



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA – PRPGP
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR

INGRID MIKAELA MOREIRA DE OLIVEIRA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL DO
DITERPENOSONDERIANINA ISOLADO DO *Croton blanchetianus* BAILL.**

CRATO – CE

2014

INGRID MIKAELA MOREIRA DE OLIVEIRA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL DO
DITERPENOSONDERIANINA ISOLADO DO *Croton blanchetianus* BAILL.**

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

Orientador:

Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira

Co-Orientador:

Prof. Dr. Hélcio Silva dos Santos

CRATO – CE

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Oliveira, Ingrid Mikaela Moreira de.

O48m Atividade antimicrobiana e espectroscopia vibracional do diterpeno sonderianina isolado do *Croton blanchetianus* BAILL/
Ingrid Mikaela Moreira de Oliveira. – Crato-CE, 2014

104p.; il.; color.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Regional do Cariri – URCA. Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira

Co-Orientador: Prof. Dr. Hélcio Silva dos Santos

1. Sonderianina; 2. *Croton blanchetianus*; 3. Antimicrobiano.

I. Título.

CDD: 633.88

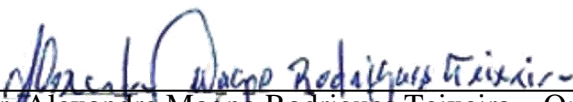
INGRID MIKAELA MOREIRA DE OLIVEIRA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL DO
DITERPENOSONDERIANINA ISOLADO DO *Croton blanchetianus* BAILL.**

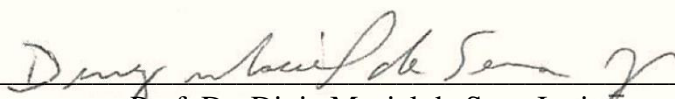
Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular. Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

APROVADA EM: 26 / 11 / 2014.

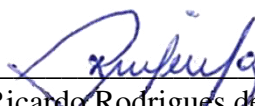
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA



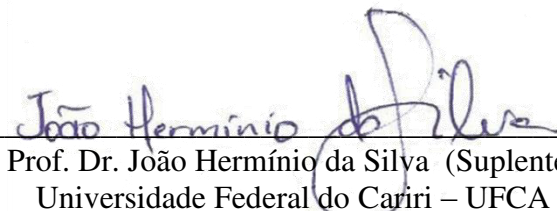
Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira – Orientador
Universidade Regional do Cariri – URCA



Prof. Dr. Diniz Maciel de Sena Junior
Universidade Regional do Cariri – URCA



Prof. Dr. Ricardo Rodrigues de França Bento
Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT



Prof. Dr. João Hermínio da Silva (Suplente)
Universidade Federal do Cariri – UFCA

Dedico este estudo a minha mãe Fátima Moreira,
ao meu avô Agostinho de Oliveira (*in memoriam*)
e ao meu orientador Alexandre Magno,
por serem para mim, grandes exemplos de educadores.

AGRADECIMENTOS

No meu caminhar em direção à concretização desta pesquisa, algumas pessoas estiveram presentes e me auxiliaram direta ou indiretamente, seja através de uma participação concreta no trabalho, seja pelo afeto, carinho e incentivo que me possibilitaram seguir adiante...

Em primeiro lugar, a Deus, pela presença constante em minha vida e por me possibilitar caminhos que tanto enriquecem o meu existir.

À minha querida mãe, Fátima Moreira, pelo amor, incentivo e compreensão constantes, e pelo otimismo contagiante que sempre me motivou a lutar por meus objetivos e superar quaisquer obstáculos, sendo assim, essencial para a minha qualificação acadêmica e formação pessoal.

Ao meu marido, Eduardo Matos, pelo amor, carinho e principalmente compreensão nos momentos em que tive que dividir minha atenção com os estudos. Você que sempre me apoiou em toda essa jornada, motivando-me e comemorando comigo cada conquista alcançada.

Ao meu avô, Agostinho (*in memoriam*), que na sua lucidez me ensinou a ser alguém melhor na vida e a sempre valorizar os estudos, sendo para mim, um exemplo ímpar de ser humano e sabedoria.

A todos da minha família, que mesmo estando distantes no momento, sempre que entram em contato, mostram-se bastante interessados em saber meus êxitos, cobrindo-me de bons conselhos e desejando sempre muito sucesso. Obrigada.

Ao meu Orientador, o Prof. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira, toda a minha gratidão pela orientação segura, ética e compromissada com o rigor científico. Obrigada por ter me acolhido como orientanda, por toda a paciência, confiança, ensinamentos e por ser muito tranquilo, otimista e incentivador, o que tornou a realização deste trabalho imensamente gratificante, proporcionando-me horizontes do crescimento profissional e pessoal. Muito mais que um orientador, o senhor se mostrou um verdadeiro amigo. Meu muitíssimo obrigada.

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

Ao professor Dr. Diniz Maciel de Sena Junior, pela colaboração, participação, paciência e valiosos ensinamentos nessa etapa que foi tão importante na minha vida. Meus sinceros agradecimentos.

Ao professor Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho, pela colaboração nos testes de atividade microbiológica.

Ao professor Dr. João Hermínio da Silva, pela disponibilidade de participar da Banca Examinadora de Qualificação.

Ao professor Dr. José Galberto Martins da Costa, pela atenção e conhecimentos transmitidos durante esta grande empreitada.

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

Ao professor Dr. Gustavo Oliveira de Meira Gusmão, da Universidade Estadual do Piauí (UEPI), por ter realizado o experimento de espectroscopia Raman.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioprospeção Molecular da Universidade Regional do Cariri (URCA) pela valiosa contribuição na minha formação profissional e científica, num cenário de compromisso e respeito.

Aos integrantes do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM), da Universidade Regional do Cariri (URCA).

A todos os colegas de turma pelos ótimos momentos e experiências que passamos juntos, que nos amadureceram e que ficarão para sempre em nossas memórias. Em especial à Débora Odília, por todo o carinho e amizade, a Walmir Emanuel, Luciene Lima e Fernando Gomes que sempre demonstraram serem verdadeiros parceiros nessa caminhada.

Às colegas do Laboratório de Bioinformática avançada da Universidade Regional do Cariri (URCA), Tatiana Oliveira, Ivna Salmito, Raylane Nogueira, Nayara Gonçalves e Luana Tavares, por todos os momentos de aprendizagem, colaboração e descontração.

À minha querida cunhada, colega de turma, parceira de laboratório e amiga acima de tudo, Jacielly Matos, que sempre se fez presente em toda essa jornada, participando ativamente dela, ajudando-me e dando-me forças para seguir em frente, rumo à concretização desta conquista.

À bolsista de IC, parceira de laboratório, Beatriz Gonçalves, por toda sua atenção, paciência e colaboração nesta pesquisa. Sua contribuição foi imensamente importante para a conclusão deste trabalho. Palavras não são suficientes para agradecer, pois você se mostrou de fato uma grande amiga. Meu muito obrigada.

Aos meus amigos, que amenizaram os momentos de tensão, possibilitando uma caminhada mais tranquila e segura. Sou muitíssimo grata.

À minha eterna professora e amiga, Cleide Correia, docente do Departamento de Enfermagem, pois jamais vou esquecer as palavras de incentivo.

À minha banca examinadora pelo prestígio, atenção e avaliação crítica que me possibilitou e auxiliou a concluir mais esta etapa.

Às Secretárias Anderciele Rolim e Lenira Pereira por toda prestatividade.

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

Enfim, a todos que acreditaram no meu potencial e que de algum modo me ajudaram a chegar até aqui, a minha sincera gratidão.

“Deus nunca disse que a jornada seria fácil,
mas Ele disse que a chegada valeria a pena”.

– *Max Lucado.*

RESUMO

Diante do potencial botânico da Caatinga e da necessidade de se encontrar novos compostos, a família *Euphorbiaceae* tem destaque por ser uma das maiores entre as dicotiledôneas, compreendendo cerca de 300 gêneros e 7500 espécies. No Brasil, existem 72 gêneros e cerca de 1300 espécies em todos os tipos de vegetação, sendo o gênero *Croton* o segundo mais representativo, com cerca de 700 espécies. Várias espécies têm aplicações na medicina popular, no tratamento de uma variedade de doenças e algumas das substâncias isoladas têm se mostrado promissoras no desenvolvimento de fármacos. Neste trabalho, apresentamos um estudo por espectroscopias Raman e Infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), cálculos teóricos de química quântica, usando a Teoria do Funcional da Densidade (DFT) e atividade antimicrobiana do diterpeno Sonderianina ($C_{21}H_{26}O_5$) que foi isolado do caule de *Croton blanchetianus*. Os espectros FT-IR e Raman do cristal da amostra policristalina da Sonderianina foram registrados à temperatura ambiente nas regiões de 400 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} , e de 40 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} , respectivamente. Adicionalmente, cálculos DFT foram realizados com o propósito de obter informações sobre as propriedades estruturais e vibracionais deste composto orgânico. Os valores das frequências calculadas, ajustadas com fator de escala de 0,9612, apresentaram boa concordância com as frequências experimentais. O teste de atividade antimicrobiana foi realizado por um ensaio de microdiluição para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da Sonderianina frente às bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, e aos fungos *Candida albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*; e também um ensaio de modulação da atividade dos aminoglicosídeos amicacina, clindamicina e gentamicina, e dos antifúngicos anfotericina B, benzoilmetronidazol e nistatina frente às bactérias multirresistentes *E. coli* 27 e *P. aeruginosa* 03, e às mesmas cepas fúngicas. A CIM da Sonderianina foi de $128\text{ }\mu\text{g/mL}$ para as bactérias e $64\text{ }\mu\text{g/mL}$ para os fungos, exceto *C. krusei* ($8\text{ }\mu\text{g/mL}$), sendo este o único valor significativo comparado ao controle. Quanto à modulação, o composto não apresentou boa associação com os aminoglicosídeos e antifúngicos. Portanto, o diterpeno Sonderianina se mostrou eficiente como possível antimicrobiano apenas frente à *C. krusei*.

Palavras-chave: *Croton, blanchetianus*, Sonderianina, Espalhamento Raman, Espectroscopia Infravermelho, Espectroscopia Vibracional, Antimicrobiano.

ABSTRACT

Given the botanical potential of Caatinga and the need to find new compounds, the *Euphorbiaceae* family stands out as one of the largest among the dicotyledons, comprising about 300 genera and 7500 species. In Brazil, there are 72 genera and about 1300 species in all vegetation types, being the genus *Croton* the second most important, with about 700 species. Several species have applications in popular medicine in the treatment of a variety of diseases and some of the isolated compounds are promising in developing drugs. This work presents a study by Raman spectroscopy and Fourier transform infrared (FT-IR), quantum chemistry theoretical calculations, using Density Functional Theory (DFT) and antimicrobial activity assessment of the diterpene Sonderianin ($C_{21}H_{26}O_5$) which was isolated from the stems of *Croton blanchetianus*. FT-IR and Raman Sonderianin polycrystalline sample spectra were recorded at ambient temperature in the regions of 400 cm^{-1} to 4000 cm^{-1} and 40 cm^{-1} to 4000 cm^{-1} , respectively. Additionally, DFT calculations were performed with the purpose of obtaining information on the structural and vibrational properties of this organic compound. The values of the calculated frequencies, after applying scale factor of 0.9612, showed good agreement with the experimental frequencies. In antimicrobial activity tests the minimal inhibitory concentration (MIC) of Sonderianin was determined in a microdilution assay against bacteria (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) and fungi (*Candida albicans*, *C. krusei* and *C. tropicalis*). The aminoglycoside modifying activity with amikacin, clindamycin and gentamicin and antifungal amphotericin B, benzoilmetronidazol, nystatin against multiresistant bacteria *E. coli* 27 and *P. aeruginosa* 03, and the same fungi was also assessed. The MIC of Sonderianin was $128\text{ }\mu\text{g/mL}$ against bacteria and $64\text{ }\mu\text{g/mL}$ against fungi, except *C. krusei* ($8\text{ }\mu\text{g/mL}$), which was the only significant value compared to the control. Regarding modulation, the compound did not show good association with aminoglycosides and antifungals. Therefore, the diterpene Sonderianin proved to be efficient as a possible antimicrobial just against *C. krusei*.

Keywords: *Croton, blanchetianus*, Sonderianin, Raman Scattering, Spectroscopy Infrared, Spectroscopy Vibrational, Antimicrobial.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação das etapas, tempo e custo do desenvolvimento de um biofármaco.	25
Figura 2 – Distribuição do gênero <i>Croton</i> .	30
Figura 3 – Esqueleto de diterpeno clerodano.	33
Quadro 1– Diterpenos clerodanos em algumas espécies de <i>Croton</i> .	34
Figura 4 – Planta <i>Croton blanchetianus</i> Baill.	35
Figura 5 – Estrutura química da sonderianina (C ₂₁ H ₂₆ O ₅).	37
Figura 6 – Tipos de vibrações moleculares.	43
Figura 7 – Representação esquemática das transições entre níveis de energia para os tipos de espalhamento Rayleigh e Raman.	46
Figura 8 – Caule do <i>Croton blanchetianus</i> Baill.	51
Figura 9 – Esquema de extração e isolamento da Sonderianina.	52
Figura 10– Espectrômetro utilizado nas medidas FT-IR.	53
Figura 11– Espectrômetro utilizado nas medidas Raman.	54
Quadro 2– Perfil de Resistência das Bactérias aos Antibióticos	56
Figura 12– Esquema do método de obtenção da CIM da Sonderianina.	58
Figura 13– Esquema do método de Avaliação da Atividade Moduladora da Sonderianina	59
Figura 14– Placa no teste de CIM	60
Figura 15– Placa no teste de Modulação	60
Figura 16– Estrutura cristalina do diterpeno sonderianina	61
Figura 17– Fórmula estrutural e molecular do diterpeno Sonderianina (C ₂₁ H ₂₆ O ₅)	62
Figura 18– Gráfico de Energia da molécula de Sonderianina (C ₂₁ H ₂₆ O ₅).	64
Figura 19– Espectros Raman e Infravermelho do cristal do diterpeno sonderianina registrados à temperatura e pressão ambiente nas regiões 40 cm ⁻¹ a 4000 cm ⁻¹ e 400 cm ⁻¹ a 4000 cm ⁻¹ , respectivamente.	65
Figura 20– Comparação entre os espectros de absorbância teórico e experimental para o diterpeno sonderianina na região de 3600 cm ⁻¹ a 2500 cm ⁻¹ e 1900 cm ⁻¹ a 400 cm ⁻¹ .	67
Figura 21– Espectros Raman e Infravermelho do cristal do diterpeno da sonderianina na região de 3500 a 2800 cm ⁻¹ .	68
Figura 22– Espectros FT-IR e Raman da sonderianina na região de 1800 a 1000 cm ⁻¹ .	69
Figura 23– Representação dos deslocamentos atômicos da vibração <i>wagging</i> do C ₂₁ H ₃ observada em $\omega_{scal} = 1430 \text{ cm}^{-1}$.	71
Figura 24– Espectros FT-IR e Raman da sonderianina na região de 1000 a 400 cm ⁻¹	72
Figura 25– Espectro Raman do diterpeno sonderianina na região de 400 a 40 cm ⁻¹	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Espectro Eletromagnético.	41
Tabela 2 –	Regiões espectrais do infravermelho.	44
Tabela 3 –	Parâmetros da amplitude normalizada utilizados para classificação da intensidade das bandas de FT-IR ($\omega_{\text{FT-IR}}$) e Raman (ω_{Raman}) obtidas experimentalmente.	55
Tabela 4 –	Comparação dos parâmetros geométricos (calculada e experimental) do diterpeno Sonderianina.	63
Tabela 5 –	Frequência calculada (ω_{calc}), frequência escalada (ω_{scal}) pelo fator de escala 0,9612, posições das bandas Raman (ω_{Raman}) e IR ($\omega_{\text{FT-IR}}$) em unidades de cm^{-1} e classificação para os modos vibracionais do diterpeno sonderianina com distribuição de energia potencial (PED).	69
Tabela 6 –	Frequência calculada (ω_{calc}), frequência escalada (ω_{scal}) pelo fator de escala 0,9612, posições das bandas Raman (ω_{Raman}) e IR ($\omega_{\text{FT-IR}}$) em unidades de cm^{-1} e classificação para os modos vibracionais do diterpeno sonderianina com distribuição de energia potencial (PED).	70
Tabela 7 –	Frequência calculada (ω_{calc}), frequência escalada (ω_{scal}) pelo fator de escala 0,9612, posições das bandas Raman (ω_{Raman}) e IR ($\omega_{\text{FT-IR}}$) em unidades de cm^{-1} e classificação para os modos vibracionais do diterpeno sonderianina com distribuição de energia potencial (PED).	72
Tabela 8 –	Frequência calculada (ω_{calc}), frequência escalada (ω_{scal}) pelo fator de escala 0,9612, posições das bandas Raman (ω_{Raman}) e IR ($\omega_{\text{FT-IR}}$) em unidades de cm^{-1} e classificação para os modos vibracionais do diterpeno sonderianina com distribuição de energia potencial (PED).	74
Tabela 9 –	Concentração inibitória mínima (CIM) da Sonderianina e dimetilsulfóxido (DMSO) frente às cepas microbianas.	75
Tabela 10 –	Concentração inibitória mínima (CIM) dos antibióticos ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) na presença de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da Sonderianina ou DMSO frente às bactérias <i>Escherichia coli</i> 27 (EC27) e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 03 (PA03)	77
Tabela 11 –	Concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) na presença de 23 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da Sonderianina ou DMSO frente aos fungos <i>Candida albicans</i> 122 e <i>C. tropicalis</i> 18 e 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ frente à <i>C. krusei</i> 01.	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATR	<i>Attenuated total reflectance</i> (Reflectância Total Atenuada)
BHI	<i>Brain heart infusion broth</i> (Caldo de Infusão de cérebro e coração)
Calc.	Calculado
CCD	Cromatografia de Coluna Delgada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CSD	<i>Cambridge Structural Database</i>
DFT	<i>Density Functional Theory</i> (Teoria do Funcional da Densidade)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxiribonucleico)
EM	Espectrometria de Massas
EM-AR	Espectrometria de Massas de Alta Resolução
Exp.	Experimental
FT-IR	<i>Fourier transform infrared</i> (Infravermelho com transformada de Fourier)
FT-Raman	<i>Fourier transform Raman</i> (Espalhamento Raman com transformada de Fourier)
HDL	<i>High-density lipoprotein</i> (Lipoproteína de Alta Densidade)
HIA	<i>Heart Infusion Agar</i> (Ágar Infusão de Coração)
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i> (Orbital molecular mais alto ocupado)
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IR	<i>Infrared</i> (Infravermelho)
Laser	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i> (Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação)
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i> (Orbital molecular mais baixo ocupado)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PED	<i>Potential Energy Distribution</i> (Distribuição de energia potencial)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
UENF	Universidade Estadual do Norte Fluminense
UFC	Universidade Federal do Ceará
URCA	Universidade Regional do Cariri
UV-VIS	Ultravioleta Visível

LISTA DE SÍMBOLOS

ω_{scal}	Posições do número de onda escalado
ω	Frequência
$\bar{\nu}$	Número de onda
λ	Fator de escala
<i>sc</i>	<i>Scissoring</i> (Tesoura)
<i>wag</i>	<i>Wagging</i> (Balanço)
δ	Deformação Angular
γ	Deformação Fora Do Plano
ν	Estiramento
ν_{as}	Estiramento Assimétrico
ν_{s}	Estiramento Simétrico
τ	Torção
ρ	Posição espacial
\vec{r}	Coordenada dos núcleos atômicos
E	Energia total
<i>vs</i>	<i>Very strong</i> (banda com intensidade muito forte)
<i>s</i>	<i>Strong</i> (banda com intensidade forte)
<i>m</i>	<i>Medium</i> (banda com intensidade média)
<i>w</i>	<i>Weak</i> (banda com intensidade fraca)
<i>vw</i>	<i>Very weak</i> (banda com intensidade muito fraca)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo Geral	23
2.2	Objetivos Específicos	23
3	REFERENCIAL TEÓRICO	24
3.1	Bioprospecção Molecular: em busca de Novos Fármacos	24
3.2	A família <i>Euphorbiaceae</i>	28
3.3	Considerações sobre o gênero <i>Croton</i> e suas atividades biológicas	29
3.4	Componentes químicos do gênero <i>Croton</i>	32
3.5	Atividades biológicas de <i>Croton blanchetianus</i> Baill	34
3.6	Considerações sobre a Sonderianina	37
3.7	Tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias e fungos	38
3.8	Espectroscopia molecular	40
3.8.1	Modos normais de vibração	42
3.8.2	Espectroscopia no Infravermelho	44
3.8.2.1	Regiões espectrais no Infravermelho	44
3.8.3	Espalhamento Raman	45
3.8.3.1	Espalhamento Rayleigh e Espalhamento Raman	45
3.8.4	Mecânica Quântica	47
3.8.5	Teoria do Funcional da Densidade (DFT)	47
3.9	Modelagem Molecular no Desenvolvimento de Novos Fármacos	48
4	MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1	Material vegetal	51
4.2	Extração e Isolamento	51
4.3	Determinação da Estrutura Molecular	52
4.4	Espectroscopia vibracional	53
4.4.1	Medidas Raman e FT-IR	53
4.5	Métodos Computacionais	54
4.6	Atividade Antimicrobiana	55
4.6.1	Preparação das amostras	56
4.6.2	Cepas microbianas	56

4.6.3	Preparação dos inóculos	57
4.6.4	Concentração Inibitória Mínima	57
4.6.5	Atividade Moduladora	58
4.6.6	Avaliação da atividade antimicrobiana e moduladora	59
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1	Estrutura Molecular	61
5.2	Espectroscopia Vibracional	65
5.2.1	Região espectral entre 3500 cm ⁻¹ e 2800 cm ⁻¹	67
5.2.2	Região espectral entre 1800 cm ⁻¹ e 1000 cm ⁻¹	69
5.2.3	Região espectral entre 1000 cm ⁻¹ e 400 cm ⁻¹	71
5.2.4	Região espectral entre 400 cm ⁻¹ e 40 cm ⁻¹	73
5.3	Atividade Antimicrobiana	74
5.3.1	Concentração Inibitória Mínima da Sonderianina	74
5.3.2	Atividade moduladora de aminoglicosídeos e antifúngicos	76
6	CONCLUSÕES	79
	PERSPECTIVAS	80
	REFERÊNCIAS	81
	APÊNDICES	97
	APÊNDICE A	98
	ANEXOS	101
	ANEXO A	102
	ANEXO B	103
	ANEXO C	104

1 INTRODUÇÃO

A prática do uso de recursos naturais como forma de tratamento e cura de enfermidades é tão antiga quanto à espécie humana. A Fitoterapia é uma palavra de origem grega, onde *therapeia* significa tratamento e *phyton*, vegetal. É definida como o estudo de plantas medicinais que tem suas aplicações terapêuticas no tratamento e cura de doenças, o que vem crescendo na atualidade (BRASIL, 2006; WAGNER; WISENAUER, 2006).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) denota que cerca de 80% da população mundial faz uso de algum recurso vegetal como estratégia de cura para suas enfermidades (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007; LEITE *et al.*, 2008). Os conhecimentos empíricos sobre a utilização e a eficácia de plantas medicinais colaboram de maneira relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais utilizados com grande frequência, devido aos resultados medicinais apresentados, apesar de a maioria não contar com seus constituintes químicos conhecidos. Dessa forma, usuários que mantêm a prática do consumo de fitoterápicos, tornam válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante várias gerações. Em contrapartida, este tipo de cultura medicinal vem despertando a curiosidade de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como a botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial. (ASOLINI *et al.*, 2006).

No Brasil, essa prática também tem sido utilizada há bastante tempo, por grupos indígenas em seus rituais religiosos e de cura (DI STASI, 2007). O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, possuindo mais de 56.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 (GIULIETTI *et al.*, 2005; IBGE, 2010). No entanto, a riqueza e diversidade desse banco genético e biomolecular se encontram em um estágio inicial de conhecimento (CALIXTO, 2003), pois dessas, apenas 15 a 17% foram investigadas quanto ao seu potencial medicinal (BARROS, 2008), com 512 plantas registradas para comercialização no Ministério da Saúde (CARVALHO *et al.*, 2008) e de acordo com a Organização Mundial de Saúde, dos 252 fármacos considerados básicos e essenciais, apenas 11% são exclusivamente de natureza vegetal (GURIB-FAKIM, 2006).

A utilização de plantas como recurso terapêutico está embasada em estudos etnofarmacológicos que, partindo do seu uso tradicional e do conhecimento popular sobre as propriedades farmacológicas (anti-inflamatória, analgésica, antiespasmódica, antimicrobiana, antitérmica, laxativas etc) de certas drogas vegetais, denotam o potencial para o desenvolvimento de novos fitoterápicos (SCOPEL, 2005). Neste contexto, as plantas são uma

fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais, pode-se utilizar para a síntese de inúmeros fármacos (WALL; WANI, 1996).

A exploração da biodiversidade brasileira destaca-se pela grande possibilidade de levar a identificação de importantes metabólitos secundários que podem ser úteis como fitofármacos ou direcionar ao desenvolvimento de novos fármacos semissintéticos ou sintéticos. Comparado ao desenvolvimento de um novo medicamento sintético, que possui um custo elevado (em torno de US\$ 350 milhões e 10 a 15 anos de estudo), o desenvolvimento de um fitomedicamento requer menos recursos, e também relativamente menor tempo de pesquisa. Estima-se que os gastos para o desenvolvimento de um fitomedicamento não devem ultrapassar 2 a 3 % do previsto para o desenvolvimento de um novo medicamento sintético (CALIXTO, 2003).

Por outro lado, nos últimos anos, há um grande interesse e aumento na busca de produtos naturais como recursos terapêuticos. Tal fato pode estar relacionado a diversos fatores, como: efeitos indesejáveis e prejuízos causados pelo uso abusivo e/ou incorreto de medicamentos sintéticos; o fato de que amplas camadas da população mundial não têm acesso aos medicamentos e à medicina institucionalizada; a consciência ecológica e a crença popular de que o natural é inofensivo (RATES, 2001). No entanto, mesmo diante da grande biodiversidade brasileira, ainda faltam muitos estudos para comprovar a eficácia e a segurança desses produtos naturais (CALIXTO, 2003).

Várias plantas são testadas não apenas para demonstrar seu potencial antimicrobiano direto, mas também como fontes de substâncias com potencial de serem agentes modificadores da ação antibiótica (GIBBONS, 2004; GURIB-FAKIM, 2006). Diversos compostos químicos de origem sintética ou natural, além de apresentarem atividade antibacteriana direta, elevam a atividade de antibióticos específicos, revertendo à resistência de algumas cepas bacterianas a alguns antibióticos, promovendo a eliminação de plasmídios que carregam determinantes de resistência e inibindo as funções de transporte da membrana plasmática de algumas classes de antibióticos. Portanto esse aumento da atividade antibiótica ou a reversão da resistência através de antibióticos, os identificam como agentes modificadores da ação antibiótica (MOLNAR *et al.*, 2004; WOLFART *et al.*, 2006).

Algumas plantas utilizadas popularmente como anti-inflamatórias possuem considerada atividade antimicrobiana frente a vários patógenos, pois alguns traumas que comprometem a integridade da barreira cutânea, constituem-se na principal causa de mudança do comportamento de bactérias que fazem parte da microbiota da pele para agente etiológico em infecções cutâneas (CAETANO *et al.*, 2002; ZAVADINACK NETTO *et al.*, 2008).

Dessa forma, a pesquisa por produtos naturais que contenham princípios ativos como os da atividade antibacteriana intrínseca ou combinada, seja com antibióticos de qualquer natureza, podem representar uma nova alternativa frente aos microrganismos multirresistentes, além de impedir o contato destes com os antibióticos, diminuindo o risco de selecionarmos novos ou melhores mecanismos de resistência bacteriana. Para os pacientes, a resistência antimicrobiana aumenta a morbidade e mortalidade, enquanto que para as instituições de saúde significa aumento nas despesas (DANCER, 2001). Assim, se poderia redirecionar a indústria farmacêutica de forma a melhorar a produção e a utilização de fitoterápicos como adjuvantes em determinados tratamentos contra agentes infecciosos ou em outras doenças em geral.

Além disso, a escassez de estudos sobre as propriedades farmacológicas de plantas em regiões com ecossistema de alta diversidade, como a região Nordeste do Brasil, que tem uma predominante área de Caatinga, pode abrir um leque de opções para estas investigações, bem como para descobertas de uma ampla diversidade de substâncias, considerando que este é um habitat específico para plantas medicinais e aromáticas não encontradas em outras regiões do globo (MAIA, 2004).

Diante do potencial botânico da Caatinga e da necessidade de se encontrar novos compostos, a família *Euphorbiaceae* tem destaque por ser uma das maiores entre as dicotiledôneas, compreendendo cerca de 300 gêneros e 7500 espécies. No Brasil, existem 72 gêneros e cerca de 1.300 espécies em todos os tipos de vegetação, sendo o gênero *Croton* o segundo mais representativo, com cerca de 700 espécies (SANTOS *et al.*, 2008).

As espécies de *Croton* e seus fitoquímicos estão entre os temas mais pesquisados nas áreas de química dos produtos naturais, farmacologia e etnofarmacologia, e novos dados são publicados no meio científico rapidamente. Diversas partes da planta de *Croton* são utilizadas tradicionalmente para o tratamento de vários problemas de saúde (bronquite, câncer, diabetes, dor, distúrbios gastrointestinais e hepáticos, hipertensão, inflamação, leucemia, malária, reumatismo e úlceras) (COSTA, 2007). Os cientistas tentam relacionar o uso da planta medicinal com o efeito observado em ensaios farmacológicos dos extratos e substâncias isoladas. Apesar do amplo interesse da comunidade científica, considerando-se a diversidade do gênero, a lista de espécies estudadas ainda é demasiadamente escassa.

Muitas espécies de *Croton* possuem forte potencial econômico, especialmente para a indústria farmacêutica, devido aos diversos metabólitos secundários encontrados (PAYO *et al.*, 2001), como: terpenoides (SALATINO *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2009); alcaloides (MILANOWSKI *et al.*, 2002; RISCO *et al.*, 2003;

ARAÚJO-JUNIOR *et al.*, 2004); flavonoides (TSACHEVA *et al.*, 2004; PALMEIRA JUNIOR *et al.*, 2005; GONZÁLEZ-VÁZQUEZ *et al.*, 2006); triterpenos e esteroides (MACIEL *et al.*, 2000; CATALÁN *et al.*, 2003). Esses metabólitos secundários são responsáveis por uma vasta variedade de atividades farmacológicas, mas principalmente atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias (SALATINO *et al.*, 2007; CARNEIRO *et al.*, 2011; SA *et al.*, 2011). Contudo, no que se refere ao *Croton blanchetianus* Baill, espécie em foco neste estudo, embora já se tenha conhecimento de suas propriedades químicas, e suas atividades biológicas já tenham sido analisadas e comprovadas, ainda são escassos estudos com suas substâncias isoladas (RODRIGUES *et al.*, 2013). Ressalta-se ainda que esse tipo de *Croton* seja uma espécie endêmica nativa da caatinga do Nordeste Brasileiro (CORDEIRO *et al.*, 2012).

A espécie *Croton blanchetianus* Baill, antes conhecida como *C. sonderianus*, sofreu um reajuste na sua nomenclatura passando a ser chamada de *C. blanchetianus* (GOVAERT; FRODIN; RADCLIFFE-SMITH, 2000). Tem sido indicada como uma planta de grande potencial econômico na região nordeste (ANGÉLICO, 2011). O metabólito secundário, diterpeno, e os constituintes do óleo essencial, monoterpenos e sesquiterpenos, são os mais estudados no gênero *Croton*. Já o grupo dos terpenoides é tão complexo e diverso que vários compostos ainda não tiveram suas atividades elucidadas (DEWICK, 2009; FELIU, 2011).

Estudos realizados com espécies diferentes de *Croton* relatam a presença do composto de nome sonderianina (C₂₁H₂₆O₅) (CRAVEIRO *et al.*, 1981b; PERES *et al.*, 1997). Esse composto foi primeiramente obtido a partir do *C. blanchetianus* Baill, popularmente conhecido como "marmeleiro preto" (MATOS, 1997; 1999; CHAVES; REINHARD, 2003). Contudo, a sonderianina é um terpenoide clerodano que é pouco relatado na literatura em relação às suas atividades antimicrobiana, antifúngica, moduladora de drogas e atividade farmacológica.

Antes de uma dada substância começar a ser explorada pela indústria farmacêutica, é fundamental que ela seja caracterizada para se identificar as principais propriedades químicas, físicas, biológicas e, eventualmente, farmacológicas, medicinais, entre outras. Conhecer as propriedades estruturais e espectroscópicas de uma molécula é de grande importância na indústria farmacêutica, visto que é possível, a partir disso: comparar a estrutura das moléculas, criando um índice de similaridade e correlacionar com a atividade farmacológica; modificar a molécula com o intuito de se alterar a solubilidade para melhorar a biodisponibilidade em ensaios *in vivo* e *in vitro*; e ampliar a potência e segurança, garantindo

assim, um melhor perfil farmacocinético e farmacodinâmico (RODRIGUES, 2001; SANTOS *et al.*, 2007; GIL *et al.*, 2008; GUIMARÃES, 2011).

