



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GABRIELE INÁCIO DE OLIVEIRA

**ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO DE TERPENÓIDES E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÁCIDO
CAURENÓICO DE *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski**

Londrina

2023

GABRIELE INÁCIO DE OLIVEIRA

**ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO DE TERPENÓIDES E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÁCIDO
CAURENÓICO DE *Sphagneticola trilobata* (L.) PRUSKI**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Nilton Syogo Arakawa

Co-orientador: Prof. Dr. Gerson Nakazato

Londrina

2023

Oliveira, Gabriele Inácio de.

ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO DE TERPENÓIDES E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÁCIDO CAURENÓICO DA *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski / Gabriele Inácio de Oliveira. - Londrina, 2023.
45 f. : il.

Orientador: Nilton Syogo Arakawa.

Coorientador: Gerson Nakazato .

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2023.

Inclui bibliografia.

1. terpenos, - Tese. 2. antimicrobiana - Tese. 3. isolamento - Tese. 4. nanopartículas - Tese. I. Arakawa, Nilton Syogo . II. Nakazato , Gerson . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. IV. Título.

CDU 61

GABRIELE INÁCIO DE OLIVEIRA

**ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO DE TERPENÓIDES E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÁCIDO
CAURENÓICO DE *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski**

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Nilton Syogo Arakawa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Renata Katsuko Takayama Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Elisa Yoko Hirooka
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 26 de abril de 2023.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor orientador Nilton Syogo Arakawa, por ter me aceito no programa, pela amizade e por ter me guiado para buscar as respostas.

Ao meu co-orientador, Professor Dr. Gerson Nakazato do Centro de Ciências Biológicas da UEL pelo fornecimento das nanopartículas de prata e pela disponibilização do laboratório para a realização dos testes.

Ao Laboratório de Espectroscopia (ESPEC) por possibilitar a obtenção dos espectros de RMN do presente trabalho;

Ao pessoal do LabBioTransFito por todas as conversas, discussões e amizade.

Aos meus amigos que se fizeram presente nesse processo, sempre me motivando e fortalecendo.

A CAPES – Demanda Social, pela bolsa concedida.

Ao CNPq – Universal Processo no. 408384/2016-6, e a Fundação Araucária/SETI/UEL – Programa de Pesquisa Básica e Aplicada – Protocolo no. PBA – 2022011000087.

A Universidade Estadual de Londrina, pela estrutura e materiais cedidos para o desenvolvimento do projeto.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Londrina pela oportunidade concedida.

OLIVEIRA, Gabriele Inácio. **ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO DE TERPENÓIDES E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÁCIDO CAURENÓICO DE *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski**. 2023. 54 páginas. Dissertação de Mestrado em Ciências farmacêuticas – Departamento de Ciências farmacêuticas da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023

RESUMO

A comercialização e aplicação de produtos naturais são tendências em expansão no mercado brasileiro e mundial, cujos terpenoides bioativos como o ácido caurenóico (AC) e ácido desidroabiético (AD), apresentam potencial para desenvolver novo fármaco. No trabalho o extrato das raízes de *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski foi submetido a diversas técnicas cromatográficas para isolar AC e AD, sendo ambos identificados através de métodos espectroscópicos de Ressonância Magnética nuclear, RMN (^1H e ^{13}C). A atividade antimicrobiana foi avaliada de AC e da BioAgNP contra *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* procedendo determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e, promoveu-se a associação de AC com Nanopartícula Biogênica (BioAgNP), pela técnica de checkerboard. As estruturas moleculares de AC e AD foram confirmadas pelo método de RMN. Em relação aos ensaios microbiológicos, a BioAgNP inibiu o crescimento do *S. aureus* com CIM de (125 μM), *E. coli* de (31,25 μM) e a *C. albicans* (7,81 μM). O AC inibiu o *S. aureus* em com CIM de (125 μM), mas não ocorrendo o mesmo com *E. coli* e *C. albicans*. A associação BioAgNP com AC apresentou efeito sinérgico contra *S. aureus*, antagonista para *E. coli*, e aditivo para *C. albicans*, devendo-se prosseguir estudos futuros visando maior aplicabilidade dessa associação com segurança e eficácia.

