β -lactâmica tiazolidínica, sendo que a intensidade da atividade antibacteriana depende da estereoquímica da cadeia lateral (Koyama *et al.*, 2012).

Figura 12: Estrutura molecular da Penicilina.



Fonte: Autora, 2019.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Modulating antibacterial activity against multidrug-resistant *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* of the flavonoid pectolinarin isolated from *Lantana camara* leaves

M.R. Xavier^a, A.M. Fonseca^b, B.G. Cruz^a, A.M.S. Mendes^b, H.S. Santos^{a,c*}, P.N. Bandeira^c, R.P. Colares^d, K.M. Canuto^e, P.R.V. Ribeiro^e, R. Braz-Filho^f, T.S. Freitas^a, H.D.M. Coutinho^a, A.M.R. Teixeira^a

^a Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, Crato, CE, Brazil

^b Departamento de Química, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Redenção, CE, Brazil

^c Centro de Ciências Exatas e Tecnologia - Curso de Química, Universidade Vale do Acaraú, Sobral, CE, Brazil

^d Instituto de Ciências Exatas e da Natureza, Campus Auroras, Universidade da Integração Internacional e da Lusofonia Afro-Brasileira, 62790-970, Redenção, CE, Brazil.

^e Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais-Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, Brazil

^f Laboratório de Ciências Químicas, Universidade estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro/UeNF, Campos dos goytacazes, RJ, Brazil

*Corresponding author.

E-mail address: helciodossantos@gmail.com

ABSTRACT

The flavonoid glycoside 5''-O- α -L-raminopyranosyl-1'- β -D-glycopyranosyl-4',6-dimethoxyflavone (C₂₉H₃₄O₁₅), also known as pectolinarin was isolated for the first time from *Lantana camara* L. and had its structure determined by nuclear magnetic resonance (NMR) and high-resolution electrospray ionization mass spectrometry (HRESIMS). In addition, tests for antibacterial activity of the pure natural substance and analysis of the potentiation of antibacterial activity of pectolinarin associated with antibiotics were carried out against standard and multiresistant bacterial strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by microdilution. Pectolinarin, when combined with the antibiotic gentamicin, showed synergism, potentiating growth inhibition against gram-positive *S. aureus* strains.

Keywords: Pectolinarin; flavonoid; *Lantana camara* L.; antibacterial activity.

INTRODUCTION

Flavonoids are one of the most diverse and important classes among plant chemical constituents, with over 6,000 flavonoids described [1-4]. Flavonoids present as their most significant subclasses: anthocyanins, catechins, chalcones, dihydroflavonols, flavonols, flavones, flavanones, and isoflavones [5].

In plants, certain functions such as protection against pathogenic microorganisms, antioxidant action, allelopathic action, enzymatic inhibition, and protection against the incidence of ultraviolet rays are attributable to flavonoids [6-8].

From the flavonoid subclasses, flavones stand out given their protective action, protecting plant cells from damage caused by photooxidation [9], as well as protecting the body against free radical species [10].

Substances extracted from plants have been arousing much scientific interest due to the diversity of the biological activities they present [11-15]. One such plant species that has been of interest to the scientific community is the *L. camara* from the Verbenaceae family, originating from the Americas and Africa [16]. *L. camara* is a plant that possesses a toxin, which considering its toxicity, has been used as a repellent against *Aedes* mosquito larvae [17].

Medicinal plants are an important source for obtaining new molecules. While several synthesis methods are used to get effective drugs to treat certain diseases, plants can produce chemical constituents that are difficult to obtain through synthesis procedures [18]. In this context, obtaining new substances isolated from medicinal plants and investigating their structural and pharmacological properties is essential.

In the present study, the natural compound 5''-O- α -L-raminopyranosyl-1'- β -D-glycopyranosyl-4',6-dimethoxyflavone (C₂₉H₃₄O₁₅), popularly known as pectolinarin, was isolated from *L. camara* and its structural determination was confirmed using the Nuclear Magnetic Resonance (NMR) technique. Besides, pure natural substance antibacterial activity assays and antibiotic potentiating activity analysis were performed against standard and multidrug-resistant *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacterial strains.

Materials and Methods

Plant material

Leaves from *L. camara* were collected in Vale do Alemão site in Pernambuco, Guaramiranga-Ceará (Brazil) district (S4°12'22.7" and W38°57'00.8") in March 2016. The material was identified by Dr. Maria Iracema Bezerra Loiola at the Herbário Prisco Bezerra (EAC), Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil, where the voucher specimens (No. 0056696) were deposited.

Extraction and isolation of flavonoids

Leaves (100 g) of *L. camara* were ground to powder and extracted with ethanol (EtOH) at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure to give an EtOH extract. The EtOH extract (35.49 g) was fractionated coarsely on a silica gel column by elution with hexane, EtOAc and MeOH. The ethyl acetate fraction resulted in the formation of a precipitate yielded bioside flavone named 5''-O- α -L-raminopyranosyl-1'- β -D-glycopyranosyl-4',6-dimethoxyflavone.