Os métodos computacionais, utilizando cálculos de primeiros princípios ou *ab initio* para caracterização de uma molécula estão cada vez mais importantes em várias áreas da física e da química. Com o uso dessa técnica é possível analisar as ligações químicas, calcular a energia de ionização, afinidades eletrônicas, a polarizabilidade, estudar os modos normais de vibração, os espectros de absorção e de emissão, susceptibilidades e propriedades de ressonância magnética nuclear (RMN) de moléculas (MARQUES; BOTTI, 2006). Os métodos experimentais em espectroscopia fornecem contribuições relevantes para o estado da arte da física atômica e molecular, da química e da biologia molecular. Muito do nosso atual conhecimento sobre a estrutura da matéria é baseado em investigações espectroscópicas. Informações sobre a estrutura molecular e sobre a interação de moléculas com seus vizinhos podem ser derivadas de diversos modos a partir dos espectros de emissão e/ou absorção gerados quando a radiação interage com os átomos e/ou moléculas da matéria (ALCÂNTARA JUNIOR, 2002).

A modelagem molecular fornece informações importantes para o processo de descoberta de fármacos. Ela permite a obtenção de propriedades específicas de uma molécula que podem influenciar na interação com o receptor. Outras informações importantes também podem ser obtidas a partir da comparação estrutural entre diferentes moléculas, o que pode permitir a geração de um índice de similaridade que pode ser correlacionado com a atividade farmacológica (RODRIGUES, 2001).

A interação da radiação eletromagnética com o movimento vibracional dos núcleos origina os espectros vibracionais no infravermelho e no Raman; neste contexto, a espectroscopia no infravermelho apresenta-se como uma técnica analítica rápida, seletiva, sensível, de simples operação e baixo custo, além de apresentar elevada velocidade analítica, possibilidades de uso em sistemas de controle on-line, e de constituir um método não destrutivo e não poluente. Em virtude destas características, esta técnica pode ser utilizada em rotinas de análises químicas (RIBEIRO, 2012).

Por mais que existam consideráveis similaridades entre os espectros Raman e os espectros no infravermelho (IR), existem claras diferenças entre os tipos de grupos que são ativos no infravermelho e ativos no Raman para torná-las técnicas complementares, em vez de competitivas. Recentemente, a espectroscopia Raman passou a ser uma ferramenta de rotina graças ao laser, aos arranjos de detectores e à disponibilidade de instrumentos comerciais a um custo moderado; além de ser uma técnica amplamente utilizada para estudos de sistemas

biológicos principalmente por necessitar de amostras pequenas, possuir baixa sensibilidade à água, diferentemente do infravermelho, e fornecer detalhamento espectral muito útil na análise de substâncias orgânicas (HOLLER *et al.*, 2009).

Apesar do crescente desenvolvimento e dos evidentes avanços científico e tecnológico da indústria farmacêutica, existem ainda inúmeras doenças que necessitam de novos fármacos, com melhor perfil terapêutico para seu tratamento. Assim, a busca por novos agentes terapêuticos ainda se faz necessária nos tempos de hoje (AMARAL *et al.*, 2003).

Na literatura ainda existem poucos trabalhos relatando atividades biológicas oriundas de substâncias isoladas a partir de *C. blanchetianus*, sendo no momento possível citar, apenas, a antibacteriana e antifúngica (MCCHESENEY *et al.*, 1991a), e em pesquisas realizadas com a sonderianina, a mesma apresentou atividade específica contra *Mycobacterium smegmatis* e *Staphylococcus aureus* (CRAVEIRO *et al.*, 1981b; CRAVEIRO; SILVEIRA, 1982). Portanto esta dissertação irá abordar esse tema, visto que a síntese de novas substâncias antimicrobianas com efeito indireto ou direto sobre o microrganismo é importante, tendo em vista o aumento da resistência aos fármacos, e consequentemente, o aumento da morbidade e mortalidade causada pelas infecções.

Também não há nenhuma publicação com a identificação das propriedades vibracionais e estruturais, utilizando-se espectroscopias de Infravermelho e espalhamento Raman. Existe apenas a caracterização da sonderianina por espectrometria de massa de alta resolução (EM-AR), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Cristalografia de Raios X (CRAVEIRO *et al.*, 1981b; PERES *et al.*, 1987). Uma melhor elucidação da estrutura da sonderianina será de extrema relevância para subsidiar trabalhos futuros que abordem a modelagem molecular, como também estudos farmacológicos, considerando também, que a sonderianina apresenta uma baixa solubilidade em água, o que prejudica sua biodisponibilidade, então o conhecimento das propriedades estruturais da molécula poderá contribuir com a modificação molecular sem prejuízo da atividade biológica (GIL *et al.*, 2008). Portanto, neste trabalho desenvolvemos estudo de espalhamento Raman, espectroscopia Infravermelho e cálculos teóricos de química quântica no composto sonderianina com o objetivo de analisar suas propriedades estruturais e vibracionais.

A seguir, serão apresentados os capítulos desta dissertação que consistem, respectivamente, nos objetivos do estudo, seguidos do referencial teórico, onde traz tópicos relacionados à bioprospecção de novos fármacos; características filogenéticas e botânicas da planta estudada; propriedades químicas, estruturais e farmacológicas do gênero e da espécie em questão; considerações sobre a sonderianina; um tópico destinado a falar sobre o

tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias e fungos; outro voltado ao estudo e métodos de espectroscopia molecular, abrangendo aspectos sobre a Teoria do Funcional da Densidade (DFT) que o embasa; e o último sobre Modelagem Molecular.

O quarto capítulo busca descrever os materiais e métodos utilizados para o desenvolvimento do estudo, apresentando um tópico sobre o material vegetal; outro a respeito das técnicas de extração e isolamento da sonderianina; determinação da estrutura molecular; o método de espectroscopia vibracional, bem como, métodos computacionais para a execução dos cálculos teóricos; e as técnicas empregadas para a obtenção da atividade antimicrobiana.

No quinto capítulo, temos os resultados e discussão desta pesquisa, apresentando uma descrição detalhada das regiões espectrais que se destacam pelos seus modos vibracionais; e a atividade antimicrobiana da substância frente a fungos e bactérias, bem como sua atividade moduladora frente a antimicrobianos já consagrados no mercado farmacêutico.

Os últimos capítulos englobam as conclusões da pesquisa, perspectivas para a continuidade do estudo e referências utilizadas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar a caracterização do composto Sonderianina isolado de *Croton blanchetianus* Baill. por meio de espectroscopia Raman e FT-IR identificando os modos vibracionais e as propriedades estruturais da molécula com o auxílio de cálculos teóricos de química quântica, bem como avaliar a atividade antimicrobiana deste composto e a modulação de antibióticos e antifúngicos.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar medidas de caracterização espectroscópica do composto Sonderianina ($C_{21}H_{26}O_5$) por espectroscopias Raman e FT-IR com o propósito de determinar os modos vibracionais;
- Fazer cálculos teóricos de química quântica, usando a Teoria Funcional da Densidade (DFT), para otimização da geometria da molécula e obtenção de seus modos normais de vibração;
- Comparar as frequências experimentais obtidas por espalhamento Raman e espectroscopia Infravermelho com aquelas obtidas pelos cálculos teóricos de química quântica;
- Classificar os modos normais de vibração da molécula isolada Sonderianina ($C_{21}H_{26}O_5$) com base na distribuição de energia potencial (PED - do inglês *Potential Energy Distribution*) e na visualização dos estiramentos e deformações angulares;
- Verificar a atividade antimicrobiana da Sonderianina frente a bactérias e fungos, determinando a concentração inibitória mínima do composto;
- Avaliar o efeito da Sonderianina como modulador da atividade de aminoglicosídeos frente a linhagens bacterianas multirresistentes e de antifúngicos frente a fungos patogênicos.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Bioprospecção Molecular: em busca de Novos Fármacos

Os procedimentos atuais de bioprospecção e biotecnologia permitem descobrir com eficiência novas substâncias e dessas desenvolver novos bioprodutos agregando dessa forma valor à biodiversidade. A Bioprospecção tem sido definida de várias formas, pois se trata de um tópico abrangente e dependendo da área do conhecimento que se aproprie do termo é conceituada de uma forma ou de outra. No entanto, de um modo geral passa pela ideia de busca por compostos orgânicos em microrganismos, plantas e animais que sejam úteis para toda a humanidade (ASTOLFI FILHO; SILVA; BIGI, 2014).

Os grandes avanços da química e biologia, e a melhor compreensão de vias bioquímicas, alvos moleculares e de mecanismos que levam ao surgimento e desenvolvimento de doenças, possibilitaram a descoberta de inovações terapêuticas relevantes, proporcionando melhorias significativas na qualidade de vida de diversas populações no mundo (GUIDO *et al.*, 2010). O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos é complexo, longo e de alto custo, tendo suas raízes profundamente conectadas às inovações científicas e tecnológicas (GUIDO *et al.*, 2008). As dificuldades específicas na área de Fármacos e Medicamentos no nosso país têm início, dentre suas possíveis razões históricas, na época em que a nova realidade da indústria farmacêutica chega ao Brasil, contribuindo para a substituição das boticas – onde se dispensavam medicamentos, em grande parte, manipulados – pelas primeiras farmácias comerciais que não mais formulam e passam a vender medicamentos industrializados (BARREIRO; FRAGA, 2005).

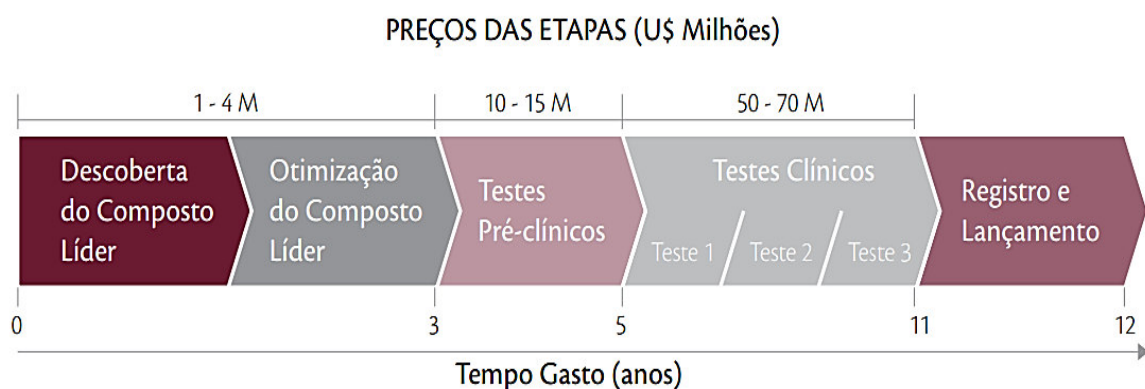
O Brasil consolida sua atividade industrial farmacêutica com as empresas multinacionais instaladas aqui e passando a realizar apenas a quarta etapa da cadeia industrial farmacêutica; transformar o fármaco - princípio ativo do medicamento, ou insumo farmoquímico (importado) - em medicamento, através da implantação da formulação galênica (BARREIRO; FRAGA, 2005).

A bioprospecção, nesse contexto, aparece como uma vocação natural do nosso ecossistema e passa a se constituir como uma meta estratégica para a própria segurança nacional do ponto de vista social, econômico e ambiental; viabilizando alternativas para o desenvolvimento sustentável e o aproveitamento da biodiversidade. A bioprospecção não é algo novo. Em épocas mais modernas não faltam exemplos, e um dos mais conhecidos é a

descoberta do ácido acetil salicílico (a aspirina), proveniente do salgueiro europeu, há muito tempo já utilizado e que se tornou um medicamento tradicional em todo o mundo até hoje. Faz-se necessário observar que o reconhecimento econômico, com a valoração da biodiversidade por diversos segmentos da indústria, estabeleceu um interesse crescente do setor produtivo no “assunto” bioprospecção (ASTOLFI FILHO; SILVA; BIGI, 2014).

O planejamento e o desenho estrutural de novos padrões moleculares de substâncias que possuam propriedades farmacoterapêuticas úteis, capazes de representar novos compostos-protótipos de fármacos, são tarefas complexas pela multiplicidade de fatores que influenciam a resposta terapêutica de uma substância exógena, por exemplo, fármaco, que precisa apresentar elevada eficácia, reflexo das propriedades farmacodinâmicas - aquelas que regem as interações responsáveis pelo reconhecimento molecular do fármaco pelo biorreceptor e resultam na resposta terapêutica desejada – e farmacocinéticas - aquelas que governam os fatores de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação do fármaco na biofase, resultando no perfil de biodisponibilidade (BARREIRO; FRAGA, 2005). Uma vez descoberto o novo composto-protótipo, a etapa seguinte na cadeia de inovação em fármacos é sua otimização. Nesta etapa, devem ser identificadas as distintas contribuições farmacofóricas de todas as subunidades estruturais, de maneira a orientar as modificações moleculares a serem introduzidas na estrutura do composto-protótipo ampliando a diversidade estrutural deste padrão molecular, otimizando-a (BARREIRO; FRAGA, 2005). A Figura 1 mostra as principais fases de desenvolvimento de um biofármaco.

FIGURA 1–Representação das etapas, tempo e custo do desenvolvimento de um biofármaco.



Fonte: ASTOLFI FILHO; SILVA; BIGI, 2014.

A Fase de descoberta do Composto Líder ou Bioensaio caracteriza-se pela descoberta de compostos orgânicos que contém um princípio ativo com ação contra um determinado alvo celular ou molecular (bioprospecção). Através de diferentes técnicas de purificação, principalmente de precipitação diferencial, filtração e cromatografia, purifica-se o princípio ativo; e a partir de técnicas de espectrometria de massas, RMN, difração de Raios X, dentre outras, determina-se a estrutura química da molécula, que pode ser chamada de substância ou composto líder. Na Otimização do composto líder se produz derivados da substância líder mais potentes ou mais permeáveis ou com farmacocinética mais favorável. Nessa fase, testes em animais de laboratório são também realizados, obtendo-se informações sobre a eficácia e também dados preliminares de segurança da utilização da nova molécula. Os Testes Pré-clínicos são realizados em animais (pelo menos dois tipos) para averiguar a segurança da utilização da nova molécula (toxicidade, mutagenicidade) e sua imunogenicidade, bem como propriedades farmacológicas.

Nos Testes Clínicos da Fase I testa-se a segurança e farmacocinética da nova molécula em pequenos grupos de seres humanos normais e voluntários (20 - 50 pessoas); nos Testes Clínicos Fase II (ou Estudo Terapêutico Piloto) testa-se a eficácia, confirma-se a segurança e coleta-se dados de biodisponibilidade e de dose x resposta em cerca de 100-200 pacientes; e nos Testes Clínicos Fase III – (Estudo Terapêutico) – trata-se de estudo normalmente multicêntricos com cerca de 800-1000 pacientes e visa identificar a relação risco/benefício a curto e longo prazo das formulações do princípio ativo, que se passar dessa fase poderá ser considerada um novo fármaco. Na fase final que consiste no registro do fármaco, dados clínicos são apresentados à Agência de Vigilância Sanitária, que poderá então aprovar o lançamento do novo medicamento no mercado, concedendo o registro (ASTOLFI FILHO; SILVA; BIGI, 2014).

A fase de Otimização do composto-protótipo deve ser realizada simultaneamente àquela da investigação das propriedades de biodisponibilidade do protótipo-eleito, de maneira a instruir sobre a necessidade de se introduzirem novas modificações moleculares em sua estrutura visando otimizar, também, as propriedades farmacocinéticas. Este procedimento antecipa, por sua vez, preciosas informações para a etapa futura de desenvolvimento galênico do composto-protótipo descoberto (BARREIRO; FRAGA, 2005).

Para esclarecer a relevância da produção de novos fármacos, cito por exemplo, a bactéria *Staphylococcus aureus* que é um problema emergente de saúde pública e traz grandes preocupações tanto aos hospitais como às comunidades. Embora 37,2% das pessoas carreguem normalmente esses cocos Gram-positivos em sua mucosa nasal, as infecções causadas por

Staphylococcus aureus podem resultar em pequenas complicações, como doenças de pele até em infecções mais graves, como osteomielites, endocardites e pneumonia (MATOUSKOVA; JANOUT, 2009; CASTRO *et al.*, 2009). Devido à má utilização dos antimicrobianos disponíveis no mercado e a alta capacidade adaptativa da bactéria *Staphylococcus aureus*, houve uma seleção de resistência destes microorganismos a diversos antimicrobianos. Atualmente, amostras da *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina são reconhecidamente um dos principais problemas de infecção hospitalar, também com relatos de infecções em animais (DIAS, 2010).

No ambiente hospitalar, as fontes de maior contaminação são os aparelhos de respiração, sistemas de hemodiálise, pias e artefatos de limpeza. A taxa de colonização por *Pseudomonas aeruginosa* na mucosa e pele de pacientes hospitalizados em uso de antibióticos de amplo espectro, tratamento quimioterápico ou que utilizam mecanismo artificial de respiração pode exceder 50% (POLLACK, 2003). As infecções adquiridas em hospitais são marcadas por uma forte característica: a multirresistência (FERREIRA, 2010).

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

Para a descoberta de novas substâncias obtidas a partir da bioprospecção de produtos naturais, diferentes estratégias podem ser utilizadas, como a etnofarmacologia, a quimiosistemática, ecologia molecular e a tentativa de erro.

Segundo o documento da Convenção da Biodiversidade (RIO DE JANEIRO – 1992) biotecnologia significa qualquer aplicação tecnológica que utilize sistemas biológicos, organismos vivos, ou seus derivados, para fabricar ou modificar produtos ou desenvolver processos para utilização específica. A biotecnologia é essencialmente multi e interdisciplinar envolvendo áreas como: biologia geral, química, biologia celular, genética, bioquímica, biofísica, biologia molecular, engenharia genética, engenharia química, farmácia, medicina, nanotecnologia, direito, comunicação, entre outras.

Desta forma, podemos dizer que a bioprospecção e a biotecnologia são procedimentos complementares e de suma importância para o desenvolvimento de

bioprodutos. Com isso, a pesquisa em bioprospecção, relacionada à descoberta de novas moléculas, tem avançado muito, tendo a aplicação de procedimentos de bioprospecção e biotecnologia como de grande importância para resolver vários problemas da saúde atual (ASTOLFI FILHO; SILVA; BIGI, 2014).

3.2 A família *Euphorbiaceae*

Malpighiales é uma ordem de plantas angiospérmicas que possuem 15.935 espécies distribuídas em 39 famílias e 716 gêneros, dentre as quais *Euphorbiaceae*. O registro fóssil sugere que as *Malpighiales* surgiram há aproximadamente 106 milhões de anos atrás (período Cretáceo, era Mesozoica, éon Fanerozoico), sendo verificado um pico de diversificação há 90 milhões de anos (DAVIS *et al.*, 2005).

Atualmente as *Malpighiales* apresentam 7,8% de todas as espécies de eudicotiledôneas do planeta. Junto com Ericales, é a ordem com maior relevância em espécies de mata primária e secundária de florestas tropicais. Outro dado relevante é que as *Malpighiales* correspondem a 28% do total de espécies e até 38% do total de plantas em florestas latifoliadas úmidas de clima tropical (DAVIS *et al.*, 2005).

A família *Euphorbiaceae* é uma das maiores entre as dicotiledôneas, compreendendo cerca de 300 gêneros e 7500 espécies. No Brasil, existem 72 gêneros e cerca de 1.300 espécies em todos os tipos de vegetação (SANTOS *et al.*, 2008). Ainda hoje constitui a sexta maior família entre as Angiospermas, depois de *Asteraceae*, *Poaceae*, *Fabaceae*, *Orchidaceae* e *Rubiaceae* (RADCLIFFE-SMITH *et al.*, 2001). *Euphorbiaceae*, abrange ainda as subfamílias *Phyllanthoideae*, *Oldfieldioideae*, *Acalyphoideae*, *Crotonoideae* e *Euphorbioideae*, (WEBSTER, 1994; CHASE, 2002; WURDACK, 2002; APG II, 2003; WURDACK; HOFFMANN; CHASE, 2005). De acordo com Secco (2005), *Euphorbiaceae* conta com diversas espécies de interesse econômico, destacando-se *Hevea brasiliensis* Müll. Arg. (seringueira), *Manihot esculenta* Crantz (mandioca ou cassava), *Ricinus comunis* L. (óleo de ricino, castor oil), *Croton cajucara* L. (sacaca, rica em linalol) e *Phyllanthus niruri* L. (quebra pedra) e *Croton blanchetianus* Baill. (marmeleiro).

A química das *Euphorbiaceae* é uma das mais complexas e interessantes entre as famílias de eudicotiledôneas, podendo ser até mesmo comparada à sua alta diversidade biológica (SEIGLER *et al.*, 1998). Uma diversidade de euforbiáceas é utilizada com finalidade alimentar, ornamental e como fonte de precursores químicos, resinas, lubrificantes e ativos medicinais. Em termos medicinais, as euforbiáceas são comumente foco de estudo.

Em 2009, em estudo realizado por Cardoso-Lopes e colaboradores, concluíram que as altas taxas de cafeína em “tamanqueira” (*Pera glabrata*) conferem a esta espécie atividade antifúngica, além de poder ser usada no tratamento visando à redução da perda de memória decorrente do mal de Alzheimer. Já em Forero *et al.* (2008) foram estudadas sete espécies de euforbiáceas, sendo que três (*Phyllanthus niruri*, *Euphorbia pulcherrima* e *Cordia eum variegatum*) apresentaram atividade antiviral sobre o vírus influenza. A espécie *Phyllanthus emblica*, rica em sesquiterpenos e flavonoides (bisabolol e campferol, respectivamente), apresenta atividade de redução dos níveis de colesterol HDL em ratos, levando a regulação das taxas glicêmicas e podendo ser utilizada em medicamentos para tratamento do diabetes (KRISHNAVENI *et al.*, 2010).

Os diterpenos são considerados o grupo de substâncias mais característico e complexo da família, principalmente os compostos com esqueletos do tipo caurano, clerodano e furano (SALATINO *et al.*, 2007). O látex das euforbiáceas é bastante rico em diterpenos do tipo éster de forbol, com atividade citotóxica. Os diterpenos do tipo clerodano são os mais comuns do *Croton*, como por exemplo, a cascarilina e os furoclerodanos de *Croton eleuteria*, que conferem atividade analgésica, antiespasmódica e antitérmica (FATTORUSSO *et al.*, 2002).

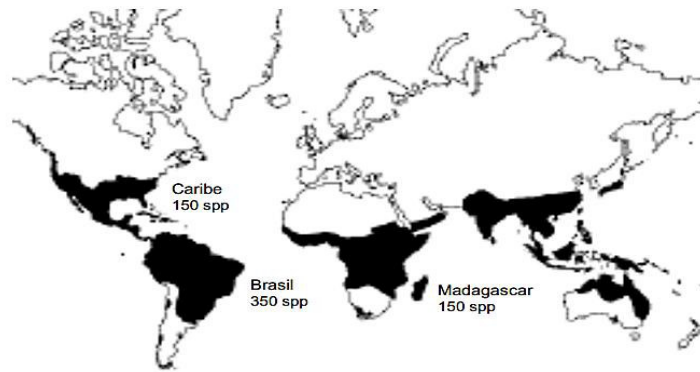
3.3 Considerações sobre o gênero *Croton* e suas atividades biológicas

O gênero *Croton*, em 1753, foi apresentado por Linnaeus ao expor 13 espécies da Ásia e África na primeira edição de *Species Plantarum*. Posteriormente, o gênero recebeu importância de diversos estudiosos (Baillon, 1858; Mueller, 1865, 1866 e 1873; e Bentham em 1880), destacando-se Webster (1992, 1993, 1994, 2001), que propôs a classificação infragenérica mais atual para o gênero (SILVA; SALES; CARNEIRO-TORRES, 2009).

O gênero *Croton* (C.), cujo significado do seu nome é “carrapato”, é o segundo maior da família *Euphorbiaceae* e pertence à subfamília *Crotonoidae* e tribo *Crotoneae* (BRAGA, 1976). A família *Euphorbiaceae* tem destaque, pois possui aproximadamente 317 gêneros e 7500 espécies. No Brasil, existem 72 gêneros e cerca de 1.300 espécies em todos os tipos de vegetação, sendo o gênero *Croton*, o segundo mais representativo, com cerca de 700 espécies em todo o globo (SANTOS *et al.*, 2008). Ele é amplamente distribuído em regiões quentes da Terra, sendo menos frequente em regiões temperadas e raramente encontrado em

regiões frias (HELUANI *et al.*, 2000) A Figura 2 mostra a distribuição do gênero *Croton* com seu respectivo número de espécies.

FIGURA 2–Distribuição do gênero *Croton*.



Fonte: BERRY *et al.*, 2005.

As espécies desse gênero estão predominantemente nas Américas, embora algumas espécies atinjam a África, Ásia e Oceania. Os principais centros de diversidade do gênero encontram-se na América do Sul, Antilhas e México (BURGER; HUFT, 1995). No Brasil, existem em torno de 354 espécies de *Croton* (BERRY, 2002).

Salatino e seus colaboradores (2007) relatam em sua pesquisa várias plantas do gênero *Croton* que são nativas da América do Sul, América do Norte e Central, África e Ásia, que possuem uso tradicional como planta medicinal e que tiveram os seus efeitos farmacológicos comprovados cientificamente. Considerando as diversas espécies presentes na América do Sul que têm sido ressaltadas em pesquisas de prospecção fitoquímica das propriedades medicinais estão: *C. betulaster* Müll. Arg., *C. brasiliensis* Müll. Arg., *C. cajucara* Benth., *C. celtidifolius* Baill., *C. dracanoides* Müll. Arg., *C. eluteria* Bennett., *C. lechleri* L., *C. lobatus* L., *C. luetzelburgii* Pax. et Hoffm., *C. malambo* Karst., *C. moritibensis* Baill., *C. muscicarpa* Müll. Arg., *C. nepetaefolius* Baill., *C. palanostigma* Klotzsch., *C. salutaris* Casar., *C. schideanus* Schlecht., *C. sellowii* Baill., *C. blanchetianus* Baill., *C. urucurana* Baill., e *C. zehntneri* Pax. et Hoffm.

Seu potencial econômico principalmente dentro da indústria farmacêutica se deve à sua alta concentração de diferentes metabólitos secundários: alcaloides, flavonoides e terpenoides (RIZSCK, 1987; PAYO *et al.*, 2001; RANDAU *et al.*, 2002), que conferem propriedades terapêuticas a muitas espécies. Estudos fitoquímicos têm demonstrado que os

metabólitos secundários não voláteis mais abundantes das espécies deste gênero são produtos naturais pertencentes principalmente à classe dos terpenos, especialmente diterpenos, que isolados mostraram-se bioativos. Esses apresentaram interessantes propriedades biológicas como atividade antitumoral, antiinflamatória, antimicrobiana, inseticida e antiespasmódica (DOURADO, 2003).

Estudos, direcionados a diversas espécies do gênero *Croton*, têm mostrado diferentes atividades farmacológicas, como: atividade antiinflamatória e antioxidante de *C. celtidifolius* (NARDI *et al.*, 2003); antileishmanicida de *C. cajucara* (SOCORRO *et al.*, 2003); antinociceptiva de *C. cajucara* (CAMPOS *et al.*, 2002); antiulcerogênica e citotóxica de *C. cajucara* (ALMEIDA *et al.*, 2003); hipoglicêmica e hipolipidêmica de *C. cajucara* (SILVA *et al.*, 2001); antimicrobacteriana e antimalárica de *C. kongensis* (THONGTAN *et al.*, 2003); antinociceptiva e antiinflamatória de *C. malambo* (SUAREZ *et al.*, 2003); antimicrobiana de *C. blanchetianus* (MCCHESENEY *et al.*, 1991a); purgativa de *C. campestris* (BABILI *et al.*, 1998); hipotensora e narcótica de *C. eluteria* (VIGOR *et al.*, 2001).

Vários tipos de venenos, usados por sociedades primitivas, também são atribuídos ao gênero *Croton* (BABILI *et al.*, 2006). Ainda tratando-se das propriedades advindas de óleos essenciais, destacamos a existência de ação antimicrobiana, anti-inflamatória e analgésica (PATINAICK *et al.*, 1997; SIANI *et al.*, 1999. ; SANTOS; RAO, 2000; MEDEIROS *et al.*, 2003). O óleo essencial e seus constituintes têm um papel como agentes aromatizantes na indústria, como fragrâncias para perfumaria e em formulações de drogas por parte da indústria farmacêutica (LEVISON *et al.*, 1994; DE VINCENZI *et al.*, 1996; BRUNETON, 1999). Estudos anteriores têm descrito o efeito antinociceptivo de óleos essenciais obtidos de algumas espécies como o *C. cajucara* Benth e *C. nepetaefolius* Baill (marmeleiro vermelho) em ratos (BIGHETTI *et al.*, 1999; . ABDON *et al.*, 2002).

O *Croton* também contém um grupo de funções importantes dentro do ecossistema terrestre, suas características se devem a alta produção de flores e frutos quase o ano inteiro. Tornando-se indicada para restaurar áreas que foram desmatadas (LIMA, PIRANI, 2008). Neste gênero é onde se encontram as grandes populações vegetais de marmeleiros e velames na vegetação secundária, principalmente da Caatinga (CRAVEIRO *et al.*, 1981a). Muitas espécies do gênero *Croton* são odoríferas e apresentam conteúdo relativamente rico em óleo essencial, que está distribuído em todos os órgãos da planta, principalmente nas folhas e nas cascas do caule (CRAVEIRO *et al.*, 1981a).

A literatura segundo Craveiro (1981a) descreve o gênero *Croton* da seguinte forma: Espécies desse gênero são representadas por árvores, arbustos, subarbustos, ervas e

raramente lianas. Podem ser monoicas ou dioicas, com tricomas de formas variadas (estrelados, escamiformes, etc.). As folhas apresentam revestimento piloso, inteiras ou raramente trilobadas com estípulas, principalmente nos ramos jovens e novos. Algumas possuem pêlos estrelados enquanto outras apresentam pêlos lepdotos ou escamosos. As flores de ambos os sexos são pequenas, esbranquiçadas e dispostas em racemos algumas vezes espiciformes, dispendo-se as masculinas, geralmente mais numerosas, na parte apical e as femininas na parte basal. Suas pétalas são livres e em número de cinco, enquanto que o número de estames varia de acordo com a espécie, nunca sendo inferior a cinco. Já o fruto é uma cápsula triococa, varia de 2 a 6 mm de diâmetro e as sementes são geralmente escuras e oleaginosas.

De acordo com Gomes, Sales e Berry (2010) o gênero *Croton* encontra-se presente no Brasil, especificamente, na Bahia (Chapada Diamantina), Ceará (Aiuaba, Planalto da Ibiapaba, Serra do Araripe), Paraíba (Pico do Jabre), Pernambuco (complexo de montanhas bacia do Jatobá) e Piauí (Serra das Confusões), limitada, provavelmente às montanhas de arenito, cordilheiras e planaltos, geralmente em áreas acima de 700 m de altitude. Ocorre em caatinga de areia, carrasco e cerrado.

3.4 Componentes químicos do gênero *Croton*

Os componentes químicos das plantas do gênero *Croton* são bem diversificados e parece existir uma afinidade química entre as espécies associadas a sua distribuição geográfica (SALATINO *et al.*, 2007). Muitas espécies deste gênero são aromáticas, indicando a presença de óleos voláteis que podem conter mono e sesquiterpenoides e, às vezes, compostos derivados do chiquimato (OLIVEIRA *et al.*, 2001a; LOPES *et al.*, 2003; SALATINO *et al.*, 2007).

As plantas do gênero *Croton* também são fontes de diferentes classes de alcaloides, sendo que esse metabólito não é clássico em plantas da família Euphorbiaceae (AMARAL; BARNES, 1998; MILANOWSKI *et al.*, 2002). Já o látex é uma substância característica de Euphorbiaceae e geralmente está associado a propriedades medicinais. Várias espécies de *Croton* contêm esse composto que pode ser de cor vermelha e conter pró-antocianidinas e/ou alcaloides (SANDOVAL *et al.*, 2002; RISCO *et al.*, 2003). Outros metabólitos frequentemente relatados são os triterpenos e compostos fenólicos, como flavonoides, lignoides e pró-antocianidinas (SALATINO *et al.*, 2007; BARRETO *et al.*,

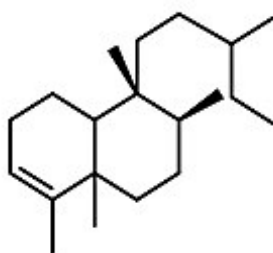
2013). Já, quando se trata dos metabólitos secundários não voláteis, estudos fitoquímicos também têm demonstrado que os mais abundantes das espécies deste gênero são produtos naturais pertencentes principalmente à classe dos terpenos, especialmente diterpenos, que isolados mostraram-se bioativos. Apresentaram interessantes propriedades biológicas como atividade antitumoral, anti-inflamatória, antimicrobiana, inseticida e antiespasmódica (DOURADO, 2003).

