



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

VALÉRIA NUNES LIMA

**Atividade antimicrobiana e espectroscopia vibracional do composto
sintético (2*E*)-1-(2'-hidroxi-3',4',6'trimetoxifenil)-3-(fenil)-prop-2-en-1-ona**

CRATO – CE

2017

VALÉRIA NUNES LIMA

Atividade antimicrobiana e espectroscopia vibracional do composto sintético (2*E*)-1-(2'-hidroxi-3',4',6'trimetoxifenil)-3-(fenil)-prop-2-en-1-ona

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. Hércio Silva dos Santos

CRATO – CE

2017

VALÉRIA NUNES LIMA

Atividade antimicrobiana e espectroscopia vibracional do composto sintético (2E)-1-(2'-hidroxi-3',4',6'trimetoxifenil)-3-(fenil)-prop-2-en-1-ona

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.

BANCA EXAMINADORA:

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

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

Prof. Dr. Paulo Nogueira Bandeira
Universidade Estadual Vale do Acaraú– UVA

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

CRATO – CE

2017

Dedico este trabalho:

A minha família Maria José, Maria de Lourdes e Maria Auxiliadora, por todo amor e

Dedicação para minha educação.

E ao meu amado filho Bernardo, que me

Mostrou o verdadeiro significado da palavra amor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me dado o dom da vida, e pela força espiritual para concretização deste trabalho. Obrigado Senhor! Por todas as bênçãos em minha vida.

Em segundo lugar, a minha amada avó Maria José, por todo o seu amor, dedicação, compreensão e por cuidar do meu filho em todos os momentos que eu precisei.

Ao meu filho Bernardo Nunes que é a fonte de inspiração da minha vida.

A minha mãe Maria de Lourdes, por todo o seu incentivo, conselhos, e por estar sempre disposta a me escutar.

A minha Tia Maria Auxiliadora por sempre me orientar da melhor forma possível, e me mostrar bons ensinamentos.

Ao meu orientador Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira, por toda paciência, compreensão e ensinamentos na execução deste trabalho, no qual contribuiu para o meu crescimento educacional e profissional.

Ao Dr. Hélcio Silva dos Santos, da Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA) pela Co-orientação.

Aos membros do laboratório de Simulações de Espectroscopia Molecular (LASEMOL) em especial a Beatriz Gonçalves por ter se tornado uma amiga muito especial. Obrigada por toda dedicação e por sempre estar apta a me ajudar e ensinar.

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

Ao Professor Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho, da Universidade Regional do Cariri (URCA), pelo fornecimento da estrutura necessária para realização das atividades biológicas.

Aos integrantes do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM), da Universidade Regional do Cariri (URCA), em especial à Tiago, Raimundo e Rafael pelo auxílio na realização dos ensaios microbiológicos e por todo apoio

Às minhas amigas Helen Calixto, Dionizia de Melo e Dayana Rodrigues por todo apoio e incentivo.

Aos meus queridos alunos do Instituto Educacional Ciranda do Saber por me proporcionar sorrisos e aliviarem a minha tensão e ansiedade.

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

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho.

Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar".
Josué 1:9

RESUMO

As chalconas e seus derivados têm recebido grande atenção devido a sua estrutura simples e à diversidade de atividades farmacológicas que apresentam. Entre elas, podemos citar atividades antibacteriana, antiinflamatória, inibidoras da tirosina fosfatase A de *Mycobacterium tuberculosis* e antifúngica. As plantas são importantes fontes de matéria prima de chalconas. Entre os principais gêneros de plantas, destacamos o *Croton anisodontus* Müll espécie endêmica nativa da caatinga do Nordeste brasileiro, da qual o composto de nome científico 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona ($C_{11}O_5H_{14}$) foi isolado a partir da casca do caule. Estudos recentes revelaram que este composto natural apresentou sinergismo frente à *P. aeruginosa* O3 e para a *S. aureus* 358 na associação do composto com a amicacina. Estes resultados corroboram com outros relatos na literatura que combinam produtos naturais com antibióticos contra bactérias, para diminuir a resistência microbiana. Ademais, a síntese de derivados de produtos naturais poderá viabilizar a descoberta de novas substâncias ativas. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana, moduladora e promover uma investigação das propriedades vibracionais do composto (2E)-1-(2'-hidroxi-3',4',6'-trimetoxifenil)-3-(fenil)-prop-2-en-1-ona ($C_{18}O_5H_{18}$) derivado do composto natural 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona isolada de *Croton anisodontus* 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 utilizando a Teoria do Funcional da Densidade (DFT - *Density Functional Theory*). Este derivado foi sintetizado em meio básico, seguindo o método de condensação aldólica de Claisen-Schmidt a partir do composto 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona e benzaldeído. Os espectros FT-IR e Raman do cristal da amostra policristalina do derivado chalcona foram registrados à temperatura ambiente nas regiões de 600 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} e 40 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} , respectivamente. Adicionalmente, cálculos DFT baseados na Distribuição de Energia Potencial (PED - *Potential Energy Distribution*) foram realizados com o propósito de obter informações sobre as propriedades vibracionais deste composto orgânico. Com respeito ao estudo de atividade antimicrobiana verificou-se que o composto sintético modificou a atividade dos antibióticos amicacina e gentamicina frente as cepas bacterianas: *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Palavras-chave: Atividade antibacteriana, Chalcona, Espectroscopia vibracional.

ABSTRACT

The chalcones and their derivatives have received great attention because of their simple structure and the diversity of pharmacological activities that they present. Among them, we can mention antibacterial, anti-inflammatory activities, inhibitors of tyrosine phosphatase A of *Mycobacterium tuberculosis* and antifungal. Plants are important sources of raw material of chalcones. Among the main genera of plants, we highlight the *Croton anisodontus* Müll. endemic species native to the Brazilian Northeast caatinga, which present the compound 2-hidroxi-3,4,6-trimethoxyacetophenone ($C_{11}O_5H_{14}$) isolated from the bark of the stem. Recent studies have shown that this natural compound showed synergism against *Pseudomonas aeruginosa* 03 and *Staphylococcus aureus* 358 in the association with amikacin compound. These results corroborate with other reports in the literature that combine natural products with antibiotics against bacteria to decrease microbial resistance. In addition, the synthesis of derivatives of natural products may enable the discovery of new active substances. In this context, the aim of this study was to evaluate the antimicrobial and antibiotic-modifying activities of the derivative chalcone (2*E*)-1-(2'-hidroxi-3',4',6'trimetoxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona ($C_{18}O_5H_{18}$) 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. This derivative chalcone was synthesized following the Claisen-Schmidt aldol condensation method from the 2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyacetophenone compound and benzaldehyde. FTIR and Raman polycrystalline sample spectra of the chalcone derivative were recorded at ambient temperature in the regions of 400 cm^{-1} to 4000 cm^{-1} and 40 cm^{-1} to 4000 cm^{-1} , respectively. Additionally, DFT calculations and of the *Potential Energy Distribution* (PED) were performed with the purpose of obtaining information on the structural and vibrational properties of this organic compound. With respect to the study of antimicrobial activity, verified which the synthetic compound modified the activity of amikacin and gentamicin antibiotics against bacterial strains: *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Key words: Antibacterial activity, Chalcone, Vibrational spectroscopy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01: Estrutura fundamental das chalconas	17
Figura 02: Tipos de vibrações moleculares	21
Figura 03: Representação esquemática das transições entre níveis de energia para os tipos de espalhamento Rayleigh e Raman	23
Figura 04: Esquema da síntese da chalcona	27
Figura 05: Representação da fórmula estrutural da substância (2E)-1-(2'-hidroxi-3',4',6'trimetoxifenil)-3-(fenil)-prop-2-en-1-ona	33
Figura 06: Espectros FT – Raman e FT – IR do composto (2E)-1-(2'-hidroxi-3',4',6'trimetoxifenil)-2-en-1-ona)-3-(fenil)-prop-2-en-1-ona nas regiões, 3200 cm ⁻¹ á 2500 cm ⁻¹ e 1840 cm ⁻¹ á 0 cm ⁻¹	34
Figura 07: CIM (Concentração Inibitória Mínima) do antibiótico gentamicina na presença e ausência da substância (2E)-1-(2'-hidroxi-3',4',6'trimetoxifenil)-2-en-1-ona)-3-(fenil)-prop-2-en-1-ona frente as bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	40
Figura 08: CIM (Concentração Inibitória Mínima) do antibiótico amicacina na presença e ausência da substância (2E)-1-(2'-hidroxi-3',4',6'trimetoxifenil)-2-en-1-ona)-3-(fenil)-prop-2-en-1-ona frente as bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Regiões Espectrais no Infravermelho.....	20
Tabela 2	Substâncias utilizadas na atividade antimicrobiana e moduladora e suas respectivas origens.....	28
Tabela 3	Perfil das linhagens bacterianas.....	29
Tabela 4	Número de onda calculado (ω_{calc}), número de onda escalonado (ω_{esc}) por fatores de escala dual (0,9626 para região entre 10 à 1800 cm^{-1} e 0,9440 para região 2800 à 4000 cm^{-1}), números de onda experimentais observados no Raman ($\omega_{\text{FT-Raman}}$) e Infravermelho ($\omega_{\text{FT-IR}}$) a temperatura ambiente (em unidades cm^{-1}) e classificação dos modos vibracionais do composto sintético HYTFENIL.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ω_{calc} –	Posições dos números de onda calculados
$\omega_{\text{FT-Raman}}$ –	Posições dos números de onda das bandas Raman
ω_{IR} –	Posições dos números de onda das bandas Infravermelho
ω_{scal} –	Posições dos números de onda escalonados
ANVISA –	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC –	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI (IHB) –	<i>Brain Heart Infusion</i>
CCD –	Cromatografia de Camada Delgada
CIM –	Concentração Inibitória Mínima
CIM/8 –	Concentração subinibitória
DFT –	Teoria do Funcional da Densidade (<i>Density Functional Theory</i>)
DMSO –	Dimetilsulfóxido
EM -	Espectroscopia de massas
FT-IR –	Infravermelho com Transformada de Fourier (<i>Fourier Transform Infrared</i>)
FT-Raman –	Espalhamento Raman com Transformada de Fourier
HIA (AIH) –	<i>Heart Infusion Agar</i>
IR –	Infravermelho (<i>Infrared</i>)
PED –	Distribuição de Energia Potencial (<i>Potential Energy Distribution</i>)
RMN –	Ressonância Magnética Nuclear
UV-VIS -	Ultravioleta-Vísivel
sc –	Vibração de deformação angular do tipo tesoura (<i>scissoring</i>)
wag –	Vibração de deformação angular do tipo balanço (<i>wagging</i>)
δ -	Deformação angular
δ_{out} -	Deformação fora do plano
v-	Estiramento
v_{as} -	Estiramento assimétrico

ν_s - Estiramento simétrico
 τ - Torção

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2. Objetivos Específicos.....	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 Considerações Sobre o Gênero Croton e Chalconas.....	17
3.2 Espectroscopia Vibracional	18
3.3 Espectroscopia no Infravermelho	20
3.5 Espectroscopia Raman	22
3.7 Microrganismos e Infecções	25
3.8 Resistência Microbiana.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Obtenção do Composto Sintético e Elucidação da Estrutura Molecular	27
4.2 Atividade Antimicrobiana e Moduladora	28
4.2.1 Drogas e Reagentes	28
4.2.2 Preparação da Amostra.....	28
4.2.3 Cepas Bacterianas.....	28
4.2.4 Perfil de Resistência das Bactérias	29
4.2.5 Obtenção do Inóculo.....	29
4.2.6 Indicação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	29
4.2.7 Avaliação da Intervenção do HYTFENIL a Resistência aos Antibacterianos	30
4.2.8 Avaliação da Atividade Antimicrobiana	31
4.3 Espalhamento Raman, Espectroscopia no Infravermelho e Cálculos DFT	31
4.3.1 Espectroscopia por Espalhamento Raman.....	31
4.3.2 Espectroscopia no Infravermelho	31
4.3.3 Métodos Computacionais.....	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 Análise da Estrutura Química do Composto (2 <i>E</i>)-1-(2'-hidroxi-3',4',6'trimetoxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona.....	33
5.3 Atividade Antimicrobiana e moduladora.....	39
6. CONCLUSÕES.....	42
REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas com fins terapêuticos é uma tradição milenar presente nas culturas de várias nações constituindo ainda hoje, um recurso alternativo de grande aceitação, não somente nos centros urbanos, mas sobretudo nas pequenas comunidades rurais. Este comportamento vem chamando a atenção da comunidade científica no sentido de comprovar a eficácia e promover o uso seguro desses recursos naturais (FENNELL *et al.*, 2004).