General

¹H and ¹³C NMR spectra were obtained using a Bruker Spectrometer, model Avance DPX - 300, and model Avance DRX-500 operating at a frequency of 300 MHz and 500 MHz for hydrogen and 75 MHz and 125 MHz for carbon, respectively. The spectra were measured in CD₃OD solvent, and chemical shifts are reported as δ values in parts per million (ppm). Silica gel 60 (230-400 mesh, Merck) was used for analytical TLC, and silica gel 60 (70-230 mesh, Merck) was used for column chromatography. TLC using vanillin-perchloric acid-EtOH, followed by heating, visualized the compound.

Antibacterial assays

The antibacterial assays were performed at the Laboratory of Microbiology and Molecular Biology at the Regional University of Cariri (URCA), Crato-CE, Brazil. The pectolinarin was solubilized in 1 mL of Dimethyl sulfoxide (DMSO-Merck, Darmstadt, Germany) to obtain an initial concentration of 10 mg/mL. This solution was then diluted

with distilled water to a concentration of 1024 µg/mL, and from this, 1:1 serial dilutions were performed to obtain concentrations ranging from 512 to 0.5 µg/mL.

Microorganisms

The standard microorganisms used in the tests were obtained through the National Institute for Quality Control in Health (INCQS) of the Oswaldo Cruz Foundation, Ministry of Health, and the multi-resistant ones were obtained from the Federal University of Pernambuco- UFPB. The bacterial strains used were *Escherichia coli* (standard *E. coli* ATCC 10536 and multidrug-resistant *E. coli* 27) and *Staphylococcus aureus* (standard *S. aureus* ATCC 25923 and multiresistant *S. aureus* 358), with their resistance profiles being identified and reported in Table 1[19]. All strains were maintained on Heart Infusion Agar (HIA, Difco Laboratories Ltda.). Prior to the assays, the strains were cultured for 24h at 37°C in Heart Infusion Agar (HIA, Difco Laboratories Ltda.).

Table 1. Origin of bacterial and antibiotic resistance profile

Bacterium	Origin	Resistance profile
<i>Escherichia coli</i> 27	Surgical wound	Ast, Ax, Amp, Ami, Amox, Ca, Cfc, Cf, Caz, Cip, Clo, Im, Can, Szt, Tet, Tob
<i>Escherichia coli</i> ATCC10536	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 358	Surgical wound	Oxa, Gen, Tob, Ami, Can, Neo, Para, But, Sis, Net
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	-	-

Ast-Aztreonam; Amp-Ampicillin; Ami-Amicilina; Amox-Amoxicillin; Ca-Cefadroxil; Can- Kanamycin; Caz-Ceftazidime; Cip-Ciprofloxacin; Cfc-Cefaclor; Cf-Cephalothin; Clo-Chloramphenicol; Imi-Imipenem; Szt-Sulfamethoxazole and Trimethoprim; Tet-Tetracycline; Tob-Tobramycin; But-Butirosina; Gen-Gentamicin; Neo-Neomycin; Net-Netilmicin; Oxa-Oxacillin; Para-Paramomicina; Sis-Sisomicin.

Drugs

The antibiotics gentamicin (aminoglycoside), norfloxacin (fluoroquinolone), and penicillin (β-lactam) were used to evaluate the antibiotic potentiating activity of the pectolinarin flavonoid. All drugs were diluted in sterile water to concentration 5000 mg/mL. The solutions were prepared following the recommendations of the National Clinical Laboratory Standards Committee - NCCLS [20].

Antimicrobial activity

The MIC (minimum inhibitory concentration) was determined in a 96 well sterile microdilution assay [21] 100 μL of the inoculum suspension (10^5 CFU/mL^{-1}) were removed and added to a Brain Heart Infusion broth (10% BHI), thereafter 100 μL of this solution was added to each well, followed by 100 μL of the pectolinarin compound which was added to the first well, followed by serial (1:1) dilutions up to the penultimate well of the microplate. The final concentration of the sample ranged from 512 - 8 $\mu\text{g/mL}$. The MIC was recorded as the lowest concentration capable of inhibiting growth.

Antibiotic potentiating activity of the flavonoid pectolinarin

The pectolinarin compound was evaluated as a potentiator of antibiotic action against clinically isolated microorganisms. The MIC of the antibiotics was evaluated in the presence and absence of the test solution in sterile microplates. The antibiotics were evaluated at concentrations ranging from 2500 to 2.5 $\mu\text{g/mL}$.