Os terpenoides são constituídos por unidades isoprênicas pentacarbonadas que são classificados quanto ao número de unidades de isoprenos em sua estrutura. Eles podem ser dos seguintes tipos: monoterpênos (2 unidades, 10 carbonos), sesquiterpênos (3 unidades, 15 carbonos), diterpênos (4 unidades, 20 carbonos), triterpênos (6 unidades, 30 carbonos), carotenoides (8 unidades, 40 carbonos) e esteroides, que são sintetizados a partir do triterpeno (DEWICK, 2009).

Diterpênos, dentro da classe dos terpenos, são metabólitos secundários derivados do ácido mevalônico. Possuem grande variedade de estruturas, que contêm 20 átomos de carbono. O interesse no isolamento deste composto está em crescimento devido suas atividades biológicas, função ecológica, utilidade como modelo em sínteses e funções taxonômicas (PALMEIRA JUNIOR *et al.*, 2006). Desconhece-se a regra fisiológica dos diterpênos no metabolismo secundário das plantas das quais eles são extraídos, entretanto acredita-se que a habilidade de sintetizar estes compostos traga benefícios às plantas (GEBBINCK *et al.*, 2002).

Dentro da classe dos diterpênos, existe um grupo chamado de clerodanos, ao qual pertence à maioria dos diterpênos isolados das espécies de *Croton*. A figura 3 apresenta o esqueleto de um diterpeno clerodano.

FIGURA 3—Esqueleto de diterpeno clerodano.



Clerodano

Fonte: FELIU, 2011.

Segundo publicação de Palmeira e colaboradores (2006), o gênero *Croton* é bastante rico em diterpenos clerodanos, que podem ser encontrados em distintas partes das plantas, inclusive nos óleos essenciais. Para o gênero *Croton*, existem muitos diterpenos clerodanos distintos, cujas estruturas são relatadas na literatura, e relacionados no Quadro 1.

QUADRO 1– Diterpenos clerodanos em algumas espécies de *Croton*

Espécie	Diterpenos Clerodanos		
<i>C. cajurara</i>	trans-crotonino cajucarinolido	trans-dehidrocrotonino sacarino	cajucarino A, B e β
<i>C. eleuteria</i>	cascalino casacariladiona	cascarilona eleuterinos	cascarilinos pseudoeleuterino B
<i>C. urucurana</i>	sonderianino 12-epi-metilbarsbacoato	15,16-epoxy-3,13(16)-clerodatrieno-2-ona	
<i>C. lechteri</i>	crolequinol metil-barsbacoato	Ácido clorequínico	korberinos
<i>C. blanchetianus</i>	sonderianina hardwickiic	cleisthantane	
<i>C. zambesicus</i>	crotocorilifurano crotozambefurano		

Fonte: Autora, adaptado de PALMEIRA *et al.*, 2006

3.5 Atividades biológicas de *Croton blanchetianus* Baill

Dentre as espécies de *Croton* relatadas na literatura científica que tiveram as propriedades farmacológicas e antimicrobianas do seu óleo essencial e extrato investigada e comparadas com o uso popular, está a espécie *C. blanchetianus*, antes denominada por *C. sonderianus* (GOVAERT, FRODIN; RADCLIFFE-SMITH, 2000). Esta espécie é exclusivamente brasileira, encontrada nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe. Seu habitat é principalmente a região entre as bacias do Rio São Francisco e Parnaíba (CRAVEIRO *et al.*, 1981a) mas também encontra-se presente em vegetação de carrasco e de caatinga (GOMES, 2006). Cresce de forma silvestre desde o Piauí e o Nordeste até Minas Gerais, ocupando as áreas desmatadas e formando grandes conjuntos relativamente homogêneos na Caatinga que somam alguns milhares de hectares (LORENZI; MATOS, 2002). Na Chapada do Araripe, mais especificamente, em Barbalha-CE, o período de floração e frutificação ocorre entre os meses de fevereiro e abril (COSTA; ARAÚJO; LIMA-VERDE, 2004). Popularmente é conhecida como marmeleiro, e também como marmeleiro-escuro ou marmeleiro-preto, em virtude de

seu tronco e ramos possuem um aspecto geral escuro (SILVEIRA, 1979). Seu aspecto visual na Figura 4.

FIGURA 4 – Planta *Croton blanchetianus* Baill.



Fonte: MAIA, 2007.

O fato de crescer de forma silvestre ocupando as áreas desmatadas e formando grandes conjuntos relativamente homogêneos na caatinga se deve a sua grande capacidade de resistência à seca e de rebrotar intensamente na época das chuvas mesmo sendo cortada pelo homem, permitindo que o marmeleiro se difunda por quase toda a área da caatinga, com exceção apenas, dos espaços extremamente secos.

Segundo Silveira (1979) a espécie *C. blanchetianus* pode ser descrita botanicamente como planta arbustiva, podendo chegar à pequena árvore. Trata-se de uma árvore caducifólia com até 4 m, com ramos, folhas e cascas aromáticas. As folhas são pilosas, oblongo lanceoladas, de tamanho médio e nervação pinada, base cordada e ápice acuminado. Os ramos possuem traços escuros que justificam o nome de marmeleiro preto com o qual a planta é vulgarmente conhecida. As flores são dispostas em racemos alongados (CRAVEIRO *et al.*, 1981a). Além de ramos e racemos, apresenta pecíolos e na parte inferior das folhas, delicado indumento de pelos estrelados de cor acinzentada, às vezes com brilho vítreo, densamente tomentoso e não lepdoto. Os ramos são quase cilíndricos, apresentando sua secção transversal elíptica. As folhas medem cerca de 10 a 14 cm de comprimento por 5 a 7 cm de largura na parte mais inferior, são triangular-ovais ou quase triangular-lanceoladas, de ápice acentuadamente acuminados e levemente cordatas na base, glandulosas, peninérvias, com 4 a 6 nervuras secundárias que se aproximam da base, apresentando estípulas cetáceas,

alongadas, levemente lacinadas. O pecíolo é 4 a 5 vezes mais curto que o limbo. Os racemos possuem flores abundantes com brácteas linear-lanceoladas cada uma com uma flor. A flor feminina destituída de pétalas apresenta cálice pentafendido, com lobos orbicular-ovais, obtusos, ondulados nas margens e acrescente superando quase a metade da cápsula. Os lacínios subsaccato-reflexos apresentam sinuosidades. O ovário é viloso-tomentoso. As cápsulas medem cerca de 7 mm de comprimento, são depresso-globosas e as sementes 5 mm de comprimento por 4 mm de largura (SILVEIRA, 1979).

C. blanchetianus apresenta-se como arbusto nas capoeiras do sertão ou árvore quando cresce nas matas (MATOS, 1997). Fornece estacas e varas curtas para cercas, bem como para preparação de armadilhas para pesca da lagosta. É usado como forragem para alimentação de bovinos, ovinos e caprinos.

Na medicina popular, as folhas e as cascas desta espécie são utilizadas por meio de infusão ou via oral (mastigação de pedaços) para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, inchaço, dor de cabeça, reumatismo e ainda como antiparasitário (MATOS, 1997; MATTOS, 1999; CHAVES; REINHARD, 2003; FRANCO; BARROS, 2006). A literatura etnofarmacológica ainda cita o uso de suas cascas no tratamento de hemorróidas inflamadas e nos casos de hemorragia uterina (LORENZI; MATOS, 2002; LIMA, 1996).

Um estudo fitoquímico desenvolvido com o extrato hexânico do lenho do caule de *C. blanchetianus* (coletado em Sobral – Ceará) revelou um diterpeno ácido de nome entbeyer-15-en-18-oic com atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium smegmatis* (McCHESNEY *et al.*, 1991a). A literatura científica também relata o estudo do extrato hexânico das raízes desta espécie, coletadas no mesmo local, onde os ensaios biológicos revelaram interessantes resultados contra bactérias Gram-positivo: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, e bactérias Gram-negativo: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Mycobacterium smegmatis*; contra fungos: *Candida albicans*, *Sacharomyces cerevisiae* e outros microorganismos (McCHESNEY *et al.*, 1991a; DOURADO, 2003). Seu extrato pode ser um meio alternativo para o controle de patógenos na prática odontológica (SILVA, 2011).

Esta planta também é rica em diterpenos clerodanos do tipo cleisthantane, com diversificada atividade biológica (McCHESNEY *et al.*, 1991a). A partir dos extratos da raiz de *C. blanchetianus*, dois compostos de diterpeno, o hardwickiic e ácidos 3,4-secotraquilobanoico, foram isolados e descritos por possuírem propriedades antibacterianas e antifúngicas (McCHESNEY *et al.*, 1991b). Já a sonderianina foi pela primeira vez obtida a

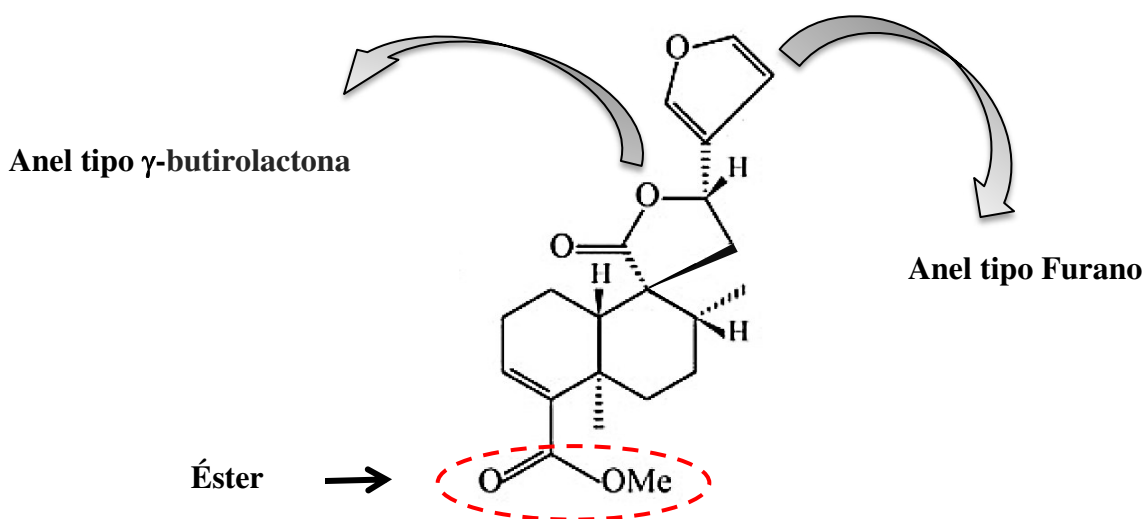
partir do *C. blanchetianus*, também apresentando atividades antimicrobianas (CRAVEIRO *et al.*, 1981; PERES *et al.*, 1997; MATOS, 1997; 1999; CHAVES; REINHARD, 2003).

Na composição química de sua madeira, foram encontrados a scopoletina, que é uma hidroxycumarina, e vários diterpenos (MORS *et al.*, 2000). Testes fitoquímicos do *C. blanchetianus* ainda indicaram a presença de terpenos, esteroides e taninos (SANTOS *et al.*, 2003). É comprovado como responsável pelo cheiro aromático das folhas e das cascas do tronco, um óleo essencial de composição complexa, contendo pineno, cânfora e guaiazuleno, além de vários outros mono e sesquiterpenos (CRAVEIRO *et al.*, 1978; CRAVEIRO; SILVEIRA, 1981a). O óleo essencial apresenta efeito antinociceptivo (CARNEIRO-LOUREIRO, 2003; SANTOS *et al.*, 2005) e mostrou-se rico em compostos com potencial de ação inseticida, além de atividades antimicrobiana, antihelmíntica, antimalárica e leishmanicida (ENAN, 2001; LIMA *et al.*, 2006).

3.6 Considerações sobre a Sonderianina

A sonderianina é classificada como um diterpeno clerodano que compreende quatro anéis (CRAVEIRO *et al.*, 1982). A estrutura molecular da sonderianina é caracterizada por um anel do tipo furano, um anel tipo γ -butirolactona e dois anéis condensados, dos quais, um encontra-se ligado a um éster, como mostra a Figura 5.

FIGURA 5—Estrutura química da sonderianina (C₂₁H₂₆O₅).



Fonte: Autora.

Esse composto foi obtido pela primeira vez a partir do *C. blanchetianus* Baill, isolado da sua cerne (MAC CHESNEY; CLARK, 1991; MATOS, 1997; 1999; CHAVES; REINHARD, 2003), mas ele também já foi isolado da casca do caule de *C. urucurana* Baill (CRAVEIRO *et al.*, 1981b; PERES *et al.*, 1997). Quando isolado a partir do caule de *C. blanchetianus*, sua estrutura foi elucidada por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e por análise de cristalografia de Raios-X (CRAVEIRO *et al.*, 1981b). Contudo, a sonderianina é um diterpeno clerodano que é pouco relatado na literatura em relação às suas atividades antibacteriana e antifúngica e não foi encontrado nenhum estudo quanto a sua ação moduladora de drogas e atividade farmacológica.

Em pesquisa realizada por Craveiro *et al.*, a mesma apresentou atividade antimicrobiana contra *Mycobacterium smegmatis* e *Staphylococcus aureus* (CRAVEIRO *et al.*, 1981a.; CRAVEIRO; SILVEIRA, 1982).

3.7 Tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias e fungos

É alta a incidência de doenças infecciosas causadas por microrganismos patogênicos (como por exemplo, bactérias, vírus, fungos e parasitas) que invadem as células do hospedeiro para se reproduzirem. Essas enfermidades representam graves problemas de saúde pública que afetam uma parcela significativa da população mundial e, devido ao seu aspecto socioeconômico, são considerados um dos principais desafios para o século XXI, principalmente nas regiões mais pobres e vulneráveis do planeta. Segundo a OMS, as doenças infecciosas são responsáveis por aproximadamente um terço das causas de mortalidade no mundo. A associação entre essas enfermidades e a baixa renda das populações mais carentes, fica evidente ao se constatar que as doenças infecciosas ocupam a primeira posição entre as principais causas de morte e incapacidade permanente nos países em desenvolvimento (SANTOS, 2006; WHO, 2008; GUIDO *et al.*, 2010).

No caso de infecções causadas tanto por fungos como por bactérias, o aumento dessas é considerável, devido à indução de resistência das bactérias aos antibióticos e ao desenvolvimento de toxicidade, após o tratamento prolongado com muitos antifúngicos (GIORDANI *et al.*, 2001). A terapia tradicional para enfermidades causadas por fungos é restrita em comparação com o tratamento para infecções bacterianas, visto que o fungo é eucarionte, então se torna mais difícil o desenvolvimento de uma droga que seja seletivamente tóxica para fungo e que não seja para as células do hospedeiro (HARRIS, 2002). Muitos

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

Os compostos que potencializam a atividade de uma droga ou que reverterem a resistência ao antibiótico são classificados como modificadores da atividade da droga ou moduladores (COUTINHO *et al.*, 2010; MATIAS *et al.*, 2011). Dentre as drogas existentes para o tratamento de infecções bacterianas e fúngicas, a quantidade de fármacos antifúngicos em uso é bem limitada quando comparada com os antibióticos e, na maioria das vezes, possuem alguma limitação na sua eficácia ou na toxicidade terapêutica (RUIZ-HERRERA; SAN-BLAS, 2003).

O uso exacerbado e inadequado de algumas drogas para o tratamento de doenças patogênicas em humanos tem provocado o aumento da incidência de resistência microbiana, principalmente quando se faz uso prolongado de apenas uma classe de antimicrobiano (ZEMBOWER *et al.*, 1998; FLUIT; SCHMITZ, 1999). Os mecanismos de resistência dos microrganismos aos antifúngicos e antibióticos ainda são pouco elucidados.

A seleção das linhagens bacterianas e fúngicas testadas neste estudo foram baseadas em sua relevância para a clínica médica e em seus mecanismos de resistência frente a antimicrobianos utilizados atualmente. Alguns estudiosos dizem que a infecção tenha uma associação direta com os serviços de saúde, de tal forma que reconhece os agravos como exclusividade de situações de internação hospitalar, que podem acontecer por causa do contato do paciente com bactérias e outras modalidades de infecções hospitalares no atendimento ambulatorial, na rotina hospitalar (MCKIBBEN *et al.*, 2005). O gênero *Staphylococcus* de bactérias são disseminados na natureza assim como também na microbiota normal da pele e na mucosa dos pássaros. Algumas espécies de *Staphylococcus* são constantemente identificadas como agentes etiológicos de infecções oportunistas em muitos animais e também em humanos (NOSTRO *et al.*, 2004; COUTINHO *et al.*, 2009). *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus haemolyticus* são as espécies mais marcantes por acarretar infecções nos seres humanos a nível hospitalar. Além de promover tipos distintos de intoxicações.

Portanto, é de grande importância uma busca contínua por novos princípios ativos contra bactérias e fungos amplamente conhecidos. Tal fato leva a um interesse em pesquisar compostos naturais (MACHADO, 2007). A rápida evolução da resistência aos

antimicrobianos e o desaceleramento no desenvolvimento de novos fármacos, leva à busca por alternativas como o tratamento com multidrogas (KEITH; BORISY; STOCKWELL, 2005). O teste da Concentração Inibitória Mínima (CIM) é utilizado para avaliar o nível de eficiência de uma substância, pois quanto menor é o valor da CIM, maior é a atividade da substância no organismo usado no teste. Um dos parâmetros analisados para se verificar se uma substância isolada é realmente viável para tornar-se um fármaco é a menor concentração necessária para que ela demonstre efeito inibitório (AZEVEDO, 2010).

López (2010) analisando a capacidade antimicrobiana dos extratos brutos metanólicos das folhas e cascas de *Croton urucurana* Baill., constatou que esses extratos das folhas não inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*; no entanto, o extrato bruto metanólico das cascas inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus*, sendo que esse resultado foi menor do que o encontrado para o antibiótico gentamicina.. Nader (2010), analisando o potencial antimicrobiano de extratos vegetais de espécies de uma área de cerrado da Reserva Ecológica Ecocerrado Brasil, no município de Araxá - MG, frente a estirpes de *Staphylococcus aureus*, constatou que os extratos clorofórmico e hexânico de *Croton antisiphiliticus* Mart., apresentaram atividade bactericida, e expressiva atividade antimicrobiana, atuando sobre cinco, das seis estirpes em teste.

3.8 Espectroscopia molecular

A espectroscopia é a ciência que analisa a interação da radiação eletromagnética com a matéria, possuindo como objetivo a determinação da configuração dos níveis de energia (eletrônica, vibracional e rotacional) de átomos ou moléculas. Com a utilização dessa técnica, obtêm-se informações quanto à estrutura molecular e suas ligações químicas.

Neste contexto, é relevante que se entenda mais sobre o espectro eletromagnético, sendo que este se caracteriza da seguinte forma: entre 390 e 700 nanômetros (nm) compreende o espectro da luz visível. A região do infravermelho (IR) estende-se dos 3×10^{11} Hz até aproximadamente os 4×10^{14} Hz e corresponde à região do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e microondas, abrangendo radiações com números de onda de 12.800 cm^{-1} a 10 cm^{-1} , ou com comprimentos de onda de 780 a $1,0 \times 10^6$ nm. (HOLLER, 2009; SILVERSTEIN *et al.*, 2007, LIMA, BAKKER, 2011). Podem-se observar na Tabela 1, as características do Espectro Eletromagnético.

TABELA 1– Espectro Eletromagnético

Designação	Frequência (Hz)			Comprimento de onda			
Ondas de rádio	< 3,0x10 ¹¹			> 0,3m			
Microondas	10 ⁹	a	3,0x10 ¹¹	0,3m	a	1 mm	
Infravermelho	3,0x10 ¹¹	a	3,8x10 ¹⁴	1 mm	a	789 nm	
Visível	Vermelho	3,8x10 ¹⁴	a	4,8x10 ¹⁴	789 nm	a	625 nm
	Laranja	4,8x10 ¹⁴	a	5,0x10 ¹⁴	625 nm	a	600 nm
	Amarelo	5,0x10 ¹⁴	a	5,2x10 ¹⁴	600 nm	a	577 nm
	Verde	5,2x10 ¹⁴	a	6,1x10 ¹⁴	577 nm	a	491 nm
	Azul	6,1x10 ¹⁴	a	6,6x10 ¹⁴	491 nm	a	455 nm
	Violeta	6,6x10 ¹⁴	a	8,0x10 ¹⁴	455 nm	a	390 nm
Ultravioleta	8,0x10 ¹⁴	a	2,4x10 ¹⁶	390 nm	a	9 nm	
Raios X	2,4x10 ¹⁶	a	5,0x10 ¹⁹	9 nm	a	6 pm	
Raios gama	> 5,0x10 ¹⁹			< 6pm			

Fonte: (adaptado, LIMA, BAKKER, 2011)

Portanto quando ocorre a incidência da radiação eletromagnética sobre a matéria, pode acontecer uma transição entre estados energéticos. A região espectral, onde são observadas as transições depende do tipo de níveis envolvidos: eletrônicos, vibracionais ou rotacionais (SALA, 2008). A energia total de uma molécula é a soma de todas essas energias.

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

Não há, praticamente, mudança da posição dos núcleos da molécula durante as transições eletrônicas, este tipo de transição é caracterizado pela passagem de um elétron que se encontra num estado de menor energia para um de maior energia, após a radiação ser absorvida. Quanto aos outros tipos de transições, ocorre a modificação da posição relativa dos átomos na molécula. Quando ocorre mudança nos níveis vibracionais, os núcleos dos átomos mudam de posição continuamente devido a alterações nas distâncias ou em seus ângulos de ligação. Já quando há mudança nos níveis rotacionais, os átomos da molécula mudam de posição devido a rotações sobre eixos definidos (centro de gravidade), enquanto os níveis de energia translacionais ocorrem devido a movimentos de translação da molécula como um todo (OLIVEIRA, 2001b).

As técnicas espectroscópicas: espectroscopia na região do Infravermelho (IR), espalhamento Raman, ultravioleta–visível (UV-VIS) e a ressonância magnética nuclear (RMN) na atualidade, são os principais recursos para a identificação e elucidação estrutural de

substâncias orgânicas, sendo bastante relevante na determinação da pureza e quantificação de substâncias orgânicas, assim como no controle e acompanhamento de reações e processos de separação. A utilização desses métodos físicos de análise traz grandes vantagens, destacando-se a diminuição do tempo de análise, redução substancial nas quantidades de amostra, aumento da capacidade de identificar ou caracterizar estruturas complexas, e não destruição da amostra (com exceção da EM). A espectroscopia na região do infravermelho tem sido também, amplamente utilizada em linhas de produção, no controle de processos industriais (LOPES; FASCIO, 2004).

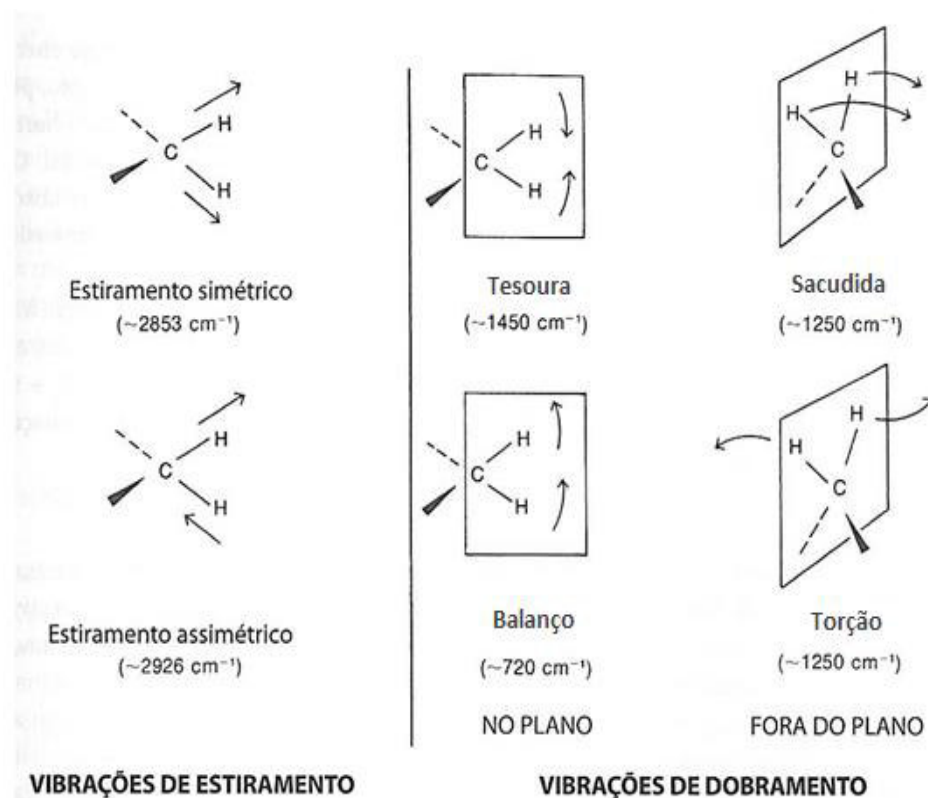
A interação da radiação eletromagnética com o movimento vibracional dos núcleos origina os espectros vibracionais que podem ser observados pelas técnicas de espectroscopia Infravermelho e espalhamento Raman. Contudo, como os efeitos físicos envolvidos nas duas técnicas são distintos, os modos vibracionais ativos também serão diferentes, ou seja, alguns modos normais da molécula aparecem somente no Infravermelho ou somente no Raman. Portanto, essas técnicas são consideradas complementares e para se obter uma análise completa dos modos vibracionais de um sistema químico pode ser necessário avaliar os dois espectros (OLIVEIRA, 2001b; SKOOG *et al.*, 2002).

3.8.1 Modos normais de vibração

Sob a ação da radiação eletromagnética, os átomos de uma molécula podem se movimentar nas três direções dos eixos cartesianos (x , y e z). A quantidade e a qualidade de movimentos que podem ser realizados pelos átomos que compõem a molécula são chamados de graus de liberdade. Uma molécula de N átomos pode se mover em 3 direções, o que implica em $3N$ modos distintos de movimentos associados aos três tipos possíveis de translação. Quando se trata de uma molécula linear, ou seja, seus átomos estão dispostos sobre um mesmo eixo do sistema de coordenadas, haverá 3 modos translacionais e apenas 2 movimentos rotacionais, pois não pode haver rotação sobre o eixo em que a molécula está definida. O número de movimentos vibracionais é calculado pelo total de graus de liberdade ($3N$) menos a quantidade de movimentos translacionais e rotacionais presentes na molécula e são denominados de modos normais de vibração. Assim, uma molécula linear terá $3N - 5$ vibrações moleculares. Já em uma molécula que não é linear ocorrem todos os modos translacionais e rotacionais, portanto o número de modos vibracionais é definido por $3N - 6$ (OLIVEIRA, 2001b; SKOOG *et al.*, 2002).

As vibrações moleculares podem ser classificadas de duas formas: vibração de deformação axial ou estiramento (*stretching*) e vibração de deformação angular (*bending*). As vibrações de estiramento são caracterizadas por uma variação contínua na distância interatômica ao longo do eixo da ligação entre dois átomos e as deformações angulares são caracterizadas pela variação do ângulo entre duas ligações. Os estiramentos são classificados em: simétricos (*symetric*) e assimétricos (*asymetric*). Já as vibrações de deformação angular podem ser de quatro tipos: assimétrica no plano (*rocking*, balanço ou oscilação), simétrica no plano (*scissoring* ou tesoura), simétrica fora do plano (*wagging*, sacudida ou balanço em fase) e assimétrica fora do plano (*twisting*, torção ou balanço fora de fase) (SKOOG *et al.*, 2002; OZAKI *et al.*, 2007; PAVIA *et al.*, 2009). Os tipos de vibrações moleculares estão representados na Figura 6.

FIGURA 6 – Tipos de vibrações moleculares.



Fonte: PAVIA *et al.*, 2010.

3.8.2 Espectroscopia no Infravermelho

3.8.2.1 Regiões espectrais no Infravermelho

A região espectral do infravermelho (IR) abrange uma radiação com número de onda de 12.800 a 10 cm^{-1} que é comumente dividida de acordo com as aplicações e instrumentação em três regiões: radiação no infravermelho próximo, médio e distante (SKOOG *et al.*, 2002). O número de onda é uma grandeza física inversamente proporcional ao comprimento de onda e pode ser definido como o número de comprimentos de onda por unidade de distância, isto é, $1/\lambda$ onde λ é o comprimento de onda, já a frequência trata-se do número de oscilações completas (ciclos) geradas por unidade de tempo (minuto, segundo etc.), sendo que a menor distância entre dois pontos consecutivos nos quais a perturbação se repete é o comprimento de onda. A Tabela 2 apresenta as três regiões espectrais de classificação do infravermelho.

TABELA 2– Regiões espectrais do infravermelho.

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

Fonte: SKOOG *et al.*, 2002.

Para que possa ocorrer a absorção da radiação infravermelho (IR) por uma molécula, esta tem que sofrer uma variação no momento de dipolo como consequência do movimento rotacional ou vibracional. Este momento é determinado pela magnitude da carga elétrica e pela distância entre dois centros de carga. Somente nessas condições o campo elétrico alternado da radiação pode interagir com a molécula, causando variações na amplitude de um de seus movimentos.

Para moléculas diatômicas homonucleares, tais como O_2 , N_2 ou Cl_2 , nenhuma variação efetiva no momento de dipolo é observada durante a vibração ou rotação, impedindo que estas moléculas absorvam radiação no infravermelho (SKOOG *et al.*, 2002; HOLLER *et al.*, 2009).

3.8.3 Espalhamento Raman

3.8.3.1 Espalhamento Rayleigh e Espalhamento Raman

A obtenção dos espectros Raman ocorre ao irradiar uma amostra com uma fonte *laser* (Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação) de radiação monocromática no visível ou no infravermelho próximo. Quando a radiação atravessa um meio transparente, as espécies presentes espalham uma fração do feixe em todas as direções. Se essa radiação for espalhada com o mesmo valor de comprimento de onda, ou seja, a energia for igual antes e depois da interação com a matéria, será um espalhamento elástico. Se a radiação depois de interagir com a matéria, tiver um comprimento de onda diferente da radiação incidente será um espalhamento inelástico da luz (OLIVEIRA, 2001b; SKOOG et al., 2002).

O espalhamento elástico também denominado de espalhamento *Rayleigh* é aquele em que a luz espalhada tem a mesma frequência da luz incidente (ν_0). Já o espalhamento inelástico ou Raman ocorre quando a luz espalhada tem frequência igual a da luz incidente mais ou menos a frequência vibracional da molécula (ν_m) (RICCI, 2008).

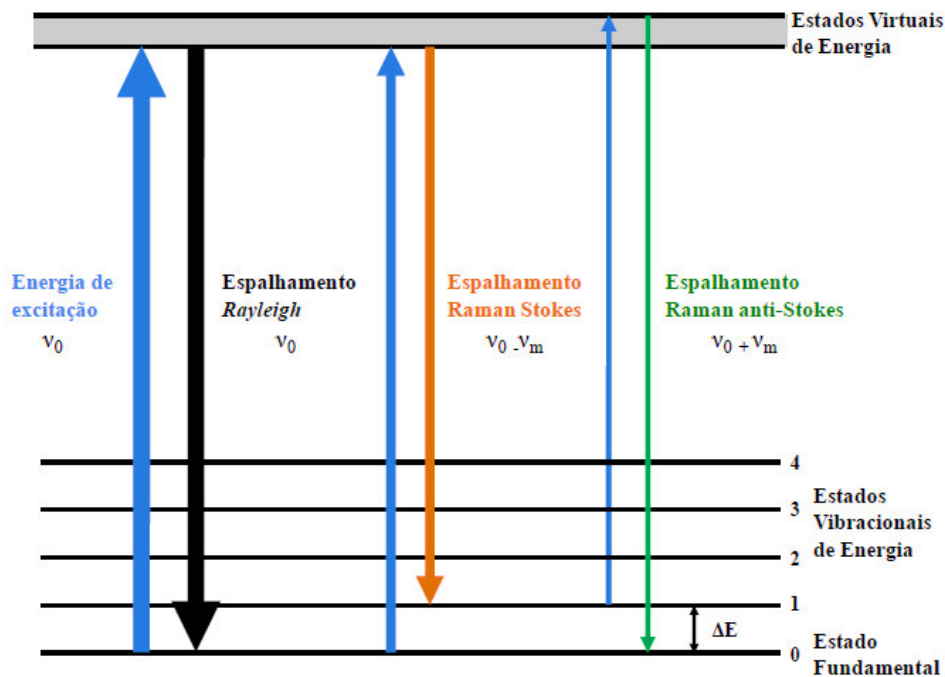
O espalhamento Raman envolve uma distorção momentânea da nuvem eletrônica em torno de um átomo ou de uma molécula, seguida por reemissão da radiação enquanto a nuvem eletrônica volta ao estado normal. Na sua forma distorcida, a molécula fica temporariamente polarizada. A grandeza física que está associada à capacidade de deformação da nuvem eletrônica de um determinado átomo ou molécula frente ao efeito de um campo elétrico externo é denominada de polarizabilidade. Portanto, a atividade Raman está ligada à polarizabilidade da molécula devido a interação do campo elétrico externo da radiação com a amostra, gerando um momento de dipolo induzido. De acordo com a mecânica quântica uma vibração somente é ativa no espectro Raman, quando durante a vibração ocorre uma mudança na polarizabilidade (OLIVEIRA, 2001b; SKOOG et al., 2002).