Vale ressaltar que as plantas são fontes naturais de uma infinidade de substâncias químicas que são biossintetizadas apresentando várias finalidades, entre elas, protegê-las contra predadores e atrair polinizadores (STEPP, 2004).

Levando em consideração a biodiversidade vegetal que existe no planeta, as pesquisas com plantas superiores apresenta-se como uma fonte extremamente promissora para a descoberta de novas substâncias que podem ser utilizados no tratamento de várias doenças (ROJAS *et al.*, 2003).

Dentre todas as famílias pertencentes à flora mundial, a família Euphorbiaceae, merece especial 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 (SALATINO *et al.*, 2007).

Estudos fitoquímicos realizados com espécies de *Croton* têm mostrado a presença de terpenóides (SANTOS *et al.*, 2008, 2004; SALATINO *et al.*, 2007), alcalóides (ARAUJO-JUNIOR *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). Dentre estas, podemos destacar os diterpenos e os flavonoides, por apresentam uma ampla variedade de atividades farmacológicas, principalmente atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias (SALATINO *et al.*, 2007; CARNEIRO *et al.*, 2011; SA *et al.*, 2012).

É descrito na literatura que diversas espécies do gênero *Croton*, possuem várias atividades farmacológicas como: atividade anti-inflamatória, antioxidante (NARDI *et al.*, 2003); antileishmanicida (SOCORRO *et al.*, 2003); antinociceptiva (CAMPOS *et al.*, 2002); antiulcerogênica, (ALMEIDA *et al.*, 2003); hipoglicêmica, hipolipidêmica (SILVA *et al.*,

2001); antimicrobacteriana, antimalárica (THONGTAN *et al*, 2003); purgativa (BABILI *et al*, 2005); hipotensora e narcótica (VIGOR *et al*, 2001).

A literatura reportou pela primeira vez a promissora atividade antimicrobiana da substância natural 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona isolada de *Croton anisodontus* (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Essa acetofenona apresentou sinergismo com $p < 0,001$ frente à *P. aeruginosa* 03 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 nenhum resultado significativo foi observado. Já para *E. coli* os resultados não foram significativos com $p > 0,05$. Por outro lado, a associação entre a 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona e os antifúngicos testados frente às espécies de *Candida* não foram capazes de influenciar na atividade antifúngica. Estes resultados corroboram com outros relatos na literatura que combinam produtos naturais com antibióticos contra bactérias, para diminuir a resistência microbiana. Ademais, a síntese de derivados de produtos naturais poderá viabilizar a descoberta de novas substâncias ativas.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana, moduladora e promover uma investigação das propriedades vibracionais do composto (2E)-1-(2'-hidroxi-3',4',6'trimetoxifenil)-3-(fenil)-prop-2-en-1-ona ($C_{18}O_5H_{18}$ - HYTFENIL) derivado do composto natural 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona isolada de *Croton anisodontus* 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*). Este derivado foi sintetizado seguindo o método de condensação aldólica de Claisen-Schmidt em meio básico a partir do composto 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona e benzaldeído. Os espectros FT-IR e Raman do cristal da amostra policristalina do derivado chalcona foram registrados à temperatura ambiente nas regiões de 600 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} e 40 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} , respectivamente. Adicionalmente, cálculos DFT utilizando a Distribuição de Energia Potencial (PED - *Potential Energy Distribution*) foram realizados com o propósito de obter informações sobre as propriedades vibracionais deste composto orgânico. Com respeito ao estudo de atividade antimicrobiana verificou-se que o composto sintético modificou a atividade dos antibióticos amicacina e gentamicina frente as seguintes cepas bacterianas: *Escherichia coli* (*E. coli* ATCC 10536 e *E. coli* 27) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* 358).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar a atividade antimicrobiana e moduladora do composto sintético HYTFENIL derivado da substância natural 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona ($C_{11}O_5H_{14}$) isolada de *Croton anisodontus* Müll., e investigar os espectros vibracionais da amostra policristalina deste composto através das técnicas de espectroscopia vibracional FT-Raman e FT-IR e por cálculos computacionais usando a Teoria do Funcional da Densidade - DFT.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar a atividade antimicrobiana do composto da chalcona sintetizada frente as linhagens bacterianas, determinando sua Concentração Inibitória Mínima - CIM;
- Verificar a eficácia do composto sintético HYTFENIL na modulação da resistência bacteriana à aminoglicosídeos;
- Caracterizar por espectroscopia vibracional ao utilizar as técnicas FT-Raman e FT-IR o composto semi-sintético HYTFENIL e realizar cálculos computacionais para investigar seus espectros vibracionais;
- Utilizar a simulação computacional para auxiliar na análise dos modos normais de vibrações da amostra policristalina do composto sintético HYTFENIL observados experimentalmente por meio das técnicas espectroscopia Raman e espectroscopia no infravermelho;
- Classificar os modos normais de vibração da substância sintética HYTFENIL com base na Distribuição de Energia Potencial - PED (*Potential Energy Distribution*).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

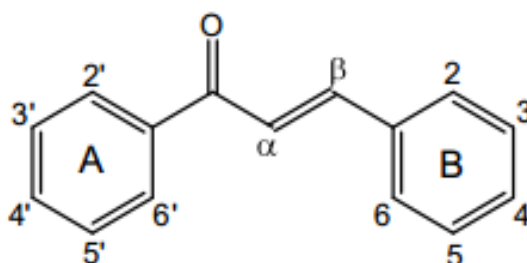
3.1 Considerações sobre o Gênero *Croton* e chalconas

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, CARNEIRO-TORRES, 2009).

A bibliografia segundo CRAVEIRA (1981) descreve o gênero *Croton* da seguinte maneira: espécies desse gênero são representadas por árvores, arbustos, subarbustos, ervas e raramente lianas; podem ser monóicas ou dióicas, com tricomas de formas variadas (estrelados, escamiformes, etc.); suas 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 lepidotos ou escamosos; 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; o fruto é uma cápsula triococa que varia de 2 a 6 mm de diâmetro; suas 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 chalconas que são cetonas α , β -insaturadas, que apresentam em sua estrutura o núcleo 1,3-diarilprop-2-en-1-ona (ÁVILA et al., 2008) (Figura 1) e o esqueleto $C_1-C-C_\alpha=C_\beta-C_1$. Elas são também compostos precursores da via de biossíntese dos flavonoides, encontrado largamente nos vegetais, principalmente nas pétalas das flores, onde tem um importante papel na polinização das plantas, pois sua cor amarela atrai insetos e pássaros, que assim polinizam outras plantas (ZUANAZZI, SIMÕES et al., 2001).

Figura 1 - Estrutura fundamental das chalconas



As chalconas e seus derivados nos últimos anos têm recebido grande importância devido a sua estrutura relativamente simples e à diversidade de atividades farmacológica que apresentam. Dentre elas, podemos citar atividade anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, antioxidante e antineoplásica (ALCARRAZ et al, 2004; CHIARADIA et al., 2008; BOECK et al., 2005). Essa larga gama de atividades é em grande parte atribuída às inúmeras possibilidades de substituições nos anéis aromáticos das chalconas, pois a metodologia de síntese das mesmas, baseada na condensação de Claisen-Schmidt, possibilita a obtenção de uma grande quantidade de compostos, uma vez que existem inúmeros benzaldeídos e acetofenonas comerciais que podem ser combinados, fornecendo a variedade estrutural pretendida (DIMMOCK et al, 1999).

3.2 Espectroscopia Vibracional

A espectroscopia consiste na obtenção de informações sobre a interação da radiação eletromagnética com a matéria. Especificamente, a espectroscopia vibracional investiga transições vibracionais com o principal objetivo de conseguir informações a respeito da natureza das ligações químicas e dos modos vibracionais de uma dada substância química, esteja ela na forma de cristal, no estado líquido, ou no estado gasoso (OLIVEIRA, 2001a). Quando a radiação eletromagnética incide sobre a matéria, pode promover uma transição entre estados energéticos.

Nas moléculas, a região espectral onde as transições são observadas depende do tipo de níveis envolvidos: eletrônicos, vibracionais ou rotacionais (SALA, 2008). A energia total de uma molécula é a soma de todas essas energias, como pode ser observado na Equação 1:

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

Nas transições eletrônicas praticamente não há mudança da posição dos núcleos da molécula, este tipo de transição é caracterizado pela passagem de um elétron de um estado de menor energia para um de maior energia, após a absorção da radiação.

Nos outros tipos de transições ocorre a mudança da posição relativa dos átomos na molécula. Nas transições vibracionais os núcleos dos átomos mudam de posição constantemente devido a mudanças nas distâncias de ligação ou nos ângulos de ligação, enquanto nas transições rotacionais os átomos da molécula mudam de posição devido a

rotações sobre eixos definidos (centro de gravidade) e nas translacionais ocorre devido a movimentos de translação da molécula como um todo (OLIVEIRA, 2001b).

Sob influência da radiação eletromagnética, os átomos de uma molécula podem se movimentar nas três direções dos eixos cartesianos (x, y e z). A quantidade e a qualidade de movimentos que podem ser efetuados pelos átomos que compõem a molécula são definidos como graus de liberdade. Uma molécula com N átomos pode se movimentar em 3 direções o que resulta 3N graus de liberdade para localizar cada átomo ou ponto no espaço. Quando uma molécula é linear, ou seja, os átomos estão dispostos sobre um dos eixos do sistema de coordenadas, haverá 3 modos translacionais e apenas 2 movimentos rotacionais, pois não pode haver rotação sobre o eixo em que a molécula está definida. Os movimentos vibracionais são calculados pelo total de graus de liberdade (3N) menos a quantidade de movimentos translacionais e rotacionais presentes na molécula e são denominados de modos normais de vibração. Logo, uma molécula linear terá $3N - 5$ vibrações moleculares. Já em uma molécula que não é linear ocorrem todos os modos translacionais e rotacionais, portanto o número de modos vibracionais é definido por $3N - 6$. Para cada modo normal de vibração, há uma relação de energia potencial que pode ser expressa de acordo com os níveis discretizados (OLIVEIRA, 2001b; SKOOG *et al.*, 2002).

As técnicas espectroscópicas: espectroscopia na região do Infravermelho (IR); espalhamento Raman; Espectrometria de Massas (EM); Ultravioleta-Visível (UV-VIS); e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) constituem atualmente, os principais recursos para a identificação e elucidação estrutural de substâncias orgânicas. A utilização desses métodos físicos de análise traz grandes vantagens, destacando-se a diminuição do tempo de análise, redução substancial nas quantidades de amostra, aumento da capacidade de identificar ou caracterizar estruturas complexas e não destruição da amostra.