The test solution at subinhibitory concentrations (MIC/8) was mixed with 10% BHI broth and the inoculum suspensions [22]. Then, 100 μL of the antibiotic was added to the first well of the plate, and serial dilutions (1:1) were performed up to the penultimate well of the microplate. The plates were incubated at 37 °C for 24 hours, and after this period, the reading was observed using resazurin.

Data analysis

Test results were performed in triplicates and expressed as the geometric mean. Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test, performed using the GraphPad Prism 6.02 software, considering significance with $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Structural determination

The ^1H NMR spectrum exhibits methyl signals due to rhamnose at δ_{H} 1.17 (d, $J=6.2$ Hz), two oxygenated methylene glucose protons equivalent to δ_{H} 3.9 (m) (br d, $J=9.9$ Hz), two singlet signals for two methoxy groups at δ_{H} 3.76 (s) and 3.85 (s) (3H, s), two anomeric protons at δ_{H} 4.25 (s) and 4.82 (d) (d, $J=7.2$ Hz), two aromatic protons at 6.88 (s) and 6.92 (s), and a AA'BB' coupling system at δ_{H} 8.02 (d, 8.9) and 7.15 (d, 8.9) (Figure 3). The carbon resonance spectrum (^{13}C NMR) presented 29 carbon signals, classified by the chemical shift and heteronuclear single quantum coherence (HSQC) spectrum values as two sugars (rhamnose: δ_{C} 17.78, 68.32, 70.44, 70.82, 72.06 and 100.45, and glucose: 66.02, 69.57, 73.20, 75.78, 76.48 and 100.45), two carbon methoxyl (δ_{C} 55.64 and 60.43), four sp^2 carbons (δ_{C} 103.43, 94.46, 114.85 (2xC) and 128.52 (2xC)), nine sp^2 quaternary carbons (δ_{C} 106.01, 122.80, 132.81, 152.29, 152.30, 156.57, 162.51 and 164.23) and a carbonyl carbon at δ_{C} 182.42. NMR spectral data are compatible with the structure of pectolinarin presented in Figure 1. Compound (**1**) was obtained as a pale brown powder with the molecular formula $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{O}_{15}$ as determined by HR-ESI-MS at m/z 622.1898 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calc. for 623.1898) [23].

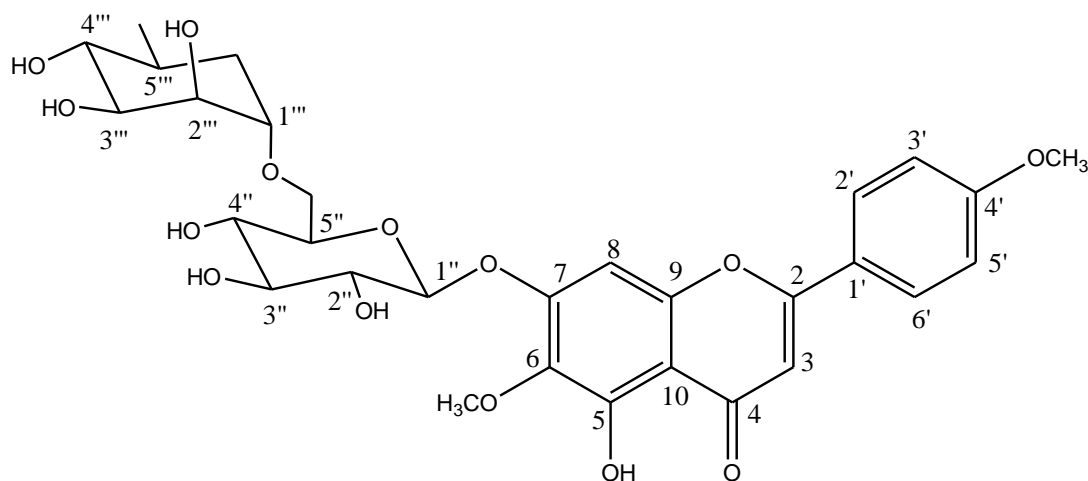


Figure 1. Molecular structure of the pectolinarin.

Antibacterial activity evaluation of the pectolinarin alone and in combination with antibiotics

The minimum inhibitory concentration (MIC) obtained for the flavone pectolinarin was $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$. Thus no differences were observed in the sensitivity of the pure natural substance against standard bacterial *S. aureus* and *E. coli* strains. However, the modulation by associating pectolinarin with gentamicin hears a change from resistant to sensitive with *S. aureus* 358. See at (Table 2).

Table 2: Pectolinarin microbiological data.

