



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

MARIA TATIANA ALVES OLIVEIRA

**Estudos microbiológicos e espectroscopia vibracional do composto 2-
hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona isolado de *Croton anisodontus* Mull.
Arg (Euphorbiaceae)**

CRATO – CE,
2014

MARIA TATIANA ALVES OLIVEIRA

**Estudos microbiológicos e espectroscopia vibracional do composto 2-
hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona isolado de *Croton anisodontus* Mull.
Arg (Euphorbiaceae)**

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

Orientador:
Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira

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

CRATO – CE,
2014

MARIA TATIANA ALVES OLIVEIRA

Estudos microbiológicos e espectroscopia vibracional do composto 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona isolado de *Croton anisodontus* Mull. Arg (Euphorbiaceae)

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

DISSERTAÇÃO APRESENTADA EM: ____ / ____ / 2014.

RESULTADO: _____

BANCA EXAMINADORA:

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

Prof. Dr. Hélcio Silva dos Santos
Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA

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

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

CRATO – CE,
2014

Dedico esse trabalho aos meus pais Maria das Dores e
Cícero Oliveira por todo amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

À Deus todo poderoso, agradeço a minha vida, motivação e presença constante.

Aos meus pais: Cícero da Silva Oliveira e Maria das Dores Alves Oliveira, pelo amor infinito, compreensão, paciência, confiança e incentivo para realização deste trabalho.

Aos meus irmãos: Edvania Alves Oliveira, Evandro Alves Oliveira, Patricia Alves Oliveira e Everaldo Alves Oliveira, por estarem sempre ao meu lado apoiando todas as minhas decisões.

A minha sobrinha Mariah Alicy Alves Medeiros que com seu sorriso inocente me encorajou a lutar e não desistir dos meus sonhos.

Ao meu orientador professor Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira, Obrigada por todos os ensinamentos, conversas, entusiasmo, preocupação, dedicação. Obrigada por me apoiar. É impossível deixar em papel o verdadeiro sentimento, mas digo: obrigada por ter aceitado ser orientador e mestre deste meu pedaço de vida. Obrigada professor, palavras não são suficientes para agradecer!

Ao meu co-orientador professor Dr. Hércio Silva dos Santos, pela participação e ensinamentos nessa etapa tão importante de minha vida. Agradeço também pela concessão da amostra utilizada nesta dissertação. Obrigada!

A Ticila Alves, Vivianne Cortez, Mariana Brigido, Nêthyelle Amarante, Patricia Luz, Paulo Landim amigos tão importantes. Obrigada por serem amigos sempre presentes e dedicados. Obrigado por apoiarem meus sonhos e estarem sempre aptos a me ajudar.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular de uma forma especial aos Drs.(a) Galberto Martins, Henrique Douglas Coutinho, Diniz Maciel, Marta Kerntopf, Imeuda Peixoto, Roseli Barbosa e Irwin Alencar. Obrigada por todo tempo dedicado a passar ensinamentos tão importantes para minha vida.

As Secretárias Anderciele Rolim e Lenira Pereira por estarem dispostas a ajudar e me auxiliar em todo decorrer do Mestrado.

Aos membros do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM), Flaviana, Audilene, Saulo, Jacqueline, Fernando, Luciene, João Vitor, Liscassia, Rosimeire, Edinardo, Nadghia e Elba pelo acolhimento e apoio.

Ao Dr. Paulo de Tarso Cavalcante Freire, da Universidade Federal do Ceará (UFC), pela disponibilização dos equipamentos para realização das medidas de espalhamento Raman e espectroscopia no infravermelho.

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

A capacidade de sonhar sempre foi o grande segredo daqueles que mudaram o mundo. Os sonhos alimentam a alma e dão asas a inteligência. É no solo fértil da memória onde semeamos os sonhos que farão grande diferença em nossa existência. Os sonhadores mudaram a história da humanidade. Eles fizeram da derrota, o pódio para a vitória; das críticas, o palco, de onde receberam os aplausos. “Sonhos perseguidos com perseverança, sempre acabam em realidade”.

(Augusto Cury)

RESUMO

A família Euphorbiaceae destaca-se por ser uma das maiores entre as dicotiledôneas. Dentre os gêneros nativos do Brasil, destaca-se o gênero *Croton* com cerca de 700 espécies, muitas das quais usadas na medicina popular para tratar várias doenças sendo uma delas as infecções por microrganismos resistentes. Uma das estratégias para a busca de novos agentes antibacterianos é o isolamento de substâncias oriundas de produtos naturais. O composto 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona de fórmula molecular $C_{11}O_5H_{14}$ foi isolado da casca do caule de *Croton anisodontus* uma espécie endêmica nativa da caatinga do Nordeste do Brasil. Vale ressaltar que não há relato na literatura sobre suas propriedades estruturais e vibracionais, sendo essas importantes para identificação, análise e caracterização dessa substância. Neste contexto este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana, moduladora e promover uma investigação das propriedades estruturais e vibracionais da substância 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona pelas técnicas de espectroscopias Raman com transformada de Fourier (FT-Raman – *Fourier Transform Raman*) e infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR - *Fourier Transform Infrared*) e cálculos computacionais usando a teoria do funcional da densidade (DFT – *Density Functional Theory*). Foram avaliadas diferentes metodologias de fracionamento do extrato hexânico da casca do caule de *Croton anisodontus*, tais como, cromatografia em coluna e partição entre solventes imiscíveis até a obtenção de um sólido denominado CAL 1, o qual após recristalização com hexano e análise por Cromatografia de Camada Delgada mostrou-se puro. Um ensaio de microdiluição foi realizado para verificar a atividade antimicrobiana e as possíveis interações entre o produto natural e os antibióticos, utilizando uma concentração sub-inibitória. A substância 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona apresentou interações com os aminoglicosídeos testados demonstrando significância com $p < 0,001$ frente a *P. aeruginosa* e para a *S. aureus* na associação com a amicacina. Os presentes resultados indicam que a substância 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona pode ser uma fonte alternativa de substância isolada com ação antibacteriana.

Palavras-chave: atividade antibacteriana, atividade antifúngica, *Croton anisodontus*, espectroscopia, cálculos computacionais

ABSTRACT

The Euphorbiaceae family stands out as one of the largest dicotyledon families. Among its genera native to Brazil, the genus *Croton* has about 700 species, many of which are used in popular medicine to treat various diseases, including infections by drug-resistant microorganisms. One of the strategies to search for new antibacterial agents is the isolation of substances from natural products. The compound 2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyacetophenone with the molecular formula $C_{11}O_5H_{14}$ was isolated from the stem bark of *Croton anisodontus*, an endemic species native to the caatinga of Northeast Brazil. It should be noted that there is no report in the literature on its structural and vibrational properties, which are important for the identification, analysis and characterization of this substance. Accordingly, the aim of this study was to evaluate the antimicrobial and antibiotic-modifying activities of the compound 2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyacetophenone and to investigate its structural and vibrational properties by Fourier Transform Raman (FT-Raman) and Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopies using Density Functional Theory (DFT) calculations. Different methods of fractionating the hexane extract of the stem bark of *Croton anisodontus* were evaluated, such as column chromatography and partition between immiscible solvents, until a solid called CAL 1 was obtained. After recrystallization from hexane and analysis by thin-layer chromatography, this substance appeared to be pure. A microdilution assay was performed to determine antimicrobial activity and possible interactions between the natural product and antibiotics, using a sub-inhibitory concentration. 2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyacetophenone demonstrated significant interactions with the aminoglycosides tested ($p < 0.001$) against *P. aeruginosa* and with amikacin for *S. aureus*. The present results indicate that 2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyacetophenone with antibacterial activity.

Key words: antibacterial activity, antifungal activity, *Croton anisodontus*, spectroscopy, computational calculations.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Alteração da permeabilidade da parede bacteriana	16
Figura 02: Alteração do sítio de ação dos antibióticos	16
Figura 03: Bomba de efluxo	16
Figura 04: Mecanismo enzimático	16
Figura 05: Espectro eletromagnético e excitação molecular	20
Figura 06: Representação esquemática das transições entre níveis de energia para os tipos de espalhamento Raman e Rayleigh	21
Figura 07: <i>Croton anisodontus</i>	22
Figura 08: Fórmula estrutural da substância 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona	30
Figura 09: Semeio dos inóculos bacteriano	33
Figura 10: Leitura da modulação	34
Figura 11: Espectrômetros utilizados nas medidas FT – Raman e FT – IR	36
Figura 12: CIM (Concentração Inibitória Mínima) dos aminoglicosídeos na presença e ausência da substância 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona frente à <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39
Figura 13: CIM (Concentração Inibitória Mínima) dos aminoglicosídeos na presença e ausência da substância 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona frente à <i>Staphylococcus aureus</i>	39
Figura 14: CIM (Concentração Inibitória Mínima) dos aminoglicosídeos na presença e ausência da substância 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona frente à <i>Escherichia coli</i>	40
Figura 15: Fórmula estrutural da substância 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona $C_{11}O_5H_{14}$	42
Figura 16: Espectro FT – Raman do cristal $C_{11}O_5H_{14}$	43
Figura 17: Espectro FT – IR do cristal $C_{11}O_5H_{14}$	44
Figura 18: Deslocamento atômico correspondente a alguns modos normais selecionados da molécula $C_{11}O_5H_{14}$	48

LISTA DE QUADROS

Quadro 01: Aplicações da espectroscopia.....	18
Quadro 02: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de 1 em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos em δC e δH estão em PPM.....	29
Quadro 03:Frequências calculadas (ω_{calc}), frequências escaladas (ω_{scal}) pelo fator de escala 0,9600, 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 $\text{C}_{11}\text{O}_5\text{H}_{14}$ com PED.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Origem das linhagens bacterianas e perfil de resistência a antibióticos.....	31
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- ω_{calc} – Posições do número de onda calculado
- $\omega_{\text{FT-Raman}}$ – Posições das bandas Raman
- ω_{IR} – Posições das bandas infravermelho
- ω_{scal} – Posições do número de onda escalado
- ATCC – *American Type Culture Collection*
- ATR – *Attenuated total reflectance*
- BHI (IHB) – *Brain heart infusion*
- CCD – Cromatografia de Camada Delgada
- CIM – Concentração Inibitória Mínima
- CIM/8 – Concentração subinibitória
- DFT – Density functional theory
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- EM – Espectrometria de Massas
- FT-IR – *Fourier transform infrared*
- FT-Raman – Espalhamento Raman com transformada de Fourier
- HMBC (CBMH) – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*
- HMQC (CQMH) – *Heteronuclear Multiple Quantum Correlation*
- HIA (AIH) – *Heart infusion Agar*
- IR – *Infrared*
- OMS – Organização Mundial de Saúde
- DEP – Distribuição de energia potencial
- RMN – Ressonância Magnética Nuclear
- RMN ^1H – Ressonância Magnética Nuclear do Hidrogênio 1
- RMN ^{13}C – Ressonância Magnética Nuclear do Carbono 13
- sc – *scissoring*(tesoura)
- wag – *wagging*(balanço)
- δ - deformação angular
- δ_{out} - deformação fora do plano
- v- estiramento
- v_{as} - estiramento assimétrico
- v_{s} - estiramento simétrico

τ – torção

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
1. OBJETIVOS	4
1.1 Objetivo geral	4
1.2 Objetivos específicos	4
2. REFERENCIAL TEÓRICO	5
2.1 Plantas medicinais	5
2.2 O Gênero Croton	6
2.3 Microrganismos e infecções	8
2.4 Resistência microbiana	10
2.5 Necessidade de novos antibióticos	11
2.6 Atividades moduladora	13
2.7 Mecanismos de resistência bacteriana e fúngico	14
2.8 Atividades biológicas das acetofenonas	17
2.9 Espectroscopia vibracional	18
2.9.1 Espectroscopia de absorção no infravermelho	19
2.9.2 Espalhamento Raman	20
2.9.3 Espectroscopia utilizando transformada de Fourier	22
2.10 Modelagem molecular e o seu papel no desenvolvimento de novos fármacos	22
2.11 Teoria Quântica	24
2.11.1 A equação de Schrödinger	24
2.11.2 A Teoria do Funcional da Densidade (DFT)	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Material vegetal	27
3.2 Extração e isolamento	28
3.3 Atividade antimicrobiana e moduladora	30
3.3.1 Drogas e reagentes	30
3.3.2 Preparo da solução inicial e das soluções de teste	31
3.3.3 Microrganismos	31
3.3.4 Perfil de resistência bactérias e fungos	32
3.3.5 Meios de cultura	32
3.3.6 Preparo e padronização de inóculos bacterianos	32
3.3.7 Preparação da solução teste	33
3.3.8 Atividade antimicrobiana	33
3.4 Avaliação da interferência de 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona sobre a resistência aos aminoglicosídeos e antifúngicos	33
3.5 Análise de dados	34
3.6 Caracterização do cristal 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona por espectroscopia Raman e infravermelho	34
3.6.1 Equipamentos de espalhamento Raman e de espectroscopia no infravermelho	34

3.7 Métodos computacionais	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1 Atividade antimicrobiana e moduladora	37
4.2 Espectroscopia vibracional	41
CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS	49

INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas representam uma das mais importantes justificativas de morte no mundo, com prevalência nas regiões tropicais. Nos países em desenvolvimento o tratamento destas enfermidades é mais difícil, não só pela existência de microrganismos resistentes, mas também pela baixa renda da população que dificulta seu acesso a essa população aos medicamentos apropriados (KUETE *et al*, 2011).

Com relação a bactérias patogênicas, um problema crescente e preocupante é o aumento da resistência bacteriana aos antibióticos (SILVEIRA *et al*, 2006). Para pacientes, a resistência antimicrobiana aumenta a morbidade e mortalidade, enquanto que para as instituições de saúde significa aumento nas despesas (DANCER, 2001).

Os microrganismos possuem vários mecanismos pelos quais podem resistir aos efeitos dos antimicrobianos, dentre eles: alteração da estrutura molecular dos antimicrobianos, produção de enzimas que inativam a droga, alteração das proteínas ligantes da penicilina ou outros pontos-alvo nas paredes das células, alvos modificados da DNA-girase, mutações de permeabilidade e modificações ribossômicas (FILE Jr, 2000).

Atualmente combinações múltiplas de drogas estão sendo utilizadas no combate à disseminação de bactérias patogênicas resistentes a antibióticos. Relatos indicam que diferentes combinações antibióticas testadas *in vitro* e aplicadas em clínicas são comuns, é o caso da combinação de penicilina com a gentamicina. Essa combinação vem sendo utilizada também entre antibióticos e produtos naturais de origem vegetal que poderão alterar a ação dos antibióticos, seja aumentando a atividade antibiótica ou revertendo a resistência (COUTINHO *et al*, 2008).

Quando a substância utilizada na combinação intervém de forma positiva, ou seja, aumentando a atividade do antibiótico, é dito que provoca um efeito sinérgico. Ao contrário, quando há uma diminuição ou inativação da ação dos antibióticos frente à substância ocorrerá o efeito antagônico (CANTON e ONOFRE, 2010).

Pesquisas com novas substâncias com efeito antimicrobiano podem contribuir significativamente no desenvolvimento do campo da saúde em nível mundial, encontrando fórmulas mais eficientes e com menos toxicidade na corrida contra a resistência de microrganismos patogênicos (SAÚDE-GUIMARÃES e FARIA, 2007).

Os avanços ocorridos nos últimos anos na área de química medicinal e biologia molecular facilitaram a descoberta de novos alvos biológicos. A química combinatória consegue comportar a síntese de milhares de compostos em um curto espaço de tempo, e técnicas de seleção permitem que sejam testados vários compostos simultaneamente (ZACCHINO, 2001). Programas computacionais contribuem na modelagem de moléculas ativas e vem aperfeiçoando novos fármacos recombinantes com maior potência e uma ação mais seletiva para a molécula alvo (BARREIRO, 2001).

As plantas são uma fonte significativa de produtos naturais com potencial biológico ativo, muitos dos quais são integrados em modelos para a síntese de uma grande quantidade de fármacos. Estes produtos constatados na natureza revelam uma infinidade quase que surpreendente de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas (BRESOLIN e FILHO, 2003). Compostos podem ser isolados de plantas, bactérias e fungos, para estudo de suas propriedades químicas, físicas e farmacológicas. Porém, muitos compostos ativos biologicamente apresentam-se em baixa concentração nas plantas, e assim são produzidos sinteticamente em maior quantidade, permitindo que suas propriedades sejam avaliadas em testes minuciosos (ARAÚJO, 2005).

A família Euphorbiaceae, tem destaque, por ser uma das maiores entre as dicotiledôneas, compreendendo cerca de 300 gêneros, e 5000 espécies. No Brasil, ocorrem 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).

Estudos fitoquímicos realizados com espécies de *Croton* têm mostrado a presença de terpenóides (SANTOS *et al*, 2008; SANTOS *et al*, 2009; SALATINO *et al*, 2007); alcalóides (MILANOWSKI *et al*, 2002; ARAUJO-Jr *et al*, 2004; RISCO *et al*, 2003); flavonóides (TSACHEVA *et al*, 2004; PALMEIRA *et al*, 2005; GONZÁLEZ-VÁZQUEZ *et al*, 2006); triterpenos e esteróides (MACIEL *et al*, 2000; CATALÁN *et al*, 2003). Esses metabólitos secundários são responsáveis por uma vasta variedade de atividades farmacológicas, principalmente atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias (SALATINO *et al*, 2007; CARNEIRO *et al*, 2011; AS *et al*, 2011) o que vem a ser de grande importância, uma vez os agentes antimicrobianos convencionais estão gradativamente perdendo sua eficácia, principalmente devido ao uso indiscriminado dessas drogas (HANCOCK *et al*, 2007).

Há um grande número de estudos sobre as atividades biológicas de diversos *Crotons*, contudo, no que se refere ao *Croton anisodontus* há pouco relato na literatura

(RODRIGUES *et al*, 2013). Ressalta-se ainda que esse *Croton* é uma espécie endêmica nativa da caatinga do Nordeste do brasileiro (CORDEIRO *et al*, 2012). Estudos realizados com espécie de *Croton anisodontus* relata a presença do composto de nome científico 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona (C₁₁O₅H₁₄) (RODRIGUES *et al*, 2013). Esse composto foi primeiramente obtido a partir do *Croton nepetaefolius* popularmente chamado de "marmeleiro vermelho" (SANTOS *et al*, 2008).