A espectroscopia na região do infravermelho tem sido amplamente utilizada em linhas de produção e no controle de processos industriais (LOPES; FASCIO, 2004). A interação da radiação eletromagnética com o movimento vibracional dos núcleos origina os espectros vibracionais que podem ser observados pelas técnicas de espectroscopia Infravermelho e espalhamento Raman. Contudo, como as causas e os efeitos físicos envolvidos nas duas técnicas são distintas, os modos vibracionais ativos podem ser diferentes, ou seja, alguns modos normais da molécula podem aparecer somente no Infravermelho ou somente no Raman. Portanto, essas técnicas são consideradas complementares e para se obter uma análise completa dos modos vibracionais de um sistema químico pode ser necessário avaliar tanto o espectro Infravermelho quanto o espectro Raman (OLIVEIRA, 2001b; SKOOG *et al.*, 2002).

3.3 Espectroscopia no Infravermelho

3.3.1 Regiões Espectrais no Infravermelho

A região espectral do infravermelho (IR) abrange uma radiação com número de onda que se estende de 12.800 a 10 cm^{-1} que é comumente dividida de acordo com as aplicações e instrumentação em três regiões: radiação no infravermelho próximo, médio e distante (SKOOG *et al.*, 2002). A Tabela 1 apresenta as três regiões espectrais de classificação no infravermelho.

Tabela 1 – Regiões Espectrais no Infravermelho

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

Fonte: SKOOG *et al.*, 2002.

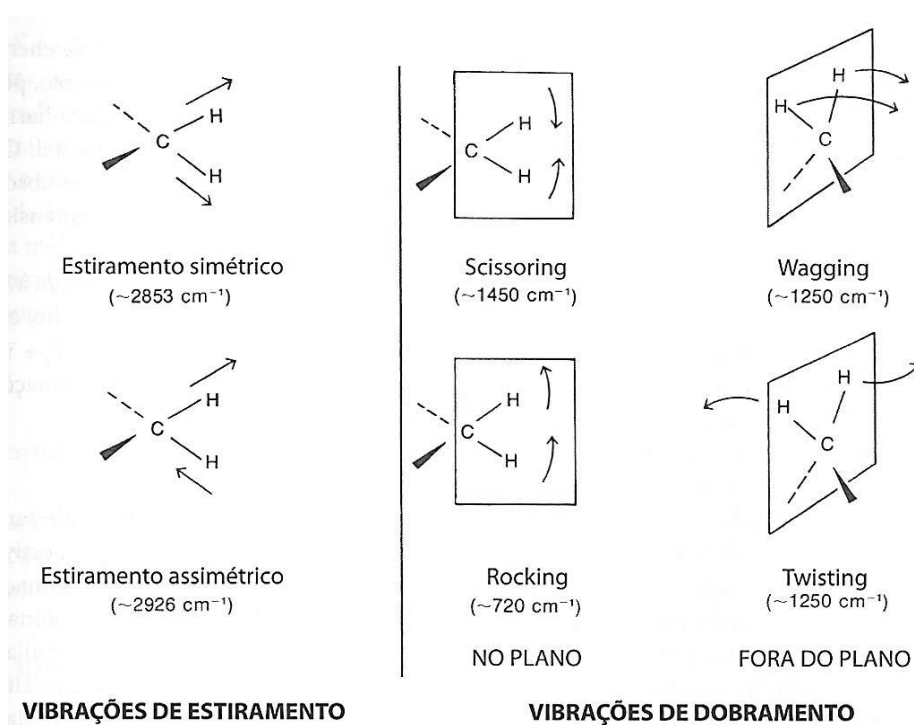
Para que possa ocorrer a absorção da radiação no infravermelho uma molécula precisa sofrer uma variação no momento de dipolo como consequência do movimento rotacional ou vibracional. Este momento é determinado pela magnitude da carga elétrica e pela distância entre dois centros de carga. Somente nessas condições o campo elétrico alternado da radiação pode interagir com a molécula, causando variações na amplitude de um de seus movimentos. Para moléculas diatômicas homonucleares, tais como O_2 , N_2 ou Cl_2 , nenhuma variação efetiva no momento de dipolo é observada durante a vibração ou rotação, impedindo que estas moléculas absorvam radiação no infravermelho (SKOOG *et al.*, 2002).

3.3.2 Modos normais de vibração

As vibrações moleculares podem ser classificadas em: vibração de deformação axial ou estiramento (*stretching*) e vibração de deformação angular (*bending*). As vibrações de estiramento são caracterizadas por uma variação contínua na distância interatômica ao longo do eixo da ligação entre dois átomos e as deformações angulares são caracterizadas pela variação do ângulo entre duas ligações, seja internamente em um conjunto de átomos ou um

grupo de átomos em relação à molécula como um todo. Os estiramentos são classificados em: simétricos (*symetric*) e assimétricos (*asymetric*). Já as vibrações de deformação angular podem ser de quatro tipos: simétrica no plano (*rocking*, balanço ou oscilação), assimétrica no plano (*scissoring* ou tesoura), simétrica fora do plano (*wagging*, sacudida ou balanço em fase) e assimétrica fora do plano (*twisting*, torção ou balanço fora de fase) (SKOOG *et al.*, 2002; PAVIA *et al.*, 2009). Os tipos de vibrações moleculares estão representados na Figura 2.

Figura 2 – Tipos de vibrações moleculares



Fonte: PAVIA *et al.*, 2010.

3.4 Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

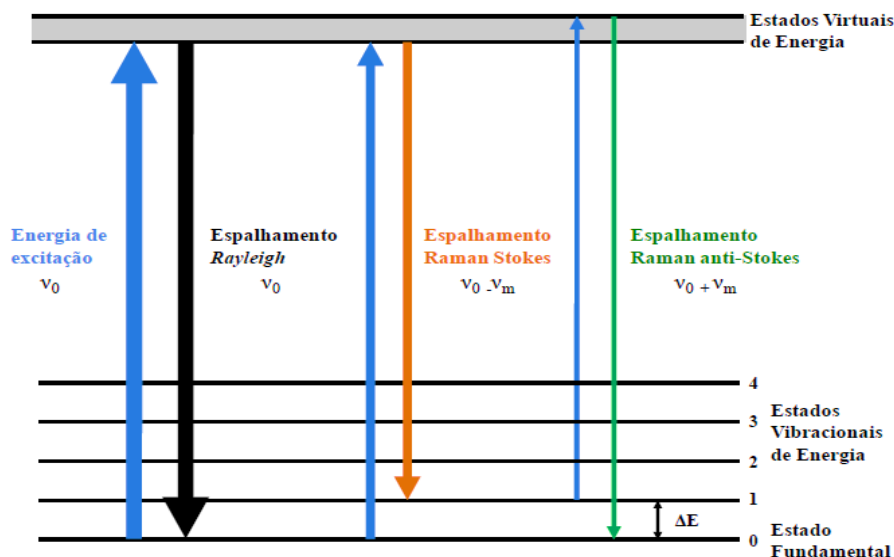
Os instrumentos com transformada de Fourier apresentam uma série de vantagens. A principal delas é que possuem uma relação sinal-ruído melhor em mais de uma ordem de magnitude que os instrumentos dispersivos de boa qualidade, podendo, em muitos casos, fazer varreduras rápidas e obter bons espectros em um tempo curto (SKOOG *et al.*, 2002).

3.5 Espectroscopia Raman

Assim como na espectroscopia no Infravermelho, a espectroscopia Raman concede informações sobre níveis de energia vibracionais e sobre a estrutura molecular de uma dada substância química. Pode-se dizer que o espalhamento Raman e a espectroscopia no Infravermelho são duas técnicas que se complementam. No entanto, os processos físicos envolvidos nessa técnica de espectroscopia é diferente. Na espectroscopia Raman ocorre o espalhamento de luz (SALA, 2008). Os espectros Raman são obtidos ao irradiar uma amostra com uma fonte laser de radiação monocromática no visível ou no infravermelho próximo. Quando a radiação atravessa um meio transparente, as espécies presentes espalham uma fração do feixe em todas as direções. Se essa radiação for espalhada com o mesmo valor de comprimento de onda, ou seja, a energia for a mesma antes e depois da interação com a matéria, será um espalhamento elástico. Se a radiação depois de interagir com a matéria, tiver um comprimento de onda diferente da radiação incidente (fonte de excitação) será um espalhamento inelástico da luz (OLIVEIRA, 2001b; SKOOG *et al.*, 2002). Podemos portanto dizer que o espalhamento elástico também denominado de espalhamento Rayleigh é aquele em que a luz espalhada tem a mesma frequência da luz incidente. No espalhamento Rayleigh, as moléculas estão no estado fundamental (estado no qual as moléculas estão em um menor nível de energia). Quando essas moléculas sofrem colisão com o fóton de energia (que é a luz incidente), passam do estado fundamental para um estado virtual e voltam em seguida para o estado fundamental e o fóton espalhado conserva a energia. Já o espalhamento inelástico ou Raman ocorre quando a luz espalhada tem frequência igual à da luz incidente mais ou menos a frequência vibracional da molécula (RICCI, 2008). Um diagrama ilustrando os espalhamentos Rayleigh e Raman é mostrado na Figura 3.

No espalhamento Rayleigh, as moléculas estão no estado fundamental (estado no qual as moléculas estão em um menor nível de energia). Quando essas moléculas sofrem colisão com o fóton de energia (que é a luz incidente), passam do estado fundamental para um estado virtual e voltam em seguida para o estado fundamental e o fóton espalhado conserva a energia.

Figura 3 – Representação esquemática das transições entre níveis de energia para os tipos de espalhamento Rayleigh e Raman.



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

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

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

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

No espalhamento Raman Stokes, as moléculas sofrem colisão com o fóton passando do estado fundamental para o estado virtual, e em seguida, decai para um estado vibracional excitado de energia, então esse fóton espalhado terá energia menor que a radiação

incidente. No espalhamento Raman anti-Stokes, o fóton encontra a molécula já em um estado excitado e leva a molécula a uma energia bem mais alta. Quando chega ao estado virtual, a molécula decai para o estado fundamental, assim o fóton espalhado terá energia maior que a radiação incidente.

O espalhamento Rayleigh tem probabilidade de ocorrência muito maior que o Raman, bem como o espalhamento Raman Stokes ocorre com mais frequência que o anti-Stokes, devido à contribuição do fator de Boltzmann, ou seja, o número de moléculas que estão no estado fundamental é muito maior que o de moléculas em estado excitado (SKOOG *et al.*, 2002). O espectro Raman de uma determinada molécula consiste de uma série de picos ou bandas, cada um correspondendo a uma frequência vibracional característica daquela molécula. Cada molécula tem o seu próprio espectro característico, e dessa forma, o espectro Raman pode fornecer uma “impressão digital” ou *fingerprint* de uma substância da qual a sua estrutura molecular pode ser determinada (LORINCZ *et al.*, 2004).

3.6 Cálculos Computacionais de Primeiros Princípios

Na mecânica quântica emprega-se a equação de Schrödinger para calcular as propriedades físicas de átomos e moléculas, a partir das interações entre os seus elétrons e núcleos (BARREIRO *et al.*, 2001). A equação de Schrödinger foi elaborada em 1925 pelo físico austríaco Erwin Schrödinger. Esta equação que determina como o estado quântico de um átomo ou molécula muda com o tempo, ou seja, o tempo de evolução da função de onda para os núcleos e elétrons constituintes do sistema molecular é representado pela equação 2 abaixo:

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

Essa equação é facilmente resolvida para sistemas quânticos com poucos átomos. No entanto para sistemas que contém muitos átomos resolver a equação de Schrödinger pode ser bastante complexa. Neste caso é necessário empregar métodos de aproximação para uma completa compreensão do efeito de cada partícula sob o sistema. Uma das aproximações fundamentais da mecânica quântica é a aproximação de Born-Oppenheimer que separa o movimento nuclear do movimento eletrônico, em uma função de onda puramente eletrônica (FREIRE; PESSOA; BROMBERG, 2011). A energia obtida pode ser calculada através de

equações conhecidas por equações de Hartree-Fock, onde se assume que a energia de um do elétron, depende do núcleo atômico e dos elétrons (SILVA, 2012).