MIC		
Bacterial strain		
<i>E. coli</i> 27	$\geq 1024 \mu\text{g/mL}$	
<i>E. coli</i> ATCC10536	$\geq 1024 \mu\text{g/mL}$	
<i>S. aureus</i> 358	$\geq 1024 \mu\text{g/mL}$	
<i>S. aureus</i> ATCC25923	$\geq 1024 \mu\text{g/mL}$	
Modulation		
	<i>S. aureus</i> 358	<i>E. coli</i> 27
Gentamycin	40,32 $\mu\text{g/mL}$	40,32 $\mu\text{g/mL}$
Penicillin	512 $\mu\text{g/mL}$	$\geq 1024 \mu\text{g/mL}$
Norfloxacin	512 $\mu\text{g/mL}$	101,59 $\mu\text{g/mL}$
Gentamycin + Pectolinarin	8 $\mu\text{g/mL}$	40,32 $\mu\text{g/mL}$
Penicillin + Pectolinarin	$\geq 1024 \mu\text{g/mL}$	$\geq 1024 \mu\text{g/mL}$
Norfloxacin+ Pectolinarin	512 $\mu\text{g/mL}$	128 $\mu\text{g/mL}$

The MIC determination of the antibiotics norfloxacin, gentamicin and penicillin in the presence and absence of the pectolinarin substance at a subinhibitory concentration ($\text{MIC}/8 = 128 \mu\text{g/mL}$) against multiresistant *S. aureus* 358 and *E. coli* 27 bacteria are shown in Figure 2.

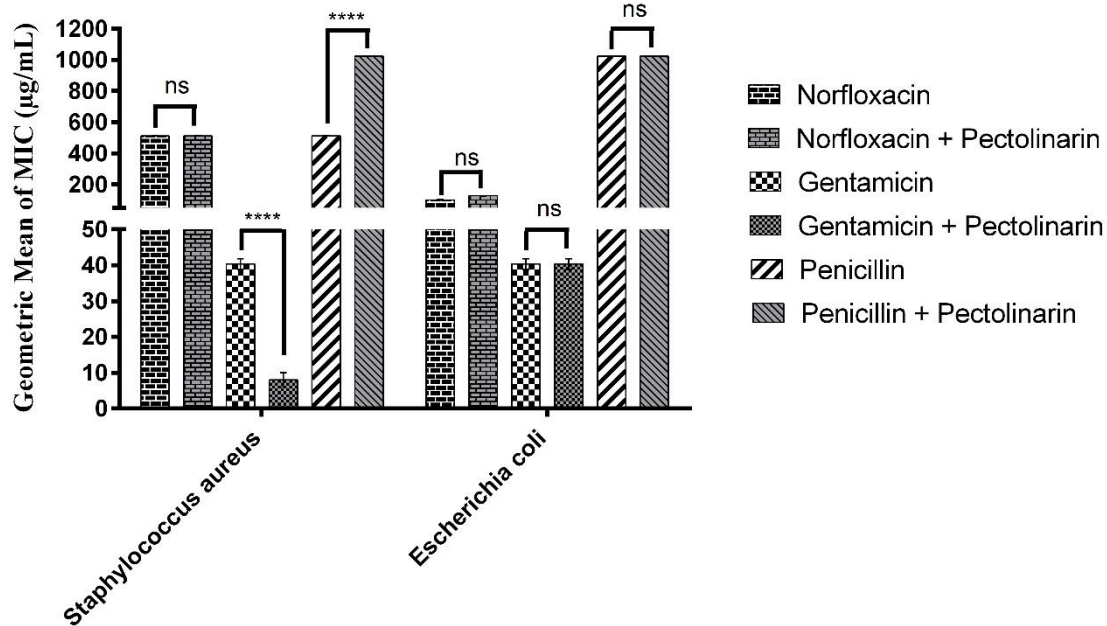


Figure 2. MIC of the antibiotics norfloxacin, gentamicin, and penicillin in the presence and absence of the pectolinarin in concentration MIC/8 (128 µg/mL), towards *S. aureus* 358 and *E. coli* 27. Statistically significant values with **** $p < 0.0001$ - Non significant values (ns) with $p > 0.05$.

In the antibiotic activity test against *S. aureus* 358, pectolinarin was seen to potentiate the inhibition of bacterial growth when associated with gentamicin, showing significant synergism with $p < 0.0001$. An antagonistic effect was observed with the association of the compound with penicillin with a significance of $p < 0.0001$, while non-significant results were obtained with the antibiotic norfloxacin. When *E. coli* 27 was the bacterial strain tested, no significant changes in MICs were observed with the association of pectolinarin with the tested antibiotics.

Aminoglycosides present bactericidal action against aerobic Gram-negative bacteria, some staphylococci, and *Mycobacterium tuberculosis* [24,25]. However, Gram-positive bacteria are more sensitive to antimicrobial action due to the presence of a bacterial wall that normally does not restrict the penetration of toxic molecules into the bacteria, whereas Gram-negative bacteria possess a barrier system consisting of an outer membrane with a cell wall formed by phospholipids, lipopolysaccharides and proteins making it impermeable to antibacterial agents, resulting in a greater resistance of these bacteria to antibiotics [26,27].