Os compostos derivados das acetofenonas possuem relatos de várias atividades biológicas como: antiespasmódica (CECHINEL Filho *et al*, 1995), antibacteriana (NIERO *et al*, 1996), antifúngica (CECHINEL Filho *et al*, 1996), antiinflamatória (FAVIER *et al*, 1998) e efeito hipocolesterolêmico (OLIVEIRA, 2001). Eles podem ter sua origem de plantas (FAVIER *et al*, 1998) ou serem produzidas por via sintética. Contudo, suas propriedades biológicas, estruturais e espectroscópicas são pouco exploradas.

Portanto, neste trabalho realizamos estudos microbiológicos e de espectroscopia vibracional no composto 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona com o objetivo de avaliar seu potencial biológico e de analisar suas propriedades vibracionais.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Verificar a atividade antimicrobiana e moduladora do composto 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona isolado do *Croton anisodontus* e investigar suas propriedades vibracionais utilizando as técnicas de espectroscopias FT-Raman e FT-IR, e cálculos computacionais usando DFT.

1.2 Objetivos específicos

- Avaliar o espectro de ação e o grau de inibição do composto 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona determinando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) sobre as linhagens bacterianas e fúngicas patogênicas;
- Verificar a eficácia do composto 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona na modulação da resistência bacteriana à aminoglicosídeos e modulação da resistência fúngica a antifúngicos;
- Realizar medidas de caracterização espectroscópica do composto 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona por espectroscopias FT-Raman e FT-IR com o propósito de determinar os modos vibracionais;
- Utilizar a simulação computacional para auxiliar na análise dos modos normais de vibrações do composto 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona observados experimentalmente pelas técnicas de espectroscopias FT-Raman e FT-IR;
- Classificar os modos normais de vibração de uma molécula isolada do composto 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona com base na distribuição de energia potencial (PED - do inglês *Potential Energy Distribution*).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

Este capítulo abordará importantes informações que serão relevantes para discussão dos resultados verificados em nosso trabalho.

2.1 Plantas medicinais

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) planta medicinal é “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos” (OMS, 2002).

A compreensão histórica sobre o uso de plantas para o tratamento e a cura de doenças define características que esta prática da medicina popular acompanha a humanidade desde seus tempos mais remotos. A este fato é adicionado o entendimento de que, para parte significativa da população mundial e em nosso país, o emprego de plantas para fins medicinais é o único recurso terapêutico encontrado (HEIDELBERG, 2001).

Até o ano de 2002 pouco se conhecia sobre a constituição química de 99,6% das plantas da flora brasileira, avaliadas entre 40 mil a 55 mil espécies, sendo que 10 mil podem ser consideradas medicinais, aromáticas e úteis (SILVA *et al*, 2002). Das espécies vegetais encontradas no Brasil, menos de 1% até o ano 2000 tinham sido estudadas adequadamente. Além disso, muitos compostos das vias metabólicas secundárias das plantas medicinais já isolados e com estruturas químicas determinadas ainda não foram estudadas quanto às suas atividades biológicas (MARTINS *et al*, 2000).

A OMS introduziu em 2002, um plano de estratégias para estimular a utilização da medicina tradicional (ou alternativa) nos programas de Assistência à Saúde de seus países membros, tendo como principais metas: criar políticas públicas para estimular programas de aplicação nos Sistemas Nacionais de Atenção à Saúde; fomento a segurança, eficácia e qualidade da prática da medicina tradicional; aumentar do acesso a esta prática terapêutica e promover o uso racional da medicina tradicional. Até hoje essas medidas ainda são adotadas pelo SUS (Sistema Único de Saúde).

As características antimicrobianas de substâncias e óleos essenciais contidos em plantas como produtos de seu metabolismo secundário têm sido analisado empiricamente durante séculos, mas foram comprovados cientificamente. Vários grupos de pesquisadores estão interessados em estudar a atividade biológica de plantas medicinais originárias de diversas regiões do mundo tornou-se um número cada vez maior. Orientados pelo uso popular das espécies nativas coletam informações e fazem comprovações das espécies utilizadas. Por outro lado, microrganismos que causam prejuízos à saúde humana estão se mostrando resistentes à maioria dos antimicrobianos conhecidos, o que incentiva ainda mais a procura por antibióticos de ocorrência natural (DUARTE, 2006).

Admitindo o potencial terapêutico das plantas medicinais e visando a sua melhor utilização para a população brasileira, o Ministério da Saúde através do Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos (DAF), órgão da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos (SCTIE), aprovou a Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), que lista 71 espécies vegetais que foram selecionadas por serem amplamente utilizadas pela população brasileira. O propósito é informar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da lista de plantas medicinais e fitoterápicas a serem disponibilizadas para uso da população, com segurança e eficácia para o tratamento de determinada doença. (BRASIL, 2009).

2.2 O Gênero *Croton*

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

A bibliografia segundo CRAVEIRO, 1981 descreve o gênero *Croton* da seguinte maneira: Espécies desse gênero são representadas por árvores, arbustos, sub arbustos, ervas e raramente lianas. Podem ser monóicas ou dióicas, 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 apresentam pêlos estrelados enquanto que outras possuem pelos lepdotos ou escamosos. As flores de ambos os sexos são pequenas, esbranquiçadas e dispostas em racemos algumas vezes espiciformes, dispondo-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.

Existem vários estudos biológicos associados ao gênero *Croton*. As plantas deste gênero possuem uma grande quantidade de metabólitos secundários responsáveis pelas atividades biológicas, dentre esses constituintes ativos encontram-se as proantocianidinas, terpenos, alcalóides, flavonas e outros compostos fenólicos (DALBÓ, 2004). Entre algumas das atividades conferidas ao gênero *Croton* que foram observadas são: atividade anti-helmíntica e efeito cardiovascular de *Croton zehntneri* (CAMURÇA-VASCONCELOS *et al*, 2007), antinociceptiva de *Croton urucurana* (RAO *et al*, 2007), moluscicida de *Croton campestris* (BABILI *et al*, 2006), antiinflamatória de *Croton cuneatus* (SUÁREZ *et al*, 2006), anticancerígeno de *Croton flavens*, mutagênica e antioxidante de *Croton lechleri* (LOPES E LOPES *et al*, 2004) e atividade antibacteriana *in vitro* de *Croton campestris* (MATIAS, 2010).

Estudos iniciais de atividade antimicrobiana dos extratos metanólico das folhas, casca do caule, lenho e raízes de *Croton anisodontus* Müll. Arg. já começaram a ser pesquisados. Esses extratos foram testados frente às bactérias *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus oralis* causadoras da cárie dental. O resultado deste estudo indicou que os extratos metanólico de *C. anisodontus* conseguiram interferir de forma significativa no crescimento das bactérias testadas. Os autores atribuem o isolamento do diterpeno casbano do lenho como confirmação para o resultado positivo da atividade antimicrobiana obtida para este extrato. Nesse mesmo trabalho ainda foram realizados estudos fitoquímicos onde aconteceu o primeiro relato para esta espécie. Segundo os autores o estudo fitoquímico dos extratos das folhas e raízes, bem como a avaliação do potencial antimicrobiano desta espécie frente a outras bactérias ainda está em andamento (RODRIGUES *et al*, 2013).

2.3 Microrganismos e infecções

A escolha das linhagens bacterianas e fúngicas testadas neste trabalho foram baseadas em sua significância para clínica médica e os seus mecanismos de resistência frente a antimicrobianos utilizados atualmente.

Alguns autores estabelecem que a infecção tenha uma relação com os serviços de saúde (IASS – Instituto de Assistência a Saúde do Servidor) de tal forma que reconhece os agravos como exclusividade de situações de internação hospitalar, que podem ocorrer devido ao contato do paciente com bactérias e outras modalidades de infecções hospitalares no atendimento ambulatorial, no dia a dia do hospital entre outros (MCKIBBEN *et al*, 2005).

As infecções hospitalares constituem importante problema de saúde pública mundial, causando o aumento na morbidade, na letalidade e no tempo de internação para o tratamento dos pacientes; provocando também mudança nos padrões de resistência microbiana; e conseqüente elevação nos custos assistenciais (SANTOS, 2006).

Os microrganismos que agem como patógenos distingue-se por sua ação e resposta nos diferentes tecidos de um mesmo hospedeiro. Existem avanços empolgantes nos estudos da relação função-estrutura para a maioria das moléculas bacterianas que possuem papel de relevante importância na doença infecciosa. Esses conhecimentos abrangem moléculas que fazem parte de estruturas tais como “pili”, proteína M estreptocócica e toxinas. A reunião de técnicas moleculares, mutagênese, análise de epítomos e cristalografia por Raios X tem dado oportunidade de novas abordagens sobre a atribuição dessas moléculas na virulência. (GOMES, 2013).

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. *S. aureus* é o patógeno mais corriqueiro em infecções purulentas, (por exemplo, furúnculo, carbúnculo, abscesso, miocardite, endocardite, pneumonia, meningite, artrite bacteriana) (VERHOEFF *et al*, 1999).

Escherichia coli é uma das mais importantes causadoras de doenças infecciosas humanas, conhecidas por fabricar enterotoxinas cujas propriedades e seu papel nas doenças diarréicas tem sido amplamente examinado. A ação das citotoxinas e seu papel na infecção humana já foi identificado (KONOWALCHUK *et al*, 1977; SCOTLAND *et al*, 1980), prevalente em infecções do trato urinário (HUGHES *et al*, 1982).

A *Pseudomonas aeruginosa* pode acarretar infecções nosocomiais graves, com alta letalidade (PELLEGRINO *et al*, 2002; SAFDAR *et al*, 2004). Na atualidade se localiza entre as principais bactérias causadoras de infecções hospitalares, ficando atrás apenas para o *Staphylococcus coagulase negativo* e o *Staphylococcus aureus* (SADER *et al*, 2001). Informações de redução da susceptibilidade da *P. aeruginosa* aos antimicrobianos vêm sendo publicados no Brasil (ANDRADE *et al*, 2003; KIFFER *et al*, 2005) e vários países (VAN ELDERE, 2003; RAJA e SINGH, 2007) destacando-se a redução de sensibilidade aos antibióticos de maior espectro de ação como os carbapenêmicos e as cefalosporinas anti-pseudomonas (NICOLETTI *et al*, 2006; LI, ZHANG e POOLE, 2000). Vale salientar que entre as mutações que provocam o aumento da resistência, está a produção de enzimas beta-lactamases e metallo-beta-lactamases (CAVALLO *et al*, 2002; SADER *et al*, 2005).

Os fungos são importantes agentes etiológicos de doenças humanas. Os mais predominantes patógenos fúngicos são as espécies de leveduras do gênero *Candida*. Essas espécies podem ocasionar várias doenças que vão desde infecções de mucosas superficiais, como candidíase vulvovaginal e candidíase orofaríngea, até infecções mais invasivas de alto potencial letal. A candidíase orofaríngea é muito frequente em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Humana (AIDS), enquanto infecções sistêmicas profundas são comumente associadas com neutropenia, resultante de terapia antineoplásica ou terapia imunossupressiva após transplante de órgãos (SULLIVAN *et al*, 2004).

O gênero *Candida* compreende cerca de 200 espécies, sendo *C. albicans* a espécie mais patogênica e constantemente isolada das lesões de candidíase. Entretanto, outras espécies também podem ser conceituadas como importantes patógenos humanos (MCCULLOUGH *et al*, 1996). Além disso, tem sido preconizado que a alta incidência de infecções causadas por espécies não albicans está aumentando (SULLIVAN *et al*, 2004).

2.4 Resistência microbiana

A resistência microbiana surge quase simultaneamente com o uso clínico das primeiras gerações de antimicrobianos. No início o acontecimento da resistência microbiana não parecia ser um problema perturbador, pois rapidamente era resolvido com a inserção de novos agentes e alterações estruturais nos compostos já existentes que aumentavam o poder de ação da droga. A intensificação na produção de antibióticos e antifúngicos, cada vez mais eficientes, associados a seu uso indiscriminado, a habilidade microbiana de assumir resistência e disseminar essa competência, tem selecionado cepas microbianas cada vez mais resistentes. Esse acontecimento tem levado mais rapidamente pacientes hospitalizados a óbito, além de elevar significativamente os custos com relação ao tratamento da infecção (COUTINHO *et al*, 2009; MATIAS *et al*, 2010).

Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) de Atlanta, nos Estados Unidos, microrganismos resistentes são aqueles que apresentam resistência a uma ou mais classes de antimicrobianos. Sob o entendimento laboratorial, compreende-se como o crescimento bacteriano *in vitro* na presença de concentrações séricas de antibiótico ou quando apresentam resistência a duas ou mais classes de drogas que causam interferência em seu papel de crescimento e, às quais seriam normalmente sensíveis (MARTINS *et al*, 2001; AZEVEDO, 2005).

A resistência microbiana aos antibióticos pode ser denominada como intrínseca ou adquirida. A intrínseca trata-se da herança genética do microrganismo, de suas propriedades naturais e fenotípicas e não expõe qualquer ameaça à terapêutica, isto porque é previsível, basta identificar o agente etiológico da infecção e os seus mecanismos de ação dos antibióticos acessíveis clinicamente no mercado. Porém a resistência adquirida acontece em uma espécie bacteriana antes sensível à droga em questão, exposto na célula da bactéria e inexistente em suas células genitoras. Essa recente particularidade é resultante das modificações ocorridas na estrutura ou a nível bioquímico da célula bacteriana, definido por alterações genéticas cromossômicas ou extra-cromossômicas (plasmídios) podendo levar ao surgimento de um indivíduo muito resistente, que normalmente não perde viabilidade e patogenicidade (GOLD e MOELLERING, 1996).

Essa necessidade na pesquisa de novos compostos com ação antimicrobiana tem levado os pesquisadores a analisar a corrida medicamento *versus* microrganismos, pois

desde o início dos anos 80 o número de antimicrobianos em fase de aperfeiçoamento para o mercado farmacêutico diminuiu extraordinariamente enquanto que a resistência dos microrganismos vem aumentando de forma descontrolada, pois estes estão cada vez mais desenvolvendo uma série de novos mecanismos de resistência (FILE Jr, 2000).

Nesse contexto, várias iniciativas têm sido argumentadas com a finalidade de evitar ou diminuir a referida situação. Dessa maneira, a constante emergência de microrganismos resistentes nas entidades de saúde e até mesmo na população em geral tem criado um grande desafio. Coincidentemente, tem se observado que providências rotineiras adotadas como acompanhamento em antimicrobianos, a limpeza das mãos, o isolamento dos pacientes e a educação em serviço nem sempre tem trazido a colaboração aguardada para o controle da resistência das bactérias (PASKOVATY *et al*, 2005; FISHMAN, 2006).

2.5 Necessidade de novos antibióticos

Antibióticos são constituintes naturais ou sintéticos capazes de anular o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias. Denominam-se como bactericidas, quando ocasionam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando estimulam a inibição do crescimento microbiano (WALSH, 2003).

Entre 1940-1960 muitos antibióticos foram descobertos através de seleção de produtos naturais microbianos, sendo a muitos deles eficientes para o tratamento de bactérias Gram positivo: β -lactâmicos (cefalosporina), aminoglicosídeos (estreptomicina), tetraciclina (clortetraciclina), macrolídeos (eritromicina), peptídeos (vancomicina) e outros (cloranfenicol, rifamicina B, clindamicina e polimixina B). Em 2006 três oriundos de sintéticos foram lançados no mercado: isoniazida, trimetropim e metronidazol (FERNANDES, 2006).

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

Os antibióticos são uma classe de medicamento essencial. Sem eles os nascimentos prematuros seriam mais complicados, a maioria das cirurgias e dos transplantes seria impossível, terapias citotóxicas para o câncer resultariam em infecções letais e os hospitais seriam focos de patogenias infecciosas. Ou seja, sem eles haveria diminuição drástica na expectativa de vida conquistada ao longo de décadas. Porém a eficiência dos antibióticos esta ameaçada, como vem sendo demonstrado em estudos realizados por NEVES *et al*, (2011); ZANOL *et al*, (2010), FIGUEIREDO *et al*, (2009); SANTOS FILHO *et al*, (2002). Há um aumento exorbitante de casos, não apenas de resistência a um fármaco, mas a muitos deles.

Estudos comprovam que o uso de antimicrobianos é a crucial força motora para a propagação de resistência bacteriana. A resistência bacteriana é maior em caso de uso inadequado desses medicamentos, onde o tratamento não é seguido conforme orientação médica. É comum o surgimento de resistência bacteriana no decorrer da terapia medicamentosa, com falência terapêutica. Mundialmente está sendo estabelecida uma correlação temporal entre a comercialização de novos agentes e o posterior desenvolvimento de resistência microbiana, muitas vezes após curto período de sua liberação para mercado (LIVERMORE, 2005; DELLIT *et al*, 2007).

Estratégias com base no controle do uso de antimicrobianos podem ser excelentes para prevenir o surgimento de mais resistência. É por isso que determinações nacionais focadas no controle de uso desses fármacos deveriam ser desenvolvidas, aperfeiçoada e executadas. O mais viável seria dispor de informações bem próximas do real, sobre as alterações nos padrões brasileiros de prescrever os antimicrobianos e fazer uma relação com a evolução dos perfis de resistência de micro-organismos provenientes de amostras ambulatoriais. Assim podendo ser desenvolvidas políticas baseadas em cada região, levando em consideração os problemas particulares encontrados em diferentes locais do território nacional (BRITO e CORDEIRO, 2012).

O aumento contínuo e descontrolado da resistência bacteriana, principalmente entre patógenos potencialmente perigosos, tem elevado a necessidade de novos fármacos e novas classes de antibióticos, tanto para infecções adquiridas em hospitais quanto na comunidade, para assim obter tratamento eficaz contra infecções (BRITO e CORDEIRO, 2012).

2.6 Atividades moduladora

O uso combinado de múltiplas drogas está sendo considerado altamente eficiente no combate à disseminação de bactérias patogênicas resistentes a antibióticos. Muitos estudos foram relatados demonstrando que diferentes combinações antibióticas testadas *in vitro* e utilizadas em clínicas são comuns. Um exemplo é o uso combinado de penicilina com a gentamicina. Essa associação vem sendo utilizada também entre antibiótico e produtos naturais de origem vegetal, que vão alterar a ação dos antibióticos, seja aumentando a atividade antibiótica ou revertendo à resistência (COUTINHO *et al*, 2008).