O espalhamento Raman pode ser de dois tipos: *Stokes* e *Anti-Stokes*. Quando a radiação espalhada é de menor frequência do que a radiação incidente, ela é chamada de espalhamento *Stokes*, já quando a radiação espalhada possui frequência maior do que a radiação da fonte é chamada espalhamento *Anti-Stokes* (HOLLER et al., 2009).

Um diagrama ilustrando os níveis de energia envolvidos nos espalhamentos *Rayleigh* e Raman é mostrado na Figura 7. No espalhamento *Rayleigh*, as partículas encontram-se no seu estado fundamental (estado no qual essas estão em um menor nível de energia). Quando esses sofrem colisão com o fóton de energia (que é a luz incidente),

passando do estado fundamental para um estado virtual e voltam em seguida para o estado fundamental, o fóton espalhado conserva a energia que já possuía.

FIGURA 7 – Representação esquemática das transições entre níveis de energia para os tipos de espalhamento Rayleigh e Raman. (Fonte: RICCI, 2008).



Nomenclatura: ν_0 = frequência da luz incidente, ν_m = frequência vibracional da molécula.

Fonte: Adaptado de RICCI (2008); SKOOG *et al.* (2002).

No espalhamento Raman *Stokes*, as moléculas sofrem colisão com o fóton passando do estado fundamental para o estado virtual e, em seguida, decaem para um estado vibracional excitado de energia, então esse fóton espalhado terá energia menor que a radiação incidente. No espalhamento Raman *anti-Stokes*, o fóton encontra a molécula já em um estado excitado e leva a molécula a uma energia bem mais alta. Quando chega ao estado virtual, a molécula decai para o estado fundamental, assim o fóton espalhado terá energia maior que a radiação incidente. O espalhamento *Rayleigh* tem probabilidade de ocorrência muito maior que o Raman, bem como o espalhamento Raman *Stokes* ocorre com mais frequência que o *Anti-Stokes*, devido à contribuição do fator de Boltzmann, ou seja, o número de moléculas que estão no estado fundamental é muito maior que o de moléculas no estado excitado (SKOOG *et al.*, 2002).

O espectro Raman de uma determinada molécula consiste de uma série de picos ou bandas, cada um correspondendo a uma frequência vibracional característica daquela molécula. Cada molécula tem o seu próprio espectro característico e, dessa forma, o espectro Raman pode fornecer uma “impressão digital” ou *fingerprint* de uma substância da qual a sua estrutura molecular pode ser determinada (LORINCZ *et al.*, 2004).

3.8.4 Mecânica Quântica

Na mecânica quântica usa-se a equação de Schrödinger para calcular as propriedades de uma molécula, a partir das interações entre os seus elétrons e núcleos (BARREIRO; RODRIGUES, 1997). O movimento dos elétrons é considerado mais rápido e independente do núcleo e, uma vez que os elétrons giram em torno do núcleo, é possível descrever a energia eletrônica separadamente da energia nuclear. Os cálculos de mecânica quântica não são exatos, pois são feitas algumas aproximações baseadas em dados empíricos (CARVALHO *et al.*, 2003).

3.8.5 Teoria do Funcional da Densidade (DFT)

Um dos métodos de cálculos teóricos de química quântica mais usados atualmente é a Teoria do funcional da densidade (DFT: Density Functional Theory). Essa teoria baseia-se na ideia de utilizar funcionais de densidade em vez da função de onda como ponto de partida para tratar sistemas com muitos elétrons. Uma vez determinada a densidade eletrônica, é possível obter toda a informação física sobre o sistema estudado. De fato, o método DFT permite obter diversas propriedades físicas e químicas de um material que dependam da energia total do sistema ou de diferenças de energia. Por meio do DFT pode-se analisar as ligações químicas, calcular parâmetros geométricos, energia de ionização, afinidades eletrônicas, momento de dipolo, polarizabilidade, estudar os modos normais de vibração, os espectros de absorção e de emissão, susceptibilidades e propriedades eletrônicas e magnéticas de uma variedade de sistemas moleculares (MARQUES; BOTTI, 2006).

A teoria do funcional da densidade (DFT) foi desenvolvida nos anos 1960, por W. Kohn, P. Hohenberg e L. Sham (HOHEMBERG *et al.*, 1964; KOHN *et al.*, 1965).

Na metodologia DFT, a minimização da energia total utilizando as funções de densidade eletrônica em função da posição espacial $\rho = \rho(\vec{r})$ é equivalente ao cálculo das funções de onda do estado fundamental do sistema, até para um sistema de muitas partículas.

Na DFT a energia total é função da densidade ρ e das coordenadas \vec{r} dos núcleos atômicos: $E = E(\rho, \vec{r})$. A energia total pode ser decomposta de forma exata em energia cinética, energia de Coulomb, e um termo que inclui os fatores de troca e correlação eletrônica. A essência da teoria é a minimização de E em relação às (funções) densidades eletrônicas ρ . Assumindo que a energia total possui um ponto mínimo local com relação à densidade eletrônica total do sistema pode-se chegar às Equações de Kohn-Shan:

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

ou

$$H_i\Psi_i = E_i\Psi_i \quad (3)$$

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

onde H é o Hamiltoniano, $-\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2$ é o operador energia cinética monoelétrica, $U(\vec{r})$ é o operador Coulombiano que inclui todas as interações eletrostáticas, $\mu_{xc}(\vec{r})$ é o termo de troca e correlação eletrônica, E_i as energias (autovalores) e Ψ_i as funções de onda (autovetores). Uma exigência fundamental para que as equações acima tenham solução para um dado sistema molecular em estudo é que a energia do estado fundamental que é determinada pelo Hamiltoniano e a função de onda do estado fundamental devem ser um funcional da densidade eletrônica do estado fundamental.

3.9 A Modelagem Molecular no Desenvolvimento de Novos Fármacos

O elevado investimento e a grande quantidade de tempo para desenvolvimento de fármacos são fatores preocupantes para o desenvolvimento da indústria farmacêutica, que precisa investir em pesquisa e criar novos fármacos com maior eficácia e seletividade. As estimativas denotam um gasto entre 800 milhões a 1,4 bilhões de dólares e um tempo de 15 a 25 anos para o desenvolvimento de um novo fármaco sem a aplicação de técnicas de modelagem molecular (GELDENHUYS *et al*, 2006). Assim, para diminuir tempo e custo, a utilização de inovações científicas e tecnológicas, combinando conhecimentos multidisciplinares de informática, biotecnologia, química e biologia, refletem no planejamento de novos fármacos de produção rápida e eficaz (DREWS, 2000, 2003). A

utilização de métodos computacionais no estudo e no planejamento de compostos bioativos tem se tornado uma prática comum nos dias atuais.

Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada – IUPAC – (da sigla inglesa – *International Union of Pure and Applied Chemistry*), a modelagem molecular (MM) é a investigação das estruturas e das propriedades moleculares pelo uso de química computacional e técnicas de visualização gráfica, visando fornecer uma representação tridimensional, sob um dado conjunto de circunstâncias (SANT’ANNA, 2009; ANDRADE *et al.*, 2010); o conceito é bastante amplo e sua definição mais geral abarca qualquer análise de dados moleculares utilizando-se métodos computacionais. No entanto, o entendimento usual, na pesquisa farmacêutica, desta moderna área do conhecimento está na utilização das ciências da informação e da implementação computacional de técnicas físicas e estatísticas aplicadas ao estudo dos sistemas biológicos, desde o nível molecular (p.ex. DNA, RNA, proteínas) até o dos organismos e sistemas complexos (OLIVA, 2008).

O processo de descoberta de novos fármacos, atribuição da Química Medicinal, caracteriza-se por sua complexidade, fruto da multiplicidade de fatores que envolvem o planejamento molecular de novas estruturas capazes de apresentar os efeitos farmacológicos desejados, com biodisponibilidade adequada ao seu emprego terapêutico, seguro e confortável (BARREIRO *et al.*, 2001; BARREIRO, 2002). Esse processo envolve necessariamente o trabalho de uma equipe multidisciplinar, que emprega um grande conjunto de metodologias computacionais de modo sistemático e de forma a facilitar e otimizar o processo de desenvolvimento de compostos bioativos, em uma constante troca de informações com grupos de síntese química e avaliação da atividade destes compostos (SANT’ANNA, 2009).

Na atualidade, o planejamento racional de fármacos fundamenta-se basicamente no conhecimento da estrutura molecular dos receptores, o que possibilita elaborar substâncias com perfis farmacológicos mais definidos. Contudo, as hipóteses são elaboradas fundamentando-se no conhecimento das propriedades físico-químicas dos compostos ativos e seus respectivos sítios moleculares de ação. Entretanto, como muitas vezes a estrutura dos receptores não é conhecida admite-se que a gênese de moléculas potencialmente bioativas seja realizada sem levar em conta sua natureza (AMARAL *et al.*, 2003).

Um dos mais importantes avanços no planejamento e na descoberta de novos fármacos tem sido a utilização da modelagem molecular. Atualmente, esta é uma ferramenta indispensável não somente no processo de descoberta de novos fármacos, mas também na otimização de protótipos já existentes e no planejamento racional de candidatos a fármacos (COHEN, 1996; CARVALHO *et al.*, 2005; SANT’ANNA, 2009; WERMUTH, 2009).

O grande desenvolvimento da modelagem molecular nos últimos anos deveu-se em grande parte ao avanço dos recursos computacionais em termos de *hardware* (velocidade de cálculo) e de *software* (programas computacionais), além dos avanços em química computacional, ressonância magnética nuclear, cristalografia de raios-X, bioquímica e biologia molecular (COHEN, 1996). Isto permitiu grande contribuição na descoberta de candidatos a fármacos, conduzindo a rápidos progressos em pesquisas e despertando o interesse tanto do meio acadêmico como de indústrias farmacêuticas (COHEN, 1996; WERMUTH, 2009; ANDRADE, 2010).

Os avanços na computação têm permitido a construção de softwares de alto desempenho, especificamente no que diz respeito ao uso de imagens 3D (tridimensionais) projetadas em duas dimensões que, devido a suas características, permitem uma melhor visualização dos modelos adotados pela comunidade científica para representar os arranjos atômicos e os processos envolvidos nos fenômenos químicos (FERREIRA *et al.*, 2011).

Ela permite a obtenção de propriedades específicas de uma molécula que podem influenciar na interação com o receptor. Como exemplos, podemos citar o mapa de potencial eletrostático, o contorno da densidade eletrônica e a energia e os coeficientes dos orbitais de fronteira HOMO (Orbital molecular mais alto ocupado) e LUMO (Orbital molecular mais baixo ocupado) (RODRIGUES, 2001).

Grande parte dos programas de modelagem molecular são capazes de desenhar a estrutura molecular e realizar os cálculos de otimização geométrica e estudos de análise conformacional. Os arquivos de saída destes cálculos podem ser utilizados como arquivos de entrada para outros programas. Desta forma, a primeira etapa em estudos de modelagem molecular é desenhar a estrutura da molécula. Em seguida, a molécula é otimizada objetivando encontrar parâmetros geométricos tais como comprimentos e ângulos de ligação que estejam próximos aos valores determinados experimentalmente (RODRIGUES, 2001).

Assim, um programa de modelagem molecular deve ser capaz de adotar o princípio da transferibilidade, ou seja, reconhecer e transferir os parâmetros embutidos no programa para uma nova molécula que apresente as mesmas características estruturais e eletrônicas das moléculas usadas para confeccionar o programa (mesmo tipo de átomos, funções químicas, hibridização molecular, etc.) (RODRIGUES, 2001). Somada à química quântica computacional é uma ferramenta útil que fornece suporte às teorias e modelos que descrevem a natureza quântica da matéria. Atualmente, os métodos mais promissores na descrição de sistemas moleculares, são os de Hartree-Fock e a Teoria do Funcional de Densidade (DFT) (SILVA *et al.*, 2009).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A coleta da planta *C. blanchetianus* Baill, bem como a extração e isolamento da Sonderianina foram realizados pelo Prof. Hécio Silva dos Santos no Laboratório de Química Orgânica da Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA) em Sobral-CE, Brasil.

4.1 Material vegetal

Amostras do caule da espécie *C. blanchetianus* Baill (Figura 8) foram coletadas no município de Sobral-CE em março de 2011. A identificação botânica foi realizada pela professora Daniela Santos Carneiro-Torres, e uma exsicata encontra-se depositada no Herbário Francisco José de Abreu Mattos-UVA sob o número 14986.

FIGURA 8 – Caule do *Croton blanchetianus* Baill.



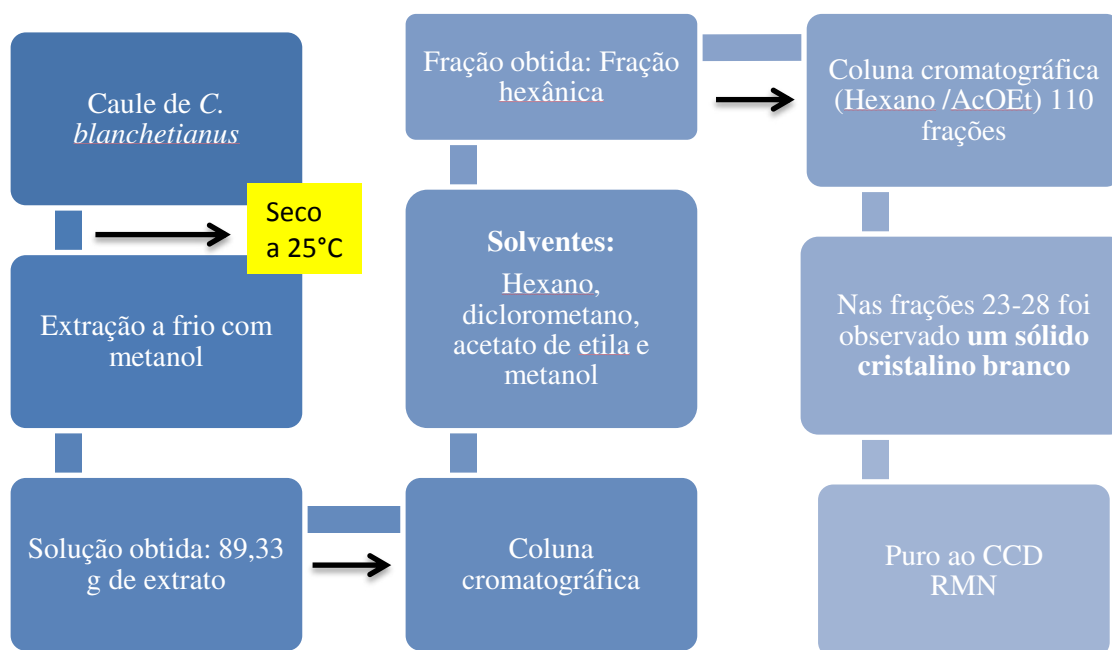
Fonte: Diogo Sérgio, 2014.

4.2 Extração e isolamento

O material vegetal constituído do caule de *C. blanchetianus* foi seco a temperatura ambiente, triturado e submetido a extração a frio com metanol. A solução obtida foi destilada sob pressão reduzida fornecendo 89,33 g de extrato. Preparou-se uma coluna cromatográfica a partir do extrato metanólico do lenho de *C. blanchetianus* (89,33 g), o qual foi adsorvido em 325,95 g de sílica gel e sobreposto em 283,18 g de sílica gel. Como eluentes foram utilizados os seguintes solventes em ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. A fração hexânica obtida da coluna anterior (21,51 g), foi adsorvida em 87,96

g de sílica gel e sobreposta em 121,09 g de sílica gel, foram utilizados os seguintes solventes em ordem crescente de polaridade: hexano (F 1-10), hexano/acetato de etila 9:1 (F 11-20), hexano/acetato de etila 8:2 (F 21-30), hexano/acetato de etila 7:3 (F 31-40), hexano/acetato de etila 6:4 (F 41-50), hexano/acetato de etila 1:1 (F 51-60), hexano/acetato de etila 4:6 (F 61-70), hexano/acetato de etila 3:7 (F 71-80), hexano/acetato de etila 2:8 (F 91-90), hexano/acetato de etila 1:9 (F 91-100), acetato de etila (F 101-110), fornecendo um total de 110 frações. Nas frações 23-28 foi observada a presença de um sólido cristalino branco denominado CBW-1, o qual mostrou-se puro através de análise por Cromatografia de Coluna Delgada (CCD). Na figura 9, podemos observar o esquema com as etapas do processo de extração e isolamento.

FIGURA 9 – Esquema de extração e isolamento da Sonderianina.



Fonte: Autora.

4.3 Determinação Estrutural

A estrutura molecular do diterpeno sonderianina foi elucidada pelo Prof. Raimundo Braz-Filho da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro- UENF utilizando Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio e carbono-13 (RMN ^1H e ^{13}C),

espectrometria de massa e comparação com os dados do Banco de Dados Estrutural de Cambridge (Cambridge Structural Database - CSD) (ANEXOS A, B e C) (GIL *et al.*, 2008; MCPHAIL *et al.*, 1989).

4.4 Espectroscopia vibracional

A caracterização da Sonderianina se deu através da espectroscopia no Infravermelho, realizada no Laboratório de Bioinformática Avançada da Universidade Regional do Cariri (URCA) e o Espalhamento Raman foi realizado no Laboratório de Espalhamento de Luz do Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza-CE, Brasil.

4.4.1 Medidas Raman e FT-IR

As medidas por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR: Fourier transform infrared) foram realizadas usando o espectrofotômetro da marca Agilent, modelo CARY 600 FT-IR, como mostrado na Figura 10. As amostras foram diluídas em KBr na razão média de 1:100 e prensadas em forma de pastilhas sob 9 tom por 2 min.

FIGURA 10 – Espectrômetro utilizado nas medidas FT-IR.



Fonte: Autora.

As medidas de espalhamento Raman foram realizadas utilizando o equipamento de Micro-Raman da marca Jobin Yvon, T64000, como mostrado na Figura 11, com a amostra excitada na linha 514,5 nm do laser de argônio, com uma potência de 150 mW.

FIGURA 11 – Espectrômetro utilizado nas medidas Raman.



Fonte: PEREIRA, 2014.

4.5 Métodos Computacionais

Os cálculos computacionais desta dissertação foram realizados no programa Gaussian 03, utilizando o algoritmo baseado na Teoria do Funcional da Densidade (DFT). Esses foram realizados numa molécula isolada do cristal do diterpeno sonderianina ($C_{21}H_{26}O_5$) utilizando um híbrido (o funcional de correlação Lee-Yang-Parr B3LYP) e o conjunto de base 6-31 G (d, p) (LEE *et al.*, 1988; PARR *et al.*, 1989; BECKE *et al.*, 1993).

Após a realização dos cálculos computacionais no *Gaussian*, foi gerado um arquivo de saída que continha a estrutura otimizada e as frequências vibracionais da molécula sonderianina. Utilizando-se o programa *Chemcraft* 1.6 foi possível a análise dos parâmetros geométricos que são: os comprimentos, ângulos e diedros das ligações entre os átomos e também analisar as atribuições dos tipos de modos vibracionais presentes na molécula.

A molécula do diterpeno sonderianina ($C_{21}H_{26}O_5$) foi otimizada e foi possível identificar as frequências vibracionais e os deslocamentos atômicos de cada modo. Na estrutura otimizada da molécula, nenhum modo de frequência imaginária foi obtido, provando que um verdadeiro mínimo sobre a superfície de energia potencial foi encontrado. As atribuições das vibrações moleculares foram baseadas em cálculos da distribuição de energia potencial (PED) usando o programa *Gar2ped* (MARTIN *et al.*, 2007). Este procedimento permitiu atribuir, com boa precisão, as vibrações moleculares presentes nos espectros Raman e infravermelho de $C_{21}H_{26}O_5$.

Para descrever as atribuições das vibrações moleculares para as bandas Raman e Infravermelho, fizemos uso dos seguintes símbolos: τ = torção; *sc* = tesoura; *wag* = sacudida, δ = deformação; γ = deformação fora do plano; ν = estiramento; ν_{as} = estiramento

assimétrico; ν_s = estiramento simétrico. No que diz respeito à classificação da intensidade das bandas de Raman e infravermelho, foi utilizada a notação seguinte: vs, s, m, w e vw, respectivamente, representando intensidade muito forte, forte, média, fraca e muito fraca. As intensidades das bandas Raman e Infravermelho foram normalizadas no intervalo de [0,1] com o propósito de analisar o quão forte se apresenta uma dada banda nesses espectros. Definiu-se a intensidade da banda de acordo com um intervalo da amplitude normalizada. Os parâmetros considerados para classificação das intensidades das bandas estão representados na Tabela 3.

TABELA 3 – Parâmetros da amplitude normalizada utilizados para classificação da intensidade das bandas de FT-IR (ω_{FT-IR}) e Raman (ω_{Raman}) obtidas experimentalmente.

Intensidade	Intensidade Normalizada (I)
Muito Forte (vs)	$50 < I < 100$
Forte	$30 < I < 50$
Média (m)	$20 < I < 30$
Fraca (w)	$15 < I < 20$
Muito fraca (vw)	$I < 15$

Fonte: LIMA, BAKKER, 2011.

Os números de onda da molécula do diterpeno sonderianina obtidos por cálculos teóricos de química quântica empregando o método DFT com o funcional B3LYP e o conjunto de base 6-31(d,p) foram ajustados às bandas Raman experimentais por um fator de escala calculado. Quanto mais próximo de um (1) for o valor do fator de escala, significa que mais próximo encontram-se os números de onda teóricos dos experimentais.

4.6 Atividade antimicrobiana

Os testes para a avaliação da atividade antimicrobiana foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da Universidade Regional do Cariri (URCA), Crato-CE, Brasil.

4.6.1 Preparação da amostra

A amostra da Sonderianina isolada de *C. blanchetianus* foi dissolvida em Dimetilsulfóxido (DMSO- Merck, Darmstadt, Alemanha), nas seguintes proporções: 10mg da amostra para 1mL de DMSO, obtendo-se uma concentração inicial de 10 mg/mL⁻¹. Em seguida, diluiu-se essa solução até um volume de 5 mL para ser utilizada nos testes. A solução foi preparada da seguinte forma: foi separada uma alíquota da solução inicial e dissolveu-se em DMSO até uma concentração final de 1024µg/mL⁻¹. Testou-se a solubilização em água destilada estéril, porém o composto não foi solúvel. Então, utilizou-se como solvente o DMSO.

4.6.2 Cepas microbianas

Os microorganismos utilizados nos testes são provenientes da “American Type Culture Collection” (ATCC), obtidas por meio do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde. A fim de determinar da concentração inibitória mínima (CIM) foram utilizadas as cepas bacterianas Gram positiva: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e Gram negativas: *Escherichia coli* ATCC 25922, e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619. Já as cepas fúngicas utilizadas foram: *Candida albicans* 122, *C. krusei* 01 e *C. tropicalis* 18. Para avaliar o efeito da Sonderianina frente aos antibióticos foram utilizadas as cepas bacterianas multirresistentes: *P. aeruginosa* 03, e *E. coli* 27; já para avaliar a atividade moduladora de antifúngicos foram utilizadas as mesmas cepas fúngicas do ensaio de CIM. O perfil das linhagens multirresistentes de bactérias está descrito no Quadro 2.

QUADRO 2- Perfil de Resistência das bactérias aos antibióticos		
Bactérias	Fonte	Perfil de Resistência
<i>Escherichia coli</i> 27	Ferida Cirúrgica	Ast, Ax, Ami, Amox, Ca, Cfc, Cf, Caz, Cip, Chlo, Im, Kan, Szt, Tet, Tob
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 03	Cultura de urina	Cpm, Ctz, Im, Cip, Ptz, Lev, Mer, Ami

Fonte: adaptado de MORAIS-BRAGA et al. (2013)

Ast: aztreonam; Ax: amoxicilina; Ami: amicacina; Amox: amoxicilina; Ca: cefadroxil; Cfc: cefaclor; Cf: cefalotina; Caz: ceftazidima; Cip: ciprofloxacina; Chlo: chloranphenicol; Im: imipenem; Kan:

canamicina; Szt: sulfametrim; Tet: tetraciclina; Tob: tobramicina; Oxa: oxacilina; Gen: gentamicina; Ctz: ceftazidima; Ptz: piperacilina-tazobactam; Lev: levofloxacina; Mer: meropenen.

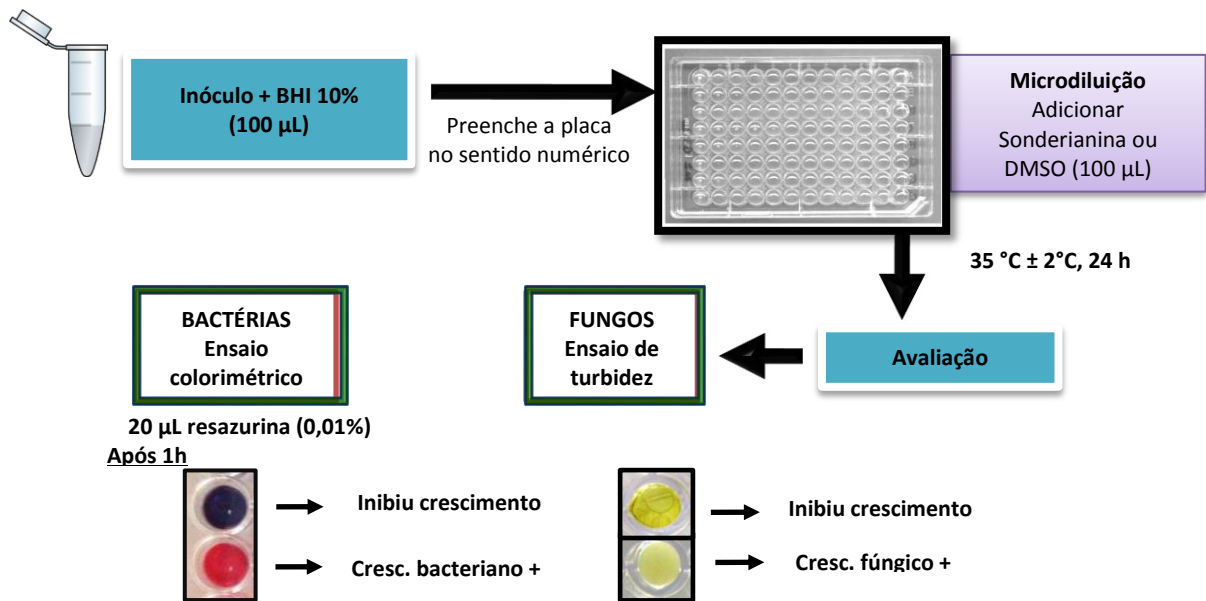
4.6.3 Preparação dos inóculos

Todos os meios de cultura foram preparados segundo as especificações do fabricante. As cepas microbianas foram mantidas em placas de Petri, contendo o meio Ágar Infusão de coração (Heart Infusion Agar- HIA; Difco Laboratories Ltd.) a 4 °C, com a finalidade de se conservarem todas as suas características bioquímicas e o perfil de sensibilidade a antimicrobianos. Antes da realização dos ensaios de CIM e modulação, as cepas bacterianas e fúngicas foram retiradas com uma alça de drigalski da cultura estoque e cultivadas em 5 mL de Caldo de Infusão de cérebro e coração (Brain heart infusion broth- BHI; HIMEDIA – Índia), sendo em seguida incubadas em estufa bacteriológica a 35 ± 2 °C por 24 h. Para preparação do inóculo dos testes foram utilizadas as suspensões bacterianas ou fúngicas em meio BHI descritas anteriormente, retirou-se 100 µL dessa suspensão e inoculou em 900 µL de caldo BHI 10% (proporção 1:10) para se obter uma concentração final de 10^5 UFC-mL⁻¹ (unidades formadoras de colônia/mL) (NCCLS, 2000).

4.6.4 Concentração inibitória mínima (CIM)

Para chegarmos à CIM da Sonderianina, foi realizado um ensaio de microdiluição (JAVADPOUR et al., 1996) em microplacas contendo 96 poços de fundo redondo de acordo com a Norma M7-A6 (CLSI, 2003) como mostra a Figura 12. Foi realizado da seguinte forma: em cada poço foi adicionado 100 µL da solução contendo o inóculo de bactéria ou fungo de cada cepa (10^5 UFC-mL⁻¹) e o meio BHI a 10%. As cepas bacterianas ou fúngicas foram distribuídas no sentido numérico das placas, sendo cada coluna numérica representada por uma cepa diferente. Após isso, 100 µL do composto Sonderianina foi colocado no primeiro poço e realizaram-se diluições seriadas (1:1) até o penúltimo poço da microplaca, resultado nas concentrações de 512, 256, 128, 64, 32, 16 e 8 µg-mL⁻¹ do composto. O último poço da microplaca é constituído apenas pelo inóculo e o meio BHI 10%, representando o controle para verificação da viabilidade das cepas. Foi realizada também uma microdiluição, utilizando-se o DMSO em vez do composto para a verificação da influência do solvente na atividade antimicrobiana. Depois as placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h.

FIGURA 12 – Esquema do método de obtenção da CIM da Sonderianina.



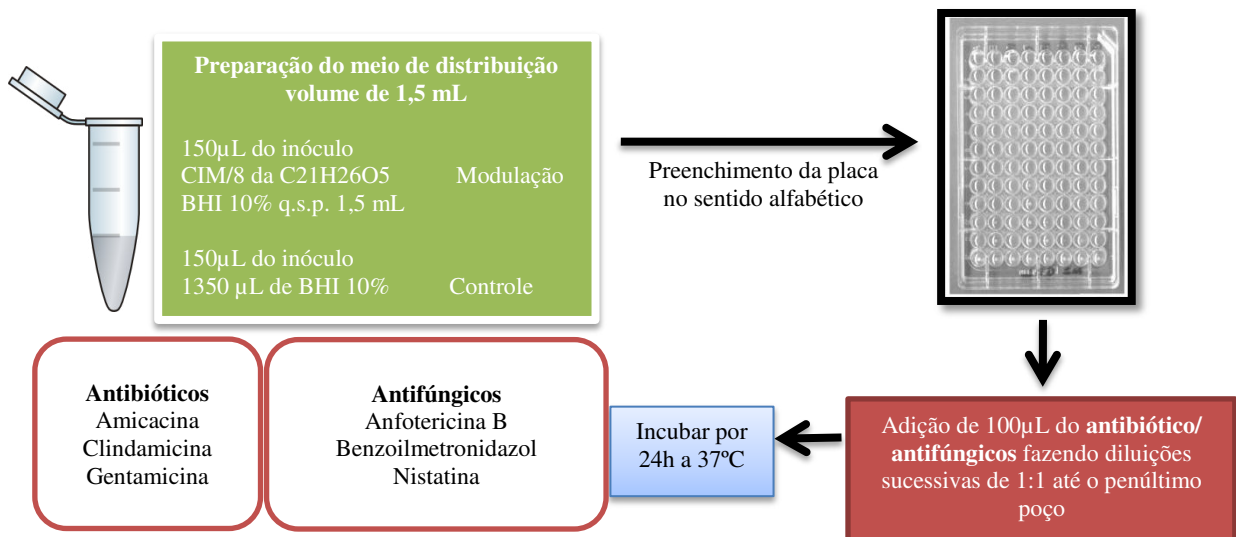
Fonte: Autor, adaptado de JAVADPOUR *et al.* (1996)

4.6.5 Atividade Moduladora

Para a realização do teste que avalia o efeito do composto sonderianina como modulador da atividade dos antibióticos/antifúngicos foram utilizados os aminoglicosídeos: amicacina, clindamicina e gentamicina (Sigma-USA), com concentração de $5.000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e os antifúngicos: anfotericina B, benzoilmetronidazol, e nistatina (Sigma-USA), com concentração de $1.024 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ como mostra a Figura 13. A modulação foi realizada através de um ensaio de microdiluição em microplacas com 96 poços (COUTINHO *et al.*, 2008), seguindo o sentido alfabético em que cada coluna (letra) representa um antibiótico ou antifúngico diferente. Com a obtenção da CIM, esse valor foi reduzido 8 vezes (CIM/8), resultando na concentração subinibitória do composto e do DMSO para ser utilizado no ensaio de modulação. Em cada poço foi adicionado 100 µL de uma solução contendo: 150 µL do inóculo ($10^5 \text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$) de bactéria de cada cepa, o composto ou DMSO (controle) na concentração subinibitória de $16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (128/8) e o meio BHI 10% q.s.p 1.500 µL. Já para o 150µL do inóculo das cepas fúngicas, os valores da concentração subinibitória foram diferentes, de $23 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ da Sonderianina ou DMSO frente aos fungos *C. albicans* 122 e *C. tropicalis* 18; e de $12 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ frente ao fungo *C. krusei* 01 e o meio BHI 10% q.s.p 1.500 µL. Em seguida, 100 µL do antibiótico ou antifúngico foi colocado no primeiro poço e realizou-se

diluições seriadas (1:1) até o penúltimo poço da microplaca. As concentrações dos antibióticos foram 2.500; 1.250; 625; 312,50; 156,25; 78,12; 39,06; 19,53; 9,76; 4,88; 2,44 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Já as concentrações dos antifúngicos foram 512; 256; 128; 64; 32; 16; 8,0; 4,0; 2,0; 1,0; 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. O último poço da microplaca não contém o antibiótico ou antifúngico, a fim de se verificar a viabilidade das cepas. No grupo controle não foi adicionado o composto, apenas o inóculo, o meio BHI 10 % e o antibiótico ou antifúngico. Portanto, consiste em dois controles: o do solvente em que foi substituído a substância pelo DMSO e o do antibiótico ou antifúngico em que não foi colocado nem a substância, nem o DMSO. Depois do teste, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h.