Palavras chave: diterpenos, antimicrobiano, isolamento, terpenos, nanopartícula de prata biogênica.

OLIVEIRA, Gabriele Inácio de. **ISOLATION, PURIFICATION OF TERPENOIDS AND EVALUATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF KAURENOIC ACID FROM *S. trilobata* (L.) Pruski. 2023. 54 pages.** Master Degree Final Paper (Pharmaceutical Sciences) - Department of Pharmaceutical Sciences, University State of Londrina, Londrina, 2023.

ABSTRACT

The commercialization and application of natural products are expanding trends in the Brazilian and world markets, whose bioactive terpenoids, such as kaurenoic acid (KA) and dehydroabietic acid (DA), have the potential to develop new drugs. In this work, the extract of the roots of *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski was submitted to several chromatographic techniques to isolate KA and DA, both identified by nuclear magnetic resonance spectroscopic methods, NMR (1H and 13C). The antimicrobial activity was evaluated of KA and BioAgNP against *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and, the association of KA with Biogenic Nanoparticle (BioAgNP) was promoted by the checkerboard technique. The molecular structures of KA and DA were confirmed by NMR method. Regarding microbiological assays, BioAgNP inhibited the growth of *S. aureus* with MIC of (125µM), *E. coli* of (31.25µM) and *C. albicans* (7.81µM). KA inhibited *S. aureus* at MIC of (125µM), but not the same with *E. coli* and *C. albicans*. The association BioAgNP with KA showed synergistic effect against *S. aureus*, antagonist for *E. coli*, and additive for *C. albicans*, and future studies should be pursued aiming a greater applicability of this association with safety and efficacy.