Quando esses produtos naturais têm sua ação de forma positiva potencializando a atividade do antibiótico, desencadeia um efeito considerado sinérgico. Já o efeito antagônico ocorre quando há uma diminuição ou inativação da ação dos antibióticos frente ao produto natural (CANTON e ONOFRE, 2010).

Estudos científicos relatam o uso extratos, óleos essenciais e substâncias isoladas de diversas plantas têm sido investigados, além de suas propriedades antibacterianas, a capacidade de interferir na atividade antibiótica, demonstrando um efeito sinérgico ou antagônico (ANGÉLICO, 2011). Outros trabalhos enfatizam que nessa associação consegue-se diminuir a toxicidade desses medicamentos convencionais, pois diminuem a quantidade do fármaco ao associar a planta medicinal, diminuindo assim toxicidade dos antibióticos (FIGUEREDO *et al*, 2013).

O extrato etanólico das folhas de *Mormodica charantia* quando testado para uma possível atividade antibacteriana frente a *E. coli* multirresistente, não foi verificado resultados significativos do ponto de vista clínico com CIM $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$, mas quando combinado em associação com a amicacina e neomicina apresentou sinergismo com efeito aditivo (COUTINHO *et al*, 2009).

Em testes de modulação da atividade de antibióticos, os extratos metanólicos e hexânicos das espécies *Croton camprestis* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia verbenácea* na concentração subinibitória de $16 \mu\text{g/mL}$, apresentaram potencialização à ação de todos os antibióticos testados em todas as linhagens de *E. colie*. *S. aureus*, reduzindo consideravelmente a quantidade de antibiótico utilizado (MATIAS, 2010).

O óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) cujos constituintes majoritários são: α -pineno (19,8%), β -mirceno (24,2%), 1,8 cineol (22,2%) e verbenona (9,3%), conforme descrito na literatura foi testado quanto a sua atividade moduladora da

resistência bacteriana. E o mesmo foi eficaz em modular a resistência de cepas de *E.coli* e *Salmonella* spp. em associação com os antibióticos ampicilina, tetraciclina e nitrofurantoína (RIBEIRO *et al*, 2012).

Estudos ainda de potencial antimicrobiano entre o óleo essencial de *L. sidoides* (OELS) etimol analisados pelo método de microdiluição frente às bactérias e fungos leveduriformes originários da ATCC, não demonstraram atividade significativa, porém a associação entre o óleo essencial de *L. sidoides* e timol que é seu componente isolado majoritário, com a gentamicina frente à *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* permitiu observar a redução da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em 32 vezes e 4 vezes respectivamente (VERAS, 2011).

2.7 Mecanismos de resistência bacteriana e fúngico

As bactérias apareceram na terra há cerca de 3,5 bilhões de anos, em ambiente adverso: temperaturas altíssimas, radiações ultravioleta e cósmica, tempestades e ausência de nutrientes. Elas derrotaram todos os obstáculos e evoluíram para atingir atualmente todos os habitats. Sua grande habilidade de adequar-se ao ambiente está relacionada à estrutura genômica, que garante a troca de genes entre as bactérias, adotando para isso elementos não cromossômicos: plasmídios, transposons e até bacteriófagos. Estes últimos causam a lisedas bactérias hospedeiras, porém pode carregar e espalhar genes bacterianos (MARTHOR e AMABIS, 1997).

Os microrganismos possuem vários mecanismos pelos quais podem resistir aos efeitos dos antimicrobianos, dentre eles: alteração da estrutura molecular dos antimicrobianos, produção de enzimas que inativam a droga, alteração das proteínas ligadoras da penicilina ou outros pontos-alvo nas paredes das células, alvos modificados da DNA-girase, mutações de permeabilidade e modificações ribossômicas (FILE Jr, 2000).

Para compreensão dos mecanismos de resistência das bactérias aos antibióticos primeiramente deve-se conhecer a sua estrutura e mecanismo de ação. Um antibiótico é um composto natural que causa a morte bacteriana ou inibe o seu crescimento. Nos dias atuais, os antibióticos e os quimioterápicos fazem parte do conceito de antimicrobianos, mas as opiniões se dividem quanto à aplicação destes conceitos (DIAS, 2009).

Na evolução das bactérias é inevitável não referir as mutações que possam ocorrer, quer essas sejam induzidas quer sejam espontâneas. O maior empecilho da resistência mediada por mutação é a sua transmissão às gerações seguintes, o que torna a bactéria resistente prevalente (MAYER, 2012; NEIHARDT, 2004; VEIGA, 1984). A transferência horizontal de genes é um processo de obtenção de material genético entre bactérias da mesma espécie ou espécies diferentes. Pode acontecer por três mecanismos: transformação, transdução ou conjugação, e ainda por transposição (DZIDIC, SUSKOVIC e KOS, 2007; TODAR, 2012).

Os mecanismos de resistência adquiridos pelas bactérias podem ser intrínsecos ou adquiridos por transmissão de material genético ou mutação (RICE e BONOMO, 2005). A resistência natural é uma particularidade intrínseca de um microrganismo, que acontece sem uma exposição anterior ao antibiótico. Uma prévia compreensão da resistência intrínseca das diferentes espécies auxilia a uma melhor escolha das estratégias de tratamento contra infecções (RICE e BONOMO, 2005).

Já a resistência adquirida com uso de antibióticos é observada principalmente através de quatro mecanismos: a alteração da permeabilidade, a alteração do local de ação, a bomba de efluxo e o mecanismo enzimático que altera a estrutura química do antibiótico (RICE e BONOMO, 2005).

Na resistência pela modificação da permeabilidade do antibiótico dever-se levar em consideração as alterações estruturais, a seletividade e o tamanho das porinas. Antibióticos como os β -lactâmicos, fluoroquinolonas e tetraciclinas penetram no interior da célula através de porinas existentes na membrana externa. Qualquer diminuição na função ou quantidade de porinas levará à resistência da bactéria ao antibiótico, diminuindo a ação do antibiótico no interior da bactéria (DECLOUR, 2009).

A resistência pela alteração do local de ação caracteriza-se pela diminuição ou mesmo pela ausência de afinidade do antibiótico ao local de ligação. Esta acontece por alteração da estrutura do peptidoglicano, interferência na síntese de proteínas ou na síntese de DNA (RICE e BONOMO, 2005; FLUIT, VISSER e SCHMITZ, 2001).

Bombas de efluxo são proteínas presentes nas membranas, e a resistência através dessa ocorre por um efluxo, isto é, o transporte ativo dos antibióticos do meio intracelular para o meio extracelular. Na resistência pela alteração do sítio de ação do antimicrobiano de afeta todas as classes de antibióticos, no entanto apresenta maior eficácia na presença de macrólidos, tetraciclinas e fluoroquinolonas, pois estes inibem a biossíntese de proteínas e de DNA. (DZIDIC, SUSKOVIC e KOS, 2007).

O mecanismo enzimático de resistência devido à inativação do fármaco resulta da produção, pela bactéria, de enzimas que degradam ou inativam o antibiótico. Existem três grandes estratégias, tais como, hidrólise, transferência de um grupo ou processo redox (DZIDIC, SUSKOVIC, KOS e 2007).

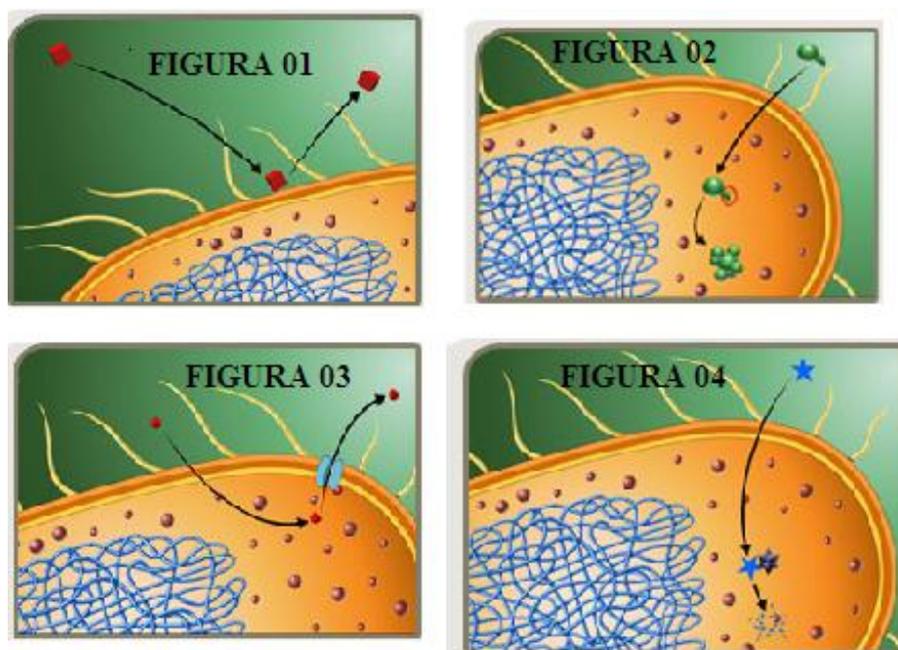


FIGURA 01 Alteração da permeabilidade da parede bacteriana. **FIGURA 02** Alteração do sítio de ação do antimicrobiano. **FIGURA 03** Bomba de efluxo. **FIGURA 04** Mecanismo enzimático. (Fonte: RM CONTROLE, 2007)

Os fungos são microrganismos encontrados no solo, na água, nos vegetais, no ar, nos animais e em detritos diversos. São eucarióticos, heterotróficos e possuem parede celular. Os fungos podem ter morfologia diferente segundo as condições nutricionais e a temperatura (TRABULSI, 1991).

Muitos fungos apresentam potencial patogênico para os humanos. De acordo com os tecidos e órgãos que são afetados, as micoses são classificadas em: micoses superficiais; micoses da pele, unhas e pêlos, micoses subcutâneas e micoses sistêmicas ou profundas (TRABULSI, 1991). As infecções por fungos são de difícil tratamento devido a sua resistência aos antifúngicos e à alta toxicidade dessa classe de fármacos (FICA, 2004). Dentre os mecanismos de resistência dos fungos destaca-se a superprodução de enzimas, implementações de vias metabólicas alternativas e a

produção de proteínas de bomba de efluxo que expulsam ou impedem que o medicamento entre na célula fúngica (PINA-VAZ *et al*, 2005; LEITE, 2010).

Os mais importantes mecanismos moleculares e bioquímicos que contribuem para o fenótipo de resistência a drogas em eucariotos são: diminuição da captação da droga; alteração ou degradação metabólica da droga pela célula; modificação na interação da droga com o sítio alvo ou com outras enzimas envolvidas na mesma via enzimática, através de mutações pontuais, expressão exagerada da molécula alvo, amplificação e conversão gênica (recombinação); aumento do efluxo celular. Um exemplo é uma maior expressão das bombas de efluxo, como os transportadores do tipo ABC (*ATP binding cassette*). A resistência de dermatófitos a agentes inibidores envolve a participação de modificadores de enzimas alvo, super-expressão de transportadores ABC e proteínas relacionadas ao estresse (MARTINEZ-ROSSI, PERES e ROSSI, 2008).

2.8 Atividades biológicas das acetofenonas

Os compostos fenólicos representam uma grande variedade de substâncias caracterizadas pela presença de um ou mais anéis aromáticos ligados a pelo menos um radical hidroxila e\ou outros substitutos, e podem ser divididos de acordo com o número de anéis fenólicos e com às estruturas as quais estão ligados (ARCHIVIO *et al*, 2007), podem atuar nas plantas como antioxidantes, antimicrobianos, antifúngicos, foto receptores, atraentes visuais e repelentes de predadores (MIDDLETON, KANDASWAMI e THEOHARIDES, 2000).

Dentre os compostos fenólicos encontram-se as acetofenonas, que apresentam várias atividades biológicas. Estes compostos podem ocorrer em plantas naturalmente (FAVIER, *et al*, 1998), ou podem ser produzidos por via sintética. Eles despertam grande interesse por apresentarem importantes atividades biológicas comprovadas, como: antiinflamatória (FAVIER *et al*, 1998), antiespasmódica (CECHINEL Filho *et al*, 1995), antibacteriana (NIERO *et al*, 1996) e antifúngica (CECHINEL Filho *et al*, 1996). Gul e colaboradores (2002) relatam importante atividade antifúngica de derivados da acetofenona conhecidos como bases bis Manich, bis (β -aroiletil) metilamina hidroclorado.

2.9 Espectroscopia vibracional

Espectroscopia é etimologicamente uma mistura de grego e latim, e significa o estudo dos espectros (L. spectrum + skop, do G. skopein, observar). O termo “espectro” foi utilizado pela primeira vez por Newton em 1671, para descrever a imagem colorida produzida por um feixe de luz solar ao incidir num alvo, após ter atravessado um prisma de vidro. Atualmente, entende-se por espectro a representação de uma dada grandeza referente a um objeto de estudo (átomo, molécula, partícula, sólido...) em função da frequência, energia ou comprimento de onda da radiação absorvida ou emitida (BERBERAN e SANTOS, 2013).

A espectroscopia define-se por sua vez como o estudo da interação radiação-matéria (OLIVEIRA, 2001). Em Espectroscopia, consideram-se os processos associados à absorção e emissão de radiação (lineares e não lineares). Para um espectroscopista, o estudo dos espectros é a finalidade da sua atividade, e não é necessária qualquer outra justificativa. No entanto, há inúmeras aplicações da Espectroscopia, se pode resumir no quadro 01 apresentado a seguir, e justificam a sua importância:

Quadro 01: aplicações da espectroscopia (FONTE: BERBERAN e SANTOS, 2013).

Objeto de estudo	Informações obtidas	Exemplos
Átomo, molécula, nanopartícula, sólido	Concentração Estrutura Dinâmica	- Distância e ângulos; grupos funcionais; forma Movimentos intra e intermoleculares
Meio (átomo, molécula, etc. usando como sonda ou como rótulo)	Parâmetros físicos e químicos, estrutura, localização	Temperatura, pressão, viscosidade, concentração de oxigênio, de água, acidez...

2.9.1 Espectroscopia de absorção no infravermelho

A radiação infravermelha não dispõe de energia suficiente para produzir transições eletrônicas. Para que uma molécula absorva a radiação no infravermelho ela deve sofrer uma modificação no momento de dipolo durante seu movimento rotacional ou vibracional. Somente sob estas circunstâncias o campo elétrico alternado da radiação pode interagir com a molécula e causar variações no momento de dipolo (SKOOG *et al*, 2009).

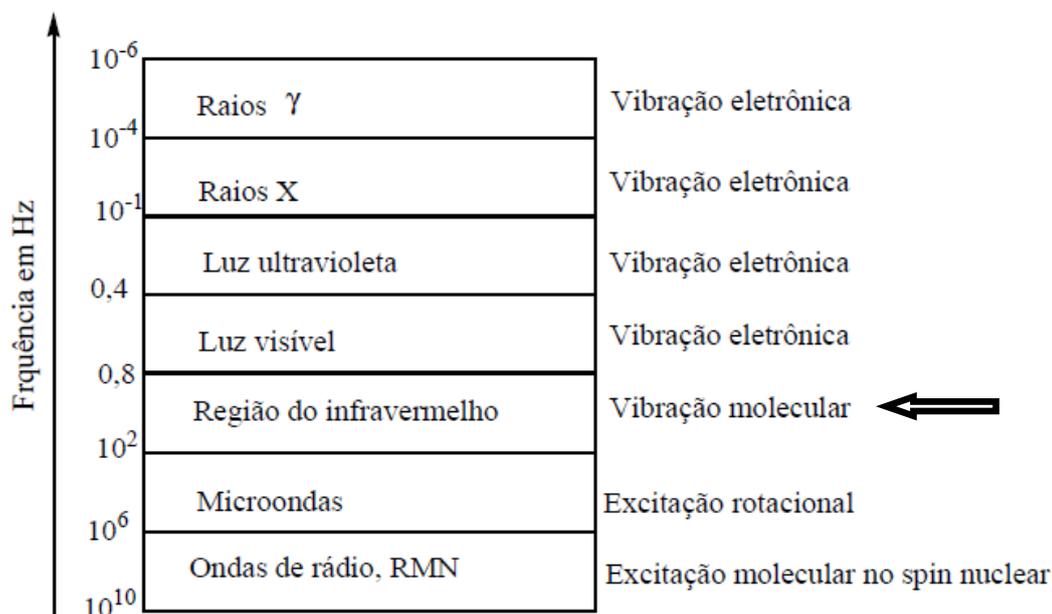
A interação ressonante entre fótons na região do infravermelho e os auto-estados vibracionais da molécula é bem determinada. A energia do fóton absorvido ($h\nu$) deve ser igual à diferença de energia entre dois auto-estados particulares.

$$h\nu = E_2 - E_1$$

As vibrações moleculares podem ser classificadas como estiramento ou deformação angular. Os estiramentos podem ser simétricos ou assimétricos. As vibrações de deformação podem ser de quatro tipos: deformação simétrica no plano (*scissoring*), deformação assimétrica no plano (*rocking*), deformação simétrica fora do plano (*wagging*), deformação assimétrica fora do plano (*twisting*).

A espectroscopia no infravermelho evidencia características da presença de vários grupos funcionais na estrutura orgânica devido à interação das moléculas ou átomos com a radiação eletromagnética em um processo de vibração molecular. A radiação infravermelha corresponde à parte do espectro eletromagnético entre as regiões do visível e das micro-ondas. Na Figura 5 na página 20 é apresentado o espectro eletromagnético e a excitação molecular correspondente a cada faixa de frequência. A porção de maior utilidade para a análise de grupos funcionais de estruturas orgânicas, esta situada entre 400 e 4000 cm^{-1} .

Figura 05. Espectro eletromagnético e a excitação molecular. (Fonte: Bruice, 2006)



As ligações covalentes que compõem as moléculas orgânicas estão em movimento axial e angular contínuo. A radiação no infravermelho faz com que átomos e grupos de átomos de compostos orgânicos vibrem com amplitude aumentada. O processo é quantizado, porém o espectro vibracional normalmente aparece como uma série de bandas, porque a cada modificação de nível de energia vibracional corresponde uma série de mudanças de níveis de energia rotacional, desta forma, as linhas se sobrepõem dando origem às bandas observadas no espectro.