FIGURA 13 – Esquema do método de Avaliação da Atividade Moduladora da Sonderianina



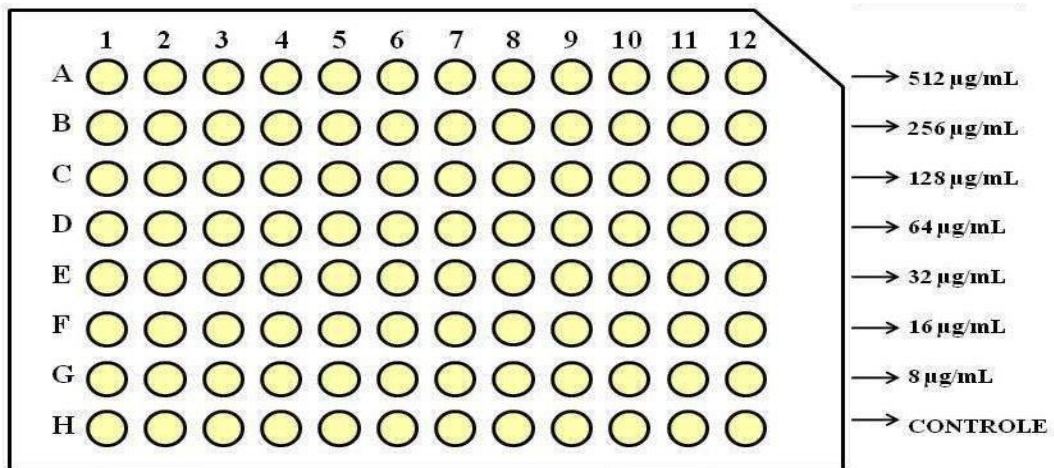
Fonte: Autora

4.6.6 Avaliação da atividade antimicrobiana e moduladora

Tanto para os ensaios da CIM, como da modulação, a avaliação do crescimento microbiano foi realizado de forma similar. Para determinar se houve crescimento bacteriano foi realizada uma análise colorimétrica, utilizando-se o corante resazurina 0,01% (p/v). Após o período de 24h de incubação, foi adicionado 20 μL do corante em cada poço da microplaca, e após 1 h a 25°C foi feita a leitura. A alteração na cor de azul para rosa indica que houve crescimento bacteriano e explica-se devido à redução da resazurina, já a permanência da coloração azul, indica ausência de crescimento (PALOMINO *et al.*, 2002). A CIM será determinada pela menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento bacteriano.

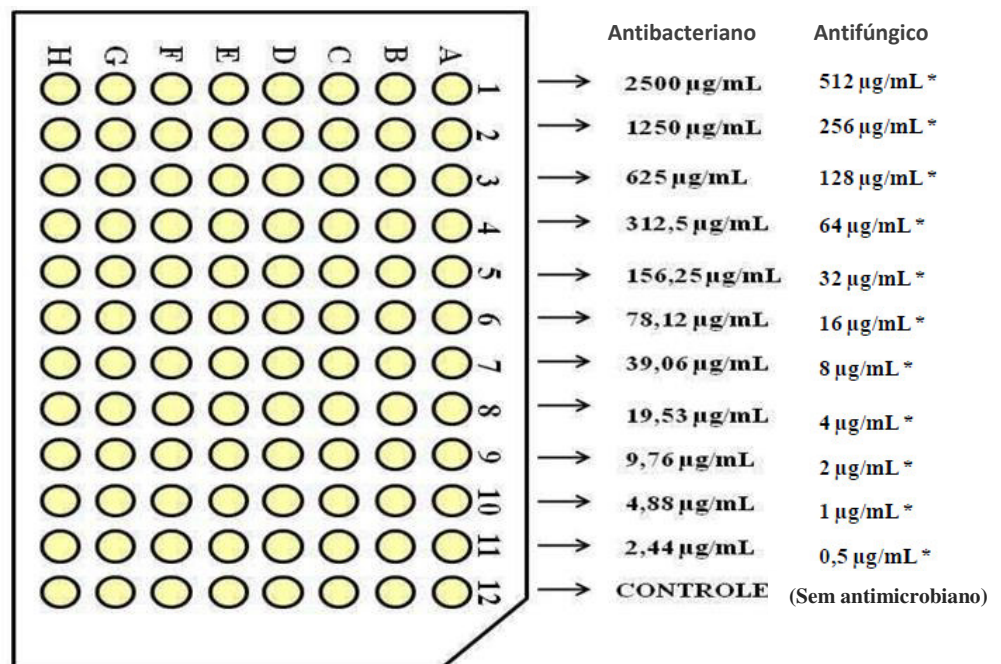
Quanto aos ensaios realizados com fungos, para determinar se houve crescimento fúngico, foi realizada uma avaliação com base na turbidez. A CIM é a menor concentração do composto em que houve 100 % da inibição do crescimento do fungo, visualizado através da ausência de turbidez do meio. A seguir, as Figuras 14 e 15 mostram a posição das placas e suas concentrações nos testes de CIM e Modulação, respectivamente.

FIGURA 14 – Placa no teste de CIM



Fonte: Autora

FIGURA 15 – Placa no teste de Modulação



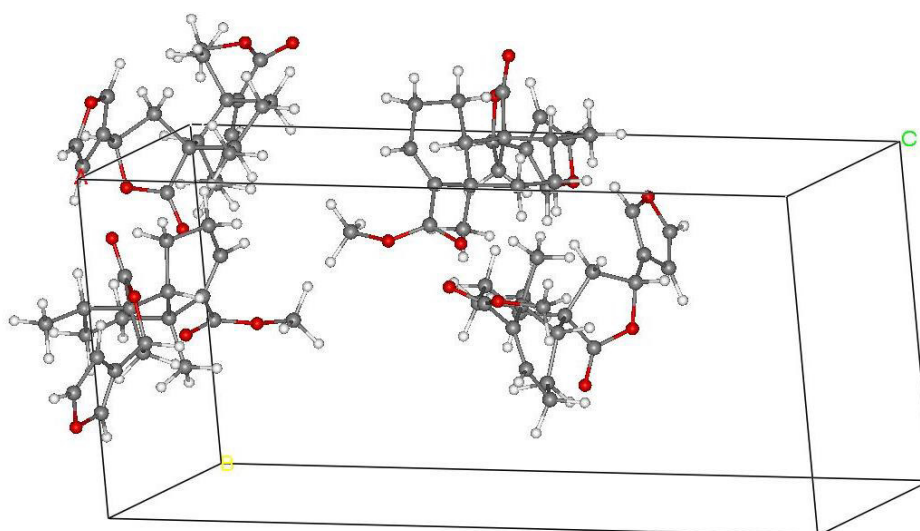
Fonte: Autora

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estrutura Molecular

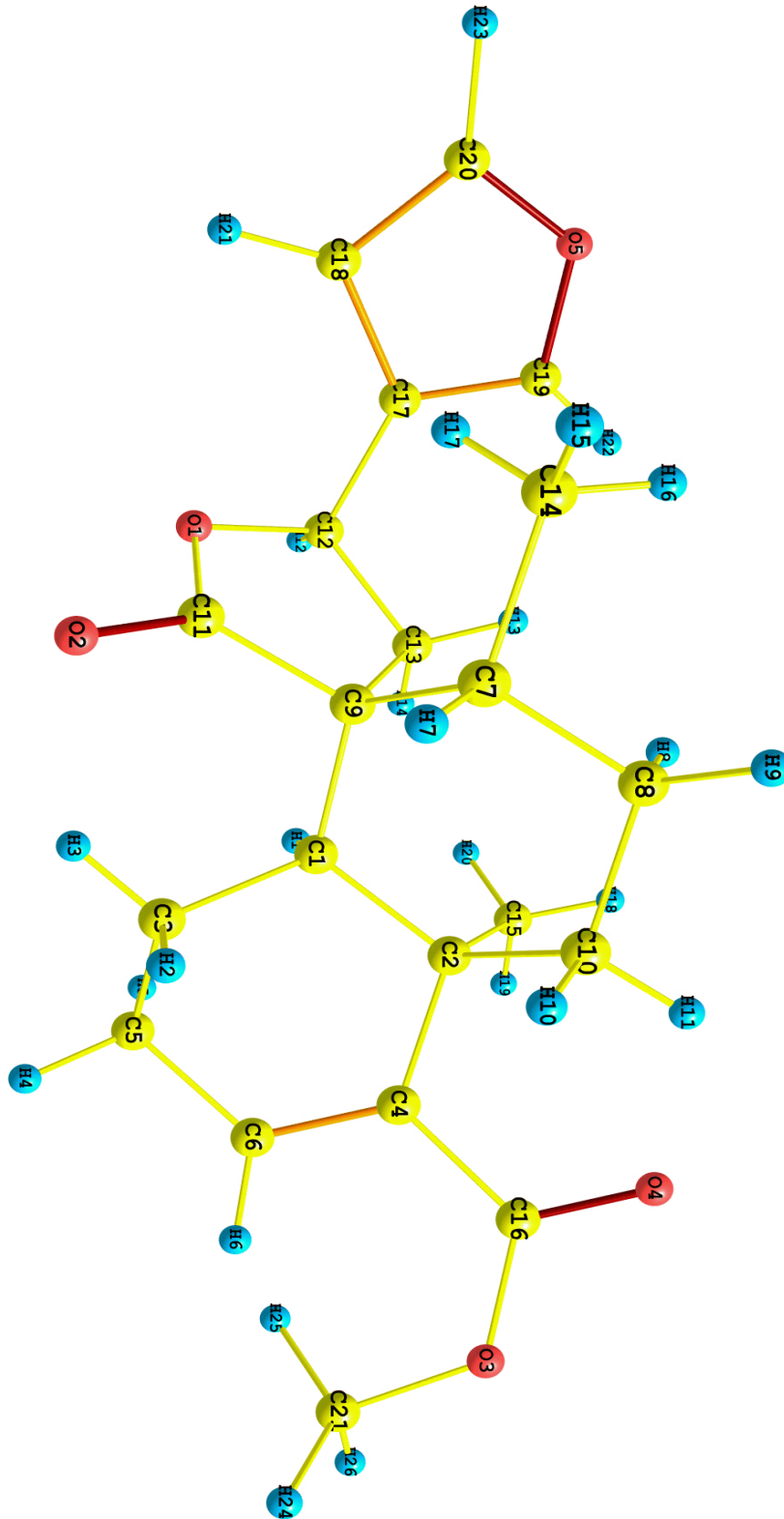
O cristal de sonderianina à temperatura ambiente pertence à estrutura ortorrômbica, grupo espacial $P2_12_12_1$ com $Z=4$ (quatro unidades por célula unitária) e parâmetros de rede: $a = 7,314 \text{ \AA}$, $b = 10,481 \text{ \AA}$, $c = 24,276 \text{ \AA}$ com $\alpha = \beta = \gamma = 90,0^\circ$ (CRAVEIRO *et al.*, 1981b). A distribuição das quatro moléculas da sonderianina na célula unitária é mostrada na Figura 16.

FIGURA 16 – Estrutura cristalina do diterpeno sonderianina



Fonte: Autora.

A estrutura base da molécula $C_{21}H_{26}O_5$ do diterpeno sonderianina é composta por um anél do tipo furano que é um composto orgânico heterocíclico e aromático formado pelos átomos de carbono 17, 18, 19 e 20, por uma γ -butirolactona formada pelos átomos de carbono 9, 11, 12 e 13 e dois anéis condensados, dos quais, um está ligado a um grupo funcional éster ($H_3C21O3C16O4$). A estrutura molecular e a numeração usada para descrever os átomos da molécula $C_{21}H_{26}O_5$ são apresentadas na Figura 17.

FIGURA 17 – Fórmula estrutural e molecular do diterpeno Sonderianina ($C_{21}H_{26}O_5$).

Fonte: Autora.

Na Tabela 4, foi apresentada comparação entre os parâmetros geométricos (calculada e experimental) da molécula do diterpeno Sonderianina.

TABELA 4 – Comparação dos parâmetros geométricos (calculada e experimental) do diterpeno Sonderianina.

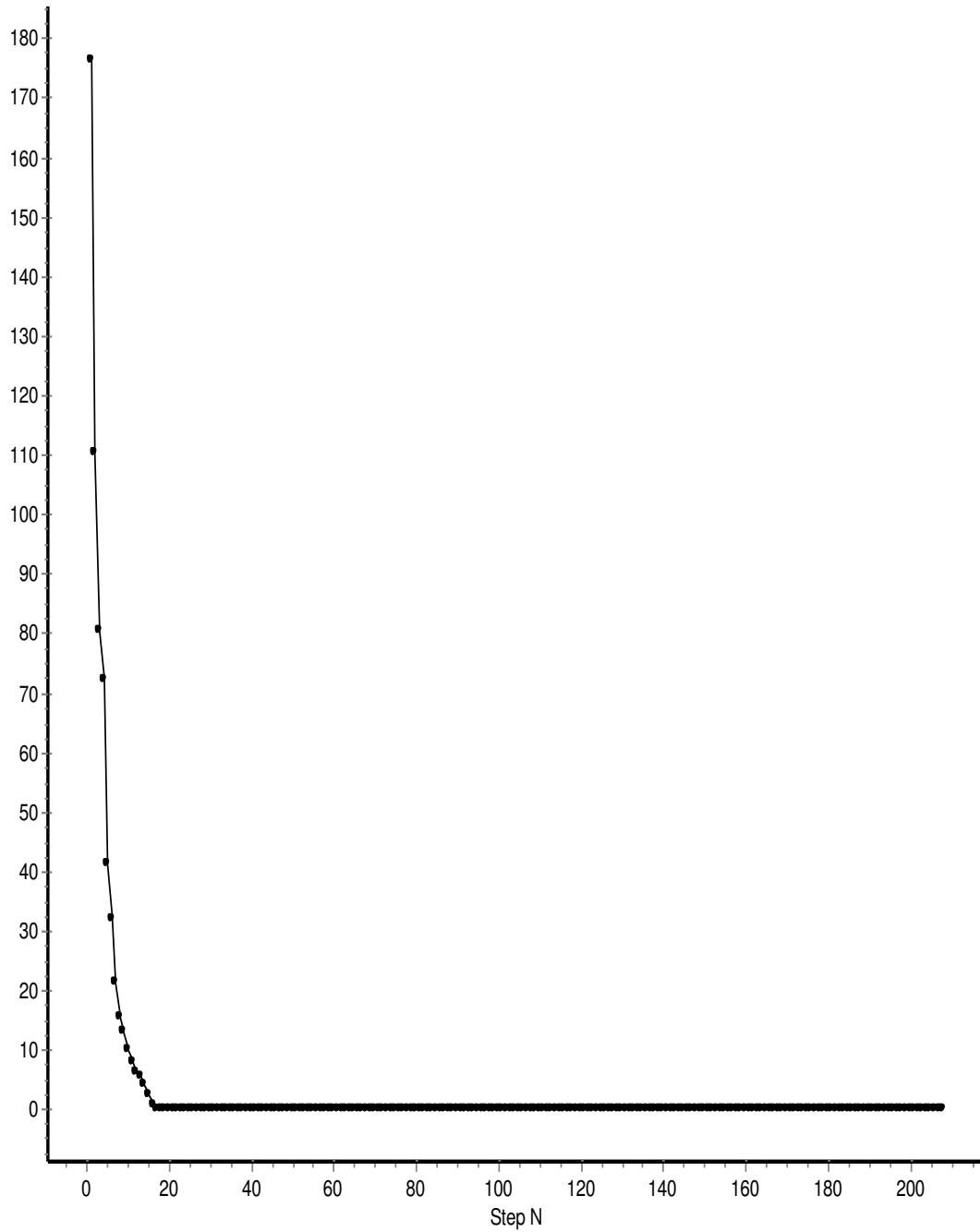
Comp. da Ligação	Exp. (Å)	Calc. (Å)	Comp. da Ligação	Exp. (Å)	Calc. (Å)
C1 - C2	1.55	1.58	C9 - C13	1.55	1.56
C1 - C3	1.57	1.55	C12 - C13	1.44	1.55
C1 - C9	1.58	1.58	C12 - C17	1.44	1.50
C2 - C4	1.55	1.54	C13 - C12	1.59	1.55
C2 - C10	1.55	1.56	C17 - C18	1.44	1.44
C2 - C15	1.54	1.55	C17 - C19	1.38	1.36
C3 - C5	1.58	1.53	C18 - C20	1.33	1.36
C4 - C6	1.31	1.34	O1 - C11	1.22	1.36
C4 - C16	1.51	1.51	O1 - C12	1.35	1.45
C5 - C6	1.57	1.50	O2 - C11	1.35	1.21
C7 - C8	1.52	1.53	O3 - C16	1.31	1.36
C7 - C9	1.55	1.57	O3 - C21	1.47	1.43
C7 - C14	1.58	1.54	O4 - C16	1.19	1.21
C8 - C10	1.55	1.53	O5 - C19	1.37	1.36
C9 - C11	1.48	1.55	O5 - C20	1.39	1.36

Ângulo da Ligação	Exp. (°)	Calc. (°)	Ângulo da Ligação	Exp. (°)	Calc. (°)
C2 - C1 - C3	109.3	110.0	C7 - C9 - C13	108.3	114.7
C2 - C1 - C9	119.5	113.1	C11 - C9 - C13	104.4	102.3
C3 - C1 - C9	110.4	113.7	C2 - C10 - C8	109.3	112.9
C1 - C2 - C4	104.6	109.2	C9 - C11 - O1	112.5	111.9
C1 - C2 - C10	107.0	109.7	C9 - C11 - O2	128.9	127.5
C1 - C2 - C15	117.3	112.6	O1 - C11 - O2	118.6	120.5
C4 - C2 - C10	110.1	110.1	C11 - O1 - C12	113.4	112.6
C4 - C2 - C15	108.3	106.0	O1 - C12 - C13	104.5	106.4
C10 - C2 - C15	109.3	109.1	O1 - C12 - C17	108.7	109.0
C1 - C3 - C5	107.2	111.2	C13 - C12 - C17	112.9	116.2
C2 - C4 - C6	123.2	124.6	C9 - C13 - C12	105.1	106.7
C2 - C4 - C16	118.9	117.8	C9 - C13 - H1	125.6	111.4
C6 - C4 - C16	117.6	117.5	C4 - C16 - O3	111.9	119.4
C3 - C5 - C6	115.3	111.8	C4 - C16 - O4	124.4	122.9
C4 - C6 - C5	124.1	123.8	O3 - C16 - O4	123.7	117.6
C8 - C7 - C9	112.6	111.5	C16 - O3 - C21	117.1	123.0
C8 - C7 - C14	109.7	111.4	C12 - C17 - C18	125.6	126.2
C9 - C7 - C14	111.2	114.0	C12 - C17 - C19	128.5	128.0
C7 - C8 - C10	110.9	112.8	C18 - C17 - C19	105.8	105.7
C1 - C9 - C7	108.9	110.4	C17 - C18 - C20	107.3	106.3
C1 - C9 - C11	114.0	111.6	C17 - C19 - O5	109.6	110.7
C1 - C9 - C13	108.6	111.7	C18 - C20 - O5	110.3	110.6
C7 - C9 - C11	112.3	105.7	C19 - O5 - C20	106.9	106.8

Fonte: Autor

Na Figura 18, a seguir, mostra o gráfico de energia da molécula otimizada da Sonderianina, com o seu menor nível de energia, que foi submetida aos testes de espectroscopia vibracional.

FIGURA 18 – Gráfico de Energia da molécula de Sonderianina ($C_{21}H_{26}O_5$).

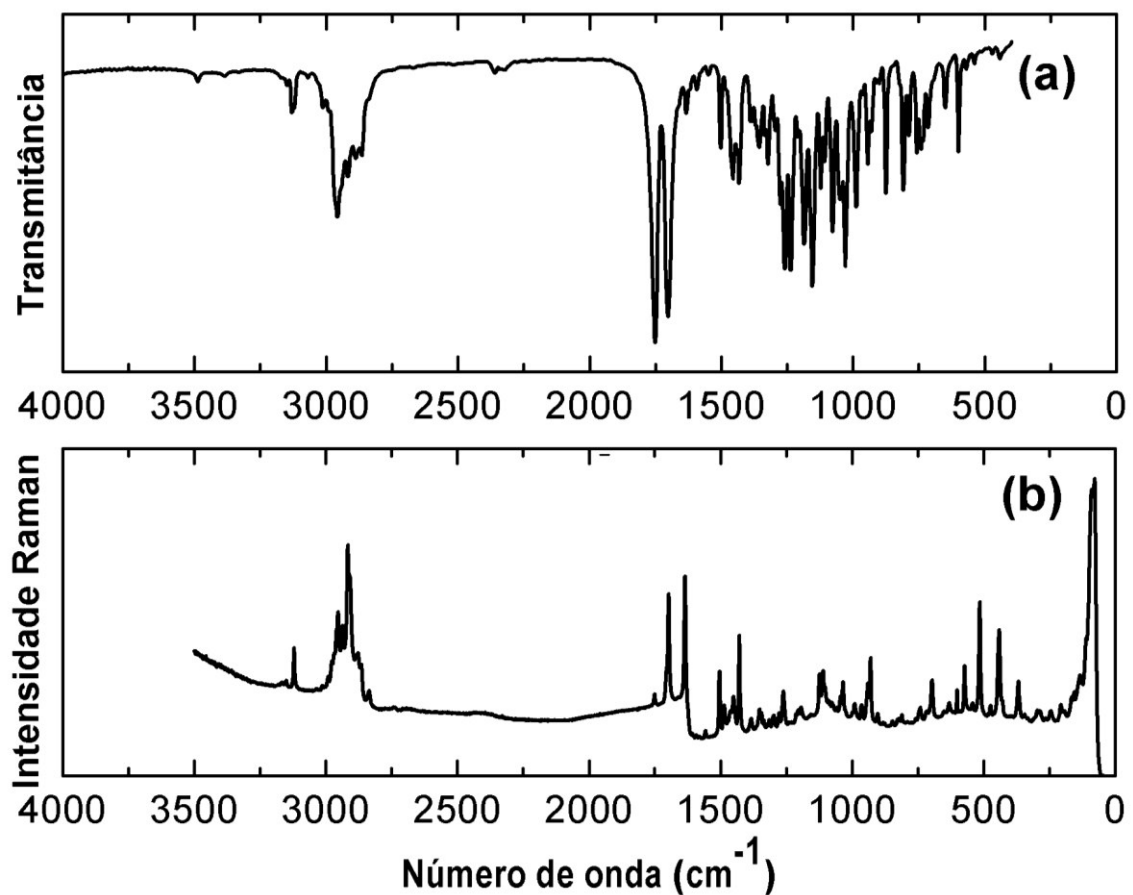


Fonte: Autora

5.2 Espectroscopia vibracional

Os espectros Raman e FT-IR para o cristal sonderianina ($C_{21}H_{26}O_5$) são apresentados na Figura 19. Eles foram registrados à temperatura e pressão ambiente nas regiões de 400 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} e 40 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} , respectivamente, com resolução de 4 cm^{-1} .

FIGURA 19 – Espectros Raman e Infravermelho do cristal do diterpeno sonderianina registrados à temperatura e pressão ambiente nas regiões 40 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} , respectivamente.



Fonte: Autora.

A molécula do diterpeno sonderianina ($C_{21}H_{26}O_5$) tem 51 átomos, portanto existem 153 graus de liberdade, excluindo-se os modos de translação e rotação, são esperados 147 modos vibracionais para uma molécula isolada desta substância. No entanto, no espectro Raman foram observadas 68 bandas e no espectro FT-IR foram observadas 50 bandas, dessas

33 bandas aparecem tanto no Raman quanto no Infravermelho, 32 bandas são exclusivamente Raman e 17 bandas são exclusivamente Infravermelho. Conclui-se que o número de modos vibracionais experimentais é menor do que o previsto.

São quatro fatores que possibilitam uma visualização experimental de um número menor de bandas (modos normais de vibração) do que o teoricamente esperado: a simetria da molécula ser muito alta, não ocorrendo variação no dipolo a partir de uma vibração particular; as energias de duas ou mais vibrações serem idênticas ou semelhantes (degenerescência); a intensidade de absorção ser tão baixa que não é detectada pelos meios comuns; e a energia vibracional estar em uma região de comprimento de onda além da faixa do instrumento (SKOOG *et al.*, 2002).

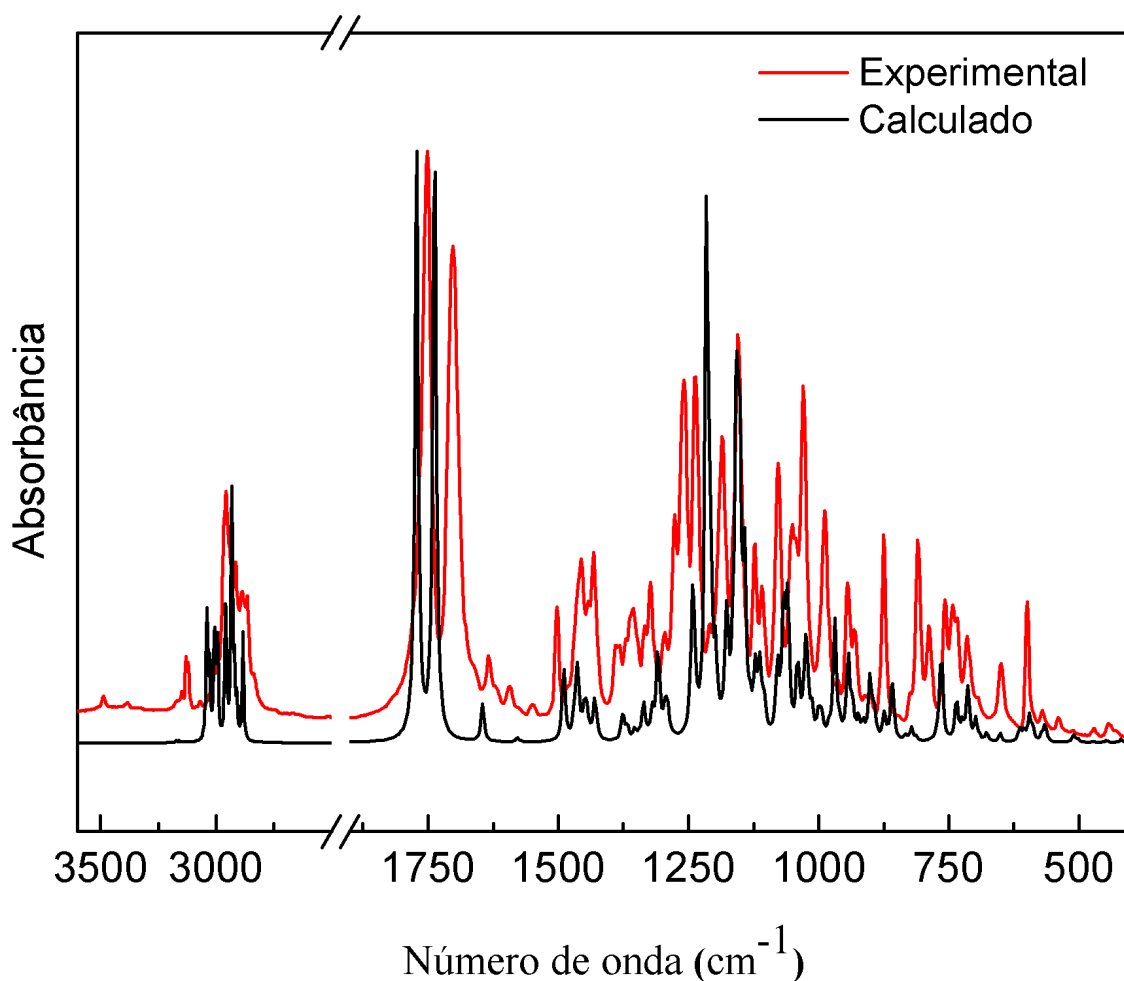
Uma descrição detalhada das atribuições dos modos vibracionais do cristal do diterpeno sonderianina é apresentada na Tabela 1 do Apêndice A dessa dissertação. Nas primeira e segunda colunas encontram-se os valores das frequências calculadas e escaladas, respectivamente. Os valores experimentais correspondentes ao número de onda para o cristal obtido por espectroscopias Raman e FT-IR, são apresentados nas terceira e quarta colunas, respectivamente. Na quinta coluna observam-se as atribuições dos modos vibracionais juntamente com a distribuição de energia potencial (PED), para valores maiores do que 10%. A contribuição percentual da PED para cada modo vibracional é mostrada entre parênteses nesta coluna.

O fator de escala (λ) obtido foi de 0,9612 com o erro quadrático total (rms_{tot}) correspondente igual a $20,1 \text{ cm}^{-1}$. Os valores obtidos para a molécula sonderianina foram menores que os valores obtidos por Wong (1996), que prevê para o método DFT com funcional B3LYP e o conjunto de base 6-31(d,p) $\lambda = 0,9613$ e $\text{rms}_{\text{tot}} = 34 \text{ cm}^{-1}$.

Na Figura 20 é mostrada a comparação entre os espectros de absorbância teórico e experimental para o cristal sonderianina ($\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_5$). Observa-se uma boa concordância entre os números de ondas teóricos e experimentais do espectro de transmitância na região de 400 cm^{-1} a 1900 cm^{-1} . Na região 2500 cm^{-1} a 1900 cm^{-1} observa-se uma concordância entre algumas bandas.

Também existem algumas divergências nas intensidades das bandas teóricas e experimentais que podem ser justificadas devido o cálculo ter sido realizado numa molécula isolada e não considerando a célula unitária do cristal.

FIGURA 20 –Comparação entre os espectros de absorbância teórico e experimental para o diterpeno sonderianina na região de 3600 cm^{-1} a 2500 cm^{-1} e 1900 cm^{-1} a 400 cm^{-1} .



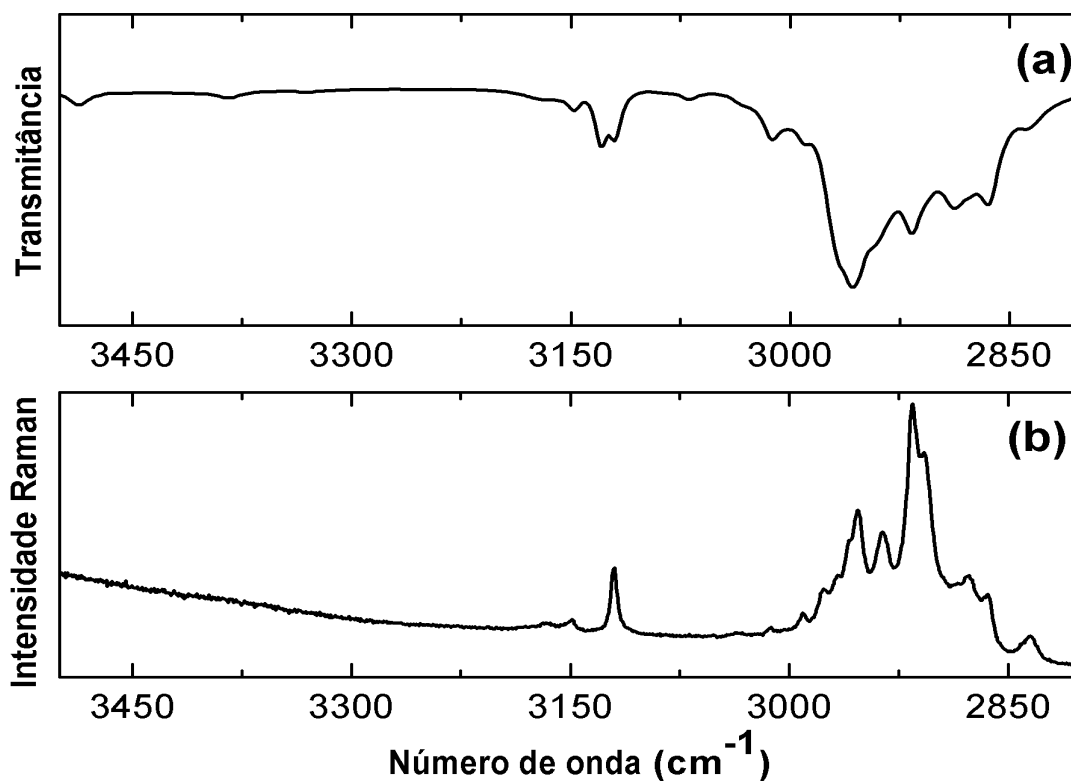
Fonte: Autora.