Keywords: diterpenes, antimicrobial, isolation, terpenes, biogenic silver nanoparticle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Florescência da <i>Sphagneticola trilobata</i> (L.) Pruski.....	14
Figura 2	Estrutura química de diterpenos A-bicíclicos (p. ex. labdano), B-tricíclicos (p. ex. abietano) e C-tetracíclicos (p. ex. caurano) respectivamente.	16
Figura 3	Estrutura de ácido caurenóico.....	17
Figura 4	Estrutura de ácido desidroabiético.....	18
Figura 5	Fluxograma das etapas do isolamento.....	26
Figura 6	Cromatografia de camada delgada de composto isolado (a) e o cristal isolados das raízes de <i>S. trilobata</i> (L.) Pruski obtido após a CLV, subfração 3 na proporção de 96:04 Hex: AcOEt (b).....	27
Figura 7	Cromatografia de camada delgada de composto isolado(a) e o cristal isolado das raízes de <i>S. trilobata</i> (L.) Pruski obtido após CCDP, subfração 6 na proporção de 90:10 Hex: AcOEt (b).....	28
Figura 8	Espectros de RMN de ¹ H do ácido diidroabiético isolado, proveniente de uma subfração (90:10 Hex: AcOEt) das raízes de <i>S. trilobata</i> (L.) Pruski.....	34
Figura 9	Espectros de RMN de ¹³ C do ácido diidroabiético isolado, proveniente de uma subfração 6 (90:10 Hex: AcOEt) das raízes de <i>S. trilobata</i> (L.) Pruski.....	36
Figura 10	Espectro RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ , δ em ppm, mult. e J em Hz) do cristal isolado de uma subfração 3 (96:04 Hex: AcOEt) das raízes de <i>S. trilobata</i> (L.) Pruski.....	38
Figura 11	Espectro RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃ , δ em ppm) do cristal isolado de uma subfração 3 (96:04 Hex: AcOEt) das raízes de <i>S. trilobata</i> (L.) Pruski	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Proporções utilizadas das fases moveis e frações obtidas da primeira CLV realizada das raízes da <i>S. trilobata</i> (L.) Pruski.....	32
Tabela 2	Proporções utilizadas das fases moveis e frações obtidas da segunda CLV realizada das raízes da <i>S. trilobata</i> (L.) Pruski.....	33
Tabela 3	Dados de RMN de 1H (400,13 MHz, CDCl ₃) do cristal isolado de uma subfração 3 da <i>S. trilobata</i> (L.) Pruski.....	35
Tabela 4	Dados de RMN de 13C (100,61 MHz, CDCl ₃) comparativo com a literatura e o obtido em laboratório.....	37
Tabela 5	Dados do espectro de RMN 1H da substância (300 MHz, CDCl ₃ , δ em ppm, mult. EJ em Hz)	39
Tabela 6	Comparação dos Espectro de RMN 13C (75 MHz, CDCl ₃ , δ em ppm) de cristal isolado de uma subfração 3 (96:04- Hex: AcOEt) das raízes de <i>S. trilobata</i> (L.) Pruski, em relação à literatura.....	41
Tabela 7	Tabela contendo os resultados dos ensaios de CIM para o AC e BioAgNPs isolados e associados no ensaio do Checkerboard frente os microrganismos testados.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Ácido Caurenóico
AcOEt	Acetato de Etila
AD	Ácido Desidroabiético
BioAgNP	Nanopartícula de Prata Biogênica
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
C	Carbono
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CDCl ₃	Clorofórmio Deuterado
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CHCl ₃	Clorofórmio
CIF	Concentração Inibitória Fracionada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institut</i>
CLV	Cromatografia Líquida a Vácuo
DAS	Sabouraud Dextrose Agar
DMAPP	Difosfato de dimetilalila
Hex	Hexano
IPP	Difosfato de isopentenila
MeOH	Metanol
MEP	Metileritritol fosfato
MH	Mueller Hinton
MVA	Mevalonato
PBS	Tampão salina-fosfato
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	10
1.1.	PLANTAS MEDICINAIS	13
1.2.	SPHAGNETICOLA TRILOBATA L. PRUSKI	14
1.3.	TERPENÓIDES	15
1.4.	ÁCIDO CAURENÓICO (AC)	17
1.5.	ÁCIDO DESIDROABIÉTICO (AD)	18
1.6.	TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS	19
1.7.	NANOPARTÍCULA DE PRATA BIOGÊNICA	20
1.8.	MICROORGANISMOS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA	21
2.	OBJETIVO	23
2.1	OBJETIVO GERAL	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3.	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1.	Equipamentos e reagente	24
3.2	LOCAL DE ESTUDO	24
3.3	COLETA DE <i>SPHAGNETICOLA TRILOBATA(L.) PRUSKI</i>	24
3.4	PREPARO DO EXTRATO BRUTO	25
3.5	FRACIONAMENTO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA A VÁCUO	25
3.6	PROCESSO DE ISOLAMENTO	26
3.6.1	A FRAÇÃO 3 (96:04 – HEX-ACOET)	26
3.6.2	A FRAÇÃO 6 (96:10 – HEX-ACOET)	27
3.7	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA(CIM)	28
3.7.1	ENSAIO DE CIM PARA BACTÉRIA (CLSI, 2018)	28
3.7.2	ENSAIO DE MIC PARA FUNGO (CLSI, 2019)	29
3.8	DETERMINAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE AC E BIOAGNPS	30
3.8.1	ENSAIO CHERKERBOARD PARA BACTÉRIAS (CLSI, 2018),	30
3.8.2	ENSAIO CHERKERBOARD PARA FUNGO (CLSI, 2019)	31
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
4.1.	ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS DE TERPENÓIDES	32
4.1.1	ISOLAMENTO AD	33
4.1.2	ISOLAMENTO AC	37
4.2	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	42
4.2.1	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	42
4.2.1.1	COM RELAÇÃO AO ÁCIDO CAURENOICO	42
4.2.1.2	COM RELAÇÃO AO BIOAGNP	43

4.3	AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO BioAgNP COM O AC.....	45
5.	CONCLUSÃO.....	47
6.	REFERÊNCIA.....	48

1. INTRODUÇÃO

1.1 PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas medicinais seguiu a humanidade com contínua evolução, trazendo benefícios incomensuráveis à espécie humana. A busca de propriedades curativas vegetais é uma das primeiras manifestações de uma longa luta humana para uso favorável de natureza, prática ancestral eficaz de todo povo originário (TÓRRES et al., 2005).

As descobertas de propriedades medicinais ou nocivas de plantas ocorriam empiricamente, observando comportamento dos animais ou mesmo humanos frente ao comportamento dos animais ou mesmo humanos sob contato através de alguma via de absorção. As valiosas informações, inicialmente transmitidas verbalmente às gerações, passaram a ser compiladas e arquivadas após surgimento da escrita (ROCHA, 2013).