A Teoria do Funcional da Densidade (DFT) surgiu como uma possibilidade para resolver a equação de Schrödinger para sistemas moleculares de muitos átomos, onde a ideia dos funcionais de densidade é aplicar uma densidade eletrônica, onde a energia é função da densidade eletrônica, $E = E(\rho, \vec{r})$ (SOUZA; FERRÃO, 2006). Com relação à densidade eletrônica total do sistema, assume-se que a energia total possui um ponto mínimo local, onde pode-se chegar às Equações de Kohn-Shan:

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 \Psi_i + U(\vec{r}) \Psi_i + \mu_{xc}(\vec{r}) \Psi_i = E_i \Psi_i \quad (3)$$

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.

3.7 Microrganismos e Infecções

Pertencentes ao reino monera, as bactérias são micro-organismos que possuem uma única célula com uma estrutura mais simples, vistos apenas com auxílio do microscópio, de tamanho variável, entre 0,2 a 1,5 μm de comprimento. Sua estrutura celular é bastante simples, podendo apresentar variações quanto ao seu tamanho, forma ou virulência, dispostas em colônias ou isoladas (BRANDÃO, 2011).

As bactérias são parte integral e inseparável da vida na terra. Elas são encontradas em diversos lugares e revestem a pele, as mucosas e cobrem o trato intestinal dos homens e dos animais. Elas estão intrinsecamente ligadas às vidas de organismos e aos amplos ambientes em que habitam. Algumas bactérias são benéficas para seu hospedeiro (homem, animal, planta) e provêm nutrientes ou proteção contra patógenos e doenças, limitando a habilidade de colonização de bactérias nocivas. Entretanto, existe atualmente uma grande classe de bactérias que representam grande preocupação para a saúde da população (NEVES *et al.*, 2011). Dentre as que mais ocasionam mortes no mundo estão o *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (MRSA), *Staphylococcus aureus* vancomicina-resistente (VRSA), *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* e *Pseudomonas aeruginosa*, que são bactérias resistentes a múltiplas

drogas. Os processos infecciosos causados por estas bactérias frequentemente estão associados com alta letalidade e altos custos de tratamento (ROCHA *et al.*, 2011).

Escherichia coli (*E. coli*) possui formato de um bacilo, é aeróbia e anaeróbia facultativa, pertencem ao grupo de bactérias Gram negativas, da família *Enterobacteriaceae* que produzem enterotoxinas que podem estar presentes nas doenças diarreicas (MURRAY, 2004; MATIAS *et al.*, 2010). Essa bactéria está presente na microbiota normal do trato intestinal dos homens. Entretanto, dentre as cepas de *E. coli*, há um grupo capaz de promover doenças nos humanos, chamadas de *E. coli* enteropatogênicas (SILVA *et al.*, 2003). Linhagens patogênicas de *E. coli* têm sido apontadas como causa primária de infecções no trato urinário, septicemia nosocomial e enterites em seres humanos. (SCHNEIDER *et al.*, 2009).

Staphylococcus aureus é uma bactéria esférica, do grupo dos cocos Gram positivos, é aeróbia e anaeróbia facultativa. Este micro-organismo é naturalmente encontrado na pele e nas mucosas dos seres humanos. Essa bactéria é comumente o agente etiológico que causa infecções purulentas em diversos tecidos e órgãos, podendo provocar diversas doenças, que vão desde uma simples infecção (espinhas e furúnculos) até infecções graves (pneumonia, meningite, endocardite, miocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia e outras) (SANTOS *et al.*, 2007; COUTINHO *et al.*, 2006).

3.8 Resistência Microbiana

Nas últimas décadas a descoberta de novos antibióticos eficientes para o tratamento de doenças infecciosas bacterianas favoreceu um enorme avanço na medicina diminuindo consideravelmente o grande número de mortes causadas por doenças de caráter infeccioso. Em contrapartida, o aumento crescente do uso de antibióticos potencializou a seleção de cepas de bactérias resistentes a esses medicamentos (BARBOSA, 2014).

A resistência bacteriana é uma grande preocupação mundial sendo objeto de estudo para diversas publicações sobre antimicrobianos, vários fármacos afetam não apenas o usuário do medicamento mas todo o ecossistema onde ele encontra-se inserido (DE OLIVEIRA; MUNARETTO, 2013).

Além disso existe um alto custo financeiro quando uma terapia é fracassada por conta de microrganismos resistentes (DEL FIO; DE MATTOS FILHO; GROPPPO, 2000).

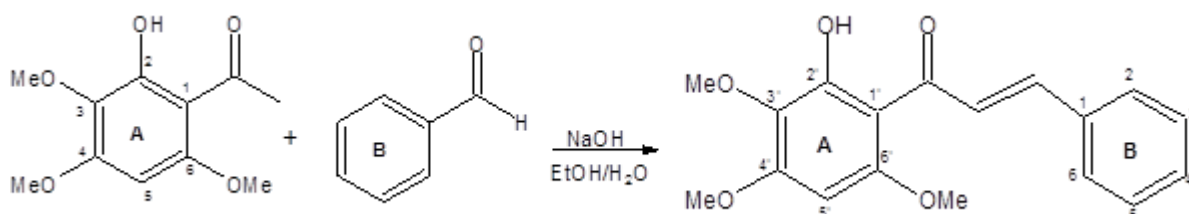
Há uma diversidade de fatores para a resistência bacteriana, entre os quais, merecem destaque os seguintes: as dificuldades para diferenciar clinicamente infecções de etiologia viral e bacterianas, a falsa crença de que o uso profilático de antibióticos poderia diminuir a ocorrência de complicações, a pressão dos familiares pela prescrição de antibióticos, a venda indiscriminada desses fármacos, o desconhecimento sobre os possíveis eventos adversos associados ao uso inadequado de antibióticos, incluindo o impacto sobre o aumento da resistência bacteriana (BRICKS, 2003). Quando um antibiótico é descoberto e introduzido no mercado, sua utilidade clínica já começa a diminuir até um ponto em que há um aumento na restrição de seu uso. Esta restrição é provocada pelo surgimento de cepas resistentes (ROCHA *et al.*, 2011).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do Composto Sintético (2E)-1-(2'-hidroxi-3',4',6'-trimetoxifenil)-3-(fenil)-prop-2-en-1-ona e Elucidação da Estrutura Molecular

O composto sintético (2E)-1-(2'-hidroxi-3',4',6'-trimetoxifenil)-3-(fenil)-prop-2-en-1-ona (HYTFENIL) derivado da substância natural 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona (C₁₁O₅H₁₄) foi isolado de *Croton anisodontus* Müll., pelo Dr. Hélcio Silva dos Santos da Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA e sua estrutura molecular foi elucidada por Ressonância Nuclear Magnética (RMN) pelo Dr. Raimundo Braz-Filho da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro-RJ, Brasil. O esquema da síntese deste derivado é mostrado na Figura 4.

Figura 4 – Esquema da síntese da chalcona (2E)-1-(2'-hidroxi-3',4',6'-trimetoxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona.



4.2 Atividade Antimicrobiana e Moduladora

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

4.2.1 Drogas e Reagentes

As substâncias utilizadas nesse trabalho para atividade antimicrobiana e moduladora são listadas abaixo na Tabela 2, com suas respectivas origens.

Tabela 2 – Substâncias utilizadas na atividade antimicrobiana e moduladora e suas respectivas origens.

SUBSTÂNCIAS	ORIGEM
Brain Heart Infusion (BHI) Agar infusão de coração(HIA)	HIMEDIA – Índia
Dimetilsulfóxido (DMSO)	MERK – Alemanha
Rezasurina	Sigma – USA
Gentamicina	Sigma – USA
Amicacina	Sigma – USA

4.2.2 Preparação da Amostra

Foi pesado 10 mg do composto e dissolvido em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo-se uma concentração inicial de 10 mg/mL. Em seguida diluiu-se essa solução inicial até um volume de 5 mL para ser utilizada em todos os testes microbiológicos. A solução foi preparada da seguinte forma: foi retirada uma alíquota da solução inicial e foi dissolvida em DMSO até uma concentração final de 1024 µg/mL.

4.2.3 Cepas Bacterianas

As cepas microbianas utilizadas nesse teste são originárias da American Type Culture Collection (ATCC) fornecidas por meio do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde. Os microrganismos

utilizados para a determinação das atividades antibacterianas foram: *Escherichia coli* (*E. coli* ATCC 10536 e *E. coli* 27) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* 358). Em ensaios biológicos foram utilizados os seguintes meios de cultura: *Agar de Infusão de Coração* - HIA (Disco Laboratories Ltd.), *Caldo de Infusão Cérebro Coração* - BHI concentração (indicado pela fabricante de 10%) (Acumedia Manufacturers, Inc.). Todas as estirpes foram mantidas a 4°C em agar HIA. Antes da realização dos ensaios, foram cultivadas durante 18 h a 35°C em caldo BHI.

4.2.4 Perfil de Resistência das Bactérias

Para analisar o efeito do composto HYTFENIL como modificafor da atividade dos antibióticos foram utilizadas cepas bacterianas multirresistentes.

O perfil das linhagens multirresistentes de bactérias está representado na Tabela 3.

Tabela 3 – Perfil das linhagens bacterianas.

Bactéria	Fonte	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>Staphylococcus aureus</i> 358	Ferida Cirúrgica	Oxa, Gen, Tob, Ami, Can, Neo, Para, But, Sis, Net

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

4.2.5 Obtenção do Inóculo

As cepas microbianas foram mantidas em placas de Petri, contendo o meio Ágar Infusão de coração a uma temperatura de 4 °C, com o propósito de conservar todas as suas características. Antes de iniciar os testes de CIM e modulação, as cepas bacterianas foram retiradas com a utilização de uma alça de Drigalski da cultura estoque e cultivada em 5 mL de

Caldo de Infusão de cérebro e coração, sendo incubadas na estufa com a temperatura 35 ± 2 °C por 24 h.

4.2.6 Indicação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para determinação da CIM foram utilizadas as suspensões bacterianas em meio BHI, onde foi retirado 100 µL dessa suspensão e inoculou em 900 µL de caldo BHI 10% (proporção 1:10) para se obter uma concentração final de 10^5 UFC mL⁻¹ (unidades formadoras de colônia/mL) onde foi realizado um ensaio de microdiluição em microplacas contendo 96 poços. O ensaio foi realizado da seguinte forma: em cada poço foi adicionado 100 µL da solução contendo o inóculo de bactéria fungo e o meio BHI 10%. As cepas bacterianas foram distribuídas no sentido numérico das placas, sendo cada coluna numérica representada por uma bactéria diferente. Em seguida, 100 µL do composto foi colocado no primeiro poço e realizaram-se diluições seriadas (1:1) até o penúltimo poço da microplaca, obtendo-se as seguintes concentrações: 512, 256, 128, 64, 32, 16 e 8 µg/mL do composto. O último poço da microplaca é constituído apenas pelo inóculo e o meio BHI 10%, representando o controle para observação da viabilidade das cepa. Após o procedimento experimental, as placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h.