Com o propósito de fazer uma discussão mais aprofundada da classificação dos modos normais de vibração do cristal do diterpeno sonderianina, a região espectral de 3500 a 40 cm^{-1} será dividida em quatro regiões conforme mostrado nas subseções subsequentes.

5.2.1 Região espectral entre 3500 cm^{-1} e 2800 cm^{-1}

Os espectros FT-IR e Raman do diterpeno sonderianina na região de 3500 a 2800 cm^{-1} são apresentados na Figura 21. Nesta região, foram observadas 12 bandas Raman e 07 bandas infravermelho. As atribuições dos modos vibracionais para essas bandas é apresentada na Tabela 5.

FIGURA 21 – Espectros Raman e Infravermelho do cristal do diterpeno sonderianina na região 3500 cm^{-1} a 2800 cm^{-1} .



Fonte: autora

TABELA 5 – Frequência calculada (ω_{calc}), frequência escalada (ω_{scal}) pelo fator de escala 0,9612, posições das bandas Raman (ω_{Raman}) e IR ($\omega_{\text{FT-IR}}$) em unidades de cm^{-1} e classificação para os modos vibracionais do diterpeno sonderianina com distribuição de energia potencial (PED).

ω_{calc}	ω_{scal}	ω_{Raman}	$\omega_{\text{FT-IR}}$	Classificação com PED* (%)
2998	2882	2835 m	2361 vw	$\nu(\text{C1H}) (51) + \nu_s(\text{C5H}_2) (31)$
3000	2884	2864 s	2864 m	$\nu_s(\text{C5H}_2) (59) + \nu(\text{C1H}) (20)$
3027	2910	2907 vs	2888 m	$\nu_s(\text{C8H}_2) (52) + \nu_s(\text{C10H}_2) (23) + \nu_s(\text{C14H}_3) (11)$
3038	2920	2916 vs	2915 s	$\nu(\text{C12H}) (76) + \nu_{\text{as}}(\text{C13H}_2) (20)$
3053	2935	2936 vs		$\nu_s(\text{C21H}_3) (78)$
3070	2951	2953 vs	2957 s	$\nu_s(\text{C3H}_2) (74) + \nu_{\text{as}}(\text{C8H}_2) (19)$
3079	2960	2977 s	2964 m	$\nu_s(\text{C3H}_2) (94)$
3115	2994	2991 m		$\nu_{\text{as}}(\text{C14H}_3) (84) + \nu_s(\text{C13H}_2) (16)$
3132	3010	3013 w	3012 w	$\nu_{\text{as}}(\text{C10H}_2) (75) + \nu_{\text{as}}(\text{C15H}_3) (16)$
3163	3040		3068 w	$\nu_{\text{as}}(\text{C3H}_2) (71) + \nu_{\text{as}}(\text{C21H}_3) (20)$
3164	3041	3119 s	3121 m	$\nu_{\text{as}}(\text{C3H}_2) (58) + \nu_{\text{as}}(\text{C21H}_3) (31)$
3171	3048	3127 s	3130 m	$\nu_{\text{as}}(\text{C13H}_2) (91)$
3277	3150	3148 s	3148 w	$\nu_{\text{as}}(\text{C20H}) (100)$
3301	3173		3167 vw	$\nu(\text{C18H}) (50) + \nu(\text{C20H}) (40)$
			3384 vw	
			3486 w	

Fonte: Autora.

Para cristais orgânicos, a região entre 2800 cm^{-1} a 3200 cm^{-1} contém as bandas originadas a partir de estiramento das ligações C – H. Dentro dessa região é possível observar

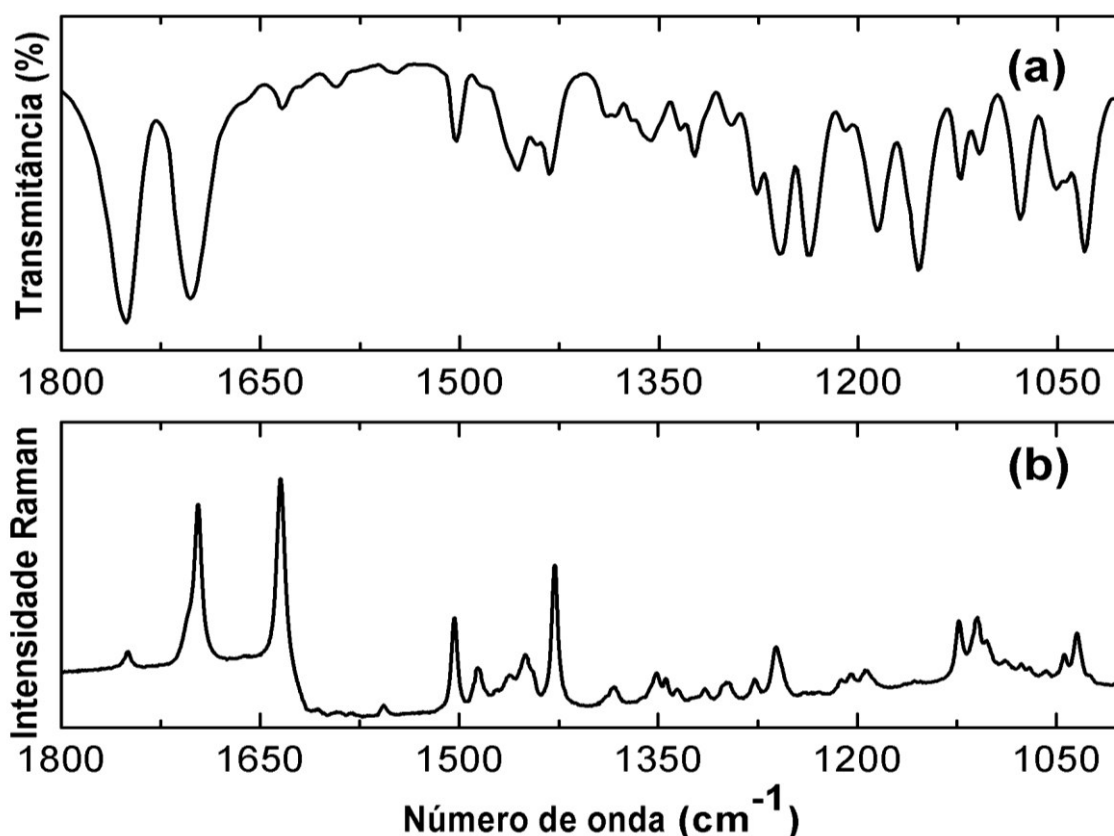
modos puros. Esses correspondem às bandas Raman localizadas em 2936 cm^{-1} , 2977 cm^{-1} (observada no IR em 2964 cm^{-1}) e 3127 cm^{-1} que correspondem, respectivamente, às vibrações de estiramento ν_s ($\text{C}21\text{H}_3$) (78), ν_s ($\text{C}3\text{H}_2$) (94) e ν_{as} ($\text{C}13\text{H}_2$) (91).

Uma vez que nenhuma banda larga nos espectros Raman e infravermelho foi nas proximidades de 3400 cm^{-1} , podemos confirmar que o cristal em estudo realmente não contém água. No entanto, existem duas bandas de transmitância com largura de linha estreita e de baixa intensidade observadas em 3486 cm^{-1} e 3384 cm^{-1} que não estão previstas nem no espectro Raman e nem nos nossos cálculos teóricos, o que chamamos de *overtone*.

5.2.2 Região espectral entre 1000 cm^{-1} e 1800 cm^{-1}

Os espectros FT-IR e Raman do diterpeno sonderianina na região entre 1800 e 1000 cm^{-1} são apresentados na Figura 22. Nesta região, foram observadas 24 bandas Raman e 23 bandas infravermelho, conforme listado na Tabela 6.

FIGURA 22 – Espectros FT-IR e Raman da sonderianina na região de 1800 a 1000 cm^{-1} .



Fonte: Autora.

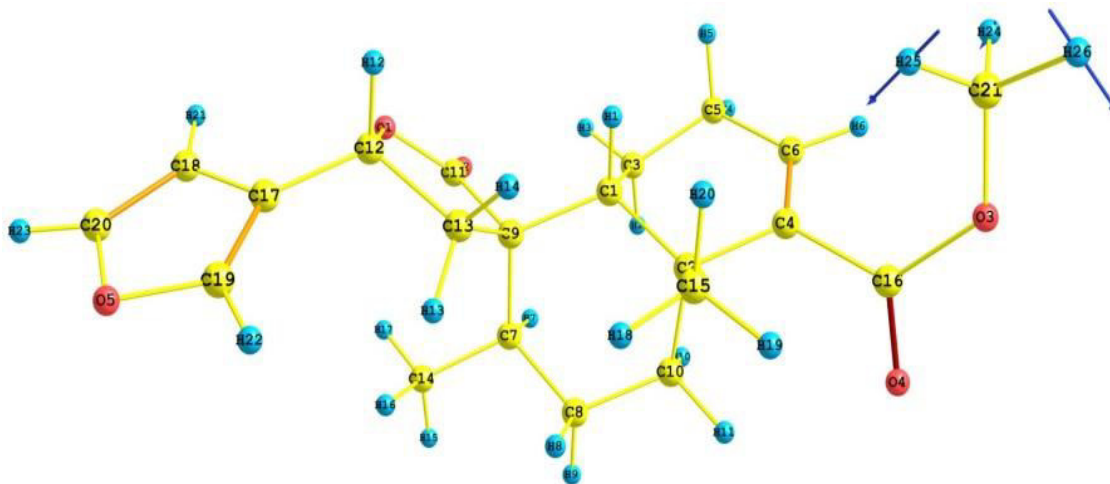
TABELA 6 – Frequência calculada (ω_{calc}), frequência escalada (ω_{scal}) pelo fator de escala 0,9612, posições das bandas Raman (ω_{Raman}) e IR ($\omega_{\text{FT-IR}}$) em unidades de cm^{-1} e classificação para os modos vibracionais do diterpeno sonderianina com distribuição de energia potencial (PED).

ω_{calc}	ω_{scal}	ω_{Raman}	$\omega_{\text{FT-IR}}$	Classificação com PED* (%)
1067	1026		1029 vs	ν (C1C3) (52) + τ (C9C1C2C10) (29)
1079	1037	1034 s		δ (HC14C7) (36) + δ (HC13C12) (19) + δ (O2C11C9) (14)
1083	1041	1044 m		δ (HC14C7) (74) + δ (O2C11C9) (11)
1102	1059	1058 m	1050 s	δ (HC15C2) (42) + ν (C1C3) (40)
1110	1067	1070 m		ν (C1C3) (54) + δ (HC14C7) (19) + τ (C9C1C2C10) (14)
1122	1078	1076 m	1078 s	δ (HC15C2) (32) + δ (O2C11C9) (19) + δ (HC14C7) (13)
1150	1105	1103 m		δ (HC14C7) (51) + δ (HC15C2) (28)
1158	1113	1109 s	1108 m	δ (HC21O3) (42) + δ (HC14C7) (34)
1167	1122	1123 s	1122 s	δ (HC21O3) (41) + δ (HC14C7) (19) + δ (O2C11C9) (14)
1188	1142		1187 s	δ (HC21O3) (60)
1205	1158	1157 m	1156 vs	δ (HC15C2) (54) + δ (HC14C7) (27)
1246	1198	1194 m		δ (HC15C2) (55) + δ (HC14C7) (31)
1257	1208	1205 m		δ (HC21O3) (23) + δ (O2C11C9) (18) + τ (C9C1C2C10) (13)
1290	1240		1238 vs	δ (HC3C1) (42) + δ (HC14C7) (29) + δ (HC21O3) (71)
1294	1244	1261 m	1259 vs	δ (HC15C2) (71) + δ (HC14C7) (16)
1330	1278	1278 m	1276 s	δ (HC3C1) (43) + δ (HC14C7) (37)
1347	1295	1299 m	1295 m	δ (HC14C7) (72) + δ (HC13C12) (11)
1374	1321		1322 s	δ (HC15C2) (29) + δ (O2C11C9) (24) + τ (C9C1C2C10) (22) + δ (HC13C12) (17)
1390	1336		1335 m	τ (C3H ₂) (66)
1400	1346	1344 m		wag (C15H ₃) (48) + δ (O2C11C9) (19)
1408	1353	1351 m	1357 m	δ (C1C3H) (68) + wag (C15H ₃) (18)
1433	1377		1389 m	wag (C15H ₃) (59) + wag (C14H ₃) (35)
1488	1430	1428 s		wag (C21H ₃) (98)
1496	1438		1433 s	δ (C14H ₃) (81)
1509	1450	1450 m		δ (C14H ₃) (94)
1519	1460		1456 s	δ (C14H ₃) (83) + δ (C21H ₃) (13)
1523	1464	1463 m		δ (C14H ₃) (89)
1549	1489	1486 m	1501 m	δ (C15H ₃) (79)
1550	1490		1548 vw	δ (C15H ₃) (66) + δ (C14H ₃) (14)
1641	1577	1503 s	1593 vw	δ (HC19O5) (72) + δ (HC19C17) (17)
1712	1646	1635 vs	1632 w	ν (C4C6) (80)
1807	1737	1696 vs	1703 vs	ν (C16O4) (100)
1844	1772	1750 m	1750 vs	ν (C11O2) (99)

Fonte: autora

Considerando que a região de *fingerprint* (impressão digital de uma dada substância) vai de 1500 a 500 cm^{-1} , a região espectral de 1800 a 1000 cm^{-1} abrange parte desta. Aqui é possível observar uma localização acentuada dos modos do grupo CH₃: vibrações *wagging* ocorrem no intervalo entre 1353 $\text{cm}^{-1} \leq \omega_{\text{scal}} \leq 1430 \text{ cm}^{-1}$, e vibração tipo deformação do CH₃ aparecem na região entre 1438 $\text{cm}^{-1} \leq \omega_{\text{scal}} \leq 1490 \text{ cm}^{-1}$. Uma banda IR de média intensidade em 1389 cm^{-1} ($\omega_{\text{scal}} = 1377 \text{ cm}^{-1}$) que foi identificada como sendo associada às vibrações: *wag* (C15H₃) (59) + *wag* (C14H₃) (35) e uma de forte intensidade em 1456 cm^{-1} ($\omega_{\text{scal}} = 1460 \text{ cm}^{-1}$) equivalente às vibrações tipo deformação: δ (C14H₃) + δ (C21H₃). A Figura 23 mostra a representação dos descolamentos atômicos da banda Raman observada em $\omega_{\text{Raman}} = 1428 \text{ cm}^{-1}$ ($\omega_{\text{scal}} = 1430 \text{ cm}^{-1}$) que é atribuída à vibração *wagging* do C21H₃.

FIGURA 23 – Representação dos vetores de deslocamentos atômicos da vibração *wagging* do C21H₃ observada em $\omega_{\text{scal}} = 1430 \text{ cm}^{-1}$.



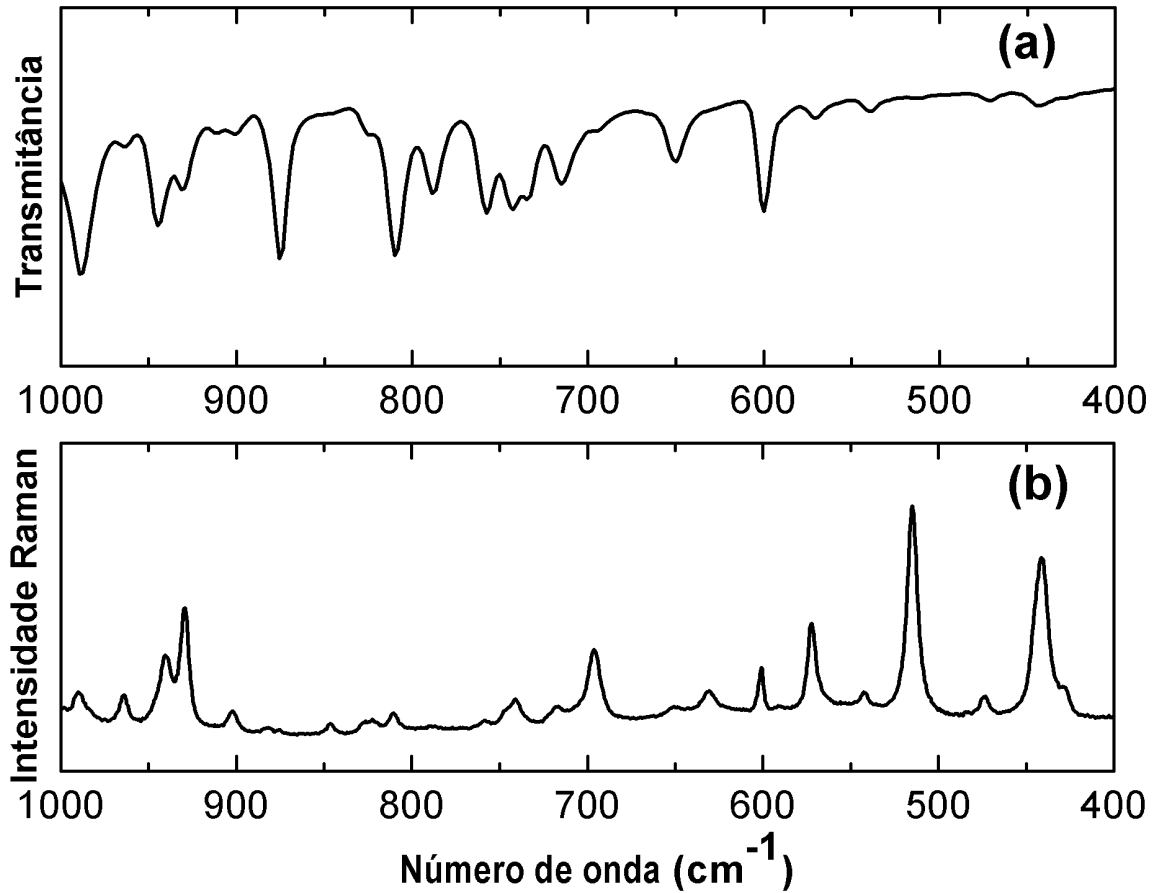
$$\omega_{\text{scal}} = 1430 \text{ cm}^{-1}$$

Fonte: Autora

Destaca-se também nessa região uma banda que se apresenta de muito forte intensidade tanto no Raman quanto no IR, respectivamente em $\omega_{\text{Raman}} = 1703 \text{ cm}^{-1}$ e $\omega_{\text{IR}} = 1696 \text{ cm}^{-1}$ que é atribuída como vibração do tipo estiramento ν (C16O4), referente à carbonila do grupo funcional éster da molécula. Uma outra vibração do tipo estiramento C – O [ν (C11O2)] apresenta-se de muito forte intensidade no Infravermelho e de média intensidade no Raman é observada em 1750 cm^{-1} ($\omega_{\text{scal}} = 1772 \text{ cm}^{-1}$).

5.2.3 Região espectral entre 1000 cm^{-1} e 400 cm^{-1}

Os espectros FT-IR e Raman do diterpeno sonderianina na região de 1000 a 400 cm^{-1} é apresentado na Figura 24. Nesta região, foram observados 21 bandas Raman e 15 bandas infravermelho conforme observado na Tabela 7.

FIGURA 24 – Espectros FT-IR e Raman da sonderianina na região de 1000 a 400 cm^{-1} .

Fonte: Autora.

TABELA 7 – Frequência calculada (ω_{calc}), frequência escalada (ω_{scal}) pelo fator de escala 0,9612, posições das bandas Raman (ω_{Raman}) e IR ($\omega_{\text{FT-IR}}$) em unidades de cm^{-1} e classificação para os modos vibracionais do diterpeno sonderianina com distribuição de energia potencial (PED).

ω_{calc}	ω_{scal}	ω_{Raman}	$\omega_{\text{FT-IR}}$	Classificação com PED* (%)
221	212	206 m		δ (O2C11C9) (33) + τ (C9C1C2C10) (32) + δ (HC14C7) (13)
315	303	297 m		δ (O2C11C9) (37) + δ (HC15C2) (26)
354	340	345 s		δ (HC14C7) (53) + τ (C9C1C2C10) (21)
382	367	367 s		δ (HC14C7) (68) + δ (O2C11C9) (20)
467	449	441 s	445 vw	τ (C9C1C2C10) (38) + δ (O2C11C9) (32) + δ (HC14C7) (13)
491	472	474 m		τ (C9C1C2C10) (42) + ν (C1C3) (19) + δ (HC14C7) (18)
531	510	515 vs		δ (O2C11C9) (42) + τ (C9C1C2C10) (42)
588	565	543 m	539 vw	δ (HC15C2) (48) + δ (HC17C2) (20) + δ (O2C11C9) (15)
594	571	572 s	570 vw	γ (C17C12C18C19) (47) + δ (O2C11C9) (23) + τ (C19C17C18C20) (21)
620	596		598 m	τ (C19C17C18C20) (100)
631	607	601 m		τ (C19C17C18C20) (48) + γ (C17C12C18C19) (18) + δ (HC15C2) (11) + τ (C9C1C2C10) (11)
639	614			δ (HC14C7) (27) + δ (O2C11C9) (22) + δ (HC15C2) (16) + δ (HC21O3) (12)
678	652	630 m	651 w	δ (HC14C7) (39) + τ (C9C1C2C10) (23) + δ (HC15C2) (22)
727	699	696 s		γ (C17C12C18C19) (37) + δ (HC15C2) (35) + δ (HC13C12) (20)
745	716	717 m	716 m	δ (O2C11C9) (27) + τ (C9C1C2C10) (21) + δ (HC14C7) (15) + τ (C19C17C18C20) (15)
765	735		743 m	τ (C9C1C2C10) (37) + δ (HC21O3) (19) + γ (C4C16C5C6) (17) + δ (HC15C2) (13)
795	764	742 m	757 m	τ (C19C17C18C20) (73) + γ (C17C12C18C19) (18)
801	770		787 m	δ (HC14C7) (26) + τ (C19C17C18C20) (25) + δ (HC15C2) (13)
845	812	810 m	809 s	δ (HC14C7) (82)

TABELA 7 – Frequência calculada (ω_{calc}), frequência escalada (ω_{scal}) pelo fator de escala 0,9612, posições das bandas Raman (ω_{Raman}) e IR ($\omega_{\text{FT-IR}}$) em unidades de cm^{-1} e classificação para os modos vibracionais do diterpeno sonderianina com distribuição de energia potencial (PED).

ω_{calc}	ω_{scal}	ω_{Raman}	$\omega_{\text{FT-IR}}$	Classificação com PED* (%)
909	874		875 s	δ (HC15C2) (51) + δ (HC14C7) (15) + δ (HC15C2) (13)
938	902	902 m	900 vw	δ (HC14C7) (81)
973	935	929 s	933 m	δ (HC15C2) (60) + δ (HC14C7) (20) + δ (HC15C2) (16)
982	944	941 s	945 m	δ (HC15C2) (54) + δ (HC14C7) (26)
1008	969	964 m		δ (HC14C7) (59) + v (C1C3) (13) + δ (O2C11C9) (13)
1034	994	990 m	990 s	δ (HC14C7) (70) + v (C1C3) (11)
1040	1000	998 m		δ (HC15C2) (52) + δ (HC14C7) (37)

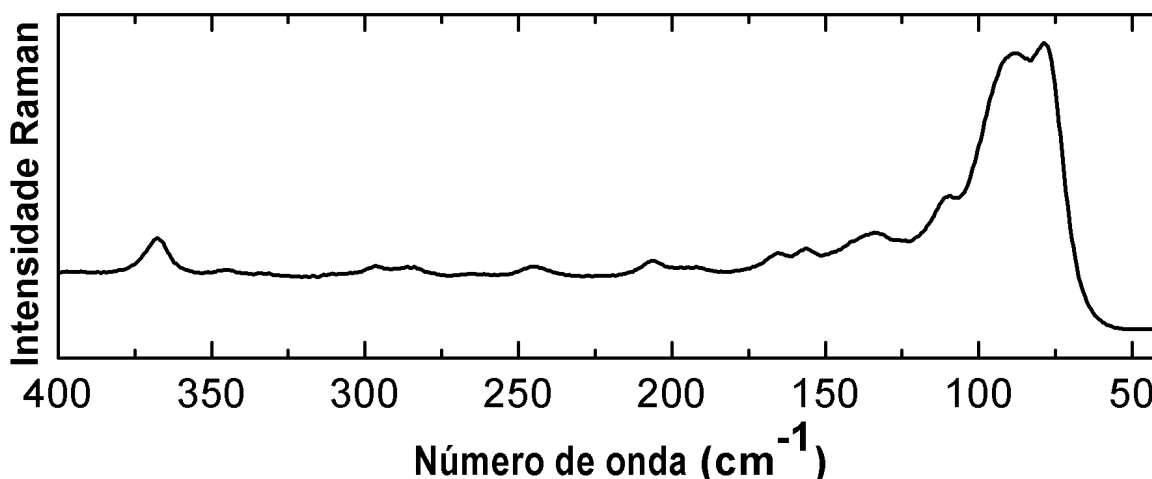
Fonte: Autora.

A região de 1000 a 400 cm^{-1} ainda abrange parte da região de *fingerprint*. A atribuição mostra que a maioria das bandas no Raman e FT-IR nessa região corresponde a misturas de modos de vibração do tipo torção, deformações angulares e deformações fora do plano. As deformações angulares δ (HC14C7) são predominantes em toda essa região, principalmente entre $340 \text{ cm}^{-1} \leq \omega_{\text{scal}} \leq 994 \text{ cm}^{-1}$. Observa-se também que as deformações fora do plano ocorrem com mais frequência no anel furano.

5.2.4 Região espectral entre 400 cm^{-1} e 40 cm^{-1}

O espectro Raman do diterpeno sonderianina na região de 400 a 40 cm^{-1} é apresentado na Figura 25. Nesta região, foram observados seis bandas Raman, conforme observado na Tabela 8.

FIGURA 25 – Espectro Raman do diterpeno sonderianina na região de 400 a 40 cm^{-1} .



Fonte: Autora.

TABELA 8 – Frequência calculada (ω_{calc}), frequência escalada (ω_{scal}) pelo fator de escala 0,9612, posições das bandas Raman (ω_{Raman}) e IR ($\omega_{\text{FT-IR}}$) em unidades de cm^{-1} e classificação para os modos vibracionais do diterpeno sonderianina com distribuição de energia potencial (PED).

ω_{calc}	ω_{scal}	ω_{Raman}	$\omega_{\text{FT-IR}}$	Classificação com PED* (%)
85	82	79 vs		τ (C9C1C2C10) (62)
102	98	88 vs		δ (HC21O3) (84) + τ (C9C1C2C10) (14)
106	102	109 s		δ (HC14C7) (52) + γ (C17C12C18C19) (22)
132	127	125 s		τ (C9C1C2C10) (55) + δ (HC21O3) (27)
156	150	146 m		τ (C9C1C2C10) (73) + δ (HC21O3) (12)
165	159	156 m		τ (C9C1C2C10) (57) + γ (C4C16C5C6) (18)
221	212	206 m		δ (O2C11C9) (33) + τ (C9C1C2C10) (32) + δ (HC14C7) (13)
315	303	297 m		δ (O2C11C9) (37) + δ (HC15C2) (26)
354	340	345 s		δ (HC14C7) (53) + τ (C9C1C2C10) (21)
382	367	367 s		δ (HC14C7) (68) + δ (O2C11C9) (20)

Fonte: Autora.

A região espectral de menores números de onda contém os modos externos, também conhecidos como modos de rede de vibração do cristal. Esses modos possuem baixa energia e estão associados com a simetria da célula unitária do cristal. Portanto, o valor do número de onda que representa o limite para os modos externos depende do sistema cristalino, porém, na literatura em geral, os modos vibracionais com número de onda inferior a 200 cm^{-1} são classificados como modos externos. Entretanto, como os cálculos teóricos de química quântica foram realizados em uma molécula isolada, e não no cristal, observam-se nesta região modos internos mistos relacionados principalmente a modos de torção C9C1C2C10 e deformação angular dos átomos HC21O3 e HC14C7.

5.3 Atividade Antimicrobiana

5.3.1 Concentração Inibitória Mínima da Sonderianina

A concentração inibitória mínima (CIM) da Sonderianina foi de $128 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ para todas as cepas bacterianas testadas como mostrado na Tabela 9. Portanto a sensibilidade ao composto entre as cepas Gram positivas e Gram negativas não diferiu. O solvente dimetilsulfóxido (DMSO), utilizado para solubilizar a amostra, também foi testado a fim de se verificar se o efeito antimicrobiano seria somente fruto da ação do composto ou teria

influência do DMSO. Foi observado que a CIM do DMSO ($128 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) é semelhante à da Sonderianina. Logo, não se pode afirmar que a Sonderianina possui efeito inibidor do crescimento das bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Quanto à CIM da Sonderianina frente às cepas fúngicas testadas, pôde-se observar que foi de $32 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ frente aos fungos *Candida albicans* 122 e *Candida tropicalis* 18 e de $8 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ frente a *Candida kruzei* 01, o que representou inibição maior comparada à apresentada pelo DMSO ($64 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) frente a todas às cepas fúngicas testadas. Portanto, podemos afirmar que a sonderianina tem atividade inibidora um pouco maior que a do DMSO, porém, relevante apenas para a *Candida kruzei* 01, pois quando o valor de concentração do Controle (DMSO) e da substância testada (Sonderianina) para inibir o crescimento do microrganismo difere em apenas um (1) poço, que foi o caso frente à *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, não se considera a diferença significativa.

TABELA 9 – Concentração inibitória mínima (CIM) da Sonderianina e dimetilsulfóxido (DMSO) frente às cepas microbianas.

Tipo de Cepas	Microorganismos	CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
		DMSO	Sonderianina
Cepas Bacterianas	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	128	128
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25619	128	128
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	128	128
Cepas Fúngicas	<i>Candida albicans</i> 122	64	32
	<i>Candida kruzei</i> 01	64	8
	<i>Candida tropicalis</i> 18	64	32

Fonte: Autora

Uma menor eficácia da atividade antibacteriana exercida por alguns produtos naturais, como a da Sonderianina, pode estar associada à baixa solubilidade do composto nos solventes DMSO e água, o que pode ocasionar uma baixa biodisponibilidade do composto em ensaios *in vivo* e *in vitro* (GIL *et al.*, 2008).

Na literatura, foram relatados alguns testes sobre a solubilidade de produtos naturais em que foram utilizados sistemas de microemulsões para aumentar a biodisponibilidade. Então, foram testados tween 80: span 20 (3:1) como surfactante, etanol como agente tensoativo, miristato de isopropila como óleo e água bidestilada em diferentes

porcentagens. Esses métodos foram eficazes para solubilizar os clerodanos *trans*-desidrocotina e *trans*-crotonina, portanto existe uma possibilidade de aumento de biodisponibilidade da Sonderianina, considerando que a mesma trata-se de um clerodano.

A literatura científica também apresenta estudo do extrato hexânico das raízes desta espécie, coletada no mesmo local, onde os ensaios biológicos revelaram interessantes resultados contra bactérias Gram-positivo: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, e bactérias Gram-negativo: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Mycobacterium smegmatis*; e contra fungos: *Candida albicans*, *Sacharomyces cerevisae* e outros microorganismos (McCHESNEY *et al.*, 1991a; DOURADO, 2003).

O óleo essencial de *C. blanchetianus* também apresentou ação antibacteriana em estudo de Angélico (2011) com uma CIM variando de 512 a 64 µg/mL, demonstrando ser mais eficiente para *S. aureus* (64 µg/mL). Porém, os óleos não inibiram as cepas de *P. Aeruginosa* e *K. pneumoniae*, considerando a CIM ≥ 1.024 µg/mL.

5.3.2 Atividade moduladora de aminoglicosídeos e antifúngicos

Avaliando-se o efeito exercido pelo composto Sonderianina como modulador da atividade dos aminoglicosídeos, foi possível verificar que não houve diferença significativa entre os valores obtidos da CIM da Sonderianina para o controle (antibióticos) e o DMSO, pois a diferença de inibição entre eles, quando esta ocorreu, foi apenas de um (1) poço, na maioria dos resultados. Logo, não se pode afirmar que a Sonderianina possui efeito inibidor na atividade da amicacina, clindamicina e gentamicina frente às bactérias multirresistentes *Escherichia coli* 27 e *Pseudomonas aeruginosa* 03.

É possível ainda observar, que nesses testes, a Sonderianina e o DMSO obtiveram resultados muito semelhantes. Já o controle, a sonderianina e o DMSO frente à *Pseudomonas aeruginosa* 03, nem sequer modificaram a atividade da Clindamicina (CIM ≥ 5.000 µg-mL⁻¹) como mostra a Tabela 10.