2.9.2 Espalhamento Raman

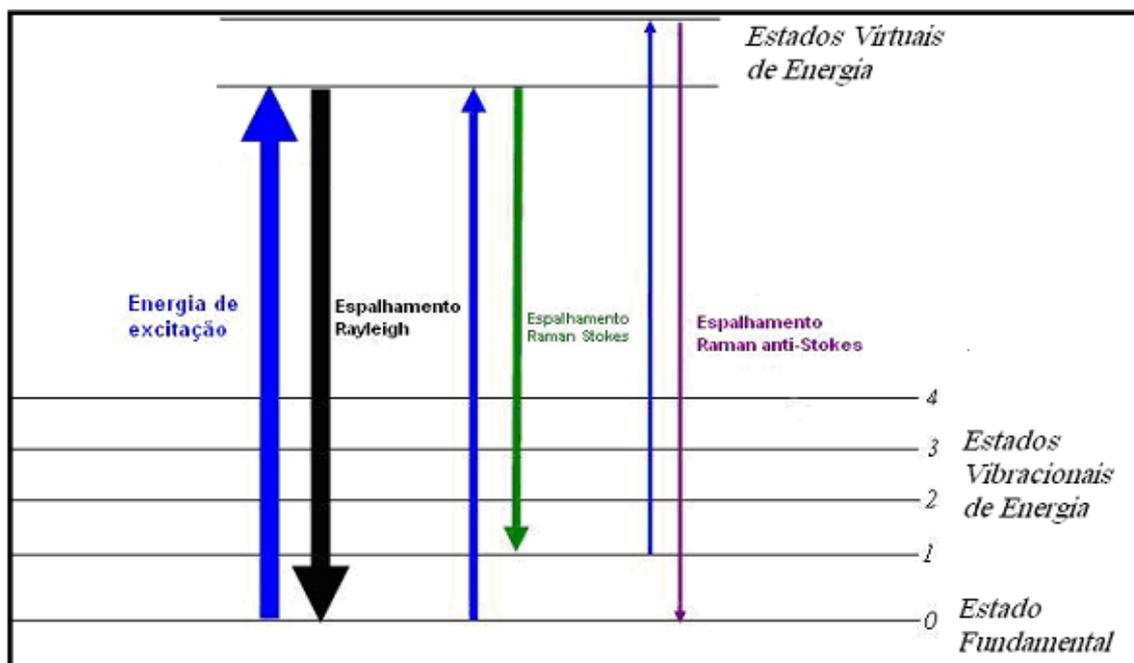
Assim como na espectroscopia no Infravermelho, a espectroscopia Raman concede informações sobre níveis de energia vibracionais e sobre a estrutura molecular, porém os processos físicos envolvidos são diferentes. Na espectroscopia Raman ocorre o espalhamento de luz (SALA, 1996). Pode-se dizer que o espalhamento Raman e a espectroscopia no Infravermelho são duas técnicas que se complementam.

O espalhamento Raman foi primeiramente estudado teoricamente por A. Smekal (RAE, THOMPSON e WITHERS, 1992), em 1923, que teve como base de seus estudos a mecânica quântica. Porém, somente em 1928 é que foi observado o efeito Raman pelo

físico indiano Chandrasekhara Venkata Raman durante um encontro da Associação de Ciências do Sul da Índia. Raman foi o primeiro a publicar o espectro de espalhamento da luz que continha linhas e bandas de determinada frequência deslocadas, em 1928, com co-autoria de K. S. Krishnan, e recebeu por este trabalho o premio Nobel de Física em 1930. Raman concluiu que os deslocamentos de frequências observados nada mais eram que frequências de oscilação dos átomos de uma molécula e que estas frequências dependiam das ligações químicas e da geometria das moléculas (SILVA, 2012).

Quando a energia da radiação inelasticamente espalhada é maior que a energia da radiação incidente é chamada de espalhamento Raman anti-Stokes; quando a energia da radiação espalhada é menor que a energia da radiação incidente é classificada como espalhamento Raman Stokes. Essa diferença é igual à transição vibracional da molécula. Se as energias espalhada e incidente tiverem o mesmo valor, o espalhamento será elástico e nenhuma informação vibracional molecular será obtida. Esse espalhamento é também conhecido como Rayleigh (SALA, 1996). A Figura 06 representa esquematicamente esses espalhamentos.

Figura 06. Representação esquemática das transições entre níveis de energia para os tipos de espalhamento Raman e Rayleigh. (Fonte: RICCI, 2008)



2.9.3 Espectroscopia utilizando transformada de Fourier

Uma técnica muito importante no estudo de sistemas moleculares complexos é a espectroscopia por transformada de Fourier (FT). No espectrômetro por transformada de Fourier, a codificação do sinal é obtida dividindo a fonte da radiação em dois feixes cujos caminhos ópticos podem ser variados periodicamente para fornecer padrões de interferências. Nessa técnica o espectrômetro é composto de um interferômetro tipo Michelson.

A transformada de Fourier é, então, usada para o processamento de dados. As vantagens dos espectrômetros por transformada de Fourier são: (i) a entrada do sinal possui uma abertura larga, os espectrômetros de prisma e de grade são limitados, pela presença de fendas estreitas que restringem tanto a irradiância como o intervalo de comprimentos de onda disponíveis; (ii) o espectro de saída possui ótima qualidade, a resolução obtida com a técnica por transformada de Fourier é muito alta, limitada apenas pela largura da janela da entrada e pela região de comprimentos de onda em análise (SKOOG *et al*, 2009). (iii) a medida de um único espectro é bem mais rápida na técnica por transformada de Fourier porque as informações de todas as frequências são colhidas simultaneamente.

O sistema de controle de espelhos num espectrômetro por transformada de Fourier permite sua movimentação em alta velocidade, possibilitando a aquisição de até 20 espectros por segundo. Isso permite que se façam múltiplas leituras de uma mesma amostra e se tire a média delas, aumentando assim a sensibilidade da análise.

2.10 Modelagem molecular e o seu papel no desenvolvimento de novos fármacos

O alto investimento e a grande quantidade de tempo para desenvolvimento de fármacos são fatores preocupantes para o crescimento da Indústria Farmacêutica, que necessita investir em pesquisa e desenvolver novos fármacos com maior eficácia e seletividade. As estimativas representam 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

(GELDENHUYS *et al*, 2006). Assim, para agilizar tempo e custo, a utilização de inovações científicas e tecnológicas, como ferramenta de pesquisa, combinando conhecimentos multidisciplinares de informática, biotecnologia, química e biologia, refletem no planejamento de novos fármacos de produção rápida e eficaz (DREWS, 2000; DREWS, 2003).

A utilização de métodos computacionais no estudo e no planejamento de compostos bioativos tem se tornado uma prática comum nos dias atuais. Em relação ao planejamento é importante destacar que, quando se fala do uso da modelagem molecular, o intuito não é chegar a uma molécula bioativa simplesmente através do uso de programas de computador. O processo de desenvolvimento dessas moléculas, devido à sua complexidade, 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).

Esses métodos computacionais podem ser utilizados como ferramentas do planejamento racional de compostos bioativos, denominado assim porque é orientado por uma hipótese racional sobre o mecanismo de ação destes compostos (BARREIRO e FRAGA, 2001).

O uso de modelos para a descrição de propriedades da matéria pode facilitar a possibilidade de cometer-se erros, devido às aproximações impostas para simplificar o mundo real. Dentro deste contexto, é interessante salientara diferença entre 'teoria' e 'modelo'. Teoria é entendida como um conjunto de leis capazes de fornecer resultados e conclusões a partir de um número de variáveis conhecidas. Normalmente, espera-se que as teorias se apliquem com a precisão definida pelos próprios limites da natureza. Porém, os modelos propõem descrever aspectos específicos de certas propriedades do sistema (SANTOS, 2001).

Em relação à parte experimental, o conhecimento da estrutura molecular de uma substância não é tarefa simples. São poucos os métodos capazes de caracterizar completamente uma dada estrutura, permitindo sua descrição precisa em termos de distâncias e ângulos de ligação, além de ângulos de torção (ou ângulos diedro) que definem sua conformação. (ABRAHAM, 1989; MARTIN, BURES e WILLETT, 1990).

Dentro deste contexto, a modelagem da estrutura molecular por métodos computacionais chegou como uma alternativa, principalmente após o aperfeiçoamento

de programas capacitados para calcular a estrutura com uma combinação adequada entre velocidade e precisão, somadas aos recursos da computação gráfica e à crescente diminuição dos custos de máquinas de alto desempenho capazes de operar estes programas e recursos (LIPKOWITZ e BOYD, 1990).

A modelagem molecular é uma ferramenta de planejamento racional envolvendo a compreensão da interação ao nível molecular de uma substância com seu receptor, segundo os pontos de vista qualitativos e quantitativos. Permite a análise aprofundada, não só da estrutura molecular em determinado sistema biológico, como também fornece meios para fazer uma previsão da potencialidade de moléculas candidatas a compostos bioativos. Simplificando pode ser considerada como conjunto de técnicas computadorizadas baseadas em métodos de química teórica e/ou dados experimentais (COHEN, 1996).

Adicionalmente, a 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).

2.11 Teoria Quântica

O uso da teoria quântica é de fundamental importância para o entendimento das propriedades físicas e químicas de átomos e moléculas. Deve ser considerado para sistemas pequenos. Por exemplo, com o emprego da teoria quântica podemos obter informações sobre as propriedades moleculares tais como densidade eletrônica, momento dipolo, cargas atômicas, parâmetros geométricos, energia, frequências vibracionais entre outras.

2.11.1 A equação de Schrödinger

A equação de Schrödinger determina corretamente a energia em um sistema atômico com a inclusão do comportamento ondulatório proposto por de Broglie para todas as partículas (núcleos e elétrons) que constituem esse sistema. Essa equação diz que ao se aplicar os operadores energia cinética e potencial eletrostático (que formam o operador Hamiltoniano) na função de onda, é obtida como resposta a própria função de onda multiplicada pela energia total do sistema. Ou seja:

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

A resolução desta equação é bastante complicada e uma série de aproximações é necessária para que ela possa ser aplicada para sistemas contendo muitos átomos.

Levar em conta o efeito de cada partícula sobre a dinâmica das demais é um problema bastante difícil que necessita aproximações. A primeira destas é aproximação Born-Oppenheimer.

A aproximação de Born-Oppenheimer separa o movimento nuclear do movimento eletrônico, visto que a massa nuclear é muito maior que a massa dos elétrons. Assim, os núcleos são assumidos em determinadas posições do espaço e a equação de Schrödinger é resolvida apenas para os elétrons, descrita por uma função de onda puramente eletrônica, na presença do potencial produzido pelos núcleos “congelados”. A melhor função de onda é obtida de tal forma que a energia seja um mínimo. A energia obtida assim é a energia eletrônica do sistema, calculada através de uma série de equações, chamadas equações de Hartree-Fock, onde se assume que a energia de um dado elétron depende dos campos elétricos produzidos pelo núcleo atômico e por todos os outros elétrons (SILVA *et al*, 2009).

2.11.2 A Teoria do Funcional da Densidade (DFT)

A Teoria do funcional da densidade (DFT) foi desenvolvida nos anos 1960, por W. Kohn, P. Hohenberg e L. Sham (HOHENBERG *et al*, 1964 e KOHN *et al*, 1965) e consiste de um método de aproximação para resolver a Equação de Schrödinger para sistemas moleculares de muitos átomos.

Na DFT a energia total é função da densidade eletrônica ρ e das coordenadas \vec{r} dos núcleos atômicos: $E = E(\rho, \vec{r})$. Portanto, a idéia dos funcionais de densidade é empregar uma densidade eletrônica.

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:

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

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

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

O material vegetal de *C. anisodontus* foi coletado no município de Itapiuna-Ceará-Brasil, em março de 2011. A identificação botânica foi realizada pelo professor Edson Nunes da Universidade Federal do Ceará. A exsicata da espécie encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra-UFC sob número 48964.

FIGURA 07. Imagem mostrando folhas e caule de *Croton anisodontus*. (FONTE: autor)



3.2 Extração e isolamento

A casca do caule (1.462,6 g) de *C. anisodontus*, seca a temperatura ambiente foi triturada e submetida à extração a frio por três dias com hexano. A solução obtida foi destilada sob pressão reduzida fornecendo o extrato hexânico (23,25 g), o qual foi adsorvido em gel de sílica e submetido à coluna cromatográfica, utilizando os eluentes: hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol. A fração clorofórmio (9,77 g) passou novamente pela cromatografada, utilizando os eluentes: hexano (F 1-6), hexano/acetato de etila (8:2 F 7-26), hexano/acetato de etila (7:3 F 27-40), acetato de etila (F 41-60) e metanol (F 61-66). Na fração 12-16 observou-se a presença de um sólido cristalino amarelo denominado CAL-1, o qual após recristalização com hexano e análise por Cromatografia de Camada Delgada mostrou-se puro.

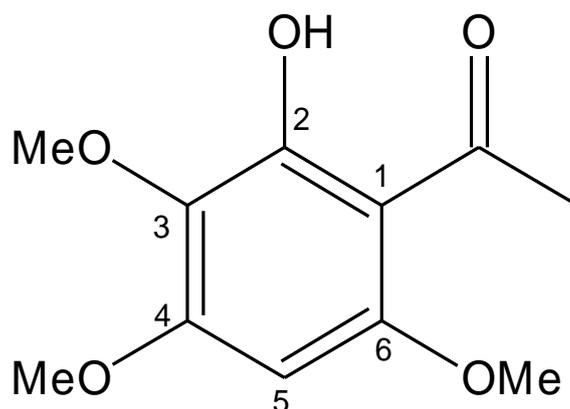
As cromatografias de adsorção em coluna foram feitas em gel de sílica 60 (63-200 μm , 70-230 mesh, Vetec). O comprimento e diâmetro das colunas variaram de acordo com a quantidade de amostra a ser submetida à cromatografia. Nas cromatografias em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatofolhas de alumínio TLC 20 x 20 cm com gel de sílica 60 GF₂₅₄ (Merck). As revelações das substâncias na cromatografia das placas analíticas foram realizadas, através da exposição destas, com solução de vanilina, seguida de aquecimento. O aparelho utilizado para a obtenção dos espectros de absorção na região do infravermelho foi o espectrômetro Perkin-Elmer, modelo 1000-FT. Os pontos de fusão foram obtidos em equipamento de micro determinação digital da METTLER TOLEDO. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear, uni e bidimensional, foram obtidos em espectrômetro Bruker DRX-300 e DPX-500 (¹H: 300 e 500 MHz; ¹³C: 75 e 125 MHz), utilizando CDCl₃ como solvente e TMS como padrão interno. Os espectros de massas foram registrados em espectrômetro de massas, aparelho Shimadzu QP5050A, operando em 70 eV.

O extrato bruto hexânico da casca do caule de *C. anisodontus* apresentou rendimentos de 1,59% que após ser submetida à coluna cromatográfica fornecendo várias frações dentre elas a fração clorofórmica com 42% de massa, que após passar novamente por cromatografia e apresentou um sólido cristalino amarelo denominado CAL-1.

Essa substância é solúvel em clorofórmio com ponto de fusão de 108,5–110,6 °C. Observou-se no espectro de absorção na região do infravermelho bandas em 1625 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$ de cetona), 1588, 1472, 1422 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=C}}$ aromático), 1278 e 1126 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-O}}$). A

análise do espectro de RMN ^1H apresentou sinais em δ_{H} 3,85 (s), 3,81 (s) e 3,72 (s) atribuídos a hidrogênios de três grupamentos metoxílicos. Um sinal em δ_{H} 5,88 (s) para um único hidrogênio ligado ao anel aromático. O sinal em δ_{H} 13,74 (1H, s) refere-se a um hidrogênio de hidroxila fenólica quelada, o que justifica a banda de absorção no espectro na região do infravermelho em 1625 cm^{-1} atribuído a um grupo carbonila de cetona, sinais estes típicos para aril cetonas *orto* a um grupo hidroxila. Finalizando a análise deste espectro pode-se verificar a existência de um singlete em δ_{H} 2,52 (s) com área de integração mostrando três hidrogênios, correspondentes a um grupamento metila. Através da análise dos espectros de RMN ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ e RMN ^{13}C -DEPT 135° verificou-se a existência de sinais correspondentes a cinco átomos de carbono quaternários aromáticos em δ_{C} 159,18 (C-4), 158,84 (C-6), 158,56 (C-2), 130,51 (C-3) e 106,36 (C-1), e somente um carbono metínico aromático em δ_{C} 86,53 (C-5). O espectro de massas de CAL-1 apresentou o pico íon molecular com m/z 226 $[\text{M}]^+$ correspondente à fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_5$. Após análise dos dados espectroscópicos (Quadro 02 na página 30) e a comparação com modelos da literatura (SANTOS *et al*, 2008), levaram a proposição da estrutura do composto como sendo o 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona isolada pela primeira vez de *C. anisodontus*.

Figura 08: Fórmula estrutural da substância 2-hidroxi-3,4,6 trimetoxiacetofenona.



Quadro 02 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C de CAL- 1 em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos em δ_{C} e δ_{H} estão em ppm.

C	1			
	HMQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
1	106,35	-		HO-2; H-5
2	158,84	-	HO-2	
3	130,53	-		HO-2; H-5; MeO-3
4	159,19	-	H-5	MeO-4
6	158,56	-	H-5	MeO-6
7	203,85	-	3H-8	
CH				
5	86,53	5,59 (s)		
CH_3				
MeO-3	60,75	3,77 (s)		
MeO-4	55,67	3,81 (s)		
MeO-6	56,03	3,86 (s)		
HO	-	13,75 (s)		

RMN ^1H - Ressonância Magnética Nuclear do hidrogênio 1-

RMN ^{13}C - Ressonância Magnética Nuclear do carbono 13.

CDCl_3 - Clorofórmio deuterado

HMQC - Heteronuclear Multiple Quantum Correlation.

HMBC - Heteronuclear Multiple Bond Correlation.

3.3 Atividade antimicrobiana e moduladora

3.3.1 Drogas e reagentes

O material utilizado nos testes encontra-se relacionados a seguir com suas respectivas procedências.

SUBSTÂNCIAS

Brain Heart Infusion (BHI)

Agar infusão de coração (HIA)

Dimetilsulfóxido (DMSO)

Rezasurina

ORIGEM

HIMEDIA – Índia

HIMEDIA – Índia

MERK – Alemanha

Sigma – USA

SUBSTÂNCIAS	ORIGEM
Gentamicina	Sigma – USA
Neomicina	Sigma – USA
Anfotericina B	Sigma – USA
Benzoilmetronidazol	Sigma – USA
Nistatina	Sigma – USA
Mebendazol	Sigma – USA

3.3.2 Preparo da solução inicial e das soluções de teste

Amostras da substância 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona isolada de *C. anisodontus*, foram solubilizadas em Dimetilsulfóxido (DMSO- Merck, Darmstadt, Alemanha), sendo observadas as seguintes proporções: 10mg da amostra solubilizada em 1mL de Dimetilsulfóxido (DMSO), para obter uma concentração inicial de 10mg/mL. Em seguida, esta solução foi diluída para 1024µg/mL da mesma forma e a partir desta, efetuaram-se diluições seriadas 1:2 em água destilada, obtendo-se as concentrações de 512 a 0,5 µg/mL.