In vitro studies have shown that pectolinarin possesses antiviral activity against the herpes simplex HSV-1 and dengue DENV-2 virus [28], anti-inflammatory and anti-allergic actions [29], as well as presenting an effective hepatoprotective action in a rat model of liver damage caused by D-galactosamine [30].

Antimicrobial resistance has become a major public health problem affecting all countries [31,32], where antimicrobial resistance may be a natural phenomenon developed by the pathogenic organism itself. However, the poor use of medications accelerates this process increasing resistance levels [33].

Treating various types of infectious diseases has become difficult, mainly due to the low efficiency of antimicrobials against today's bacteria [34,35], which reinforces the need for the validation of new plant-derived drugs through research that will be useful in combating the spread of pathogenic microorganisms.

CONCLUSION

In this work, we presented for the first time the extraction and isolation of the flavonoid glycoside pectolinarin from *Lantana camara* L. leaves. The molecular structure of this natural product was determined by NMR and HRESIMS. Antibacterial activity assays of the pectolinarin alone and in combination with antibiotics were performed against standard and multidrug-resistant *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacterial strains. The pectolinarin flavonoid when combined with the gentamicin antibiotic potentiated its action gram-positive *S. aureus* bacteria. Moreover, an antagonistic effect was observed when the pectolinarin was combined with the penicillin antibiotic against the multiresistant *S. aureus* 358 strain. This research suggests that pectolinarin is a promising compound with potential application as an antibacterial drug.

Acknowledgments

The authors thank the EMBRAPA AGROINDÚSTRIA TROPICAL-Multiuser Laboratory of Natural Product Chemistry by obtaining the spectral data.

REFERENCES

1. Machado H, Nagen TJ, Peters VM, Fonseca CS, Oliveira TT (2008) Flavonoids and potential therapeutic. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução* 27:33-39
2. Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F (1999) Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences* 65 (4):337-353. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(99\)00120-4](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(99)00120-4)
3. Le Marchand L (2002) Cancer preventive effects of flavonoids—a review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 56 (6):296-301. [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(02\)00186-5](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(02)00186-5)
4. Yang CS, Landau JM, Huang M-T, Newmark HL (2001) Inhibition of Carcinogenesis by Dietary Polyphenolic Compounds. *Annual Review of Nutrition* 21 (1):381-406. 10.1146/annurev.nutr.21.1.381
5. Cook NC, Samman S (1996) Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 7 (2):66-76. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(95\)00168-9](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(95)00168-9)
6. Harborne JB, Williams CA (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55 (6):481-504. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00235-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00235-1)
7. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 13 (10):572-584. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5)
8. Nijveldt RJ, Nood Ev, Hoorn DEv, Boelens PG, Norren Kv, Leeuwen PAv (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Society for Clinical Nutrition* 74:418–425
9. Ferreira MMM, Oliveira AHCd, Santos NSd (2008) Flavones and flavonols: new insights into their chemical structure and biological function. *Revista Agro@mbiente* 2:57-60
10. Tapas A, Sakarkar D, Kakde R (2008) Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. 7:1089-1099
11. Guimarães LGdL, Cardoso MdG, Sousa PEd, Andrade Jd, Vieira SS (2011) Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. *Revista Ciência Agronômica* 42:464-472
12. Donato AM, Morretes BL (2011) Morfo-anatomia foliar de *Myrcia multiflora* (Lam.) DC. - Myrtaceae. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 13:43-51
13. Limberger RP, Sobral M, Henriques AT, Menut C, Bessièrre J-M (2004) Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. *Química Nova* 27:916-919