TABELA 10 – Concentração inibitória mínima (CIM) dos antibióticos ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) na presença de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da Sonderianina ou DMSO frente às bactérias *Escherichia coli* 27 (EC27) e *Pseudomonas aeruginosa* 03 (PA03)

Antibióticos	EC27			PA 03		
	Controle	Sonderianina	DMSO	Controle	Sonderianina	DMSO
Amicacina	9,76	9,76	9,76	156,25	39,06	78,12
Clindamicina	625	312,5	312,5	≥ 5.000	≥ 5.000	≥ 5.000
Gentamicina	19,53	19,53	19,53	625	156,25	156,25

DMSO= dimetilsulfóxido

Fonte: Autora

A sonderianina combinada com a Anfotericina B, embora tenha apresentado valor de inibição frente a todas as cepas fúngicas, não apresentou diferença significativa entre esses valores em comparação com o controle (antibióticos), pois a diferença de inibição entre eles foi de apenas 1 poço, portanto não foi relevante. Já a sonderianina combinada com os antifúngicos benzoilmetronidazol e nistatina não interferiu na inibição do crescimento dos fungos *Candida albicans* 122, *C. krusei* 01 e *C. tropicalis* 18. Portanto, a associação do composto com esses antifúngicos não aumentou (sinergismo) e nem diminuiu (antagonismo) a inibição do crescimento dos fungos, sendo observado uma CIM maior ou igual a $1.024\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para esses dois tratamentos frente às cepas testadas. A Sonderianina e o DMSO mais uma vez obtiveram resultados muito semelhantes, portanto não significativos, como mostra a Tabela 11.

TABELA 11 – Concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) na presença de 23 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da Sonderianina ou DMSO frente aos fungos *C. albicans* 122 e *C. tropicalis* 18 e 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ frente à *C. krusei* 01.

Antifúngicos	CA			CK			CT		
	C	S	DMSO	C	S	DMSO	C	S	DMSO
Anfotericina B	512	512	128	512	256	256	256	512	512
Benzoilmetronidazol	≥ 1.024	≥ 1.024	≥ 1.024	≥ 1.024	≥ 1.024	≥ 1.024	≥ 1.024	≥ 1.024	≥ 1.024
Nistatina	≥ 1.024	≥ 1.024	≥ 1.024	≥ 1.024	≥ 1.024	≥ 1.024	≥ 1.024	≥ 1.024	≥ 1.024

C= controle; S= sonderianina; DMSO= dimetilsulfóxido

Fonte: Autora

Na literatura, não foram encontrados estudos sobre a Sonderianina quanto à avaliação do seu efeito modificador da atividade de antibióticos ou antifúngicos. Já para o óleo essencial de *C. blanchetianus* segundo Angélico (2011), o mesmo atua sinergisticamente com os antibióticos amicacina, canamicina e gentamicina frente à apenas uma linhagem: *B. cereus*.

6 CONCLUSÕES

- Foram obtidas 68 frequências experimentais para os espectros Raman e 46 para os espectros do Infravermelho. Uma discussão das bandas Raman e Infravermelho foi realizada com base na classificação dos modos normais de vibração de uma molécula isolada do diterpeno sonderanina;
- A geometria estável da molécula (com conformação de mais baixa energia) e os 150 modos normais de vibração esperados para essa substância foram obtidos por cálculos teóricos de química quântica, usando a Teoria do Funcional da Densidade (DFT);
- Os números de onda calculados foram bem correlacionados com os números de onda experimentais das bandas Raman já que o valor do fator de escala calculado foi de 0.9612, e o erro quadrático total obtido foi de 20,1 cm^{-1} . Esses valores estão de acordo com os valores previstos para o método DFT na literatura. Essa concordância possibilitou a atribuição completa das bandas Raman e Infravermelho juntamente com o cálculo da distribuição de energia potencial (PED) para cada modo normal de vibração do cristal do diterpeno sonderanina;
- A Sonderianina mostrou-se promissora como composto antimicrobiano apenas frente à cepa fúngica *C. kruszei* (8 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$), pois apresentou uma concentração inibitória mínima significativa comparada ao controle dimetilsulfóxido (DMSO) (64 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$).
- O composto Sonderianina não apresentou influência significativa associada à atividade dos antibióticos amicacina, clindamicina e gentamicina e nem dos antifúngicos anfotericina B, benzoilmetronidazol e nistatina frente às cepas avaliadas.

PERSPECTIVAS

Para dar continuidade ao estudo das propriedades biológicas, estruturais e vibracionais da Sonderianina, pontuamos as perspectivas a seguir:

- Realização de medidas experimentais de espectroscopia Raman com variação de pressão e/ou temperatura para verificar se ocorre alguma transição de fase e/ou possíveis modificações das propriedades biológicas do composto;
- Verificar a possibilidade de uso de sistemas de microemulsões para aumentar a biodisponibilidade da Sonderianina para avaliar se há uma diferença na inibição frente às mesmas cepas utilizadas neste trabalho, como também podem ser testados outros microrganismos.
- Avaliar a toxicidade da Sonderianina já que a mesma apresentou atividade antifúngica.

REFERÊNCIAS

- ABDON, A.P.V.; LEAL-CARDOSO, J.H.; COELHO-DE-SOUZA, A.N.; MORAIS, S.M.; SANTOS, C.F., Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v.35 n.10, p.1215–1219, 2002.
- ALCÂNTARA JUNIOR, P: **Espectroscopia Molecular**, Departamento de Física, Universidade Federal do Pará, 2002. Disponível em: <<http://www.ufpa.br/ccen/fisica/didatico/espectroscopia.pdf>> Acesso em: 10.out.2014
- ALMEIDA, A. B. A. *et al.* Antiulcerogenic effect and cytotoxic activity of semi-synthetic crotonin obtained from *Croton cajucara* Benth. **European Journal of Pharmacology**, v. 472, p. 205-212, 2003.
- AMARAL, A. C. F.; R. A. BARNES. A tetrahydroprotoberberine alkaloid from *Croton hemiargyreus*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 1445-1447, 1998.
- AMARAL, P.A.; NEVES, G.; FARIAS, F.; EIFLER-LIMA, V.L. Química Combinatória: moderna ferramenta para a obtenção de candidatos a protótipos de novos fármacos. **Brazilian Journal Pharmaceutical Science**, v. 39, n. 4, p. 351-363, 2003.
- ANDRADE, C.H.; TROSSINI, G.H.G.; FERREIRA. E.I. Modelagem molecular no ensino de química farmacêutica. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 7, p. 1-23, 2010.
- ANGÉLICO, E. C. **Avaliação das atividades antibacteriana e antioxidante de *Croton heliotropiifolius* Kuntze e *Croton blanchetianus* Baill.** Patos- PB: UFCG, 2011. 24p. (Dissertação- Mestrado em Zootecnia- Sistemas Agrossilvipastoris no Semi-árido).
- APG II. Angiosperm Phylogeny Group. An Update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, p. 399-436. 2003.
- ARAÚJO-JUNIOR, V.T.; SILVA, M.S.; CUNHA, E.V.L.; AGRA, M.D.; SILVA, R.N.; BARBOSA, J.M.; BRAZ-FILHO, R. Alkaloids and Diterpenes From *Croton moritibensis*. **Pharm. Biol.**, v.42, 62-67, 2004.
- ASOLINI, F. C.; TEDESCO, A. M.; CARPES, S. T.; FERAZ, C.; ALENCAR, S.M. Antioxidant and antibacterial activities of phenolic compounds from extracts of plants used as tea. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, n.3, p. 209-215, 2006.
- ASTOLFI FILHO, A.; SILVA, C. G. N.; BIGGI, M. F. M. **Bioprospecção e biotecnologia** Parc. Estrat. Brasília-DF, v. 19, n. 38, p. 45-80. Jan/jun 2014.
- AZEVEDO, M. M. B. **Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais de *Croton cajucara* Benth. e *Croton sacaquinha* Croizat. e obtenção de seus componentes bioativos.** 2010. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ.

BABILI, F. EL.; FABRE, N.; MOULIS, C.; FOURASTE, I. Molluscicidal activity against *Bulinus truncates* of *Croton campestris*. **Fitoterapia**, v. 77, 384-387, 2006.

BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17 p. 444-447, 2007.

BARREIRO, E. J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. **Química Nova**, v. 25, p. 1172-1180, 2002.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C.A.M. A questão da inovação em fármacos no Brasil: proposta de criação do Programa Nacional de Fármacos (PRONFAR). **Química Nova**, v. 28, p. 56-63, 2005.

_____. **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**, Editora ArtMed Ltda.: Porto Alegre, 2001.

BARREIRO, E.J.; RODRIGUES, C.R. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. **Química Nova**, v. 20, p. 1-11, 1997.

BARRETO, M. B.; GOMES, C. L.; FREITAS, J. V. B. D. E; PINTO, F. DAS C. L.; SILVEIRA, E. R.; GRAMOSA, N. V.; TORRES, D. S. C. Flavonoides e terpenoides de *Croton muscicarpa* (Euphorbiaceae). **Química Nova**, v.xy, n. 00, 200_. Publicado na web 2013.

BARROS, F. M. C. **Variabilidade sazonal, atividade antimicrobiana, fracionamento bioguiado, isolamento e elucidação estrutural dos principais constituintes do óleo essencial de *Lippia Alba* (MILL.) N. E. Brown.** 2008. 162p. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, RS. 2008.

BECKE, A.D. Density-Functional Thermo chemistry. The role of exact exchange. **Journal of Chemical Physics**, vol. 98, p. 5648-5652, 1993.

BERBERAN, M.N.; SANTOS. **Espectroscopia** (Princípios de Química - Física). Técnico Lisboa, março de 2013.

BERRY, P.E. ***Croton* Research Network**. University of Wisconsin-Madison. 2002. Disponível em:<<http://www.cria.org.br/eventos/tdbi/flora/presentations/PaulBerry/crotonFB/brazil.html>>. Acesso em: 8 abr. 2013.

BIGHETTI, E.J., HIRUMA-LIMA, C.A., GRACIOSO, J.S., BRITO, A.R.,. Anti inflammatory and antinociceptive effects in rodents of the essential oil of *Croton cajucara* Benth. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** v.51 n.12, p.1447-1453, 1999.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. Escola Superior de Agricultura de Mossoró. 3. ed. Fortaleza, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, DF, 2006.

BURGER, W.; HUFT, M. **Family 113** – Euphorbiaceae. *Fieldiana*, new series, v. 36, p. 1-169, 1995.

CAETANO, N.; SARAIVA, A.; PEREIRA, R.; CARVALHO, D.; PIMENTEL, M. C. B., MAIA, M. B. S. Determinação de atividade antimicrobiana de extratos de plantas de uso popular como antiinflamatório. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 132-135, 2002.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 5, n. 3, p. 37-39, 2003.

CAMPOS, A. R. *et al.* Investigations on the antinociceptive activity of crude extracts from *Croton cajucara* leaves in mice. **Fitoterapia**, v.73, p.116-120, 2002.

CARDOSO L.S., ARAUJO M.I., GOES A.M., PACIFICO L.G., OLIVEIRA R.R., OLIVEIRA S.C. Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of *Schistosoma mansoni* recombinant proteins in human cytokine analysis. **Microb Cell Fact**; v. 6, p.1-5, 2007.

CARDOSO-LOPES, E. M., PAULA, D. M. B. D., BARBO, F. E., SOUZA, A. D., BLATT, C. T. T., TORRES, L. M. B. Chemical composition, acetylcholinesterase inhibitory and antifungal activities of *Pera glabrata* (Schott) Baill. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v.32 n. 4, p. 819-825, 2009.

CARNEIRO, V. A.; SANTOS, H. S.; ARRUDA, F. V. S.; BANDEIRA, P.N.; ALBUQUERQUE, M.R.J.R.; PEREIRA, M.O.; HENRIQUES, M.; CAVADA, B.S.; TEIXEIRA, E.H. Casbane Diterpene as a Promising Natural Antimicrobial Agent against Biofilm-Associated Infections. **Molecul**. v. 16, p. 190-201, 2011.

CARNEIRO-LOUREIRO, A.C. **Efeito antiedematogênico e antinociceptivo do óleo essencial de *Croton sonderianus* Muell.Arg.** 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2003.

CARVALHO A.C.B.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Rev Bras Farmacogn** v.18, p.314-319, 2008.

CARVALHO, I.; BORGES, A.D.L.; BERNARDES, L.S.C. Medicinal Chemistry and Molecular Modeling: An Integration To Teach Drug Structure–Activity Relationship and the Molecular Basis of Drug Action. **Journal of Chemical Education**, v. 82, p. 588-596, 2005.

CARVALHO, I.; PUPO, M.T.; BORGES, A.D.L.; BERNARDES, L.S.C. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 428-438, 2003.

CASTRO, F.L.; BARTH JUNIOR., V.C.; GALLO, S.W.; RARO, O.H.F.; FERREIRA, C.A.S.; OLIVEIRA, S.D. **Determinação da resistência antimicrobiana de isolados de *Staphylococcus aureus***. X Salão de Iniciação Científica – PUCRS, 2009.

CATALÁN, C.A.N.; HELUANI, C.S.; KOTOWICZ, C.; GEDRIS, T.E.; HERZ, W. A linear sesterterpene, two squalene derivatives and two peptide derivatives from *Croton hieronymi*. **Phytochemistry**. v.64, p. 625-629, 2003.

CHASE, M. W. **When in doubt, put it in Flacourtiaceae**: a molecular phylogenetic analysis based on plastid rbcL DNA sequences. *Kew Bulletin*, v. 57, p.141-181, 2002.

CHAVES, S. A. M.; REINHARD, K. J. **Palespharmacology and Pollen**: Theory, Method, and Application. *Memoirs Institute de Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 98, p. 207–11, 2003.

COHEN, N.C. **Guidebook on molecular modeling in drug design**. San Diego: Academic Press, 1996.

CONVENÇÃO SOBRE DIVERSIDADE BIOLÓGICA. Artigo 2. **Utilização de termos para os propósitos desta Convenção**: [...] Biotecnologia significa qualquer aplicação tecnológica que utilize sistemas biológicos, organismos vivos, ou seus derivados, para fabricar ou modificar produtos ou processos para utilização específica [...]. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/chm/_arquivos/cdbport.pdf>. Acesso em: 25 set. 2014.

CORDEIRO, I. *et al.* ***Croton* in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB035765>>, 2012.

COSTA, I. R.; ARAÚJO, F. S. LIMA-VERDE, L. W. Flora e aspectos auto-ecológicos de um enclave de cerrado na chapada do Araripe, Nordeste do Brasil, **Acta bot. bras.** v. 18, n.4 p.759-770. 2004.

COSTA, J. G. M. DA; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; PEREIRA, C. K.; SOUZA, E. O. DE; CALDAS, G. F. R.; SILVA, M. R.; SANTOS, N. K. A. MOTA, M. L.; SANTOS, P. F. DOS. Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.4, p. 583-586, 2008.

COSTA, M. N. **Estudo do Mecanismo de Ação de Derivados Aminoalcoois e de Derivados do Sistema Tienopiridina na Replicação *in vitro* do Vírus Herpes Simples Tipo 1**. Centro de Estudos Gerais. Niteroi, Universidade Federal Fluminense, 2007.

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

_____ **Herbal therapy associated with antibiotic therapy**: potentiation of the antibiotic activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by *Turnera ulmifolia* L. *BMC Complement Altern Med*. v. 9, p. 13, 2009.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; SIQUEIRA, J. P. J. R.; LIMA, E. O. Effect of *Momordica charantia* L. in the resistance to aminoglycosides in methicillin-resistant

Staphylococcus aureus. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, p. 467–471, 2010.

CRAVEIRO, A.; SILVEIRA, E.R. 2 cleistanthane type diterpenes from *Croton sonderianus*. **Phytochemistry** v.21, n.10, 1982, p.2571–2574.

CRAVEIRO, A.; FERNANDES, A.; ANDRADE, C. H.; MATOS, F. J.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza-Ceará: UFC (Universidade Federal do Ceará), P. 209, 1981a.

CRAVEIRO, A., SILVEIRA, E.R., BRAZ FILHO, R. AND MASCARENHAS, I.P. **Sonderianin, a furanoid diterpene from *Croton sonderianus***. **Phytochemistry** v. 20, n.4, 1981b, p.852–854.

CRAVEIRO, A.A.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W. Essential and Fatty Oils of *Croton sonderianus*. **Revista Latino-Americana de Química**, v.9, p.95-97, 1978.

DANCER, S.J.The problem with cephalosporins. **J Antimicrob Chemother**.48, p. 463–78, 2001.

DAVIS, C. C., WEBB, C. O., WURDACK, KENNETH J, JARAMILLO, C. A., DONOGHUE, M. J. Explosive radiation of Malpighiales supports a mid-cretaceous origin of modern tropical rain forests. **The American naturalist**, v. 165, n.3, p. 36-65, 2005.

DE VINCENZI, M., MANCINI, E., DESSI, M.R., Monographs on botanical flavouring substances used in foods: Part V. **Fitoterapia** v. 67, p. 241–251, 1996.

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

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: verdades e mentiras: o que os usuários e os profissionais de saúde precisam saber**. São Paulo: UNESP, 2007.

DIAS, N.L. **Identificação de *Staphylococcus aureus*, avaliação do seu potencial enterotoxigênico e resistência a meticilina pela técnica de pcr em amostras de leite da microrregião de sete lagoas-Mg**, 2009. Dissertação de Mestrado da Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária. Belo Horizonte, março, 2010.

DOURADO, R.C.M. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste do Brasil: *Croton sonderianus* - Euphobiaceae**. 2003. Tese (Doutorado em Química Orgânica). Faculdade de Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

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

_____. Strategic trends in the drug industry. **Drug Discovery Today**. v. 8, n.9, p. 411-420, 2003.

ENAN, E., Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. **Communications in Biochemical Physiology**. v.130, n.3, p. 325–337, 2001.

FATTORUSSO, E., TAGLIALATELA-SCAFATI, O., CAMPAGNUOLO, C., SANTELIA, F. U. APPENDINO, G., SPAGLIARDI, P. . Diterpenoids from Cascarilla (*Croton eluteria* Bennet). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n.18, p. 5131-5138, 2002.

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

FERREIRA, C.; ARROIO, A.; REZENDE, D.B. Uso de modelagem molecular no estudo dos conceitos de nucleofilicidade e basicidade. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1661-1665, 2011.

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

FLUIT, A. C.; SCHMITZ, F. J. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.18, p.761-770, 1999.

FONTENELLE, R. O. S.; MORAIS, S. M.; BRITO, E. H. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; NASCIMENTO, N. R. F.; KERNTOPF, M. R.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian Caatinga biome. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1383-1390, 2008.

FORERO, J. E., AVILA, L., TABORDA, N., TABARES, P., LÓPEZ, A., TORRES, F. In vitro anti-influenza screening of several Euphorbiaceae species: structure of a bioactive Cyanoglucoside from *Codiaeum variegatum*. **Phytochemistry**, v.69, n.16, p.2815-281, (2008).

FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; MONTGOMERY, J. A.; VREVEN, JR., T.; KUDIN, K. N.; BURANT, J. C.; MILLAM, J. M.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; COSSI, M.; SCALMANI, G.; REGA, N.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; KLENE, M.; LI, X.; KNOX, J. E.; HRATCHIAN, H. P.; CROSS, J. B.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C. OCHTERSKI, J. W.; AYALA, P. Y.; MOROKUMA, K.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; ZAKRZEWSKI, V. G.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; STRAIN, M. C.; FARKAS, O.; MALICK, D. K.; RABUCK, A. D.; RAGHAVACHARI, K.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CUI, Q.; BABOUL, A. G.; CLIFFORD, S.; CIOSLOWSKI, J.; STEFANOV, B. B.; LIU, G.; LIASHENKO, A.; PISKORZ, P.; KOMAROMI, I.; MARTIN, R. L.; FOX, D. J.; KEITH, T.; AL-LAHAM, M. A.; PENG, C. Y.; NANAYAKKARA, A.; CHALLACOMBE, M.; GILL, P. M. W.; JOHNSON, B.; CHEN, W.; WONG, M. W.; GONZALEZ, C.; POPLE, J. A. **Gaussian 03**, Revision B.02, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 2003.

GEBBINCK, E. A. Klein; JANSEN, B. J. M.; GROOT, A. de. Insect antifeedant activity of clerodane diterpenes and related model compounds. **Phytochemistry**, Paises Baixos, n. 61, p.737-770, 2002.

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

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

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

GIORDANO, N.J., NAKANISHI. *Computacional physics - 2nd ed.* Perarson Prentice Hall, 2006.

GIULIETTI, A.M.; HARLEY, R.M.; QUEIROZ, L.P.; WANDERLEY, M.G.L.; VAN DEN BERG, C. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. *Megadiversidade* v. 1 n. 1, p. 52-61, 2005.

GOMES, A. P. S. *Revisão das espécies sulamericanas de Croton L. subgen. Croton sect. Argyroglossum Baill. (Crotonoideae- Euphorbiaceae)*. p. 124. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006.

GOMES, A. P. S.; SALES, M. F. DE; BERRY, P. E. *Croton limae* (Euphorbiaceae), a new species of section *Argyroglossum* from northeastern Brazil. *Brittonia*, v. 62, n. 3, p. 206–209, 2010.

GONZÁLEZ-VÁZQUEZ, R.; DIAZ, B.K.; AGUILAR, M.I.; DIEGO, N.; LOTINA-HENNSEN, B. Pachypodol from *Croton ciliatoglanduliferus* Ort. as Water-Splitting Enzyme Inhibitor on Thylakoids. *J. Agric. Food Chem.* p. 54, p. 1217-1221, 2006.

GOVAERTS, R., FRODIN, D.G.; RADCLIFFE-SMITH, A.. World Checklist and Bibliography of Euphorbiaceae (and Pandaceae). The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, *Kew*. v.1-4, p. 1-1622. 2000.

GUIDO, R.V.C.; ANDRICOPULO, A.D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. *Estudos Avançados*, v. 24, p. 81-98, 2010.

GUIDO, R.V.C.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. *Current Medicinal Chemistry*, v.15, n.1, p. 37-46, 2008.

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

GURIB-FAKIM, A. *Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow*. Molecular aspects of medicine, v. 27, p. 91-93, 2006.

HARRIS, R. Progress with superficial mycoses using essential oils. **International Journal of Aromatherapy**, v. 12, p. 83–91, 2002.

HEINEN, P.E.T. **Estudo das Alterações Mitocondriais Provocadas na Sepsis por Espectroscopia de Infravermelho pela Transformada de Fourier e Refletância Total Atenuada**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, out., 2006.

HELUANI, C.S.; CATALAN, C.A.N.; HERNÁNDEZ, L.R.; TAPIA, E.B.; NATAN, P.J. Three new diterpenoids based on novel sarcopetalene skeleton from *Croton sarcopetalus*. **J Nat Prod** v. 63, p. 222-225, 2000.

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

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

IBGE, Diretoria de Geociências Coordenação de Recursos Naturais e Estudos Ambientais. **Indicadores de Desenvolvimento Sustentável** . n. 7 Rio de Janeiro/RJ, 2010

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

KEITH, C. T.; BORISY, A. A.; STOCKWELL, B. R. Multicomponent therapeutics for networked systems. **Nature Reviews Drug Discovery**, n. 4, p. 71–78, 2005.

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

KRISHNAVENI, M.; MIRUNALINI, S. **Therapeutic potential of Phyllanthus emblica (amla): the ayurvedic wonder**. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 21, n.1, p. 93-105, 2010.

LANDAU, R.H.; PÁEZ, M.J.; BORDEIANU, C.C. **Computational physics** -2nd ed. Willey-VCH, 2007.

LEE, C.T.; YANG, W.T.; PARR R.G. Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy formula into a Functional of the Electron-Density. **Physical Review Letters**, v. 37, p. 785-789, 1988.

LEITE, D. O.; PRADO R. J. Espectroscopia no infravermelho: uma apresentação para o Ensino Médio. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 34, n. 2, p. 2504-1 a 9, 2012.

LEITE, J. P. V.; FERNANDES, J. M.; FAVARO, L. V; GONTIJO, D. C.; MAROTTA, C.P. B.; SIQUEIRA, L. C.; MAIA, R. T.; GARCIA, F. C. P., **Plantas medicinais no entorno do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro**. MG.BIOTA, v.1, n.4, p. 16-34, 2008.

LEVISON, K.K., TAKAYAMA, K., OKABE, K., NAGAI, T.,. Formulation optimization of indomethacin gels containing a combination of three kinds of cyclic monoterpenes as percutaneous penetration enhancers. **Journal of Pharmacy**, 1994.

LIMA, A.; BAKKER J. Espectroscopia no infravermelho próximo para a monitorização da perfusão tecidual. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, vol. 23, p. 341-351, 2011.

LIMA, J.L.S. **Plantas forrageiras das caatingas – usos e potencialidade**. In: EMBRAPA/PNE/KEW, 1996.

LIMA, L. R.; PIRANI, J. R. Revisão taxonômica de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s). **Biota Neotrópica**, v. 8, p. 177-231, 2008.

LIMA, M.G.A., MAIA, I.C.C., SOUSA, B.D., MORAIS, S.M., FREITAS, S.M.,. Effect of stalk and leaf extracts from Euphorbiaceae species on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae. **Rev. Inst. Med. Trop.** v. 48, p. 211–214, 2006.

LOPES, D.; BIZZO, H. R.; SOBRINHO, A. F. S.; PEREIRA, M. V. G. Essential oil from leaves of *Croton sacaquinha* Benth. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, p. 48-49, 2003.

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

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.

LORINCZ, A.; HADDAD, D.; NAIK, R.; NAIK, V.; FUNG, A.; CAO, A.; MANDA, P.; PANDYA, A.; AUNER, G.; RABAH, R., LANGENBURG, S.E.; KLEIN, M.D. Raman Spectroscopy for Neoplastic Tissue Differentiation: a pilot study. **Journal of Pediatric Surgery**, v.39, n.6, p. 953-956, June 2004.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; ARRUDA, A.C.; PAMPLONA, S.G.S.R.; VANDERLINDE, F.A.; LAPA, A.J.; ECHEVARRIA, A.; GRYNBERG, N.F.; CÔLUS, I.M.S.; FARIAS, R.A.F.; COSTA, A.M.L.; RAO, V.S.N. Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. **J. Ethnopharmacol.** v. 70, p. 41-55, 2000.

MAIA, G.N. **Caatinga árvores e arbustos e suas utilidades**. 1ª Ed. Leitura & Arte. 19-31p. 2004.

MAIA, Paula Virgínia Mendes. **Efeitos do Óleo Essencial de *Croton Sonderianus* Muell. Arg. sobre a Contratilidade do Músculo Liso Traqueal de ratos**. 2007. 92f. (Mestrado) – Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual do Ceará, 2007.

MARQUES, M. A. L.; BOTTI, S. O que é e para que serve a teoria dos funcionais da densidade? **Gazeta de física**, v. 29, n. 4, p. 10-15, 2006.

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

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

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**, 1 ed. UFC, 1997. 141p.

MATOS, F. J. A., MACHADO, M. I. L., CRAVEIRO, A. A., BARBOSA-FILHO, J. M. Essential oil of *Mentha x villosa* Huds. **Journal of Essential Oil Research**, v. 11, p. 41-44, 1999.

MATOS, F.J.A. **O formulário fitoterápico do professor Dias da Rocha**: informações sobre o emprego da medicina caseira, de plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. 2.ed. Fortaleza: EDUFC, 1997.

_____. **Plantas medicinais**: guia de seleção e emprego de plantas ~ usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. Imprensa Universitária, Fortaleza, 1999, p. 346.

MATOUSKOVA, I.; JANOUT, V. **Current Knowledge of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus**. Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia Republic, v. 152, n, 2, p. 191-202, 2009.

MATTOS, F. J. A. **Plantas da medicina popular do Nordeste: propriedades atribuídas e confirmadas**, UFC, Fortaleza, 1999. p. 80.

MCCHESENEY, J. D.; CLARK, A. M.; SILVEIRA, E. R. Antimicrobial diterpenes of *Croton sonderianus*.II. ent-Beyer-15-en-18-oic acid. **Pharmacology Research**, v.8, p. 1243-1247, 1991a.

_____, Antimicrobial diterpenes of *Croton sonderianus*, L, Hardwickic and 3,4- Secotrachylobanoic acids. **Journal of Natural Products** 54 (6), 1625–1633, 1991b.

MEDEIROS, J.R., CAMPOS, L.B., MENDONÇA, S.C., DAVIN, L.B., LEWIS, N.G., Composition and antimicrobial activity of the essential oils from invasive species of the Azores, *Hedychium gardnerianum* and *Pittosporum undulatum*. **Phytochemistry**, v. 64, n.2, p. 561–565, 2003.

MCKIBBEN, L.; HORAN, T.M.P.H.; TOKARS, J.I.M.D.; FOWLER, G.M.P.H.; CARDO, D.M.M.D.; MICHELE, L. PEARSON, M. D. BRENNAN, P. J. M.D. **Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee**. Guidance on Public Reporting of Healthcare-Associated Infections: Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. *Infect control*, v. 33, p. 217-226, 2005.

MILANOWSKI, D. J.; WINTER, R. E. K.; ELVIN-LEWIS, M. P. F.; LEWIS, W. H. Geographic distribution of three alkaloid chemotypes of *Croton lechleri*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 6, p. 814-819, 2002.

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

MORAIS-BRAGA, M. F. B.; SOUZA, T. M.; SANTOS, K. K. A.; GUEDES, G. M. M.; ANDRADE, J. C.; TINTINO, S. R.; COSTA, J. G. M.; MENEZES, I. R. A. SARAIVA, A. Á. F.; COUTINHO, H. D. M. **Atividade antibacteriana, antifúngica e moduladora da atividade antimicrobiana de frações obtidas de *Lygodium venustum* SW**. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, v. 12, n.1, p. 38 – 43, 2013.

MORGON, N.H.; COUTINHO, K. **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular**. São Paulo, Ed. Livraria da Física, 2007.

NADER, T. T. **Potencial de atividade antimicrobiana in vitro de extratos vegetais do cerrado frente estirpes de *Staphylococcus aureus***. 2010. 56 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista– Unesp, Jaboticabal-SP

NARDI, G. M. *et al.* Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Croton celtidifolius* Bark. **Phytomedicine**, v.10, p.176-184, 2003.

NCCLS – NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 5 ed. Villanova- PA: NCCLS approved standard M7-A5, v. 20, n. 2, 2000.

NOSTRO, A.; BLANCO, A. R.; CANNATELLI, M. A.; ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiol Lett**. v. 230, p.191–195, 2004.

OLIVA G. **Bioinformática: Perspectivas na Medicina**. Gazeta Médica da Bahia, v. 78, p. 52-58, 2008.

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

_____. **Espectroscopia Molecular**. Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola, n, 4, p. 24-30, 2001b.

PALMEIRA JUNIOR, Sebastião F. et al. Clerodane diterpenes from *Croton* species: Distribution and a Compilation of their and ¹³C NMR. **Natural Product Communications**, Brasil, v. 4, n. 1, p.319-344, 2006.

PALMEIRA, S. F.; CONSERVA, L.M.; SILVEIRA, E.R. Two clerodane diterpenes and flavonoids from *Croton brasiliensis*. **J. Braz. Chem. Soc.** v.16, p. 1420-1424, 2005.

PARR, R. G.; YANG, W. **Density Functional Theory of Atoms and Molecules**, Oxford University Press, New York, 1989.

PATTNAICK, S., SUBRAMANYAM, V.R., BAPAJI, M., KOLE, C.R. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. **Microbios** v. 89, p. 39–46, 1997

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

_____. **Introduction to Spectroscopy**. 4. ed. Belmont - CA: Brooks/Cole, Cengage Learning, 2009, p. 744.

PAYO, H. A.; DOMINICIS, M. E.; MAYOR, J.; OQUENDO, M.; SARDUY, R.. Tamizaje fitoquímico preliminar de espécies del género *Croton* L. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 35, p. 203-206. 2001.

PEREIRA, J. E. M. **Espectroscopia Vibracional em Cristais do Ácido Trans-Cinâmico Complexado Com Európio Sob Condições Extremas**. Dissertação (Mestrado em Física). Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2014.

PERES, M. T. L. P.; MONACHE, F. D.; CRUZ, A. B.; PIZZOLATTI, M. G.; YUNES, R. A. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 56, p. 223-226, 1997.

PERES, M. T. L. P.; MONACHE, F. D.; PIZZOLATTI, M.G.; SANTOS, A.R.S.; BEIRITH, A.; CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A. Analgesic compounds of *Croton urucurana* Baillon. Pharmacological criteria used in their isolation. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 209-211, 1998.

PERES M.T.L.P; PIZZOLATI, M.G.; YUNES, R.A.; MONACHE, F.D. Clerodane diterpenes of *Croton urucurana*. **Phytochemistry**. v. 49 p. 171-174, 1998.

POLLACK, M. **Pseudomonas aeruginosa**. In: MANDELL G. L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. (eds.). Principles and Practices of Infectious Diseases. 4th ed. Philadelphia, Churchill Livingstone, 1995; 2003.