4.2.7 Avaliação da Intervenção do HYTFENIL a Resistência aos Antibacterianos

Para avaliar o efeito da substância HYTFENIL como modificador da atividade dos antibióticos foram utilizados os aminoglicosídeos: amicacina e gentamicina com concentração de 5.000 µg/mL. A modulação foi estabelecida por um ensaio de microdiluição em microplacas que possuem 96 poços, seguindo o sentido alfabetico na qual cada coluna(letra) representa um antibiótico diferente. Diante da CIM no teste antimicrobiano, esse valor diminuiu 8 vezes, resultando na concentração inibitória do composto para em seguida ser utilizado no ensaio de modulação. Em cada poço foi adicionado 100 µL de uma solução contendo: 150 µL do inóculo de bactéria de cada cepa, o composto na concentração subinibitória de 16 µg/mL e o meio BHI 10% q.s.p 1.500 µL. Em seguida, 100 µL do antibiótico foi colocado no primeiro poço e realizou-se diluições seriadas (1:1) até o penúltimo poço da microplaca. As concentrações dos antibióticos foram: 2.500; 1.250; 625; 312,50; 156,25; 78,12; 39,06; 19,53; 9,76; 4,88; 2,44 µg.mL⁻¹. O último poço da

microplaca não contém o antibiótico com o objetivo de se verificar a viabilidade das cepas. No grupo controle não foi adicionado o composto, apenas o inóculo, o meio BHI 10 % e o antibiótico. Portanto, há 2 controles: o do solvente em que foi substituído o composto pelo DMSO e o do antibiótico em que não foi colocado nem o composto nem o DMSO. Após a realização dos procedimentos, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 ± 2 °C por 24 h.

4.2.8 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

Nos ensaios de CIM e modulação foi verificado o crescimento microbiano. Para verificar se houve crescimento bacteriano foi realizado um ensaio colorimétrico, utilizando-se o corante resazurina. Após o período de 24 h de incubação das placas, foi adicionado 20 µL do corante em cada poço da microplaca, e depois de 1 h em temperatura ambiente foi feita a leitura. Onde a mudança da coloração de azul para rosa indica que houve crescimento bacteriano, e ocorre devido à redução da resazurina.

4.3 Espalhamento Raman, Espectroscopia no Infravermelho e Cálculos DFT

4.3.1 Espectroscopia por Espalhamento Raman

A caracterização do composto sintético HYTFENIL, utilizando a técnica de Espalhamento Raman com transformada de Fourier, foi realizada no Laboratório de Espalhamento Raman do Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza-CE, Brasil.

As medidas de FT-Raman foram realizados no aparelho de modelo Vertex 70, módulo Ram II, COM DETECTOR d418-T, com fonte de laser Nd: YAG que excita a amostra na linha de 1064 nm, com 150mW de potência de saída. A resolução do espectro foi ajustada na região de 40 a 4000 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} .

4.3.2 Espectroscopia no Infravermelho

As medidas por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) foram realizadas no Laboratório de Simulações e Espectroscopia molecular da Universidade Regional do Cariri (URCA), usando o espectrofotômetro da marca Agilent, modelo CARY

600 FT-IR. O espectro de transmitância foi registrado, na região de 400 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} . As medidas foram realizadas pelo método de pastilhas KBr (Brometo de Potássio), o KBr quando submetido a efeitos de pressão funde-se e inclui o composto em uma matriz, tendo como resultado uma pastilha que consiste em um disco transparente (LARKIN, 2011).

4.3.3 Métodos Computacionais

Os cálculos computacionais foram realizados utilizando o Programa *Gaussian 09* disponível no ambiente computacional do Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho da Universidade de Campinas - CENAPAD-SP através do Projeto 373: “Estudo de propriedades estruturais e vibracionais em cristais moleculares orgânicos”. Para obtenção da geometria otimizada e das frequências vibracionais do composto em estudo foram empregados cálculos teóricos de química quântica por meio da Teoria do Funcional da Densidade (DFT) com o funcional B3LYP e o conjunto de base 6-31 G (d,p). A estrutura otimizada e as frequências vibracionais da molécula foram visualizadas por meio do programa *Chemcraft 1.6*. Os números de onda obtidos teoricamente foram ajustados com as bandas experimentais FT-Raman por um fator de escala que é utilizado para minimizar os erros entre as frequências calculadas e as experimentais. Foram usados dois fatores de escala para melhor ajuste entre os espectros experimentais e calculados. Para região entre 10 à 1800 cm^{-1} foi utilizado o fator de escala 0,9626 com o erro quadrático total correspondente a 14 cm^{-1} e para região entre 2800 à 4000 cm^{-1} foi utilizado o fator de escala 0,9440 com o erro quadrático total correspondente a 9 cm^{-1} . Os números de onda ajustados foram comparados com as posições das bandas Raman e Infravermelho, sendo realizado as atribuições para cada modo normal de vibração. As atribuições das vibrações moleculares foram baseadas em cálculos de Distribuição de Energia Potencial (PED) utilizando o *software* VEDA. Para descrever as atribuições das vibrações moleculares foram atribuídos os seguintes símbolos: τ = torção (*twisting*); r = balanço (*rocking*); sc = tesoura; (*scissoring*); wag = sacudida (*wagging*), δ = deformação (*bending*); δ_{as} = deformação assimétrica (*asymmetric bending*); v = estiramento (*stretching*); v_{as} = estiramento assimétrico (*asymmetric stretching*); v_s = estiramento simétrico (*symetric stretching*). Em seguida foi realizada a classificação das bandas Raman e Infravermelho em relação ao quão forte são suas intensidades com o auxílio do programa Excel. As intensidades das bandas nos espectros Raman e infravermelho foram normalizadas

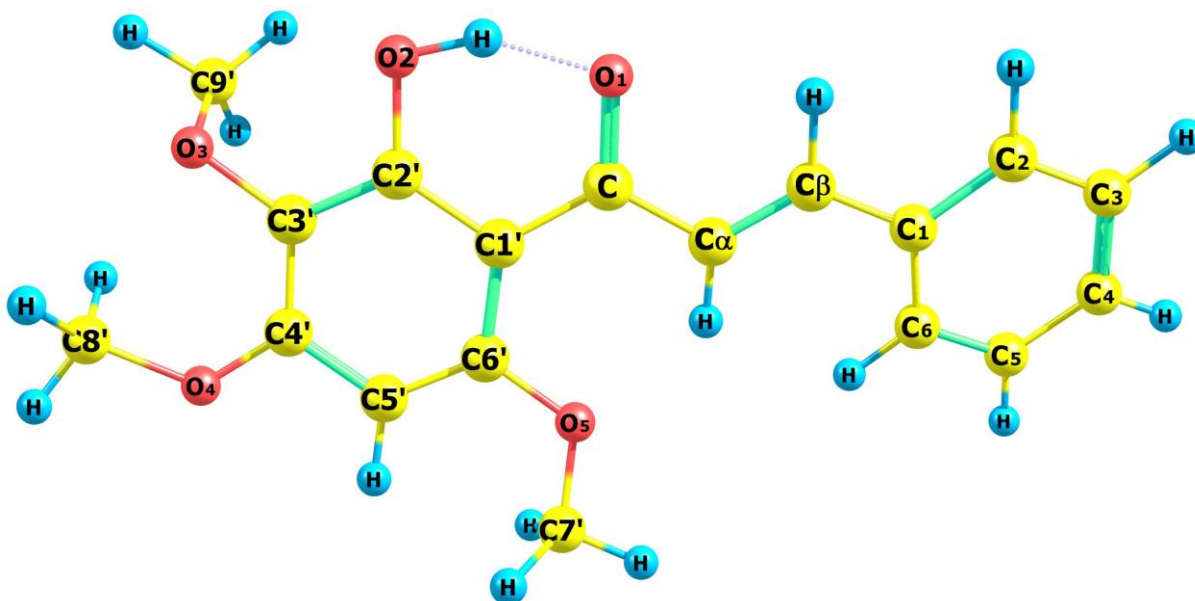
no intervalo de [0-100] e foi utilizado o seguinte parâmetro e nomenclatura para a classificação quanto as intensidades das bandas: vs = muito forte (*very strong*) [100-50], s= forte (*strong*) [50-30], m=média (*medium*) [30-20], w=fraca (*weak*) [20-15] e vw =muito fraca (*very weak*) [15-5].

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise da Estrutura Química do Composto (2E)-1-(2'-hidroxi-3',4',6'trimetoxifenil)-3-(fenil)-prop-2-en-1-ona

O composto (2E)-1-(2'-hidroxi-3',4',6'trimetoxifenil)-3-(fenil)-prop-2-en-1 de formula molecular $C_{18}O_5H_{18}$ contém 41 átomos distribuídos em 2 anéis aromáticos de seis membros. O anel R1 que é formado pelos átomos C1', C2', C3', C4', C5' e C6' e o anel R2 é formado pelos átomos C1, C2, C3, C4, C5 e C6. A estrutura molecular e a numeração usada para descrever os átomos da molécula $C_{18}O_5H_{18}$ é apresentada na Figura 5. Nesta figura os átomos de carbono estão representados pela cor amarela, os oxigênios pela cor vermelha e os hidrogênios pela cor azul.

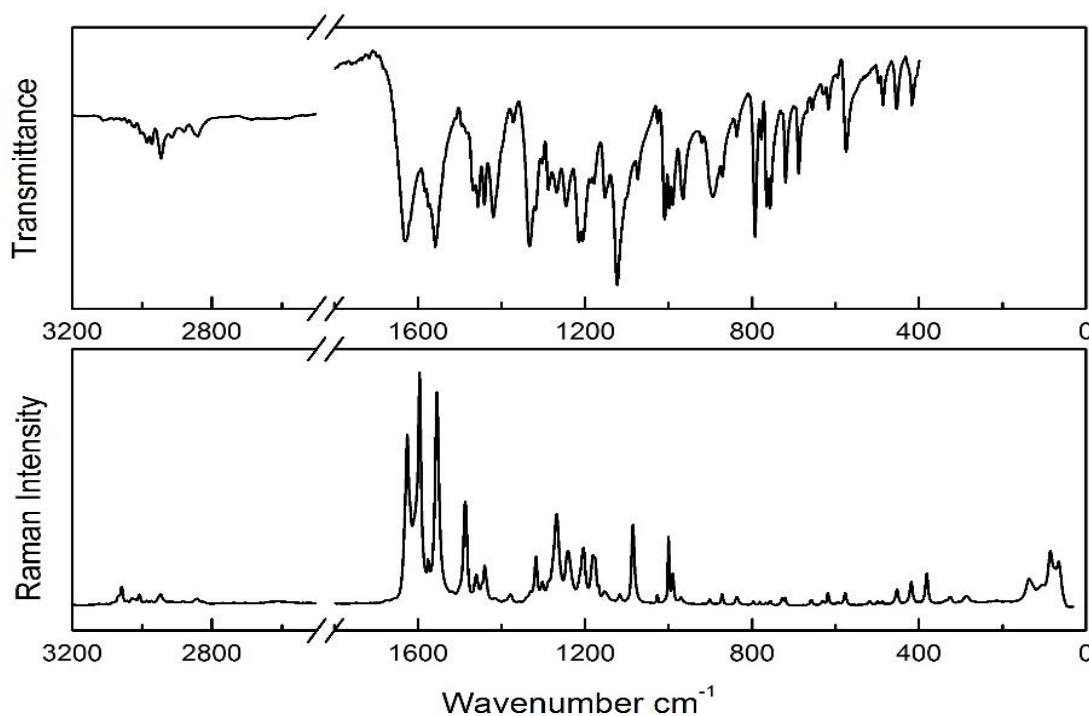
Figura 5 – Representação da substância (2E)-1-(2'-hidroxi-3',4',6'trimetoxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona ($C_{18}O_5H_{18}$).



5.2 Análise Espectroscópica do Composto (2E)-1-(2'-hidroxi-3',4',6'trimetoxifenil)-3-(fenil)-prop-2-en-1-ona

Os espectros FT-Raman e FT-IR de amostras policristalinas do composto (2E)-1-(2'-hidroxi-3',4',6'-trimetoxifenil)-3-(fenil)-prop-2-en-1-ona ($C_{18}O_5H_{18}$) são apresentados na Figura 6.