14. Porto KRdA, Roel AR, Silva MMd, Coelho RM, Scheleder EJD, Jeller AH (2008) Atividade larvicida do óleo de *Anacardium humile* Saint Hill sobre *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41:586-589
15. Simas NK, Lima EdC, Conceição SdR, Kuster RM, Oliveira Filho AMd, Lage CLS (2004) Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue : atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. *Química Nova* 27:46-49
16. Watanabe MA, Maia AdHN, Nicolella G (2007) Ocorrência de ácaros em flores de *Lantana camara* L. *Científica, Jaboticabal* 35:31 - 38
17. Iannacone J, Lamas G (2003) Efectos toxicologicos del nim, rotenona y cartap sobre tres microavispa parasitoides de plagas agrícolas en el Perú. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* 29:123-142
18. Foglio MA, Queiroga CL, Sousa IMdO, Ferreira RRA (2006) Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. *Multi Ciência* 7
- 19 Cruz FJA, Brito IP, Sobral FMA, Sousa LAT, Alves EF, Andreza RS, et al. Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora dos extratos metanólico e hexânico da folha de *Allium cepa*. *Rev Cienc Salud*. 2016;14(2):191-200. doi: dx.doi.org/10.12804/revsalud14.02.2016.04
- 20 NCCLS. 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved Standard, 6th ed. NCCLS document M7. Wayne, Pennsylvania, USA.
21. Javadpour MM, Juban MM, Lo WCJ, Bishop SM, Alberty JB, Cowell SM, Becker CL, McLaughlin ML (1996) De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *Journal of Medicinal Chemistry* 39 (16):3107-3113. <https://doi.org/10.1021/jm9509410>
22. Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP (2008) Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. *Chemotherapy* 54 (4):328-330. 10.1159/000151267
23. Fonseca AMd, Mendes AMdS, Martins VEP, Colares RP, Braz-Filho R, Canuto KM, Ribeiro PRV, Teixeira AMR, Pinto ORdO, Alcócer JCA, Campos OS, Marinho ES (2019) Pharmacological Activity of the Flavonoid Pectolinarin from the Leaves of *Lantana Camara* (Verbenaceae). *International Journal of Development Research* 09 (09):29604-29609
24. Atakan IH, Kaplan M, Kaya E, Aktoz T, Inci O (2002) A life-threatening infection: Fournier's gangrene. *International Urology and Nephrology* 34:392. <https://doi.org/10.1023/A:1024427418743>
25. Severino P, Magalhães VD (2002) The role of integrons in the dissemination of antibiotic resistance among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from an intensive care unit in Brazil. *Research in Microbiology* 153 (4):221-226. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(02\)01310-4](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(02)01310-4)

26. Kolodziejek AM, Schnider DR, Rohde HN, Wojtowicz AJ, Bohach GA, Minnich SA, Hovde CJ (2010) Outer membrane protein X (Ail) contributes to *Yersinia pestis* virulence in pneumonic plague and its activity is dependent on the lipopolysaccharide core length. *Infect Immun* 78 (12):5233-5243. <https://doi.org/10.1128/IAI.00783-10>
27. Silipo A, Molinaro A (2010) The Diversity of the Core Oligosaccharide in Lipopolysaccharides. *Subcellular Biochemistry* 53. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9078-2_4
28. Simões LR, Maciel GM, Brandão GC, Kroon EG, Castilho RO, Oliveira AB (2011) Antiviral activity of *Distictella elongata* (Vahl) Urb. (Bignoniaceae), a potentially useful source of anti-dengue drugs from the state of Minas Gerais, Brazil. *Letters in Applied Microbiology* 53:602–607. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03146.x>
29. Lim H, Son KH, Chang HW, Bae K, Kang SS, Kim HP (2008) Anti-inflammatory Activity of Pectolinarigenin and Pectolinarin Isolated from *Cirsium chanroenicum*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 31 (11):2063-2067. <https://doi.org/10.1248/bpb.31.2063>
30. Yoo Y-M, Nam J-H, Kim M-Y, Choi J, Park H-J (2008) Pectolinarin and Pectolinarigenin of *Cirsium setidens* Prevent the Hepatic Injury in Rats Caused by D-Galactosamine via an Antioxidant Mechanism. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* - 31
31. Roca I, Akova M, Baquero F, Carlet J, Cavaleri M, Coenen S, Cohen J, Findlay D, Gyssens I, Heure OE, Kahlmeter G, Kruse H, Laxminarayan, Liébana E, López-Cerero L, MacGowan A, Martins M, Rodríguez-Baño J, Rolain J-M, Segovia C, Sigauque B, Taconelli E, Wellington E, Vila J (2015) The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *Global threat of antimicrobial resistance* 6:22-19
32. Sharlanda M, Saroeya P, Berezinb EN (2015) The global threat of antimicrobial resistance - The need for standardized surveillance tools to define burden and develop interventions. *Journal Pediatrics* 91:410-412
33. World Health Organization, 2005. Containing antimicrobial resistance. Geneva 10:514–517
34. Grundmann H, Klugman KP, Walsh T, Ramon-Pardo P, Sigauque B, Khan W, Laxminarayan R, Heddini A, Stelling J (2011) A framework for global surveillance of antibiotic resistance. *Drug Resistance Updates* 14 (2):79-87. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2011.02.007>
35. Mokoka TA, McGaw LJ, Mdee LK, Bagla VP, Iwalewa EO, Eloff JN (2013) Antimicrobial activity and cytotoxicity of triterpenes isolated from leaves of *Maytenus undata* (Celastraceae). *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13 (1):111. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-111>

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados de RMN possibilitaram obter informações sobre a estrutura molecular do composto isolado das folhas da planta Cambará de Chumbo (*Lantana camara* L.) revelando que ele trata-se do flavonoide pectolarina de nome químico 5''-O- α -L-raminopiranosil-1'- β -D-glicopiranosil-4',6-dimetoxiflavona, e fórmula molecular $C_{29}H_{34}O_{15}$.