3.3.3 Microrganismos

Os microrganismos utilizados nos testes foram obtidos através do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde. As linhagens bacterianas utilizadas foram: *Escherichia coli* (*E. coli* ATCC 10536 e *E. coli* 27); *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* 358); *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa* ATCC 15442 e *P. aeruginosa* 03); *Candida albicans* (*C. albicans* ATCC 40006); *Candida krusei* (*C. krusei* ATCC 6258) e *Candida tropicalis* (*C. tropicalis* ATCC 13803). Todas as linhagens foram mantidas em *Agar infusão de coração* (HIA, Difco Laboratories Ltda.). Antes da realização dos ensaios, as linhagens foram cultivadas por 18h a 37 °C em caldo *infusão de cérebro e coração* (BHI, Difco Laboratories Ltda.)

3.3.4 Perfil de resistência bactérias e fungos

Tabela 01. Origem das linhagens bacterianas e perfil de resistência a antibióticos

Bactéria	Origem	Perfil de Resistência
<i>Escherichia coli</i> 27	Ferida cirúrgica	Ast, Ax, Amp, Ami, Amox, Ca, Cfc, Cf, Caz, Cip, Clo, Im, Can, Szt, Tet, Tob
<i>Escherichia coli</i> ATCC10536	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 358	Ferida cirúrgica	Oxa, Gen, Tob, Ami, Can, Neo, Para, But, Sis, Net
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	-	-
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i> 03	Urocultura	Cpm,Ctz,Imi,Cip,Ptz,Lev,Mer,Ami
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 40006	-	-
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	-	-
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803	-	-

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

3.3.5 Meios de cultura

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

3.3.6 Preparo e padronização de inóculos bacterianos

Culturas de bactérias foram mantidas a 4 °C em Heart Infusion Agar (HIA). Antes dos testes, as linhagens foram repassadas para o meio citado e incubadas a 35°C por 24 horas. As linhagens repicadas a serem testadas foram inoculadas em Caldo Brain Heart Infusion (BHI) e incubadas na mesma situação antes do teste. Suspensões com crescimento bacteriano foram diluídas até a obtenção de 10⁵ céls/mL (NCCLS, 2000).

3.3.7 Preparação da solução teste

Para os testes foi utilizada solução preparada a partir do composto C₁₁H₁₄O₅ sob uma concentração de 10 mg/mL, dissolvidos em DMSO (dimetil sulfóxido), seguida diluídos com água destilada para uma concentração de 1024 µg/mL.

3.3.8 Atividade antimicrobiana

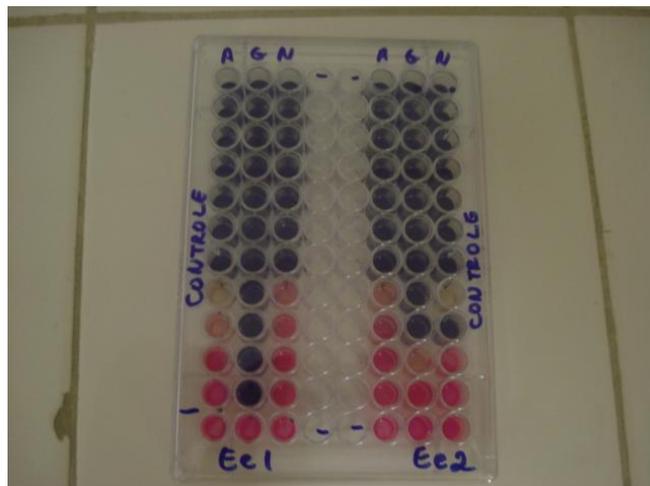
A CIM (concentração inibitória mínima) foi determinada em ensaio de microdiluição em caldo (NCCLS, 2003) utilizando-se um inóculo de 100 µL de cada linhagem, suspensas em caldo BHI com concentração de 10⁵ UFC/mL em placas de microtitulação com 96 poços, com diluições em série ½. Em cada poço foi adicionado 100 µL de solução de cada amostra. A concentração final da amostra variou entre 512 – 8 µg/mL. Para os controles foram utilizados os antibióticos padrões amicacina e gentamicina cujas concentrações finais variaram entre 512 µg/mL – 8,0 µg/mL. As CIMs foram registradas como as menores concentrações para a inibição do crescimento.

3.4 Avaliação da interferência de 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona sobre a resistência aos aminoglicosídeos e antifúngicos

Para avaliar a substância 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona, como moduladora da ação antibiótica, a CIM de antibióticos da classe dos aminoglicosídeos foram avaliados na presença e na ausência da solução teste em microplacas estéreis. Os antibióticos foram avaliados nas concentrações variando de 2500 a 2,5 µg/mL.

A solução teste foi misturada em caldo BHI 10% em concentrações subinibitórias, (CIM/8). A preparação das soluções de antibióticos foi realizada com a adição de água destilada estéril em concentração dobrada (5000 µg/mL) em relação à concentração inicial definida e volumes de 100 µL diluídos seriadamente 1:1 em caldo BHI 10%. Em cada cavidade com 100 µL do meio de cultura continha a suspensão bacteriana diluída (1:10). Os mesmos controles utilizados na avaliação da CIM para os extratos foram utilizados durante a modulação (COUTINHO *et al*, 2008). As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas e após esse período a leitura foi evidenciada pelo uso de resazurina.

FIGURA 10. Imagem das placas de microdiluição mostrando leitura da atividade Moduladora do composto. (FONTE: autor)



3.5 Análise de dados

Os resultados dos testes foram feitos em triplicata e expressos como média geométrica. Para análise estatística foi aplicada a two-way ANOVA seguida do teste de Bonferroni posttests. Considerando significância com $p < 0,05$.

3.6 Caracterização do cristal 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona por espectroscopia Raman e infravermelho

A substância 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona foi caracterizada por técnicas de espectroscopias Raman e infravermelho no Laboratório de Espalhamento Raman do Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará –UFC e Laboratório de Bioinformática Avançada da Universidade Regional do Cariri (URCA).

3.6.1 Equipamentos de espalhamento Raman e de espectroscopia no infravermelho

As medidas de espalhamento Raman com transformada de Fourier (FT-Raman) foi realizada com uso do equipamento FT-Raman Bruker Vertex 70 com módulo Ram II com a amostra da substância excitada na linha 1064 nm de um laser de Nd:YAG e usando uma potência de laser de 150 mW. O espectros Raman foram registrados na região de 40 a 4000 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} .

Para espectroscopia no infravermelho a substância 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona foram diluídas em KBr na razão média de 1:100, logo após foi prensada em forma de pastilhas. As medidas por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) foram realizadas usando o espectrofotômetro da marca Bruker, modelo Equinox-55. O espectro de transmitância foi registrado, na região de 400 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} .

Os equipamentos utilizados para a realização de medidas FT-IR e FT-Raman está ilustrado na Figura 13.

Figura 11: Espectrômetro utilizado nas medidas FT-Raman e FT-IR. (FONTE: autor)



3.7 Métodos computacionais

Neste trabalho foram empregados cálculos computacionais de química quântica, baseados na Teoria do funcional da densidade (DFT), utilizando o programa Gaussian 03 (FRISCH *et al*, 2003) para obtenção das frequências vibracionais do composto 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona ($\text{C}_{11}\text{O}_5\text{H}_{14}$). A estrutura molecular do $\text{C}_{11}\text{O}_5\text{H}_{14}$ utilizada como arquivo de entrada para o Gaussian foi desenhada no programa ChemSketch por meio dos dados obtidos a partir da espectroscopia de RMN ^1H e ^{13}C .

Os cálculos DFT foram realizados numa molécula de $\text{C}_{11}\text{O}_5\text{H}_{14}$ utilizando o funcional de correlação Lee-Yang-Parr B3LYP (LEE *et al*, 1988; PARR *et al.*, 1989; BECKE *et al*, 1993) e o conjunto de base 6-31 G (d, p) (PETERSSON *et al*, 1988). A estrutura molecular da molécula foi otimizada e as frequências vibracionais foram então calculadas. O arquivo de saída contém os parâmetros geométricos da estrutura otimizada, as frequências vibracionais e os deslocamentos atômicos de cada modo. A

classificação das vibrações moleculares foi realizada com base na distribuição de energia potencial (PED) usando o programa VEDA (JAMRÓZ, 2000).

As frequências calculadas foram ajustadas pelo fator de escala 0,9600 com o propósito de obter uma boa concordância com aquelas obtidas experimentalmente. Essa concordância possibilitou a atribuição completa das bandas Raman e Infravermelho para cada modo normal de vibração de 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona. Este procedimento permitiu atribuir com boa precisão as vibrações moleculares presentes nos espectros Raman e infravermelho.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

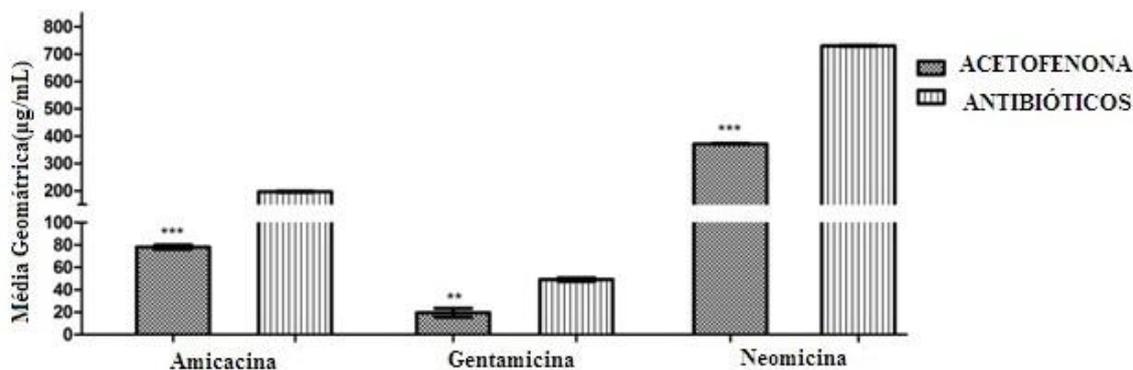
4.1 Atividade antimicrobiana e moduladora

Logo após o isolamento foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da substância 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona testada frente às linhagens padrões bacterianas (*E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*) e fúngicas (*C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*) comparativamente os resultados apresentaram a mesma CIM $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ o que significa que não houve relevância clínica.

Outros estudos que utilizaram produtos naturais ou substâncias ativas de plantas com atividades antimicrobianas e moduladoras têm obtido resultados satisfatórios (FERNANDES *et al*, 2005; BENEZ *et al*, 2007). A atividade antimicrobiana dos compostos isolados depende de sua estrutura química (DORMAN e DEANS, 2000).

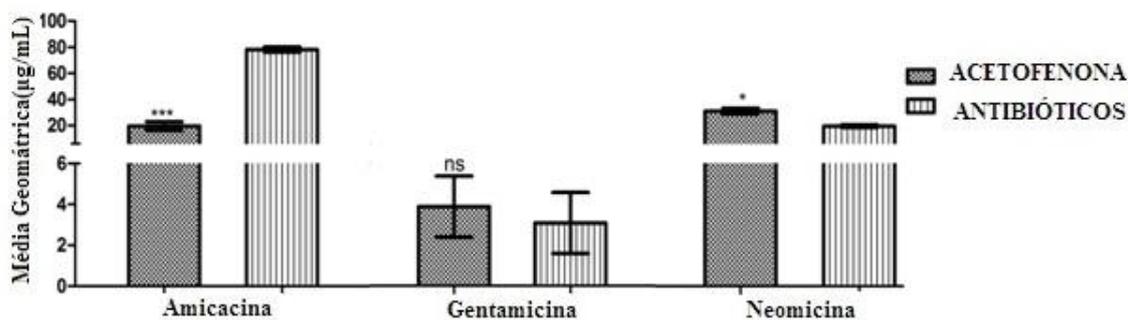
Na determinação das CIMs dos aminoglicosídeos na presença e na ausência da substância 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona em uma concentração CIM/8 de 128 $\mu\text{g/mL}$. Foi observado sinergismo significativo com $p < 0,001$ frente à *P. aeruginosa* 03 (Figura 12 na página 38) e para a *S. aureus* 358 na associação do composto com a amicacina. Porém, foi observado um antagonismo com significância de $p < 0,01$ quando o antibiótico de escolha foi a neomicina. Na associação do composto com a gentamicina (Figura 13 na página 38) nenhum resultado significativo foi observado. Já para *E. coli* os resultados foram não significativos com $p > 0,05$ (Figura 14 na página 39). Estes resultados corroboram com outros relatos na literatura que combinam produtos naturais com antibióticos contra bactérias, para diminuir a resistência microbiana (COUTINHO *et al*, 2011). Vale ressaltar que esse é o primeiro estudo de atividade antimicrobiana e moduladora de 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona isolado de *Croton anisodontus* na literatura.

Figura 14. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos aminoglicosídeos na presença e na ausência da substância 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona em uma concentração CIM/8 (128 µg/mL), frente a *P. aeruginosa* 03.



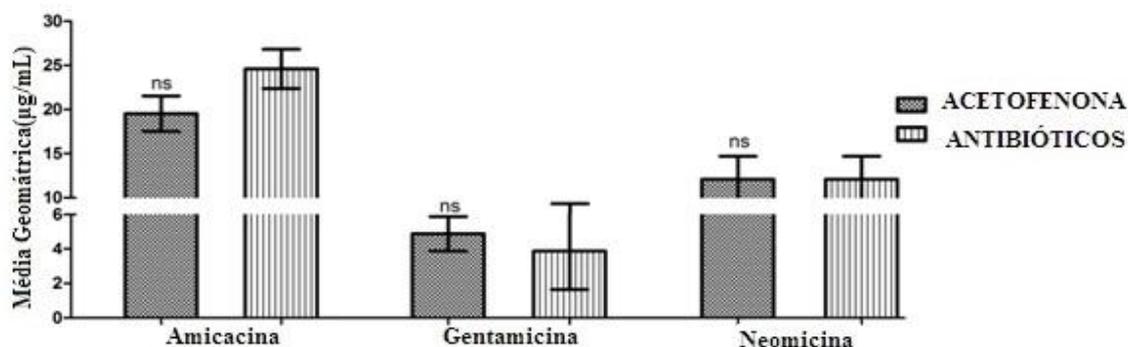
Valores estatisticamente significativos com ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Figura 15. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos aminoglicosídeos na presença e na ausência da substância 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona em uma concentração CIM/8 (128 µg/mL), frente a *S. aureus* 358.



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

Figura 16. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos aminoglicosídeos na presença e na ausência da substância 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona em uma concentração CIM/8 (128 µg/mL), frente a *E. coli* 27.



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

Estudos anteriores indicam que a possível atividade sinérgica observada pode ser devido a constituição de metabolitos secundários presentes no extrato e no óleo de espécies do gênero *Croton* (JUNIOR *et al*, 2011) como os taninos e flavonóides que são sintetizados por plantas em resposta a infecções microbianas (DIXON *et al*, 1983) e (HO *et al*, 2000), sendo capazes de alterar a parede celular ou destruir a membrana plasmática facilitando absorção das drogas (TSUCHIYA *et al*, 1996; MATIAS *et al*, 2010; FIGUEREDO *et al*, 2013). Além de indicarem a presença de alcaloides que apresentam uma atividade antimicrobiana conhecida (RIBEIRO *et al*, 1993; TSACHEVA *et al*, 2004). Através dos resultados podemos inferir que de alguma forma que a substância 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona pode modificar a estrutura bacteriana facilitando a ação dos aminoglicosídeos.

Devido à absorção para o espaço intracelular, a toxicidade celular é comum para todos os aminoglicosídeos com exceção da estreptomicina. Nefrotoxicidade, ototoxicidade e bloqueio neuromuscular são os mais importantes efeitos tóxicos dos aminoglicosídeos (VALLEJO *et al*, 2001; OLIVEIRA *et al*, 2006).

A combinação do composto com os aminoglicosídeos pode ser uma alternativa para minimizar os efeitos indesejáveis desses antibióticos, quando utilizadas para o tratamento de *S. aureus* e *P. auruginosa* uma vez que associação acarreta em um efeito sinérgico reduzindo significativamente a CIM destas drogas, diminuindo então a dose necessária para que haja sucesso terapêutico (FIGUEREDO *et al*, 2013).

Os aminoglicosídeos tem ação bactericida sobre bactérias Gram-negativas aeróbias, alguns estafilococos e *M.tuberculosis* dos aminoglicosídeos (ATAKAN *et al*, 2002; SEVERINO e MAGALHÃES, 2002). Estudos realizados mostram que bactérias Gram positivas são mais sensíveis à ação de antimicrobianos devido à presença de uma parede bacteriana que normalmente não restringe a penetração de moléculas tóxicas à bactéria, enquanto as Gram negativas possuem um sistema de barreira constituído pela membrana externa da parede formada por fosfolipídios, lipopolissacarídeos e proteínas que gera uma impermeabilidade aos agentes antibacterianos, resultando em maior resistência dessas bactérias aos antibióticos (LAMBERT, 2002).

A possível diferença de atividade do composto frente as linhagem de *S. aureus* associados à amicacina e a neomicina, provavelmente se devem as diferenças estruturais destes aminoglicosídeos que são moléculas hidrofílicas, formadas por um anel aminociclitol ligado a um ou mais amino açúcar através de ligação glicosídica. Na maioria destes compostos com utilidade clínica, o grupo aminociclitol é a 2-desoxi-estreptamina, que pode ser dissubstituída na posição 4 e 5, ou 4 e 6 (MAGNET e BLANCHAD, 2005). Assim podendo interferir na polaridade, solubilidade, em fim, na absorção destas drogas.