Figura 6 - Espectros FT-Raman e FT-IR do composto sintético (2E)-1-(2'-hidroxi-3',4',6'-trimetoxifenil)-3-(fenil)-prop-2-en-1-ona nas regiões, 3200 cm^{-1} à 2500 cm^{-1} e 1840 cm^{-1} à 0 cm^{-1} .



No espectro FT-Raman foram observadas 48 bandas entre as quais: 26 tiveram uma intensidade muito fraca, 01 intensidade fraca, 9 intensidade media, 5 intensidade forte e 7 intensidade muito forte. Onde a maioria apresentaram uma intensidade muito fraca. Enquanto no espectro FT-IR foram identificadas 51 bandas e apresentam 3 com intensidade muito fraca, 01 intensidade fraca, 04 intensidade media, 16 intensidade forte e 27 intensidade muito forte.

A molécula $C_{18}O_5H_{18}$ possui 41 átomos, portanto possuem 123 graus de liberdade ($3N$), excluindo-se os três modos rotacionais e os três movimentos translacionais ($3N-6$) são esperados 117 modos vibracionais. Na Tabela 1 há uma descrição detalhada dos números de onda atribuídos associados a cada uma das bandas Raman e Infravermelho. Na 1ª coluna estão os valores dos números de onda calculados pelo método DFT (ω_{calc}), na 2ª coluna os números de onda escalonados (ω_{esc}) e na 3ª e 4ª coluna os valores experimentais para o composto, em número de onda (cm^{-1}), obtidos por espectroscopia Raman ($\omega_{\text{FT-Raman}}$) e por Infravermelho

($\omega_{\text{FT-IR}}$) respectivamente, já na 5ª coluna está representada a classificação dos modos vibracionais.

Tabela 4- Número de onda calculado (ω_{calc}), número de onda escalonado (ω_{esc}) por fatores de escala dual (0,9626 para região entre 10 à 1800 cm^{-1} e 0,9440 para região 2800 à 4000 cm^{-1}), números de onda experimentais observados no Raman ($\omega_{\text{FT-Raman}}$) e Infravermelho ($\omega_{\text{FT-IR}}$) a temperatura ambiente (em unidades cm^{-1}) e classificação dos modos vibracionais do composto sintético HYTFENIL.

ω_{calc}	ω_{esc}	$\omega_{\text{FT-Raman}}$	$\omega_{\text{FT-IR}}$	Atribuição dos modos vibracionais com PED* (%)
12	12			τ (C5'C6'C1'C) (10) + τ (C6'C1'CC α) (12) + τ (C8'O4C4'C5') (47)
18	17			τ (C5'C6'C1'C) (18) + τ (C6'C1'CC α) (26) + τ (C8'O4C4'C5') (17)
20	19			τ (C α C β C1C2) (59) + τ (C1'CC α C β) (31)
47	45			δ (C α C β C1) (26) + δ (C1'CC α) (19) + δ (CC α C β) (28)
67	64	65m		τ (C4'C5'C6'C1') (14) + τ (C7'O5C6'C5') (33) + τ (C8'O4C4'C5') (12)
77	74			τ (C5'C6'C1'C) (12) + τ (C1'CC α C β) (10) + τ (CC α C β C1) (15) + γ (C β C2C6C1) (12)
102	98	86m		τ (C6'C3'C4'C5') (20) + τ (C7'O5C6'C5') (11) + τ (C9'O3C3'C4') (15)
103	99			τ (C7'O5C6'C5') (12) + τ (C9'O3C3'C4') (32)
111	107			τ (C3'C4'C5'C6') (10) + τ (C1'CC α C β) (23) + τ (C9'O3C3'C4') (12)
121	116			τ (C6'C1'CC α) (22) + τ (C7'O5C6'C5') (14)
147	142	137vw		δ (O3C3'C6') (12) + τ (HC9'O3C3') (27) + τ (C9'O3C3'C4') (18)
198	191			τ (C3'C4'C5'C6') (15) + τ (C6'C3'C4'C5') (15) + τ (C4'C5'C6'C1') (19) + γ (O4C5'C3'C4') (12)
201	193			δ (C6'C1'C) (16) + δ (C β C1C6) (11) + δ (O5C6'C5') (17) + δ (C7'O5C6') (14)
206	198			δ (O4C4'C3') (15) + δ (O5C6'C5') (16)
230	221			δ (C9'O3C3') (18) + γ (O3C4'C6'C3') (22)
243	234			τ (HC8'O4C4') (58) + τ (C6'C3'C4'C5') (13)
264	254			δ (O4C4'C3') (14) + δ (C β C1C6) (13) + δ (C8'O4C4') (16)
277	267			τ (C6C5C4C3) (14) + τ (C3'C4'C5'C6') (30) + τ (CC α C β C1) (21)
286	275	287vw		τ (HC7'O5C6') (52)
312	300			τ (C5'C6'C1'C) (23) + τ (C3'C4'C5'C6') (22)
324	312	325vw		δ (O3C3'C6') (24)
356	343			δ (C6'C1'C) (14) + δ (C8'O4C4') (31)
376	362			δ (C6'C3'C4') (10) + δ (C3'C4'C5') (16) + δ (O3C3'C6') (11)
413	398	382vw		τ (HC2C3C4) (10) + τ (HC6C5C4) (12) + τ (C6C5C4C3) (33) + τ (C5C4C3C2) (20) + τ (C1C2C3C4) (18)
429	413	420vw	417m	ν (C1'C) (12) + δ (C4'C5'C6') (16) + δ (C8'O4C4') (11)
439	423			δ (O2C6'C1) (33)
467	450	453vw	454m	δ (C7'O5C6') (11)
498	479			γ (C β C2C6C1) (33)
501	482	487vw	486m	δ (C α C β C1) (10) + δ (C1'CC α) (15)
514	495	499vw	496vw	δ (C9'O3C3') (23)
574	553	517vw		ν (C3'C4') (18) + ν (O4C4') (10) + δ (C6'C3'C4') (15)
592	570	577vw	575s	δ (O1CC α) (26) + δ (C1C2C3) (18)
622	599	593vw	595vw	τ (HC5'C6'C1) (23) + γ (O1C3'C1'C6') (22) + γ (O2C5'C3'C4') (28)
633	609			δ (C6C5C4) (22) + δ (C4C3C2) (38) + δ (C1C2C3) (13)
641	617	618vw	617m	ν (C1'C) (11) + δ (O1CC α) (10) + δ (C3'C4'C5') (11)
655	631	630vw		γ (O1C α C1'C) (15) + γ (O5C5'C1'C6') (40)
693	667	656vw		τ (C1C2C3C4) (13) + γ (O2C3'C1'C6') (13) + γ (O3C4'C6'C3') (13) + γ (O4C5'C3'C4') (15)
701	675		688vs	τ (HC4C5C6) (10) + τ (C3'C4'C5'C6') (10) + τ (C1C2C3C4) (26) + γ (O2C3'C1'C6') (13)

731	704			γ (O1C α C1'C) (32)
753	725	721vw	720vs	δ (O4C4'C3') (11) + δ (O5C6'C5') (21)
767	738	729vw		ν (O3C3') (14) + δ (O1CC α) (16) + δ (C5C4C3) (10)
782	753	756vw	757vs	τ (HC3C4C5) (11) + τ (HC4C5C6) (10) + τ (HC5C4C3) (11) + τ (C1C2C3C4) (17) + γ (O1C α C1'C) (13) + γ (C β C2C6C1) (13)
802	772	768vw	765vs	τ (HC5'C6'C1) (69)
851	819	781vw		ν (C β C1) (10) + δ (C5C4C3) (19)
853	821	798vw	792vs	τ (HC2C3C4) (24) + τ (HC6C5C4) (27) + τ (HC3C4C5) (21) + τ (HC5C4C3) (19)
899	865	835vw	837s	τ (HC α C β C1) (57)
916	882	872vw	871vs	δ (C α C β C1) (11) + δ (O23CC α) (10) + δ (CC α C β) (14)
932	897	902vw	893vs	τ (HC α C β C1) (11) + τ (HC2C3C4) (24) + τ (HC6C5C4) (22) + τ (HC4C5C6) (29)
966	930			τ (HO2C6'C3') (92)
973	937			τ (HC2C3C4) (18) + τ (HC6C5C4) (15) + τ (HC3C4C5) (25) + τ (HC5C4C3) (33)
989	952			ν (O4C4') (31) + ν (O3C9') (13)
999	962	969vw	964vs	τ (HC3C4C5) (23) + τ (HC4C5C6) (30) + τ (HC5C4C3) (17) + τ (C6C5C4C3) (10)
1015	977			δ (C6C5C4) (33) + δ (C4C3C2) (16) + δ (C5C4C3) (20)
1026	988	990w	990vs	ν (O5C7') (32) + ν (O4C8') (13) + δ (C4'C5'C6') (12)
1037	998	1000m	998vs	τ (HC α C β C1) (15) + τ (HC β C1C2) (70)
1045	1006		1009vs	ν (O3C9') (50)
1056	1017	1027vw	1025s	ν (C4C3) (21) + ν (C5C4) (27)
1111	1069			ν (C6C5) (12) + ν (C3C2) (19) + δ (HC2C3) (10) + δ (HC6C5) (12) + δ (HC4C3) (15)
1115	1073	1085s	1074vs	ν (CC α) (19) + ν (O4C8') (19)
1157	1114	1117vw	1123vs	ν (O2C6') (16) + ν (O5C7') (21)
1171	1127			r (C8'H ₃) (26) + τ (HC8'O4C4') (70)
1176	1132			r (C7'H ₃) (26) + τ (HC7'O5C6') (70)
1177	1133			r (C9'H ₃) (26) + τ (HC9'O3C3') (70)
1189	1145			δ (HC3C2) (17) + δ (HC4C3) (30) + δ (HC5C4) (16)
1209	1164	1154vw	1152vs	δ (HC2C3) (26) + δ (HC6C5) (19) + δ (HC3C2) (13) + δ (HC5C4) (15)
1218	1172			r (C9'H ₃) (10) + τ (HC9'O3C3') (44)
1223	1177	1181m		τ (HC8'O4C4') (27)
1239	1193			ν (C1'C) (11) + δ (HC5'C6') (18) + δ (HC α C β) (13)
1240	1194			ν (C1C2) (13) + ν (C β C1) (21) + δ (HC β C α) (16)
1248	1201	1204m	1206vs	ν (O4C4') (13) + ν (O5C6') (14) + δ (HC5'C6') (14)
1274	1226	1242m	1246vs	ν (C4'C5') (13) + ν (O3C3') (24)
1320	1271	1268s	1268vs	ν (C6'C3') (17)
1332	1282			δ (HC β C α) (17)
1356	1305	1302vw	1287vs	ν (O2C6') (18)
1357	1306			ν (C α C β) (13) + ν (C1C2) (11) + δ (HC β C α) (30)
1368	1317	1318m	1317vs	δ (HC2C3) (24) + δ (HC6C5) (22) + δ (HC4C3) (13)
1381	1329	1378vw	1333vs	ν (C5'C6') (10) + δ (HC α C β) (24)
1477	1422		1419vs	wag (C9'H ₃) (54) + wag (C8'H ₃) (14)
1482	1427			wag (C9'H ₃) (10) + wag (C8'H ₃) (11) + wag (C7'H ₃) (34)
1490	1434			δ (HC4C3) (12) + δ_{as} (C9'H ₃) (12)
1492	1436			δ (HC4C3) (10) + δ_{as} (C9'H ₃) (22)
1500	1444	1440w	1439vs	δ_{as} (C8'H ₃) (63) + τ (HC8'O4C4') (12)
1503	1447			δ_{as} (C9'H ₃) (19) + δ_{as} (C8'H ₃) (15) + δ_{as} (C7'H ₃) (24)
1504	1448			δ_{as} (C7'H ₃) (69) + τ (HC7'O5C6') (14)
1508	1452			δ_{as} (C8'H ₃) (62) + τ (HC8'O4C4') (11)
1516	1459		1455vs	δ_{as} (C8'H ₃) (17) + δ_{as} (C7'H ₃) (33)
1518	1461	1460vw		δ (HO2C6') (17) + δ_{as} (C7'H ₃) (10)
1527	1470		1468vs	δ_{as} (C9'H ₃) (77) + τ (HC9'O3C3') (14)
1531	1474			ν (CO1) (12) + δ_{as} (C7'H ₃) (28) + δ_{as} (C8'H ₃) (10)
1540	1482	1487s		δ (HC2C3) (17) + δ (HC6C5) (15) + δ (HC3C2) (15) + δ (HC5C4) (19)
1615	1555	1554vs	1558vs	ν (CO1) (20) + ν (C4'C5') (14)