Com relação a investigação do efeito antibacteriano direto e/ou ação potenciadora de antibióticos; os experimentos realizados neste trabalho mostram que a pectolarina quando testada isoladamente não apresenta atividade antibacteriana. No entanto, quando associado ao aminoglicosídeo gentamicina apresentou sinergismo contra bactérias multirresistentes de *S. aureus* 358. Além disso, foi observado um efeito antagônico com a pectolarina combinada com o antibiótico penicilina também contra cepas multiresistentes de *S. aureus* 358.

REFERÊNCIAS

- 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**, v. 36, n. 1, p. 111-116, 2015.
- Bejarano, O; Pérez, C; Mora, S. Resistencia microbiana desde una perspectiva Metagenômica. **NOVA**, 2018.
- Bezerra J, W. A; Costa, A. R; Rodrigues, F. C; Duarte, A. E; Rocha, M. I; Barros, L. M. Potencial medicinal de *Lantana camara* L. (VERBENACEAE). **Caderno de Cultura e Ciência**, Ano XI, v.15, n.1, Out, 2016.
- Brito, B. G. D; Vidotto, M. C; Berbel, M. M; Tagliari, K. C. Fatores de virulência presentes em amostras de *Escherichia coli* uropatogênicas - UPEC para suínos. **Ciência Rural**, v. 34, n., p. 645-652, 2004.
- Brooks, G.F; Carroll, C. K; Butel, J. S; Morse, S. A; MIETZNER, T. A. *Microbiologia Médica*. Editora AMGH, 26 ed. Porto Alegre, 2014.
- Bruice, P.Y. **Química orgânica**. Editora Pearson Prentice Hall, São Paulo, 2006.
- Calixto, C. M. F.; Cavaleiro, É.T. G. Penicilina: Efeito do Acaso e Momento Histórico no Desenvolvimento Científico. **Química nova na escola**. Vol. 34, Nº 3, p. 118-123, AGOSTO 2012.
- Costa, J.G.M.D.; Sousa, E.O.D.; Rodrigues, F.F.G.; Lima, S.G.D.; Braz-Filho, R. Composição química e avaliação das atividades antibacteriana e de toxicidade dos óleos essenciais de *Lantana camara* L. e *Lantana sp.* **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n., p. 710-714, 2009.
- Coutinho, H. D. M; Brito, S. M. O; Leite, N. F; Vandesmet, V. C. S; Oliveira, M. T. A; Martins, G. M. A. B, *et al.* Avaliação comparativa da modulação de antibióticos, frente às cepas bacterianas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*. **Rev Cienc Salud**. 2015.
- Cruz FJA, Brito IP, Sobral FMA, Sousa LAT, Alves EF, Andreza RS, et al. Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora dos extratos metanólico e hexânico da folha de *Allium cepa*. *Rev Cienc Salud*. 2016;14(2):191-200.
- DE Sousa, E.O.; DE Almeida, S. C. X.; Damasceno, S. S.; Nobre, C. B.; DA Costa, J. G. M. *Lantana camara* L. e *Lantana montevidensis* (Spreng.) Briq. In: Albuquerque U., Patil U., Máthé Á. (eds) *Plantas Medicinais e Aromáticas da América do Sul. Plantas Medicinais e Aromáticas do Mundo*, vol 5, 2018.
- Dewick, P.M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**: Wiley, 2009.

Dieguez, C. M; Montanheiro, T. L. V; Cleto, L. B; Bonfim, M. J. C; Dartora, C. A. Os fundamentos quânticos da Ressonância Magnética Nuclear. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, vol. 40, nº 1, e1310, 2018.

Ferreira, M.M.M.; Oliveira, A.H.C.D.; Santos, N.S.D. Flavones and flavonols: new insights into their chemical structure and biological function. **Revista Agroambiente**, v. 2, n., p. 57-60, 2008.

Foglio, M.A.; Queiroga, C.L.; Sousa, I.M.D.O.; Ferreira, R.R.A. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Multi Ciência**, v. 7, n., p., 2006.

Fonseca, A. M; Mendes, A. M. S; Martins, V. E. P *et al*, 2019. Pharmacological activity of the flavonoid pectolinarin from the leaves of lantana camara (verbenaceae)”, **International Journal of Development Research**, 09, (09), 29604-29609.

Górniak, I; Bartoszewski, R; Króliczewski, J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. **Phytochem Rev.** 2019;18(1):241–72.

Holler, F.J.; Skoog, A.D.; Crouch, R.S. **Princípios de Análise Instrumental**. Porto Alegre - RS: Editora Bookman, 2009.

Holzgrabe, U. Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 57, p. 229–240, 2010.

Huber, L.S.; Rodriguez-Amaya, D.B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 1, p. 97-108, 2008.