RADCLIFFE-SMITH, A. Genera Euphorbiacearum. **Royal Botanic Gardens**, Kiew.. 2001

RANAU, K.P.; XAVIER, H.S.; DIMECH, G.S.; WNDERLEY, A.G. Avaliação preliminar da atividade farmacológica (antiespasmódica e antiulceratogênica) do extrato aquoso bruto de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm (Euphorbiaceae). **Revista Lecta**, v.21, n.1, p. 61-68, 2002.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

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

RISCO, E.; GHIA, F.; VILA, R.; IGLESIAS, J.; ÁLVAREZ, E.; CAÑIGUERAL, S. Immunomodulatory activity and chemical characterization of sangre de drago (dragon's blood) from *Croton lechleri*. **Planta Med**, v. 69, n. 9, p. 785-794, 2003.

RIZSK, A.F. The chemical constituents and economic plants of the Euphorbiaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 94, p.293-326, 1987.

RODRIGUES, A.S.; MESQUITA, B.M.; BARROSO, P.D.B.; RABELO, E.M.; BANDEIRA, P.N.; ALBUQUERQUE, M.R.J.R.; TEIXEIRA, E.H.; SANTOS, H.S. **Atividade antimicrobiana dos extratos de *Croton anisodontus* Mull. Arg. contra bactérias causadoras de cárie dental.** 36a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, SBQ, 2013.

RODRIGUES, C. R. Processos Modernos no Desenvolvimento de Fármacos: Modelagem Molecular. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 03, p. 43-49, 2001.

RUIZ-HERRERA, J.; SAN-BLAS, G. Chitin synthesis as a target for antifungal drugs. **Current Drug Targets – Infectious Disorders**, v. 3, p. 77-91, 2003.

SA, N.C.; CAVALCANTE, T.T.A.; ARAUJO, A.X.; SANTOS, H.S.; ALBUQUERQUE, M.R.J.R.; BANDEIRA, P.N.; CUNHA, R.M.S.; CAVADA, B.S.; TEIXEIRA, E.H. Antimicrobial and antibiofilm action of Casbane Diterpene from *Croton nepetaefolius* against oral bacteria. *Archives of Oral Biology*. 2011.

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

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 1, p. 11-33, 2007.

SANDOVAL, M.; OKUHAMA, N. N.; CLARK, M.; ANGELES, F. M.; LAO, J.; BUSTAMANTE, S.; MILLER, M. J. Sangre de grado *Croton palanostigma* induces apoptosis in human gastrointestinal cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, n. 2-3, p. 121-129, 2002.

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

SANTO, A.H. Mortalidade relacionada à asma, Brasil, 2000: um estudo usando causas múltiplas de morte. **Cad. Saúde Pública**. v. 22, n.1, 2005

SANTOS, F. A.; JEFERSON, F. A.; SANTOS, C. C.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. N. Antinociceptive effect of leaf essential oil from *Croton sonderianus* in mice. **Life Sciences**, v. 77, 2953–2963, 2005.

SANTOS, F.A. *et al.* AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ALELOPÁTICO DE *Croton blanchetianus* Baill E *Croton rhamnifolioides* Pax & K. Hoffm. SOBRE A GERMINAÇÃO DE *Lactuca sativa* L. **Revista de Biologia e Farmácia**., 2003.

SANTOS, F.A., RAO, V.S.. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. **Phytotherapy Research** 14 (4), 240–244, 2000.

SANTOS, H.S.; BARROS, F.W.A.; ALBUQUERQUE, M.R.J.R.; BANDEIRA, P.N.; PESSOA, C.; BRAZ-FILHO, R.; MONTE, F.J.Q.; LEAL-CARDOSO, J.H.; LEMOS, T.L.G. Cytotoxic Diterpenoids from *Croton argyrophylloides*, **J. Nat. Prod.** 72, 1884-1887, 2009.

SANTOS, H.S.; MESQUITA, F.M.R.; LEMOS, T.L.G.; MONTE, F.J.Q.; BRAZ-FILHO, R. Diterpenos casbanos e acetofenonas de *Croton nepetaefolius* (Euphorbiaceae). **Quim.Nova.**31, 601-604, 2008.

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

SANTOS, L. M. L.; SANTANA, A. L. B. D.; NASCIMENTO, M. S.; SOUSA, K. M. O. Biofar, **Rev. Biol. Farm.** Campina Grande/PB, v. 9, n. 1, p. 27-35, março/maio, 2013.

SANTOS, S. S. et al. **Química Nova**, 31, 601-604, 2008

SCOPEL, M. **Análise Botânica, Química e Biológica Comparativa entre Flores das Espécies *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis* Cham. & Schldl. e Avaliação Preliminar da Estabilidade.** 2005. 227 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre. 2005.

SECCO, R. S. **Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Euphorbiaceae- Parte I.** Rodriguésia, v. 56, n. 86, p. 143-168, 2005.

WEBSTER, G.L. **Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae.** Annals of Missouri Botanical Garden, v. 81, n.1, p. 33-144. 1994.

SEIGLER, D. S. **Plant Secondary Metabolism.** (M. J. Crawley, Ed.)Methods In Molecular Biology Clifton Nj (v. 643, p. 759). John Wiley & Sons, Ltd., 1998

SILVA *et al.* Aproximações da Mecânica Quântica no Estudo de. Propriedades Moleculares. **Revista Processos Químicos.** Goiânia, v.3, n.6, ano 3, p. 09, jul/dez, 2009.

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

SILVEIRA, E.R.; McCHESNEY, J.D. 6,7-oxygenated *neoclerodane* furan diterpenes from *Croton sonderianus*. **Phytochemistry**, v.36, n.6, p.1457-1463, 1994.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos.** 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN T.A. **Princípios de análise instrumental**. 5.ed. Porto Alegre:Bookman, 2002.

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

SOCORRO, S. R. M. S., R. R. MENDONCA-FILHO, H. R. BIZZO, I. DE ALMEIDA RODRIGUES, R. M. SOARES, T. SOUTO-PADRON, C. S. ALVIANO, AND A. H. LOPES. **Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara***. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 47, p.1895-1901, 2003.

SUAREZ, A.I. *et al.*. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton malambo* Bark aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.88, p.11-14, 2003.

THONGTAN, J. *et al.* New antimycobacterial and antimalarial 8,9-secokaurane diterpenes from *Croton kongensis*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 868-870, 2003.

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

VIANA, J.D.M.; FÁZZIO, A.; CANUTO S. **Teoria Quântica de Moléculas e Sólidos: simulação computacional**. São Paulo, Ed. Livraria da Física, 2004.

VIGOR, C. *et al.* Three clerodane diterpenoids from *Croton eluteria* Bennett. **Phytochemistry**, v. 57, p. 1209-1212, 2001.

WAGNER, H.; WISENAUER, M. **Fitoterapia – Fitofármacos, Farmacologia e Aplicações Clínicas**. 2.ed. São Paulo: Pharmabooks, 2006.

WALL, M. E, WANI, M. C. Camptothecin and taxol. From discovery to clinic. **Journal for Ethnopharmacology**, v. 51:: 239-254. 1996.

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

WERMUTH, C.G. **The practice of medicinal chemistry**. 3rd ed. London: Academic Press; 2009.

WHO. **The global burden of disease: 2004 update**. Geneva: World Health Organization, p. 1-146, 2008.

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

WURDACK, K. J. **Molecular systematics and evolution of Euphorbiaceae sensu lato**, Tese (PhD.em Sistemática e Evolução) - University of North Carolina, Chapel Hill, USA, 2002.

WURDACK, K. J.; HOFFMANN, P.; CHASE, M. W. Molecular phylogenetic analysis of uniovulate Euphorbiaceae (Euphorbiaceae sensu stricto) using plastid rbcL and trnLF DNA sequences. **American Journal of Botany**, v. 92, p. 1397-1420, 2005.

ZAVADINACK , M.N.; HERREIRO, F.; BANDEIRA, C.O.P.; ITO, Y.; CIORLIN, E.; SAQUETI, E.E.; ANSILIEIRO, I.J.; GONSALVES, L.; SIQUEIRA, V.L.D. *Staphylococcus aureus*: incidência e resistência antimicrobiana em abscessos cutâneos de origem comunitária. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 3, p. 709-712, 2008.

ZEMBOWER, T. R.; NOSKIN, G. A.; POSTELNICK, M. J.; NGUYEN, C.; PETERSON, L. R. The utility of aminoglycosides in an era of emerging drug resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 10, p. 95–105, 1998.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Tabela 1: Frequência calculada (ω_{calc}), frequência escalada (ω_{scal}) pelo fator de escala 0.9612, posições das bandas Raman ($\omega_{\text{FT-Raman}}$) e IR ($\omega_{\text{FT-IR}}$) em unidades de cm^{-1} e classificação para os modos vibracionais de $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_5$ com distribuição de energia potencial (PED).

ω_{calc}	ω_{scal}	ω_{Raman}	$\omega_{\text{FT-IR}}$	Classificação com PED* (%)
11	11			τ (C9C1C2C10) (51) + δ (HC14C7) (31)
37	36			δ (HC14C7) (37) + τ (C9C1C2C10) (35)
39	37			τ (C9C1C2C10) (95)
47	45			τ (C9C1C2C10) (68) + δ (HC21O3) (17)
58	56			τ (C9C1C2C10) (95)
85	82	79 vs		τ (C9C1C2C10) (62)
102	98	88 vs		δ (HC21O3) (84) + τ (C9C1C2C10) (14)
106	102	109 s		δ (HC14C7) (52) + γ (C17C12C18C19) (22)
132	127	125 s		τ (C9C1C2C10) (55) + δ (HC21O3) (27)
142	136			τ (C9C1C2C10) (91)
156	150	146 m		τ (C9C1C2C10) (73) + δ (HC21O3) (12)
165	159	156 m		τ (C9C1C2C10) (57) + γ (C4C16C5C6) (18)
180	173			δ (HC14C7) (92)
190	183			γ (C17C12C18C19) (90)
207	199			δ (HC14C7) (63) + τ (C9C1C2C10) (29)
221	212	206 m		δ (O2C11C9) (33) + τ (C9C1C2C10) (32) + δ (HC14C7) (13)
223	214			τ (C9C1C2C10) (80) + γ (C17C12C18C19) (10)
230	221			τ (C9C1C2C10) (98)
261	251			τ (C9C1C2C10) (79) + δ (HC14C7) (13)
276	265			δ (O2C11C9) (50) + τ (C9C1C2C10) (22)
289	278			τ (C9C1C2C10) (75)
315	303	297 m		δ (O2C11C9) (37) + δ (HC15C2) (26)
320	308			τ (C9C1C2C10) (65) + δ (HC14C7) (63)
337	324			τ (C9C1C2C10) (53) + δ (HC14C7) (14)
354	340	345 s		δ (HC14C7) (53) + τ (C9C1C2C10) (21)
379	364			δ (HC14C7) (59) + τ (C9C1C2C10) (18)
382	367	367 s		δ (HC14C7) (68) + δ (O2C11C9) (20)
394	379			τ (C9C1C2C10) (49) + δ (HC15C2) (32)
422	406			τ (C9C1C2C10) (34) + δ (HC15C2) (21) + δ (HC14C7) (16)
436	419			τ (C9C1C2C10) (37) + δ (HC14C7) (26) + δ (HC15C2) (22)
467	449	441 s	445 vw	τ (C9C1C2C10) (38) + δ (O2C11C9) (32) + δ (HC14C7) (13)
491	472	474 m		τ (C9C1C2C10) (42) + ν (C1C3) (19) + δ (HC14C7) (18)
522	502			τ (C9C1C2C10) (27) + δ (HC15C2) (20) + δ (HC16C7) (20)
531	510	515 vs		δ (O2C11C9) (42) + τ (C9C1C2C10) (42)
588	565	543 m	539 vw	δ (HC15C2) (48) + δ (HC17C2) (20) + δ (O2C11C9) (15)
594	571	572 s	570 vw	γ (C17C12C18C19) (47) + δ (O2C11C9) (23) + τ (C19C17C18C20) (21)
613	589			δ (O2C11C9) (71) + ν (C1C3) (12)
620	596		598 m	τ (C19C17C18C20) (100)
631	607	601 m		τ (C19C17C18C20) (48) + γ (C17C12C18C19) (18) + δ (HC15C2) (11) + τ (C9C1C2C10) (11)
639	614			δ (HC14C7) (27) + δ (O2C11C9) (22) + δ (HC15C2) (16) + δ (HC21O3) (12)
678	652	630 m	651 w	δ (HC14C7) (39) + τ (C9C1C2C10) (23) + δ (HC15C2) (22)
705	678			δ (HC15C2) (41) + δ (HC13C12) (11) + δ (O2C11C9) (11)
719	691			γ (C17C12C18C19) (26) + τ (C19C17C18C20) (18) + ν (C1C3) (17)
727	699	696 s		γ (C17C12C18C19) (37) + δ (HC15C2) (35) + δ (HC13C12) (20)
743	714			τ (C19C17C18C20) (60) + γ (C17C12C18C19) (28)
745	716	717 m	716 m	δ (O2C11C9) (27) + τ (C9C1C2C10) (21) + δ (HC14C7) (15) + τ (C19C17C18C20) (15)
754	725			τ (C9C1C2C10) (39) + δ (O2C11C9) (33) + δ (HC12O1) (11)

Tabela 1 (continuação): Frequência calculada (ω_{calc}), frequência escalada (ω_{scal}) pelo fator de escala 0.9612, posições das bandas Raman ($\omega_{\text{FT-Raman}}$) e IR ($\omega_{\text{FT-IR}}$) em unidades de cm^{-1} e classificação para os modos vibracionais de $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_5$ com distribuição de energia potencial (PED).

ω_{calc}	ω_{scal}	ω_{Raman}	$\omega_{\text{FT-IR}}$	Classificação com PED * (%)
765	735		743 m	τ (C9C1C2C10) (37) + δ (HC21O3) (19) + γ (C4C16C5C6) (17) + δ (HC15C2) (13)
795	764	742 m	757 m	τ (C19C17C18C20) (73) + γ (C17C12C18C19) (18)
801	770		787 m	δ (HC14C7) (26) + τ (C19C17C18C20) (25) + δ (HC15C2) (13)
845	812	810 m	809 s	δ (HC14C7) (82)
855	822			δ (HC14C7) (68)
867	833			τ (C19C17C18C20) (58) + δ (HC14C7) (27)
893	858			δ (O2C11C9) (41) + ν (C19O5) (33)
897	862			δ (HC15C2) (63) + δ (HC14C7) (19) + δ (HC15C2) (11)
909	874		875 s	δ (HC15C2) (51) + δ (HC14C7) (15) + δ (HC15C2) (13)
930	894			δ (HC14C7) (64) + δ (HC15C2) (19)
938	902	902 m	900 vw	δ (HC14C7) (81)
951	914			δ (HC14C7) (94)
961	924			δ (HC14C7) (69)
973	935	929 s	933 m	δ (HC15C2) (60) + δ (HC14C7) (20) + δ (HC15C2) (16)
982	944	941 s	945 m	δ (HC15C2) (54) + δ (HC14C7) (26)
998	959			ν (C1C3) (49) + δ (HC14C7) (20) + δ (O2C11C9) (18)
1008	969	964 m		δ (HC14C7) (59) + ν (C1C3) (13) + δ (O2C11C9) (13)
1019	979			δ (HC14C7) (55) + δ (HC15C2) (11)
1034	994	990 m	990 s	δ (HC14C7) (70) + ν (C1C3) (11)
1040	1000	998 m		δ (HC15C2) (52) + δ (HC14C7) (37)
1054	1013			δ (HC14C7) (54) + δ (HC15C2) (28)
1064	1023			δ (HC14C7) (60) + ν (C1C3) (17)
1067	1026		1029 vs	ν (C1C3) (52) + τ (C9C1C2C10) (29)
1079	1037	1034 s		δ (HC14C7) (36) + δ (HC13C12) (19) + δ (O2C11C9) (14)
1083	1041	1044 m		δ (HC14C7) (74) + δ (O2C11C9) (11)
1102	1059	1058 m	1050 s	δ (HC15C2) (42) + ν (C1C3) (40)
1107	1064			ν (C19O5) (88)
1110	1067	1070 m		ν (C1C3) (54) + δ (HC14C7) (19) + τ (C9C1C2C10) (14)
1122	1078	1076 m	1078 s	δ (HC15C2) (32) + δ (O2C11C9) (19) + δ (HC14C7) (13)
1150	1105	1103 m		δ (HC14C7) (51) + δ (HC15C2) (28)
1158	1113	1109 s	1108 m	δ (HC21O3) (42) + δ (HC14C7) (34)
1167	1122	1123 s	1122 s	δ (HC21O3) (41) + δ (HC14C7) (19) + δ (O2C11C9) (14)
1177	1131			δ (HC21O3) (93)
1188	1142		1187 s	δ (HC21O3) (60)
1199	1152			δ (HC14C7) (69)
1205	1158	1157 m	1156 vs	δ (HC15C2) (54) + δ (HC14C7) (27)
1212	1165			δ (HC15C2) (41) + ν (C19O5) (23) + δ (O2C11C9) (20)
1224	1177			δ (HC3C1) (28) + ν (C1C3) (22) + τ (C9C1C2C10) (14) + δ (HC14C7) (14)
1246	1198	1194 m		δ (HC15C2) (55) + δ (HC14C7) (31)
1257	1208	1205 m		δ (HC21O3) (23) + δ (O2C11C9) (18) + τ (C9C1C2C10) (13)
1264	1215			δ (HC21O3) (83)
1266	1217			δ (HC21O3) (61)
1286	1236			ν (C19O5) (51) + δ (HC14C7) (12) + δ (HC3C1) (11)
1290	1240		1238 vs	δ (HC3C1) (42) + δ (HC14C7) (29) + δ (HC21O3) (71)
1294	1244	1261 m	1259 vs	δ (HC15C2) (71) + δ (HC14C7) (16)
1330	1278	1278 m	1276 s	δ (HC3C1) (43) + δ (HC14C7) (37)
1342	1290			δ (HC13C12) (87)
1347	1295	1299 m	1295 m	δ (HC14C7) (72) + δ (HC13C12) (11)
1358	1305			δ (HC14C7) (41) + τ (C9C1C2C10) (33) + δ (HC13C12)
1362	1309			δ (HC13C12) (38) + δ (HC14C7) (19) + δ (HC12O1) (15) + δ (O2C11C9) (13)
1372	1319			τ (C9C1C2C10) (23) + δ (HC13C12) (21) + δ (HC15C2) (20) + ν (C1C3) (18)
1374	1321		1322 s	δ (HC15C2) (29) + δ (O2C11C9) (24) + τ (C9C1C2C10) (22) + δ (HC13C12) (17)
1383	1329			δ (HC15C2) (78)
1390	1336		1335 m	τ (C3H ₂) (66)
1391	1337			τ (C3H ₂) (48) + δ (HC13C12) (17)
1400	1346	1344 m		wag (C15H ₃) (48) + δ (O2C11C9) (19)
1408	1353	1351 m	1357 m	δ (C1C3H) (68) + wag (C15H ₃) (18)
1422	1367			δ (O2C11C9) (46) + δ (HC12O1) (33) + δ (HC13C12) (17)
1431	1375			wag (C15H ₃) (85)
1433	1377		1389 m	wag (C15H ₃) (59) + wag (C14H ₃) (35)

Tabela 1 (continuação): Frequência calculada (ω_{calc}), frequência escalada (ω_{scal}) pelo fator de escala 0.9612, posições das bandas Raman ($\omega_{\text{FT-Raman}}$) e IR ($\omega_{\text{FT-IR}}$) em unidades de cm^{-1} e classificação para os modos vibracionais de $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_5$ com distribuição de energia potencial (PED).

ω_{calc}	ω_{scal}	ω_{Raman}	$\omega_{\text{FT-IR}}$	Classificação com PED * (%)
1483	1425			wag (C21H ₃) (63) + sc (C3H ₂) (15)
1488	1430	1428 s		wag (C21H ₃) (98)
1496	1438		1433 s	sc (C14H ₃) (81)
1503	1445			sc (C14H ₃) (47) + sc (C21H ₃) (50)
1504	1446			sc (C14H ₃) (72)
1508	1449			sc (C14H ₃) (92)
1509	1450	1450 m		sc (C14H ₃) (94)
1519	1460		1456 s	sc (C14H ₃) (83) + sc (C21H ₃) (13)
1522	1463			sc (C14H ₃) (89)
1523	1464	1463 m		sc (C14H ₃) (89)
1528	1469			sc (C14H ₃) (84)
1549	1489	1486 m	1501 m	sc (C15H ₃) (79)
1550	1490		1548 vw	sc (C15H ₃) (66) + sc (C14H ₃) (14)
1641	1577	1503 s	1593 vw	δ (HC19O5) (72) + δ (HC19C17) (17)
1712	1646	1635 vs	1632 w	v (C4C6) (80)
1807	1737	1696 vs	1703 vs	v (C16O4) (100)
1844	1772	1750 m	1750 vs	v (C11O2) (99)
2998	2882	2835 m	2361 vw	v (C1H) (51) + v _s (C5H ₂) (31)
3000	2884	2864 s	2864 m	v _s (C5H ₂) (59) + v (C1H) (20)
3027	2910	2907 vs	2888 m	v _s (C8H ₂) (52) + v _s (C10H ₂) (23) + v _s (C14H ₃) (11)
3038	2920	2916 vs	2915 s	v (HC12) (76) + v _{as} (C13H ₂) (20)
3046	2928			v _s (C3H ₂) (36) + v _s (C14H ₃) (26) + v _s (C10H ₂) (18) + v _{as} (C8H ₂) (16)
3049	2931			v _s (C15H ₃) (82) + v _s (C21H ₃) (13)
3050	2932			v _s (C14H ₃) (47) + v _s (C3H ₂) (17) + v _s (C15H ₃) (16) + v _s (C21H ₃) (11)
3052	2934			v _s (C21H ₃) (95)
3053	2935	2936 vs		v _s (C21H ₃) (78)
3055	2936			v _{as} (C8H ₂) (31) + v _{as} (C10H ₂) (56)
3070	2951	2953 vs	2957 s	v _s (C3H ₂) (74) + v _{as} (C8H ₂) (19)
3079	2960	2977 s		v _s (C3H ₂) (94)
3109	2988			v _s (C13H ₂) (94)
3115	2994	2991 s		v _{as} (C14H ₃) (84) + v _s (C13H ₂) (16)
3123	3002	2997 m		v _{as} (C15H ₃) (100)
3125	3004			v _{as} (C14H ₃) (100)
3129	3008			v _{as} (C21H ₃) (89)
3132	3010	3013 s	3012 w	v _{as} (C10H ₂) (75) + v _{as} (C15H ₃) (16)
3150	3028	3020 s		v _{as} (C21H ₃) (93)
3161	3038			v _{as} (C13H ₂) (50) + v _{as} (C15H ₃) (31)
3163	3040		3068 w	v _{as} (C3H ₂) (71) + v _{as} (C21H ₃) (20)
3164	3041	3107 m		v _{as} (C3H ₂) (58) + v _{as} (C21H ₃) (31)
3171	3048	3119 s	3121 m	v _{as} (C13H ₂) (91)
3277	3150	3127 s	3130 m	v _{as} (C20H) (100)
3289	3161	3148 s	3148 w	v (C19H) (100)
3301	3173		3167 vw	v (C18H) (50) + v (C20H) (40)
			3384 vw	
			3486 w	

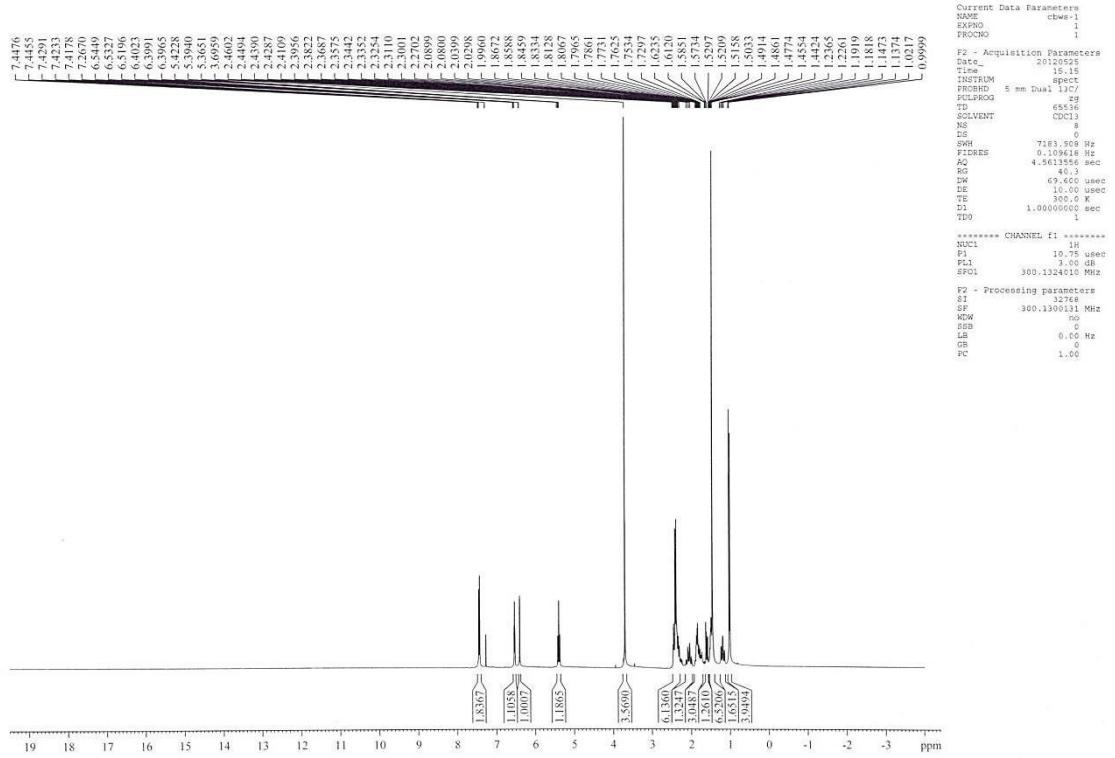
* Somente PED com valores maiores que 10 % são dados.

Legenda: τ = torção (*twisting*); ; sc = tesoura (*scissoring*); wag = sacudida (*wagging*); δ = deformação (*bending*); γ = deformação fora do plano (*rocking*); v = estiramento (*stretching*); v_{as} = estiramento assimétrico (*asymetric stretch*); v_s = estiramento simétrico (*symetric stretch*). vs = muito forte (*very Strong*); s = forte (*strong*); m = média; w = fraca (*weak*); vw = muito fraca (*very weak*).

ANEXOS

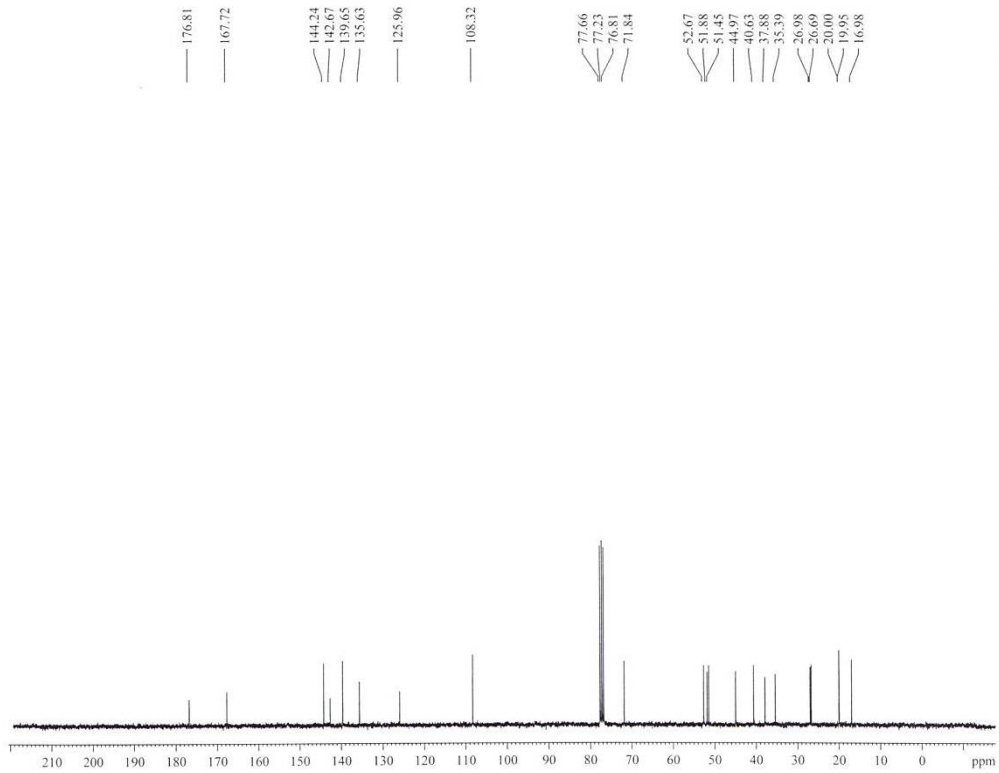
ANEXO A – ESPECTRO DE RMN1 H DA SONDERIANINA

CBWS1 (HELICIO/WILSON - UVA) [RMN1H, CDCL3] Operador GUSTAVO



ANEXO B - ESPECTRO DE RMN¹³C DA SONDERIANINA

CBWS1 (HELICIO WILSON - UVA) [RMN1H, CDCL3] Operador GUSTAVO

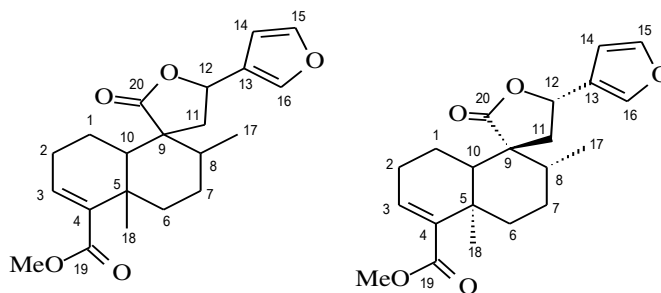


```

Current Data Parameters
NAME: cbws1
EXPNO: 1
PROCNO: 1
F2 - Acquisition Parameters
Date_ : 202005
Time : 15.25
INSTRUM : #sect
PROBHD : 5 mm Dui. 13C
PULPROG : zgpg30
ID : 43.34
SOLVENT : CDCl3
NS : 254
DS : 2
SWH : 17985.412 Hz
FIDRES : 0.274432 Hz
AQ : 1.4219208 sec
RG : 272768
SQ : 27.800 usec
DE : 10.00 usec
TE : 300.0 K
D1 : 1.0000000 sec
d11 : 0.0000000 sec
DELTA : 0.8999999 sec
TD0 : 1
***** CHANNEL f1 *****
NUC1 : 13C
P1 : 10.00 usec
PL1 : 0.00 dB
SFO1 : 75.4752853 MHz
***** CHANNEL f2 *****
CPDPRG2 : waltz16
NUC2 : 1H
PCPD2 : 90.00 usec
PL2 : 0.00 dB
PL12 : 21.00 dB
PL13 : 21.00 dB
SFO2 : 300.1312023 MHz
F2 - Processing parameters
SI : 32768
SF : 75.4677458 MHz
WDW : EM
SSB : 0
LB : 1.00 Hz
GB : 0
PC : 1.40
    
```

ANEXO C – DADOS DE REFERÊNCIA DOS ESPECTROS DE RMN DA SONDERIANINA

Os espectros de RMN coincidem com os valores publicados na literatura, conforme verificado nas figuras e tabela discriminadas abaixo.



Phytochemistry **1981**, 20, 852

	Sonderianina [do Trabalho]		Sonderianina [da Literatura]	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
C				
4	142.6	-	142.3	-
5	37.8	-	37.6	-
9	51.4	-	51.6	-
13	125.9	-	125.6	-
19	167.7	-	164.5	-
20	176.8	-	173.0	-
CH				
3	135.6	6.53 (t, 3.0)	135.3	6.53 (t, 3.0)
8	40.6	1.49 (m)	40.4	1.48 (m)
10	51.8	1.59 (dd, 10.0, 4.0)	52.4	1.59 (dd, 10.0, 4.0)
12	71.8	5.39 (t, 8.5)	71.6	5.40 (t, 8.5)
14	108.3	6.39 (m)	108.0	6.40 (m)
15	144.2	7.44 (m)	143.8	7.45 (m)
16	139.6	7.42 (m)	139.5	7.43 (m)
CH₂				
1	19.9	3.49-2.20 1.90-1.70	19.7	3.49-2.20 1.90-1.70
2	26.9	2.49-2.20	26.8	2.49-2.20
6		2.40 1.90-1.70		2.40 1.90-1.70
7	26.7	2.08 (m) 1.18 (m)	26.5	2.06 (m) 1.18 (m)
11	44.9	2.39 (d, 8.5)	44.7	2.40 (d, 8.5)
CH₃				
17	16.9	1.01 (d, 7.0)	16.8	1.02 (d,b 7.0)
18	19.9	1.45 (s)	19.7	1.46 (s)
MeO	52.7	3.69 (s)	53.3	3.70 (s)