1629	1568			v (C3C4) (15)
1632	1571	1576m		v (C5'C6') (12) + v (C3'C4') (10) + v (C3C4) (10)
1657	1595	1596vs		v (C6C5') (30) + v (C3C2) (10)
1677	1614			v (C6'C3') (15) + δ (HO2C6') (30)
1694	1631	1624vs	1629vs	v (C α C β) (44) + v (O1C) (13)
2871	2710			v (O2H) (95)
3019	2850	2842vw		v _s (C9'H ₃) (99)
3028	2858			v _s (C7'H ₃) (100)
3058	2887	2882vw	2881s	v _s (C8'H ₃) (99)
3095	2922		2915s	v _{as} (C7'H ₃) (100)
3111	2937	2946vw	2946s	v _{as} (C9'H ₃) (100)
3137	2961			v _{as} (C8'H ₃) (99)
3148	2972	2975vw	2972s	v _{as} (C9'H ₃) (99)
3152	2975			v _{as} (C7'H ₃) (89)
3157	2980	2988vw	2986s	v _{as} (C8'H) (98)
3177	2999	3007vw	3004s	v (C β H) (56) + v (C2H) (23) + v (C3H) (10)
3180	3002			v (C β H) (37) + v (C3H) (15) + v (C4H) (18) + v (C5H) (19)
3185	3007			v (C2H) (36) + v (C6H) (10) + v (C5H) (35)
3194	3015			v (C2H) (22) + v (C6H) (16) + v (C3H) (19) + v (C4H) (31) + v (C5H) (11)
3203	3024		3021s	v (C6H) (47) + v (C3H) (29)
3210	3030			v (C6H) (21) + v (C3H) (20) + v (C4H) (31) + v (C5H) (23)
3255	3073	3058vw		v (C5'H) (99)
3281	3097		3113s	v (C α H) (99)

Nomenclatura: τ = torção (twisting); δ = deformação (bending); δ_{as} = deformação assimétrica (asymmetric bending) r = balanço (rocking); wag = sacudida (wagging); sc = tesoura; (scissoring); v = estiramento (stretching); v σ = estiramento simétrico (symetric stretch); v_{as} = estiramento assimétrico (asymmetric stretch); vs= muito forte (very strong); s = forte (strong); m = média (medium); w = fraca (weak); vw =muito fraca (very weak).

A atribuição das vibrações moleculares para o composto sintético (2E)-1-(2'-hidroxi-3',4',6'-trimetoxifenil)-3-(fenil)-prop-2-en-1-ona mostra que a maioria das bandas no FT-Raman e FT-IR correspondem a mistura de modos vibracionais.

Na região espectral de menores números de onda inferior a 200 cm⁻¹ foram modos internos mistos relacionados principalmente a modos de torção C'C'C'C', C'O'C'C' e deformação angular do O'C'C'. Lembramos que o cálculo DFT foi realizado para uma molécula não fornece informações sobre os modos de rede e, portanto, os números de onda calculados e escalonados são apenas parcialmente confiáveis nesta faixa. Portanto, os modos que aparecem na região do pequeno número de onda podem ser o resultado da combinação das deformações dos anéis (conforme calculado) com os modos de rede (como esperado).

A maioria das bandas nos espectros Raman e no infravermelho na região de 200 a 1000 cm⁻¹ correspondem a misturas de modos de vibração do tipo torções, deformações angulares e as deformações fora do plano. As torções dos átomos HCCC, CCCC, C'C'C'C' são

predominante em toda essa região, enquanto que as deformações fora do plano dos átomos O'C'C'C' ocorrem com mais frequência na região que compreende $622 \text{ cm}^{-1} \leq \omega_{\text{calc}} \leq 782 \text{ cm}^{-1}$.

Na região de 1000 a 1800 cm^{-1} observa-se a predominância de modos de estiramentos dos átomos C-C, C'-C' e C'-O'. Mas também é possível observar uma localização acentuada dos modos CH₃. As bandas de estiramento C-C e C'-O são observados nas regiões entre $1045 \text{ cm}^{-1} \leq \omega_{\text{calc}} \leq 1157 \text{ cm}^{-1}$, $1239 \text{ cm}^{-1} \leq \omega_{\text{calc}} \leq 1381 \text{ cm}^{-1}$ e $1615 \text{ cm}^{-1} \leq \omega_{\text{calc}} \leq 1694 \text{ cm}^{-1}$. Vale ressaltar que o modos de estiramento da carbonila C=O é observado tanto no Raman em 1424 cm^{-1} como no espectro infravermelho em 1429 cm^{-1} . Vibrações rocking ocorrem nos números de onda calculados 1171, 1176, 1177 e 1488 cm^{-1} , porém esses modos não têm correspondência com nenhuma banda Raman e IR do composto HYTFENIL. Uma banda IR de muito forte intensidade em 1419 cm^{-1} ($\omega_{\text{cal}} = 1477 \text{ cm}^{-1}$) que foi identificada como sendo associada as vibrações *wagging* do C'H₃. Vibração tipo deformação assimétrica do C'H₃ aparecem na região entre $1490 \text{ cm}^{-1} \leq \omega_{\text{calc}} \leq 1531 \text{ cm}^{-1}$. Uma banda IR de muito forte intensidade em 1455 cm^{-1} ($\omega_{\text{cal}} = 1516 \text{ cm}^{-1}$) e foi identificada como sendo associada as deformações assimétricas do C17H₃ e do C18H₃.

Na região entre 2800 cm^{-1} e 4000 cm^{-1} são observadas principalmente bandas originadas a partir de estiramento dos grupos funcionais CH, C'H, C'H₃ e OH. As bandas Raman e infravermelho nesta região são de baixa intensidade e são principalmente associadas aos grupos metil da molécula.

5.2 Atividade Antimicrobiana e Moduladora

Este é o primeiro estudo da atividade antibacteriana e moduladora do composto sintético HYTFENIL derivado da substância natural 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona (C₁₁O₅H₁₄) isolada de *Croton anisodontus* Müll.,

5.2.1 Concentração Inibitória Mínima e Moduladora

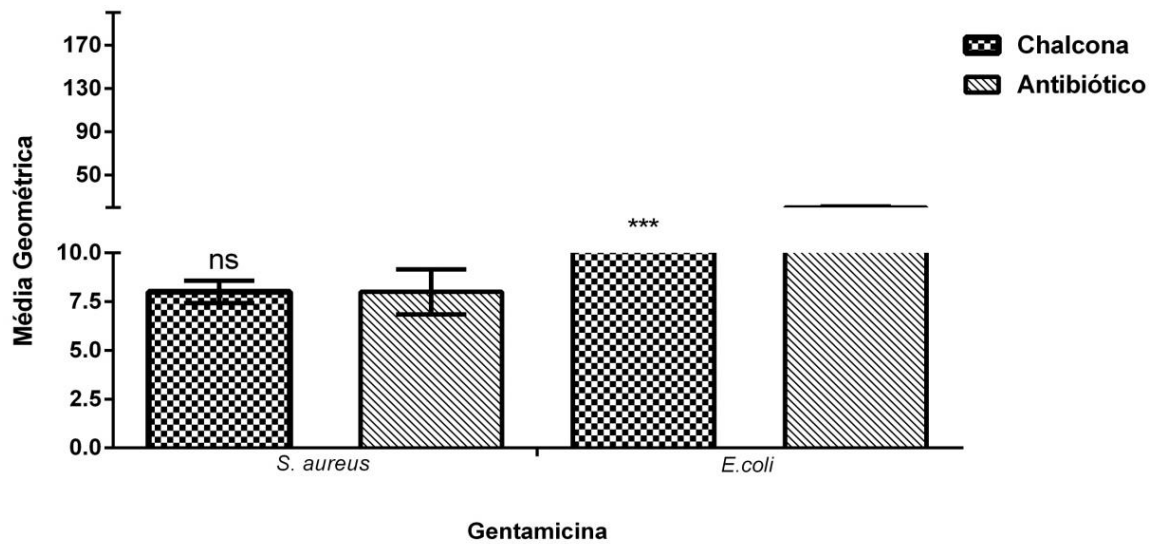
A concentração Inibitória Mínima (CIM) do composto foi de 1024 µg mL⁻¹ para todas as cepas bacterianas testadas, portanto não houve diferença na sensibilidade ao composto entre as cepas. Foi observado que a CIM do DMSO (1024 µg mL⁻¹) foi semelhante a do composto. Logo, não se pode afirmar que o composto possui efeito inibidor do crescimento das bactérias *Escherichia coli* ATCC 10536 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

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 principalmente de sua estrutura química (DORMAN *et al.*, 2000).

Na determinação das CIMs, um efeito é tido como sinérgico quando observa-se uma contribuição favorável na ação do antibiótico junto ao composto, com diminuição da sua concentração inibitória mínima. Já o efeito antagônico, ocorre justamente o oposto, com diminuição ou inativação no efeito do antibacteriano (COUTINHO *et al.*, 2011).

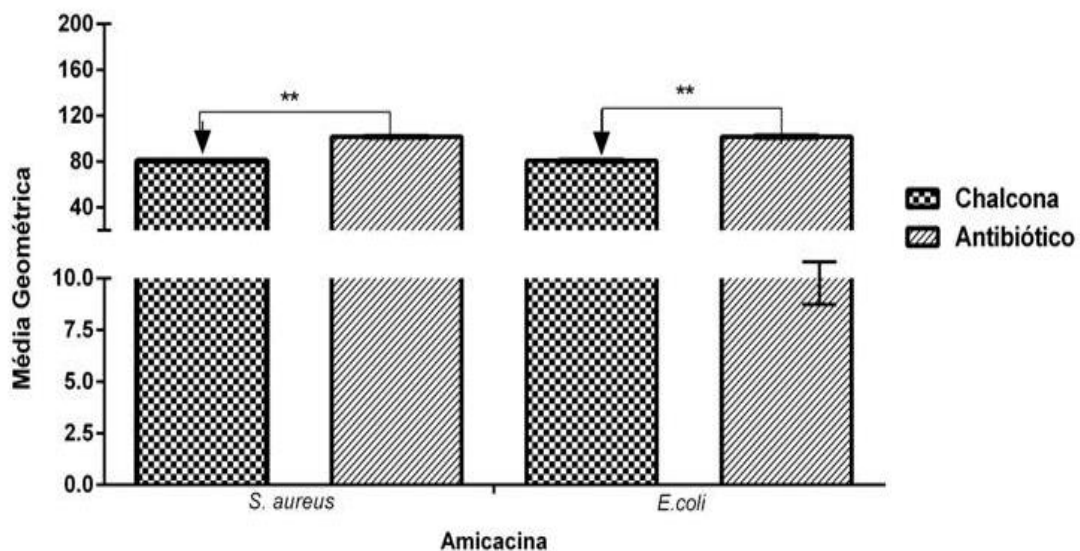
Na CIM dos aminoglicosídeos na presença e na ausência da substância sintética HYTFENIL na concentração CIM/8 (128 µg/mL), frente às linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* apresentaram um efeito inibidor significativo no crescimento das bactérias. Um efeito antagonista foi observado quando associada a droga gentamicina frente a bactéria *Staphylococcus aureus*, porém obteve sinergismo quando associada esse aminoglicosídeo é modulado com a bactéria *Escherichia coli* com resultado estatisticamente significativo (p<0,001). Já a combinação da substância sintética junto com antibiótico amicacina frente as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* ocorreu sinergismo com significância de p<0,01. Estes resultados demonstram que as plantas medicinais podem se tornar um importante adjuvante das drogas antibacterianas e no controle da resistência bacteriana.