INFINITYPHARMA. **Norfloxacino antimicrobiano**. v. n. p. 2019a. Disponível em: <<https://infinitypharma.com.br/uploads/insumos/pdf/n/norfloxacino.pdf>>. Acesso em: 08/11/2019.

INFINITYPHARMA. **Gentamicina sulfato antimicrobiano**. v. n. p. 2019b. Disponível em: <<https://infinitypharma.com.br/uploads/insumos/pdf/g/gentamicina-sulfato.pdf>>. Acesso em: 08/11/2019.

Karak, P. atividades biológicas de flavonóides: uma visão geral. **IJPSR** 2019, 3, 1567–1574

Klaus, R; Freitas, K. C; Silveira, R; Barbosa, A. A; Pereira, R. A; Brauner, C. C; Corrêa, M. N; Rabassa, V. R. Caracterização molecular de isolados de escherichia coli em casos de diarreia neonatal bovina. **BrazilianJournal of Development**, 2020.

Koyama, N.; Inokoshi, J.; Tomoda, H. Anti-infectious agents against MRSA. **Molecules**, v. 18, p. 204-224, 2012.

Lantana in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB15164>>. Acesso em: 06 Mar. 2020.

Levinson, W. **Microbiologia médica e imunologia**. Porto Alegre: Editora AMGH, 2010.

Lu, J; Jin, M; Nguyen, S. H; Mao, L; Li, J *et al*; Coin, L. J. Non-antibiotic antimicrobial triclosan induces multiple antibiotic resistance through genetic mutation. *Environ Int.* 2018;118:257–65.

Maranni, A. C.; Cena, C. R. Espectroscopia óptica aplicada para diferenciação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. **71ª Reunião Anual da SBPC** - 21 a 27 de julho de 2019 - UFMS - Campo Grande / MS.

Miller, Lloyd ; Fowler, Vance; Shukla, Sanjay; Rose, Warren; Proctor, Richard. (2019). Development of a vaccine against *Staphylococcus aureus* invasive infections: Evidence-based on human immunity, genetics, and bacterial evasion mechanisms. **FEMS microbiology reviews**. 44. 10.1093/femsre/fuz030.

Moraes, M. C.B.; DO Lago, C. L. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray” aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. **Química Nova**, Vol. 26, No. 4, 556-563, 2003.

Paradisi, F; Corti, G; Messeri., D. Antistaphylococcal (MSSA, MRSA, MSSE, MRSE) Antibiotics. *Antibiotic therapy, part II*, p. 1-13, volume 85 number 1 january 2001.

Petrovska, B.B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy reviews**, v. 6, n. 11, p. 1-5, 2012.

Rodrigues, T. S; Santos, A. M. R; Lima, P. C; Moura, M. E. B; Goiano, P. D. O. L; Fontinele, D. R. S. Resistência Bacteriana á Antibióticos na Unidade de Terapia Intensiva: Revisão Integrativa. **Rev Pre Infec e Saúde[Internet]**. 2018;

Saraf, A; Quereshi, S; Sharma, K; Khan, N. A. Atividade antimicrobiana de *Lantana camara* L. **Jornal of Experimental Sciences**. vol 2, ed. 10, 2011.

Silva, S. G; Bieski, I. G. C. A importância medicinal dos flavonóides na saúde humana, com ênfase na espécie *Arrabidaea chica* (Bonpl.) B. Verl. **Revista Saúde Viva Multidisciplinar da AJES**, v. 1, n. 1, p. 1 - 156, Ago./Dez. 2018.

Silveira, G. P; Nome, F; Gesser J. C; SÁ, M. M. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**. Vol. 29, No. 4, 844-855, 2006.

TavaresJ. M. de M.; MouraM. V. de; TeixeiraM. M.; CostaF. H. da R.; Fernandes CostaI. K.; MendonçaA. E. O. de. Incidência de infecção urinária em pacientes

hospitalizados em uso de cateter vesical de demora. Revista Eletrônica Acervo Saúde, v. 12, n. 8, p. e3497, 26 jun. 2020.

Tortora, G.J; Funke, B.R; Case, C.L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

Tortora, G.J.; Funke, B.R.; Case, C.L. **Microbiologia 8^a** edição,2004.

Trabulsi, L.R.; Alterthum, F. **Microbiologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2016.

Virto, M. R; Frutos, P; Torrado, S; Frutos, G. Gentamicin release from modified acrylic bone cements with lactose and hydroxypropylmethylcellulose. **Biomaterials**, v. 24, n. 1, p. 79-87, 2003.

Ved, A; Arsi, T; Prakash, O; Gupta, A. (2018). Review On Phytochemistry And Pharmacological Activity Of Lantana Camara Linn. Int J Pharm Sci Res, 9(1), 37–43.