As linhagens de *P. aeruginosa* e de *S. aureus* foram mais sensíveis à interação amostras com antibióticos se comparada com as linhagens de *E. coli*. Estes resultados concordam com os encontrados na literatura (VERAS, 2011), os quais demonstram que as linhagens de *E. coli* são mais resistentes à ação de produtos naturais, como extratos e óleos essenciais(VERAS, 2011), podendo ser devido a presença de outros mecanismos de resistência como bomba de efluxo, produção de enzimas que clivam o anel β -lactâmico (β -lactamases), mudanças nas PBP, entre outros (BUSH e EVERETT, 2001; EURIGHT *et al*, 2002).

A associação da substância 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona com os antifúngicos testados não apresentaram significância, ou seja, $p>0,05$ para todas as cepas fúngicas testadas (*C. krusei*, *C. albicans* e *C. tropicalis*).

As linhagens bacterianas foram mais sensíveis à interação composto com os antimicrobianos se comparada com as linhagens fúngicas. Estes resultados concordam com os com estudos prévios (SILVA, 2009), os quais demonstram que os fungos são mais resistentes à ação de produtos naturais, como extratos e óleos essenciais, fato este que pode ser justificado pela constituição da sua parede a presença da quitina, que atua

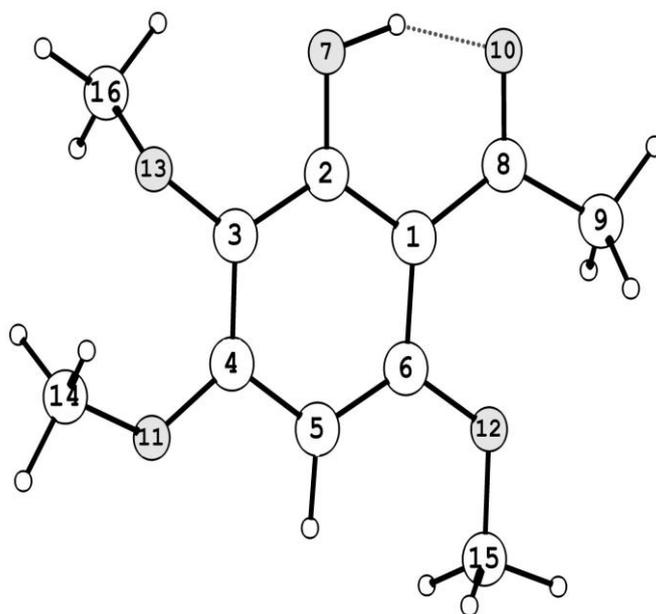
como um componente estrutural de suporte (MERZENDORFER, 2003), assim dificultando a descoberta de novos antifúngicos.

A escolha para tratamento de infecções por espécies de *Candida* são restritos e muitos antifúngicos existentes possuem efeitos indesejáveis, como alta toxicidade, e ocasiona a resistência, principalmente em indivíduos imunodeprimidos (FICA, 2004). São alguns dos fatores que dificultam estudos seguros para produção de novos medicamentos contra fungos.

4.2 Espectroscopia vibracional

A estrutura base da molécula $C_{11}O_5H_{14}$ é composta por um anel aromático que é formado pelos átomos de carbono 1, 2, 3, 4, 5 e 6. A estrutura molecular e a numeração usada para descrever os átomos da molécula $C_{11}O_5H_{14}$ são apresentadas na Figura 15.

Figura 15. Fórmula estrutural da substância 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona ($C_{11}H_{14}O_5$).



Os espectros FT-Raman e FT-IR para o cristal 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona ($C_{11}O_5H_{14}$) são apresentados nas Figuras 16 e 17, respectivamente na página 42. Eles foram registrados à temperatura ambiente nas regiões de 40 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} , e de 400 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} , respectivamente.

Figura 16. Espectro FT-Raman do cristal $C_{11}O_5H_{14}$ nas regiões, 3750 cm^{-1} à 2500 cm^{-1} e 1850 cm^{-1} à 0 cm^{-1} .

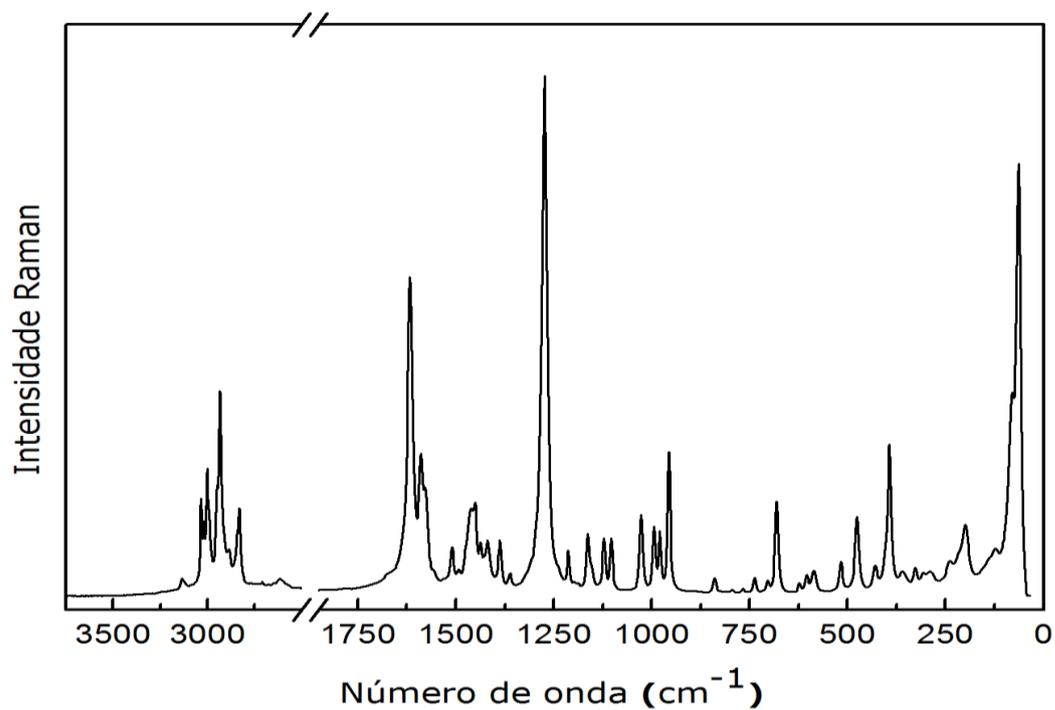
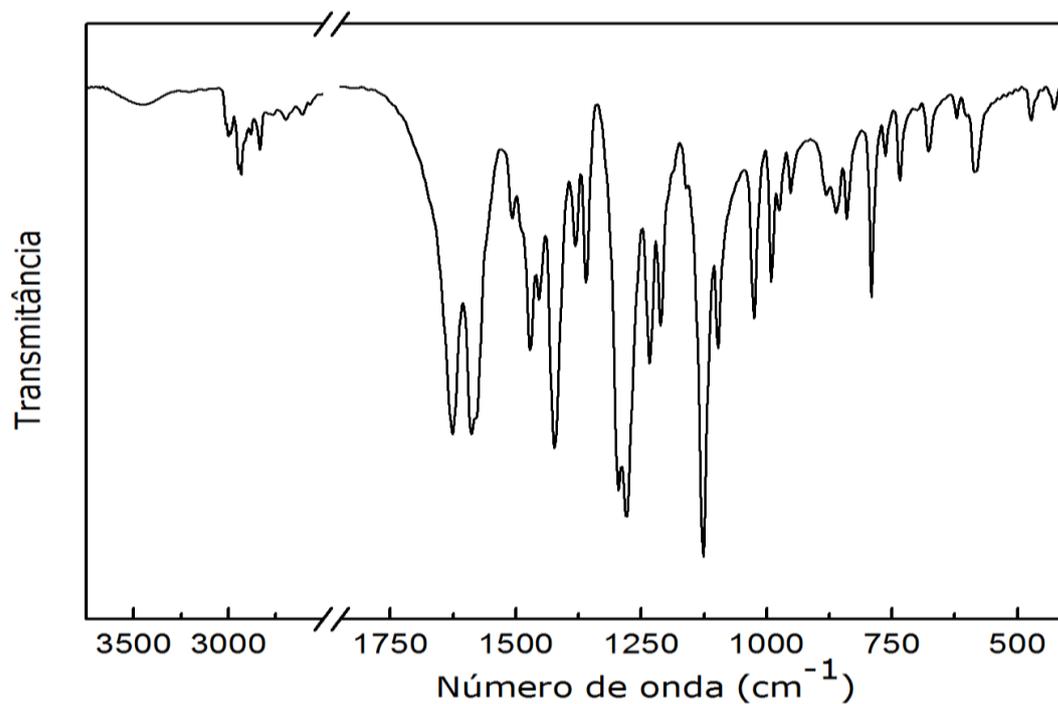


Figura 17. Espectro FT-IR do cristal $C_{11}O_5H_{14}$ nas regiões, 3750 cm^{-1} à 2500 cm^{-1} e 1840 cm^{-1} à 400 cm^{-1} .



A molécula $C_{11}O_5H_{14}$ contém 30 átomos e, portanto possui 84 modos normais de vibração. O Quadro 3 mostra uma descrição das atribuições dos modos vibracionais da molécula $C_{11}O_5H_{14}$. A primeira coluna mostra o número de onda calculado e a segunda coluna o número de onda escalado. Os valores experimentais que correspondem ao número de onda para 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona obtidos pelas técnicas de espectroscopia FT-Raman e FT-IR são apresentados respectivamente, na terceira coluna e na quarta coluna. Na quinta coluna estão representadas 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.

As atribuições das vibrações moleculares são descritas com os seguintes símbolos: τ = torção, sc = *scissoring*, wag = *wagging*, δ = deformação, γ = deformação fora do plano, ν = estiramento, ν_{as} = estiramento assimétrico e ν_s = estiramento simétrico.

Quadro 3: Frequências calculadas (ω_{calc}), frequências escaladas (ω_{scal}) pelo fator de escala 0,9600, posições das bandas Raman ($\omega_{FT-Raman}$) e IR (ω_{FT-IR}) em unidades de cm^{-1} e classificação para os modos vibracionais de $C_{11}O_5H_{14}$ com PED.

ω_{calc}	ω_{scal}	$\omega_{FT-Raman}$	ω_{FT-IR}	Classificação dos modos vibracionais com PED* (%)
25	24			τ [C9O3C4C3] (58)
55	53			τ [C3C4C5C6] (14) + τ [C8C7C1C6] (30) + γ [C8C6C2C1] (17)
74	71	63 ν_s		τ [C2C3C4C5] (15) + τ [C10O4C6C1] (27)
98	94	80 s		τ [C11O5C3C4] (55)
104	100			τ [C8C7C1C6] (17) + [C10O4C6C1] (26) + γ [C8C6C2C1] (10)
124	119	125 vw		τ [C3C4C5C6] (11) + τ [C1C6C5C4] (11) + τ [C8C7C1C6] (25) + [C10O4C6C1] (17) + γ [O5C4C2C3] (12)
157	151	141 vw		δ [O5C3C2] (12) + τ [HC11O5C3] (32) + τ [C11O5C3C4] (16)
192	184			δ [O3C4C5] (12) + τ [C1C6C5C4] (15)
202	194	200 w		δ [O3C4C5] (12) + δ [O4C6C5] (25) + δ [C10O4C6] (14) + τ [C2C3C4C5] (10)
215	206			δ [C7C1C2] (23)
226	217			τ [HC8C7C1] (37)
230	221			γ [O5C4C2C3] (11)
243	233	241vw		τ [HC9O3C4] (57)
282	271			τ [HC9O3C4] (25) + τ [HC10O4C6] (11)
294	282	288 vw		τ [C3C4C5C6] (17) + γ [C8C6C2C1] (28)
306	294	308 vw		δ [C7C1C2] (11) + δ [C8C7C1] (16) + δ [C9O3C4] (14)
323	310	327 vw		δ [C1C6C5] (13) + δ [O5C3C2] (13)
359	345			δ [C7C1C2] (12) + δ [O5C3C2] (22) + δ [C10O4C6] (11)

388	372	360 vw		δ [C8C7C1] (42)
412	396	394 m		ν [C9C8] (10) + δ [C6C5C4] (17) + δ [C7C1C2] (10) + δ [C9O3C4] (12)
443	425	430 w	427 vw	δ [O1C2C1] (48) + δ [C9O3C4] (10)
471	452	476 m	473 vw	δ [C10O4C6] (19)
510	490	517 w		δ [C11O5C3] (30)
573	550			ν [C3C4] (19) + ν [O3C4] (10) + δ [C2C3C4] (14)
586	563	586 vw	584 w	τ [HC8C7C1] (26) + γ [O2C8C1C7] (38)
609	585	605 vw	602 vw	δ [O2C7C8] (49)
630	605	623 vw	621 vw	τ [HC5C6C1] (24) + τ [C1C6C5C4] (10) + γ [O1C3C1C2] (14) + γ [O4C1C5C6] (15) + γ [O3C3C5C4] (15)
678	651	681 m	677 w	γ [O4C1C5C6] (17) + γ [O3C3C5C4] (18)
690	662	703 vw	700 vw	γ [O4C1C5C6] (20)
712	684	737 vw	735 w	γ [O1C3C1C2] (40) + γ [O5C4C2C3] (12)
752	722	766 vw	763w	δ [O3C4C5] (11) + δ [O4C6C5] (26)
802	770	792 vw	791 m	τ [HC5C6C1] (71)
844	810	839 w	840 w	ν [O5C3] (17) + ν [C8C7] (21) + δ [O1C2C1] (10)
960	922		861 w	τ [HO1C2C3] (92)
974	935	957 m	881 w	ν [C8C7] (14) + ν [O3C9] (28)
1006	966	980 m	952 w	ν [O5C11] (21) + τ [HC8C7C1] (23)
1030	989	994 m	975 w	ν [O4C10] (34) + ν [O3C9] (17) + δ [C6C5C4] (11)
1049	1007		991 m	ν [O5C11] (52)
1050	1008	1027 m	1025 m	r [C8H ₃] (23) + τ [HC8C7C1] (51) + γ [O2C8C1C7] (22)
1133	1088			ν [O3C9] (15)
1158	1112	1104 m	1097 m	ν [O1C2] (15) + ν [O4C10] (18)
1172	1125	1121 m	1126 vs	r [C9H ₃] (80)
1178	1131			r [C10H ₃] (18) + r [C11H ₃] (27)
1179	1131			r [C10H ₃] (41) + r [C11H ₃] (24)
1194	1146	1154 w		r [C10H ₃] (20) + r [C11H ₃] (21)
1216	1167	1164 m	1160 vw	δ [HC5C6] (10) + r [C10H ₃] (20) + r [C11H ₃] (37)
1225	1176			r [C9H ₃] (34)
1248	1198		1185 vw	ν [O3C4] (16) + ν [O4C6] (12)
1254	1204	1212 w	1212 m	ν [O5C3] (23) + δ [HC5C6] (28)
1314	1261		1233 m	ν [C2C3] (19) + ν [C1C6] (11) + ν [C7C1] (17)
1347	1293	1274 vs	1279 vs	ν [C6C5] (14) + ν [C2C3] (14) + ν [C7C1] (10)
1365	1310		1295 vs	ν [O1C2] (20)
1408	1352	1362 vw	1360 m	wag [C8H ₃] (67)
1429	1372	1388 m	1382 w	wag [C8H ₃] (20) + wag [C10H ₃] (20)
1466	1407			wag [C8H ₃] (72)
1478	1419	1419 m	1422 s	wag [C9H ₃] (13) + wag [C11H ₃] (35)
1482	1423			wag [C9H ₃] (12) + wag [C10H ₃] (39) + wag [C11H ₃] (20)
1487	1428			sc [C8H ₃] (77) + τ [HC8C7C1] (17)
1492	1432	1437 m		δ [HO1C2] (10) + sc [C11H ₃] (49)
1500	1440			sc [C8H ₃] (34) + sc [C9H ₃] (50)
1503	1443			sc [C11H ₃] (35)
1504	1444			sc [C10H ₃] (91)
1508	1448	1452 m	1454 w	sc [C9H ₃] (62)
1517	1456			sc [C9H ₃] (35) + sc [C10H ₃] (24)
1520	1459	1462 m	1472 m	sc [C11H ₃] (60)
1526	1465	1477 vw	1488 vw	sc [C11H ₃] (91)
1546	1484	1510 w	1507 vw	ν [O2C7] (10) + ν [C4C5] (10) + ν [C1C6] (15) + δ [HC5C6] (15) + sc [C10H ₃] (10)
1624	1559	1579 m	1578m	ν [C3C4] (23) + ν [C1C6] (13)
1661	1595	1589 m	1588 s	ν [O2C7] (29) + ν [C6C5] (13) + ν [C4C5] (12)
1686	1619	1618 s	1626 s	ν [O2C7] (30) + ν [C2C3] (11) + δ [HO1C2] (30)
2964	2845	2831m	2834 w	ν [O1H] (96)
3020	2899	2844 w		ν_s [C11H ₃] (99)

3028	2907	2885 vw	2882 vw	ν_s [C10H ₃] (100)
3059	2937	2916 w	2912 vw	ν_s [C9H ₃] (100)
3069	2946	2934 m	2935 w	ν_s [C8H ₃] (100)
3095	2971	2948 m	2947 w	ν_{as} [C10H ₃] (99)
3111	2987	2992 m	2990 w	ν_{as} [C11H ₃] (99)
3140	3014	3002 m	3000 w	ν_{as} [C8H ₃] (100)
3140	3014			ν_{as} [C9H ₃] (90)
3148	3022	3021 m	3018 vw	ν_{as} [C11H ₃] (99)
3153	3027	3034 m		ν_{as} [C10H ₃] (88)
3154	3028			ν_{as} [C9H ₃] (97)
3169	3042			ν_{as} [C8H ₃] (100)
3253	3123	3135 vw		ν [C5H] (99)

Somente PED com valores maiores que 9 % são dados.

Nomenclatura: τ = torção; sc = *scissoring*; wag = *wagging*, δ = deformação; γ = deformação fora do plano;

ν = estiramento; ν_{as} = estiramento assimétrico; ν_s = estiramento simétrico.

vs = muito forte; s = forte; m = média; w = fraca; vw = muito fraca.

Uma análise dos modos normais do cristal mostra que a maioria das bandas no FT-Raman e FT-IR localizadas na região abaixo de 1686 cm⁻¹ correspondem a misturas de modos de vibração. Vibrações tipo torção (τ), deformações angulares (δ) e as deformações fora do plano (γ) estão presentes principalmente na região das frequências calculadas abaixo de 1050 cm⁻¹.