Figura 7. Concentração Inibitória Mínima (CIM) do antibiótico gentamicina na presença e na ausência da substância HYTFENIL, em uma concentração CIM (128 µg/mL), frente a bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.



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

Figura 8. Concentração Inibitória Mínima (CIM) do antibiótico amicacina na presença e na ausência da substância HYTFENIL, em uma concentração CIM (128 µg/mL), frente a bactéria *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.



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

Um estudo realizado sobre a substância natural 2-hidroxi-3,4,6 trimetoxiacetofenona, indicaram que o contato direto, frente à bactéria *S. aureus* na associação com o antibiótico amicacina ocorreu um sinergismo com significância com $p < 0,001$ (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

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 (HO *et al.*, 2000), sendo capazes de alterar a parede celular ou destruir a membrana plasmática facilitando absorção das drogas (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).

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 *E. coli* 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).

6 CONCLUSÕES

O propósito maior deste trabalho é visibilizar a caracterização estrutural e espectroscópica da substância sintética (2*E*)-1-(2'-hidroxi-3',4',6'trimetoxifenil)-3-(fenil)-prop-2-en-1-ona extraída de uma planta medicinal e sintetizada.

Adicionalmente, pretende-se que a experiência, técnicas, e os resultados deste trabalho de investigação básica, possibilite o entendimento das propriedades físicas e químicas de compostos sintéticos. Deste conhecimento científico almeja-se agregar valor econômico a essas substâncias por meio de fabricação de novas drogas e/ou produtos e desenvolvimento de novas aplicações tecnológicas de biomoléculas que sejam compartilhados com os setores produtivos afins.

REFERÊNCIAS

ALCARRAZ, M.J. *et al.* Role of nuclear factor – κ B and heme oxygenase -1 in the mechanism of action of an anti-inflammatory chalcona derivative in RAW 264.7 cells. *British Journal of Pharmacology*. v. 142, p. 1191 – 1199, 2004.

ALMEIDA, A. B. A. *et al.* Antiulcerogenic effect and cytotoxic activity of semi-synthetic crotonin obtained from *Croton cajucara* Benth. *European Journal of Pharmacology*, v. 472, p. 205-212, 2003.

ÁVILA, H.P.; SMÂNIA, E.F.; MONACHE, F.D.; JUNIOR, A.S. Structure-activity relationship of antibacterial chalconas. *Bioorganic. & Medicinal Chemistry*. v. 16, p. 9790 – 9794, 2008.

BABILI, F. E. *et al.* Molluscicidal activity against *Bulinus truncatus* of *Croton campestris*. *Fitoterapia*, n. 77, p. 384-387, 2006.

BARBOSA, L. A. Resistência bacteriana decorrente do uso abusivo de antibióticos: informações relevantes para elaboração de programas educativos voltados para profissionais da saúde e para a comunidade. *Acervo da Iniciação Científica*, n. 1, 2014.

BARREIRO, E.D; FRAGA, C.A.M. *Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos* . Artmed Editora. Porto Alegre, 2001.

BERRY, P.E. *Croton ResearchNetwork*. University of Wisconsin-Madison. 2002.

Disponível

em:<<http://www.cria.org.br/eventos/tdbi/flora/presentations/PaulBerry/crotonFB/brazil.html>>. Acesso em: 8 abr. 2013.

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.

BOECK, P. *et al.* Antifungal activity and Studies on mode of action of novel xanthoxiline-driven chalconas. *Archiv der Pharmazie - Chemistry Life Scientific*, v. 338, p. 87 – 95, 2005.

BRANDÃO, A. Bactérias, essas velhas, perigosas e benéficas conhecidas, *Pharmacia Brasileira* nº 83 - Setembro/Outubro/Novembro 2011.

BRICKS, L. F. Uso judicioso de medicamentos em crianças. *J pediatr*, v. 79, n. Supl 1, p. S107-S114, 2003.

BRUICE, P. Y. *Química Orgânica*. São Paulo: Pearson Prentice Hall, v. 1, 2006.

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

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

CAMPOS, B.F. Síntese de novas moléculas com potencial terapêutico: Imidas cíclicas, chalconas e compostos relacionados. 2007. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 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.

CHIARRADIA, L.D. *et al* Synthesis and pharmacological activity of chalconas derived from 2,4,6-trimethoxyacetophenone in RAW 267.7 cells stimulated by LPS: Quantitative structure-activity relationships. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.16, p. 658 – 667, 2008.

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 DF, A. M. F.; BARBOSA-FILHO J. M. Morfo-anatomia foliar de *Ocotea gardneri* (Meisn.) Mez (Lauraceae/Lauroideae). *Rev Bras de Farmacogn*; 16:(2):178-84, 2006.

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.

DEL FIO, F. S.; DE MATTOS FILHO, T. R.; GROPPPO, F. C. Resistência bacteriana. *Revista Brasileira de Medicina* (Rio de Janeiro), v. 57, n. 10, p. 1129-1140, 2000.

DE OLIVEIRA, K. R.; MUNARETTO, P. Uso racional de antibióticos: responsabilidade de prescritores, usuários e dispensadores. *Revista Contexto & Saúde*, v. 10, n. 18, p. 43-51, 2013.

DIMMOCK, J.R.; ELIAS, D.W.; BENAZELY, M.A.; KANDEPU, N.M. Bioactivities of chalconas. *Current Medicinal Chemistry*, v. 6(12), p. 1125 – 11249, 1999.

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.

FABRI RL, Nogueira MS, Moreira JD, Bouzada ML. Scio E. Identification of antioxidant and antimicrobial compounds of *Lippia* species by bioautography. *J Med Food*; 14:(7-8):840-6, 2011.

FENNELL, C.W.; LINDSEY, K.L.; MCGRAW, L.; SPARG, S.G.; STAFFORD, G.I.; ELGORASHI, E. E.; GRACE, O.M.; STADEN, J. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: pharmacological screening and toxicology. *J. Ethnopharmacol.*, v. 94, p. 205-217, 2004.

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.

FREIRE JR, O; PESSOA JR, O; BROMBERG, JL. Teoria Quântica: estudos históricos e implicações culturais [online]. Campina Grande: EDUEPB; São Paulo: Livraria da Física, 2011. 456 p. ISBN 978-85-7879-060-8. Available from SciELO Books

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

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. Quím. Nova, vol.33, n.9, pp. 1829-1829, 2010.

FIGUEIREDO, D.Q. *et al.* Detecção de metalo-betalactamases em amostras hospitalares de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. *J Bras PatolMed 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.

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.

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

HELUANI CS, Catalan CAN, Hernández LR, Tapia EB, Natan PJ. *J Nat Prod*; 63, 222-225, 2000.

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.

KENDAL, A. *et al* Potent antimetabolic and cell growth inhibitory properties of substituted chalcones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 8, p. 1051 – 1056, 1998.

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

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

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

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.

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

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

MURRAY, P. R. *Microbiologia Médica*. 4 ed. [S.l.]: Elsevier, 2004

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

NI, L.; MENG, C.Q.; SIKOKSKI, J.A. Recent advances in therapeutic chalcones. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, v. 14(12), p. 1669 – 1691, 2004.

NOWAKOWSKA, Z.A. A review of anti-inflammatory chalcones. *European Journal of Chemistry*, v. 42, p. 125 – 137, 2007.

OLIVEIRA A. C.; SILVA R. S. Desafios de cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. *Rev Elet Enferm*; 10:189-97, 2008.

OLIVEIRA, I.M.M. *et al.* Vibrational spectra and DFT calculations of sonderianin diterpene, *Journal of Molecular Structure*, 1099, 226-231, 2015.

OLIVEIRA, A. C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; SANTOS, C. F.; MORAIS, S. M.; COELHO-SOUZA, A. N. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton zehntnerii* mice. *Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research*, v. 34, n.11, p. 1471–1474, 2001a.

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

OLIVEIRA, M.J.R; SIMÕES, M.J.S; SASSI, C.R.R. Fitoterapia no sistema de saúde pública (SUS) no Estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu v. 8, n. 2, p. 39-41, 2006.

OLIVERIA, M T..A. Estudos microbiológicos e espectroscopia vibracional do composto 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona isolado de *Croton anisodontus* Mull. Arg (Euphorbiaceae). Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular do departamento de Química Biológica da Universidade Regional do Cariri – URCA, 67 f, 2013.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. *Introduction to Spectroscopy*. 4. ed. Belmont - CA: Brooks/Cole, Cengage Learning, 744 p. 2009.

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

REZENDE HA, COCCO MIM. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. Revista Escola Enfermagem USP; 36(3): 282-8, 2002.

RICCI, E. G. Aplicação do método de análise dos componentes principais e espectroscopia Raman para a avaliação da mistura de etanol-metanol. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Universidade de França. França, 2008.

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.

ROCHA, D. P. *et al.* Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. Quim. Nova, v. 34, p. 111-118, 2011.

ROCHA, D. P. *et al.* Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. Química Nova, v. 34, n. 1, p. 111-118, 2011.

ROSA, R.L.; BARCELOS, A.L.V. and BAMPI, G. Investigação do uso de plantas medicinais no tratamento de indivíduos com diabetes melito na cidade de Herval D' Oeste - SC. Rev. bras. plantas medicinais, vol.14, n.2, pp. 306-310, 2012.

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

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

SANTOS, J. L. *et al.* Síntese e modelagem molecular do novo derivado indolinônico como candidato a antiinflamatório COX-2 seletivo. Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences, v. 28, n.2, p. 235-240, 2007.

SANTOS, N, DE Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar, Texto Contexto Enferm, 13(n.esp):64-70, 2004.

SCHNEIDER, R.N.; NADVORNY, A.; SCHMIDT, V. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados de *Escherichia coli* obtidos de água superficiais e subterrâneas, em área de produção de suínos. Biotemas, v. 22, n. 3, p. 11-17, 2009.

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, N.; SILVEIRA, N. F. A.; YOKOYA, F.; OKAZAKI, M. M. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em vegetais e resistência aos agentes de desinfecção de verduras. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 23, n. 2, p. 167-173, 2003.

SILVA, R. M. *et al.* Blood glucose and triglyceride-lowering effect of trans-dehydrocrotonin, a diterpene from *Croton cajucara* Benth., in rats. Diabetes, Obesity & Metabolism, v.3, p.452-456, 2001.

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.

SOCORRO, S. R. M. S. *et al.* Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.47, p.1895-901, 2003.

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

SOUZA, J. S; FERRÃO, M. F. Aplicações da espectroscopia no infravermelho no controle de qualidade de medicamentos contendo diclofenaco de potássio. Parte I : Dosagem por regressão multivariada. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. vol. 42, n. 3, jul./set., 2006.

STEPP, J. R. The role of weeds s sources of pharmaceuticals. J. Ethnopharmacol., v. 92, p. 163-166, 2004.

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

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Princípios de análise instrumental. 5.ed. Porto Alegre: Bookman. 836 p; 2002.

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.

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

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.

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

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C. e CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. Quím. Nova, vol.24, n.1, p. 147-152, 2001.

ZUANAZZI, J.A.S. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Orgs). Farmacognosia: da Planta ao medicamento. 3ed. Florianópolis: Editora da UFSC, Porto Alegre: Editora da UFRGS, Cap. 23, p. 499 – 526, 2001.