Vibrações do tipo deformação relacionadas ao grupo metil são claramente localizadas em regiões bem definidas. As vibrações *rocking* são observadas na região entre 1050 cm⁻¹ ≤ ω_{cal} ≤ 1225 cm⁻¹, vibrações *wagging* ocorrem entre 1408 cm⁻¹ ≤ ω_{cal} ≤ 1482 cm⁻¹ e as vibrações tipo *scissoring* do CH₃ aparecem em na região entre 1487 cm⁻¹ ≤ ω_{cal} ≤ 1526 cm⁻¹.

No espectro FT-Raman (Figura 18) foram 55 modos ativos no Raman. Pode-se observar, por exemplo, duas bandas muito fortes com número de onda de 1274 cm⁻¹ e 63 cm⁻¹ que correspondem respectivamente aos estiramentos C6C5, C2C3 e C7C1 e a torção dos átomos C2C3C4C5 e C10O4C6C1. Observa-se também neste espectro duas bandas fortes com número de onda de 1618 cm⁻¹ e 80 cm⁻¹ que correspondem respectivamente a modos de estiramentos dos átomos O2C7 e C2C3 combinados com dos átomos HO1C2, e a torção dos átomos C11O5C3C4.

No espectro FT-IR (Figura 16 página 42) foram 43 modos ativos no infravermelho. Pode-se observar, por exemplo, três bandas muito fortes com número de onda de 1295, 1279 e 1126 cm⁻¹ que correspondem respectivamente ao estiramento

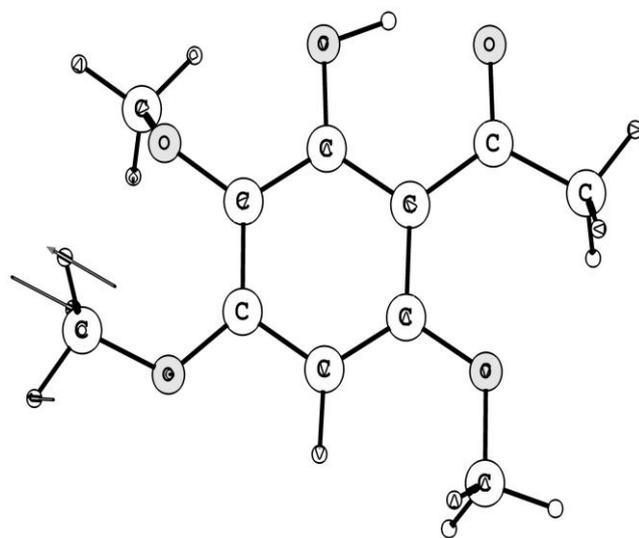
O1C2, estiramentos dos átomos C6C5, C2C3 e C7C1 e a vibração do tipo *rocking* do C9H₃. Observa-se também neste espectro três bandas fortes com número de onda de 1626, 1588, e 1422 cm⁻¹ que correspondem respectivamente a modos combinados (estiramento e deformação) dos átomos O2C7, C2C3 e HO1C2, a modos de estiramento dos átomos O2C7, C6C5 e C4C5 e a vibração do tipo *wagging* dos grupos metil C9H₃ e C11H₃.

A região entre 2800 cm⁻¹ a 3300 cm⁻¹ contém as bandas originadas a partir de estiramento dos grupos funcionais CH e CH₃ de 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona (C₁₁O₅H₁₄).

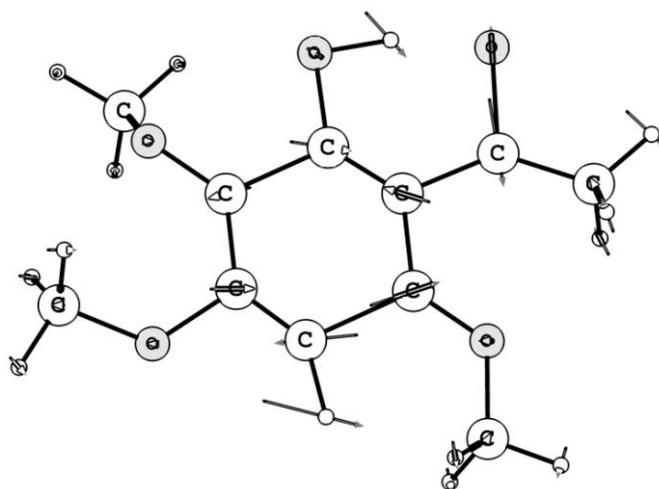
No espectro infravermelho foi observada uma banda larga em torno de 3470 cm⁻¹, e uma vez que os modos de estiramentos da molécula de água ocorrem próximos a 3400 cm⁻¹, isso ocorreu devido a umidade da partilha de KBr. Para esclarecer esta dúvida, foram realizadas medidas por espectroscopia de Infravermelho do tipo reflexão total atenuada com transformada de Fourier (ATR-FTIR do inglês Attenuated Total Reflection- Fourier Transform Infrared).

Os deslocamentos atômicos correspondentes a alguns modos normais selecionados da molécula C₁₁O₅H₁₄ são apresentados na Figura 18 na página 47.

Figura 18: Deslocamentos atômicos correspondentes a dois modos normais selecionados da molécula $C_{11}O_5H_{14}$.



$$\omega_{\text{cal}} = 1172 \text{ cm}^{-1}$$



$$\omega_{\text{cal}} = 1661 \text{ cm}^{-1}$$

CONCLUSÃO

- A atividade antimicrobiana verificada pela substância 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona apresentou os mesmos valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente as bactérias e fungos padrão ATCC testados, sendo todos os valores observados $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ não tendo relevância clínica.
- Os resultados obtidos indicaram sinergismo com os aminoglicosídeos quando os mesmos foram associados à 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona, por contato direto, frente às bactérias demonstrando significância com $p < 0,001$ frente a *P. aeruginosa* e para a *S. aureus* na associação com a amicacina.. Por outro lado, a associação entre a 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona e os antifúngicos testados frente às espécies de *Candida* não foi capaz de influenciar na atividade antifúngica.
- Quando as frequências calculadas foram ajustadas pelo fator de escala 0,9600, apresentou-se uma relação bem próxima entre os valores calculados e os obtidos nos espectros FT-Raman e FT-IR, estabelecendo uma boa concordância entre os resultados, isso torna possível a atribuição completa das bandas Raman e Infravermelho juntamente com a distribuição de energia potencial (PED) para cada modo normal de vibração da substância 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona ($\text{C}_{11}\text{O}_5\text{H}_{14}$).

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, D. J. X-ray crystallography and drug design. In: PERUN, T. J.; PROPST, C. L. (eds) *Computer-aided drug design: methods and applications*. Marcel Dekker, New York, 1989.
- ANDO, R.A. Espectroscopia Vibracional Raman Ressonante e Eletrônica de Nitroderivados de Sistemas Configurados. Dissertação de Mestrado- USP. São Paulo, 2005.
- ANDRADE, S.S.; JONES, R.N.; GALES, A.C. - Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centres: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *J Antimicrob Chemother* 52, 140-141, 2003.
- ANGÉLICO, E.C. Avaliação das atividades antibacteriana e antioxidante de *croton heliotropiifolius kunte* e *croton blanchetianus* BAILL. Dissertação apresentada a UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE-UFCG. Campina Grande, 2011.
- ARAÚJO-Jr, 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.*, 42, 62-67, 2004.
- ARAÚJO, M.E.M. Química analítica aplicada aos produtos naturais. Texto de apoio: Mestrado em química analítica aplicada, 2005.
- ATAKAN, I.H.; KAPLAN, M.; KAYA, E.; AKTOZ, T.; INCI, O. A life threatening infection: Fournier's gangrene. *Int Urol Nephro*, 34, 387-392, 2002.
- AZEVEDO, F.M. Microrganismos multirresistentes. In: Oliveira A.C. Infecções hospitalares: epidemiologia, prevenção e controle. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 341-47, 2005.
- BARREIRO, E.D; FRAGA, C.A.M. Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos . Artmed Editora. Porto Alegre, 2001.
- BARREIRO, E.J. Desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais. In: Yunes, R.A.; Calixto, J.B. Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. Chapecó: Argos, p 237- 296, 2001.
- BECKE, A.D. Density-Functional Thermo chemistry. The role of exact exchange. *Journal of Chemical Physics*, vol. 98, p. 5648-5652, 1993.

BENEZ, S.M.; BOERICKE, W.; CAIRO, N. Manual de Homeopatia Veterinária:Indicações Clínicas e Patológicas– Teoria e Prática. São Paulo: Ed. Robe, 13 -15, 2002.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos Formulário Terapêutico Nacional: Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS RENISUS. Fev 2009. Disponível em: < [http://www. saude.gov.br/bvs](http://www.saude.gov.br/bvs) >. Acessado em junho de 2012

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

BRITO, M.A.; CORDEIRO, B.C. Necessidade de novos antibióticos. J Bras Patol Med Lab, v. 48,n. 4, p. 247-249, agosto de 2012.

BUSH, R.M.; EVERETT, K.D.E. Molecular evolution of the Chlamydiaceae, Intern.J Syst Bacter, 51, 203-220, 2001.

CALIXTO, J.B.; SIQUEIRA Jr, J.M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: Desafio. Gazeta Médica da Bahia, p.98-106, 2008.

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

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

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

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.64, 625-629, 2003.

CAVALLO J.D.; PLESIAT P.; COUETDIC G.; et al - Mechanisms of beta-lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: prevalence of OprM-overproducing strains in a French multicentre study (1997). *J Antimicrob.Chemother.*50, 1039-1043, 2002.

CECHINEL FILHO, V.; Miguel, O. G.; Calixto, J. B. Antispasmodic activity of xanthoxyline derivatives structure activity relationships. *J. Phramacol Sci.* v. 84, p. 473-475, 1995.

CECHINEL FILHO, V et al. Fungicide and Fungistatic effects of xanthoxyline. *J. Ethnopharmacol.*, v.53, p. 171-173, 1996.

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

COHEN, N.C. *Guidebook on molecular modeling in drug design*. San Diego: Academic Press.p.361, 1996.

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

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; KERNTOPF, M.R.; MENEZES, I.R.A. Modulatory antibiotic activity and chemical composition of hydroalcoholic extract of *Croton campestris*. *Journal of Medicinal Plants Research.*5, 4400-4404, 2011.

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

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

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; SIQUEIRA-JÚNIO, J.P.; LIMA, E. O. *In vitro* anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* -MRSA strains. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* v. 18: 670-675, 2008.

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

DALBÓ, S. Avaliação da atividade antinociceptiva da subfração 63 (SF63) obtida a partir das cascas da *Croton celtidifolius* (EUPHORBIACEAE) – estudo do mecanismo de ação. Florianópolis. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina. 88f, 2004.

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

DECLLOUR, A. Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance *National Institutes of Health.* 1749 (5), 808-816, 2009.

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

DIAS, D.J. Estudo dos principais mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos em bactérias patogênicas de Gram negativo. Dissertação FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA - DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA, 2009.

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

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

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

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

Dzidic, S.; Suskovic, J.; Kos, B. Antibiotic resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. *Food Technology Biotechnology.* 46(11), 11-21, 2007.

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

FAVIER, L. et al. Anti-inflammatory activity of acetophenones from *Ophryosporus axilliflorus*. *Planta Med.* v. 64, p. 657-659, 1998..

FERNANDES, T.T.; FERNANDES, A.T.S.; PIMENTA, S.C. Atividade antimicrobiana das plantas *Plathymenia reticulata*, *Hymenea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*. *Revista de Patologia Tropical.* 34, 113-122, 2005.

FICA, C.A. Tratamiento de infecciones fúngicas sistêmicas. Primera parte: fluconazol, itraconazol y voriconazol. *Revista Chilena de Infectologia.* 21, 26-38, 2004.

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

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

FILE Jr. T.M. Visão Geral Sobre Resistência Bacteriana nos Anos 90. In: PLE CHEST The Cardiopulmonary and Critical Care Journal (edição em português). Suplemento 2:1(3-9), 2000.

FISHMAN N. Antimicrobial stewardship. *Am J Infect Control*. 34(5 suppl):S55-S63, 2006.

FLUIT, A.; VISSER, M.; SCHMITZ, F. Molecular detection of Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), 837-862, 2001.

FRISCH M. J., et al. Gaussian 03 (Revision B01), Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 2003.

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

GOMES, M.J.P. Parasitismo e Patogenicidade. FAVET-UFRGS, 2013.

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.* 54, 1217-1221, 2006.

GUL, H. I.; OJANEN, T.; HÄNNINEN O. Antifungal evaluation of bis mannich bases derived from acetophenones and their corresponding piperidinols and stability studies. *Biol. Pharm. Bull*, v.25, p. 1307-1310, 2002.

GUTHRIE D. History of medicine. London, 1920.

HANCOCK, R. E. W. The end of an era. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 489-497, 2007.

HO, K.Y.; TSAI, C.C.; HUANG, J.S.; CHEN, C.P.; LIN, T.C.; LIN, C.C. Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitisidaea* L. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 53, 187-91, 2011.

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

HUGHES, C.; MULLER, D.; HACHER, J.; GOEBEL, W. Genetics and pathogenic role of *Escherichia coli* haemolysin. *Toxicon*. 20:247-52, 1982.

JAMRÓZ, M. H. Vibrational Energy Distribution Analysis: VEDA 3 program, Drug Institute, Warsaw, 2000.

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

JUNIOR, F.E.B.; MATIAS, E.F.F.; OLIVEIRA, D.R.; RAMOS, A.G.B.; FERNANDES, C.N.; SOUZA, H.H.F.; NETO, L.J.L.; PEREIRA, A.O.B.; ARARUNA, M.K.A.; SANTOS, F.A.V.; DIXON, R.A.; DEY, P.M.; LAMB, C.J. Phytoalexins: enzymology and molecular biology. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 55, 1–69, 1983.

KENNEDY M. A brief history of disease, science and medicine: from the ice age to the genome project. Califórnia: Asklepiad Press. 2004.

KIFFER, C.; HSIUNG, A.; OPLUSTIL, C., et al - Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTYC Program Brazil 2003. *Braz J Infect Dis*. 9:216-224, 2005.

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

KONOWALCHUK, J.; DICKIE, N.S.; STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichiacoli*, *Infection and immunity*, 18:775-779, 1977

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

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

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*, vol. 37, p. 785-789, 1988.

LEITE, F.S. Perfil fenotípico e de expressão de proteínas de *Cryptococcus neoformans* após tratamento com substâncias obtidas da planta *Pterogyne nitens*. Dissertação (Pós Graduação em Biotecnologia e Biotecnologia Aplicada a Farmácia) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, 2010.

LI, X.Z.; ZHANG, L.; POOLE, K. Interplay between the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system and the outer membrane barrier in the multiple antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 45:433-436, 2000.

Lipkowitz, K. B. & Boyd, D. B. (eds) *Reviews in computational chemistry*. VCH Pub, New York, 1990.

LIVERMORE, D.M. Minimising antibiotic resistance. *Lancet. Infect. Dis.*, [S. l.], v. 5, p. 450-459, 2005.

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

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.* 70, 41-55, 2000.

MAYER, G. Genetic Exchange. em *Microbiology and Immnology On-line*. Visualizado Dezembro 20, 2012, no <http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/genetic%20ex.htm>, 2010.

MCCULLOUGH, M.J.; ROSS, B.C.; READE, P.C. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *Int J Oral Maxillofac Surg.* v.25, p.136-44, 1996.

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; and the 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.

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

MANN, C.M.; MARKHAN J.L. A new method for determine the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of applied microbiology*, vol. 84, p. 538-544, 1998.

MARTIN, Y. C.; BURES, M. G.; WILLETT, P. Searching Databases of Three-Dimensional Structures. In: LIPKOWITZ, K.B.; BOYD, D. B. (eds) *Reviews in computational chemistry*. VCH Pub, New York, 1990.

- MARTINEZ-ROSSI, N.M.; PERES, N.T.A.; ROSSI, A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. *Mycopathologia*.166:369-83, 2008.
- MARTINS, E. R. et al. Plantas medicinais. 5. ed. Viçosa: UFV, 2000.
- MARTINS, M.A.; AZEVEDO, F.M.; ROCHA, L.C.M.; ROSÁRIO, P.W.S. Drogas antibacterianas: antibióticos. In: MARTINS, M.A. Manual de infecção hospitalar: epidemiologia, prevenção e controle. 2ª ed. Belo Horizonte: Medsi. p. 451-72, 2001.
- MATIAS, E.F.F.; SANTOS, K.K.A.; ALMEIDA, T.S.; COSTA, J.G.E.; COUTINHO, H.D.M. Atividade antibacteriana *In vitro* de *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia verbenacea* DC. R. bras. Bioci., Porto Alegre, v. 8, n. 3, p. 294-298, jul./set. 2010.
- MATIAS, E.F.F.; SANTOS, K.K.A.; ALMEIDA, T.S.; COSTA, J.G.M.; COUTINHO, H.D.M. Enhancement of Antibiotic Activity by *Cordia verbenacea* DC. Latin American Journal of Pharmacy.29, 1049-1052, 2010.
- MERZENDORFER, H.; ZIMMICH, L. Insect chitin synthases: review. J. Exp. Biol. 206, 4393 – 4412, 2003.
- MIDDLETON, E. J.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, v.52, p.673-751, 2000.
- MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Desenvolvimento de fitoterápicos. São Paulo: Probe Editorial.p.116, 1999.
- MILANOWSKI, D.J.; WINTER, R.E.K.; ELVIN-LEWIS, M.P.F.; LEWIS, W.H. Geographic Distribution of Three Alkaloid Chemotypes of *Crotonlechleri*. J. Nat. Prod. 65, 814-819, 2002.
- NCCLS – NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 5ª ed. Villanova, PA: NCCLS approved standard M7-A5, v.20, n.2, 2000.
- NEIHARDT, F. Bacterial genetics. Em McGraw Hill (Eds.), *Sherrie Medical Microbiology - An introduction to infectious diseases*, Nova Iorque.4ª ed., pp. 53 – 74, 2004.
- NEVES, P. R. et al. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. *J Bras Patol Med Lab*, v. 47, n. 4, p. 409-20, 2011.
- NIERO, R et al., Isolation of triterpenes and n acetophenone derivative with antispasmodic activity from *Euphorbia milli* Desmoul.Ex Boiss (Euphorbiaceae). *Acta Farmac.Boa naerense*, v.15, p.239-242, 1996.

NICOLETTI, G.; SCHITO, G.; FADDA, G.; et al - Bacterial isolates from severe infections and their antibiotic susceptibility patterns in Italy: a nationwide study in the hospital setting. *J Chemother.* 18:589-602, 2006.

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

OLIVEIRA, J.F.P.; CIPULLO, J.P.; BURDMANN, E.A. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery.* 21, 444-452, 2006.

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

OLIVEIRA, L.F.C. Espectroscopia Molecular. Caderno Temático de Química Nova na Escola. Num. 4- maio, 2011.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SAÚDE (OMS). Estratégias de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. Ginebra 2002. 67p. <Disponível em: http://www.opas.org.br/medicamentos/site/UploadArq/trm_strat_spam.pdf>. Acesso em junho 2012

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

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and unexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 46, n.8, p. 2720-2722, 2002.

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

PASQUALE, T.R.; TAN, J.S. *Clin. Infect. Dis.* 2005, 40, 127; Drews, J.; *Science* 2000, 287, 1960.

PASKOVATY, A.; PFLOMM, J.M.; MYKE, N.; SEO, S.K. A multidisciplinary approach to antimicrobial stewardship: evolution into the 21st century. *Int J Antimicrob Agents.* 25(1):1-10, 2005.

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

PELLEGRINO, F.L.; TEIXEIRA, L.M.; CARVALHO, M.D.M.D.A.G.; et al - Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol.* 40:2420-2424, 2002.

PETERSSON, G.A., BENNETT, A., TENSFELDT, T.G., AL-LAHAM, M.A., SHIRLEY, W.A., MANTZARIS, J. A complete basis set model chemistry. I. The total energies of closed-shell atoms and hydrides of the first-row elements. *J. Chem. Phys.* 89: 2193–2218, 1988.

PETERSSON, G.A. AND ALLAHAM, M.A.. A complete basis set model chemistry. II. Open- shell systems and the total energies of the first- row atoms. *J. Chem. Phys.* 94: 6081–6090, 1991.

PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A.G.; COSTA DE OLIVEIRA, S.; RICARDO, E.; MARDH, P. A. Potent synergic effect between ibuprofen and azoles on *Candida* resulting from blockade of efflux pumps as determined by FUN-1 staining and flow cytometry. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* v. 56, p. 678–685, 2005.

PROPST, C. L.; PERUN, T. J. Introduction to computeraided drug design. In: PERUN, T. J.; PROPST, C. L. (eds) *Computer-aided drug design: methods and applications.* Marcel Dekker, New York, 1989.

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

RAE, A.D.; J. G. THOMPSON, G.; WITHERS, G.R.L. *Acta Crystallographica Section B-Structural Science* 48, 418, 1992.

RAJA, N.S.; SINGH, N.N. Antimicrobial susceptibility pattern of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital. *J Microbiol Immunol Infect.* 40:45-49, 2007.

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

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

RIBEIRO, P.E.M.; PAULO, M.Q.; SOUZA, B.A.R. M. Isolation of active substances from *Croton campestris* St. Hil. (Euphorbiaceae) leaves. *Rev.Bras.Farmacog.* 74, 36-41, 1993.

RICE, L., BONOMO, R. Genetic and Biochemical mechanisms of bacterial. Em *Viclor Lorian, M. D. (Eds), Antibiotics in Laboratory Medicine* (5^a ed., pp. 441-476). Nova Iorque, 2005.

- RISCO, E.; GHIA, F.; VILA, R.; IGLESIAS, J.; ÁLVAREZ, E.; CANIGUERAL, S. Immunomodulatory Activity and Chemical Characterisation of Sangre de Drago (Dragon's Blood) from *Croton lechleri*. *Planta Med.* 69, 785-794, 2003.
- ROCHA, D.P.; PINTO, G.F.; RUGGIERO, R.; OLIVEIRA, C.A.; GUERRA, W. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. *Quim. Nova*, Vol. 34, No. 1, 111-118, 2011.
- RODRIGUES, A.S.; MESQUITA, B.M.; BANDEIRA, P.N.; ALBUQUERQUE, M.R.J.R.; BRAZ-FILHO, R.; SANTOS, H.S. Constituintes Químicos Isolados de *Croton anisodontus*, 36^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, SBQ, 2013.
- 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. 36^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, SBQ, 2013.
- 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.
- SADER, H.S.; CASTANHEIRA, M.; MENDES, R.E.; et al - Dissemination and diversity of metallo-beta-lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Int J Antimicrob Agents*. 25:57-61, 2005.
- SADER, H.S.; GALES, A.C.; PFALLER, M.A.; et al - Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Braz J Infect Dis*. 5:200-214, 2001.
- SAFDAR, N.; HANDELSMAN, J.; MAKI, D.G. - Does combination antimicrobial therapy reduce mortality in Gram-negative bacteraemia? A meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 4:519-527, 2004.
- SALA, O. Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho, Editora UNESP: São Paulo, 1996.
- SAMPAIO, G.M.M. Atividade antimicrobiana e espectroscopia vibracional de 5-[(4H-1,2,4-triazol-4-ilamino)metileno]-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona monohidratada. Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, 2012.

- SANT'ANNA, C.M.R. Métodos de Modelagem Molecular para Estudos e Planejamento de Compostos Bioativos. Uma introdução. Revista Virtual Química (1), 49-57, Fevereiro de 2009.
- SANTOS, A.A.M. O modelo brasileiro para o controle das infecções hospitalares: após vinte anos de legislação, onde estamos e para onde vamos? Dissertação, Belo Horizonte, 2006.
- SANTOS FILHO, L. *et al.* Determinação da produção de metalo- β -lactamases em amostras de *Pseudomonasaeruginosa* isoladas em João Pessoa, Paraíba. *J BrasPatol Med Lab*, v. 38, n. 4, p. 291-6, 2002.
- SANTOS, H.F. O Conceito Da Modelagem Molecular. Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola, Num. 4 – maio de 2001.
- 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, 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.
- SALATINO, S.; SALATINO, M.L.F.; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *J. Braz. Chem. Soc.* 18, 11-33, 2007.
- SANTOS, S. S. *et al.* *Química Nova*, 31, 601-604, 2008
- SATO, Y.; SHIBATA, H.; ARAI, T.; YAMAMOTO, A.; OKIMURA, Y.; ARAKAKI, N.; HIGUTI, T. Variation in synergistic activity by flavone and its related compounds on the increased susceptibility of various strains of methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* to β – lactam antibiotics. *International journal of antimicrobial agents*, v.24, p. 28-35, 2004.
- SAÚDE-GUIMARÃES, D.A.; FARIA, A.R. Substâncias da natureza com atividade anti-Trypanosoma cruzi. *Rev Bras Farmacogn* 17: 455-465, 2007.
- SCOTLAND, S.M.; DAY, N.P.; WILLSHAW, G.A.; ROWE, B. Cytotoxic enteropathogenic *Escherichia coli*. *Lancet*. 1:90, 1980.
- SEVERINO, P.; MAGALHÃES, V.D. The role of integrons in the dissemination of antibiotic resistance among clinical isolates of *P. aeruginosa* from an intensive care unit in Brazil. *Res Microbiol*.153, 221-226, 2002.
- SILVA, A.N.A.A. Propriedades Vibracionais no Composto Aurivellius $\text{Bi}_3\text{Fe}_{0,5}\text{Nb}_{1,5}\text{O}_9$. Dissertação de Mestrado- UFMA. São Luís do Maranhão, 2012.

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

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

SILVA, R.L. et al. Efeito do extrato aquoso da *Hyptis pectinata* sobre a proliferação de hepatócitos apóshepatectomia parcial. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.17.Suplemento 3, p.101-105, 2002.

SILVA, V. H. C., JÚNIOR, P. S. C., OLIVEIRA, H. C. B., CAMARGO, A. J. . *Revista Processos Químicos*. p. 9-16, 2009.

SILVEIRA, G.P.F.; GESSER, J.C.; SÁ, M.M.; TERENZI, H.Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. *Quim. Nova*, Vol. 29, No. 4, p.844-855, 2006.

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

SOUZA, A.S.; AVANCINI, C.A.M.; WIEST, J.M., Atividades antimicrobianas de *Tagetes minuta* L. - Compositae (Chinchilho) frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v.37, n.6, 2000.

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

SULLIVAN, D.J.; MORAN, G.P.; PINJON, E.; et al. Comparasion of the epidemiology, drug resistance machanisms and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* v.4, p.369-76, 2004.

TRABULSI, L.R. - *Microbiologia*. 2a ed. Rio de Janeiro, Atheneu. p.386, 1991.

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

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

TODAR, K. (s.d.). Bacterial Resistance to Antibiotics. em *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. no http://textbookofbacteriology.net/resantimicrobial_3.html, Visualizado Fevereiro 27, 2012.

VALLEJO, J.C.; SILVA, M.N.; OLIVEIRA, J.A.A.; CARNEIRO, J.J.; ROCHA, L.S.O.; FIGUEIREDO, J.F.C.; CHIOSI, M.F.V. Detecção precoce de ototoxicidade usando emissões otoacústicas produtivas dedistorção. *Revista Brasileira Otorrinolaringologia*. 67, 845-851, 2001.

VAN ELDERE, J. - Multicentre surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility patterns in nosocomial infections. *J Antimicrob. Chemother.* 51:347-352, 2003.

Veiga. *Os antibióticos na prática clínica*. Lisboa: Infecon, 1984.

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

VERHOEFF, J.; BEAUJEAN, D.; VLOK, H.; BAARS, A.; MEYLER, A.; WERKWN, V. D. C.. A Dutch approach to methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 18:461-86, 1999.

WALSH, C.; *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance*, ASM Press: Washington, 2003.

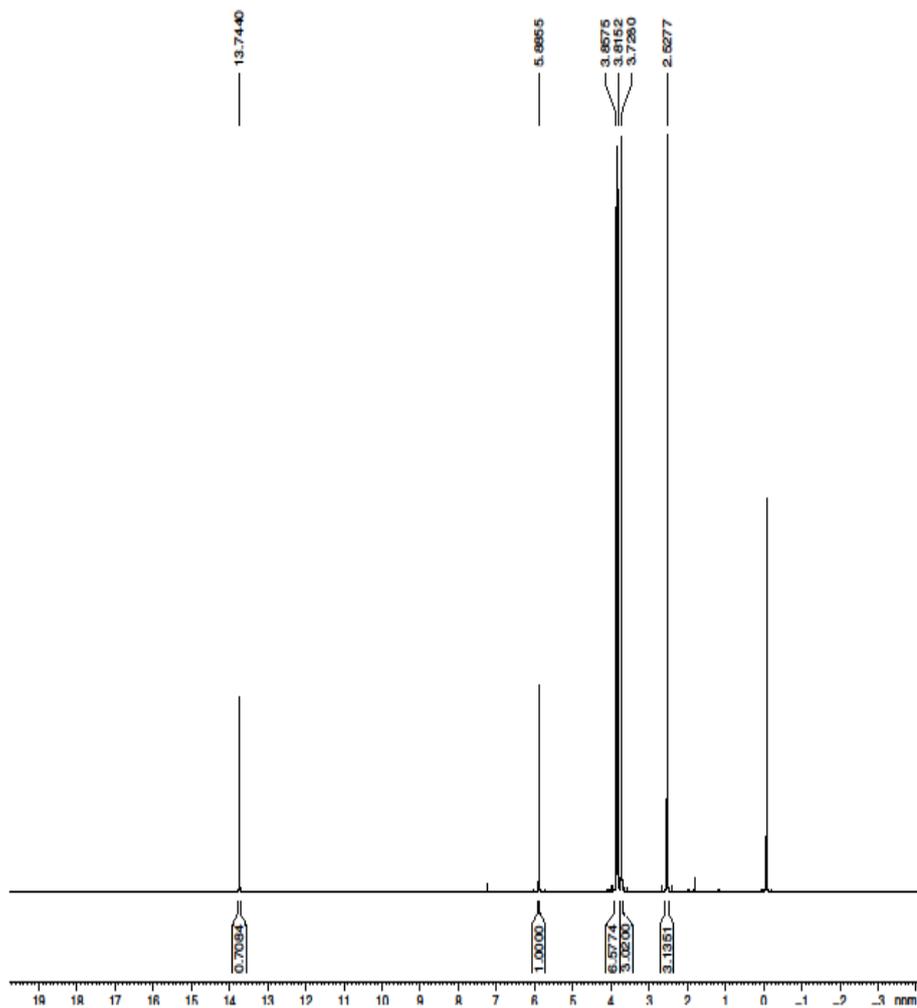
ZACCHINO, S. Estratégias para descoberta de novos antifúngicos. In: Yunes, R. A; Calixto, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. Chapecó: Argos, p 237- 296, 2001.

ZANOL, F.M.; PICOLI, S.U.; MORSCH, F. Detecção fenotípica de metalobetalactamase em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* de hospitais de Caxias do Sul. *J Bras Patol Med Lab*, v. 46, n. 4, p. 309-14, 2010

APÊNDICE

APÊNDICE 01: Espectro RMN ¹H

-(HLLGURADHANO - UVA) [RMN 1H, CDCL3] OPERADOR RUSE JANE 2/03/



Current Data Parameters
NAME ac3
EXPNO 1
PROCNO 1

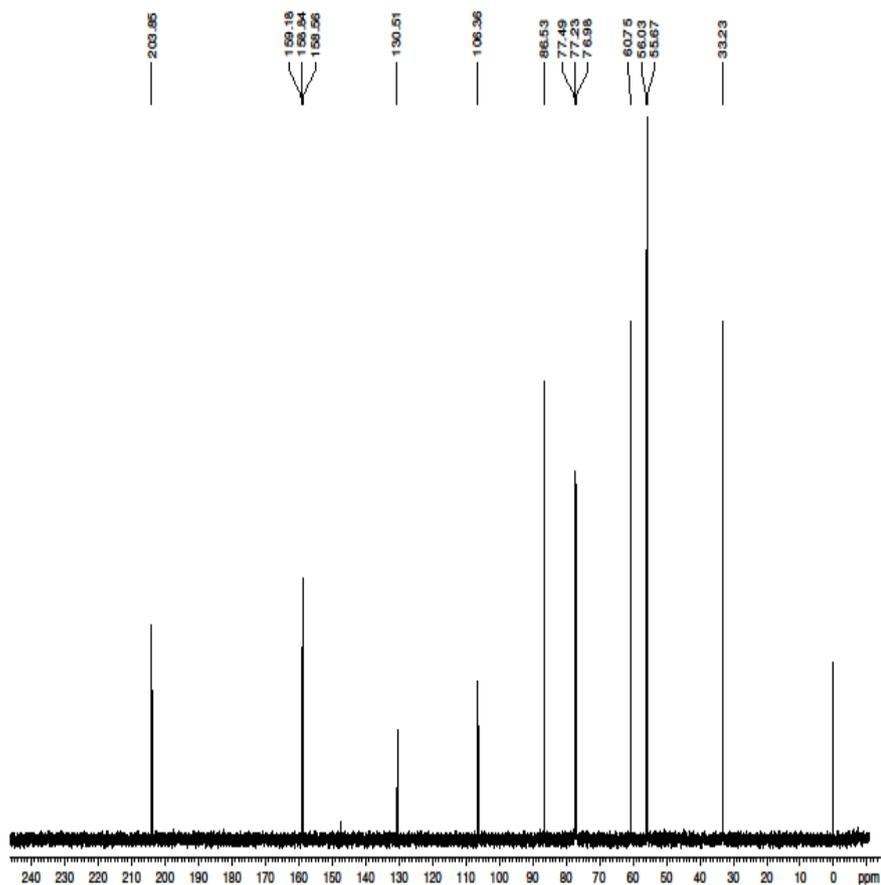
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20120427
Time 11.51
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG zg
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 8
DS 0
SWH 12019.230 Hz
FIDRES 0.183399 Hz
AQ 2.7263477 sec
RG 20.2
DW 41.600 usec
DE 6.00 usec
TE 299.0 K
D1 1.0000000 sec
TDO 1

----- CHANNEL f1 -----
NUC1 1H
P1 9.20 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 499.8040000 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 499.8000426 MHz
WDW no
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.00

APÊNDICE 02: Espectro RMN¹³C

Cl-3(HELClOR/ADRIANO - UVA) [RMN 13C-BB, CDCl₃] OPERADOR ROSE JANE 27/03/201



Current Data Parameters

NAME ac3
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters

Date 20120427
Time 11.58
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG zgpg30
TD 65356
SOLVENT CDCl₃
NS 261
DS 0
SWH 32679.738 Hz
FIDRES 0.500027 Hz
AQ 0.9999568 sec
RG 1024
DW 15.300 usec
DE 6.00 usec
TE 299.3 K
D1 1.00000000 sec
d11 0.03000000 sec
DELTA 0.89999998 sec
TDO 1

CHANNEL f1

NUC1 13C
P1 15.50 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 125.6888100 MHz

CHANNEL f2

CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 0.00 dB
PL12 19.00 dB
PL13 22.00 dB
SFO2 499.8019982 MHz

F2 - Processing parameters

SI 32768
SF 125.6748000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

ANEXOS

ANEXO 01 : Comprovante de submissão – ARTIGO 1

Natural Product Communications

Acknowledgement

Westerville, Ohio, January 8, 2014

Dear Prof. Maciel,

This is to acknowledge with thanks receipt of your manuscript entitled “Identification and Modulatory Activity Assessment of 2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyacetophenone isolated from *Croton anisodontus* Mull. Arg (Euphorbiaceae)” MS No. P934612, which is now in the review process. Please refer to the above manuscript number in all future inquiries to identify your manuscript.

Thank you for giving us the opportunity to consider your work. We shall advise you of the editorial decision as soon as possible.

Yours sincerely,

Dr. Pawan K. Agrawal
Editor-in-Chief
Natural Product Communications
E-mail: agrawal@naturalproduct.us

ANEXO 02 : Comprovante de submissão – ARTIGO 2

Voltar para lista (página 1) « Anterior Próxima »

 Responder  Responder a todos  Encaminhar  Apagar  Spam Mais ações... ▼

Microbial Drug Resistance - Account Created in Manuscript Central [Exibir detalhes](#)

De: hcurry@mail.rockefeller.edu 

16-Dec-2013

Dear Dr. Oliveira:

A manuscript titled SYNTHESIS, ANTIMICROBIAL AND MODULATORY-ANTIBIOTIC ACTIVITY OF 4-BENZENESULFONYL-MORPHOLINE (MDR-2013-0219) has been submitted by Dr. Henrique Coutinho to Microbial Drug Resistance.