O resgate da aplicação de plantas medicinais decorre pela facilidade no acesso, aliado a característica saudável, por ser natural. Embora, o uso indiscriminado tende a aumentar as interações medicamentosas devido os inúmeros compostos presentes, podendo gerar sinergismo ou antagonismo farmacológico despertando interesse científico (BALBINO; DIAS, 2010).

Plantas medicinais apresentam diversas moléculas oriundas de metabolismo primário e secundário, sendo o último responsável por originar moléculas bioativas (TAIZ; ZEIGER, 2006). É imprescindível o conhecimento sobre rotas metabólicas biossintéticas classificadas em três grupos principais: os compostos fenólicos, alcaloides e terpenos. Os compostos fenólicos são derivados de ácido chiquímico e do ácido mevalônico, enquanto os alcalóides derivam de aminoácidos tirosina e triptofano e, do ácido chiquímico. Os terpenos originam da via de mevalonato e condensação de moléculas de glicose (LÓPEZ, 2006).

1.2. SPHAGNETICOLA TRILOBATA L. PRUSKI

Sphagneticola trilobata L. Pruski, pertencente à família Asteraceae, anteriormente denominada de *Wedelia paludosa* e *Acmella brasilienses*, é uma herbácea rasteira com longo período de vida e floração ao longo do ano (Figura 1). Popularmente é conhecida como pseudo-arnica, arnica-do-mato, arnica-do-brejo, vedélia, mal-me-quer do brejo, margaridão, pingo-de-ouro ou picão da praia (BATISTA et al., 2007; FUCINA et al., 2012). A espécie apresenta alto índice de enfolhamento, folhas simples, trilobadas e inflorescência do tipo capítulo isolado de coloração amarela. A distribuição geográfica é ampla, abrangendo toda América Latina, principalmente nas regiões tropicais úmidas, do México à Argentina (FERNANDES; RITTER, 2009); no Brasil, ocorre em todas as regiões (MONDI; BRINGEL, 2015).

Figura 1 – Florescência da *S. trilobata* Pruski.



Fonte: MONDIN; EGGERS, FERREIRA, 2010.

A espécie é considerada ornamental, sendo recomendada para jardim, seja em locais secos ou úmidos e sombreados, cuja estrutura rústica permite sobrevivência em umidade excessiva, ou seca. A medicina popular utiliza a espécie contra gripe, resfriado, enxaqueca, além de dor muscular, reumatismo, úlcera e artrite (MEENA et al. 2011, SANTOS et al., 2015; BALEKAR et al., 2012). Estudos fitoquímicos, demonstraram maior concentração de compostos com natureza esteroideal como estigmasterol (FUCINA et al., 2012), representado por cauranos (BACCARIN et al., 2009).

1.3. TERPENÓIDES

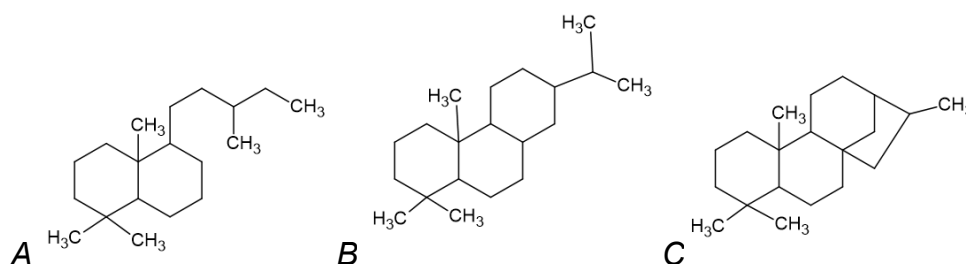
Os terpenoides se envolvem em diferentes funções nos vegetais, tendo sua biossíntese dividida em duas rotas principais. Temos uma derivada direto do ciclo de Calvin-Benson, que conduz a formação da 1-desoxi-D-xilulose (DOX), esse composto é encaminhado para a formação de 2-metileritritol fosfato (MEP) essa descoberta mostrou que é possível que hemiterpenos, monoterpenos, diterpenos e tetraterpenos sejam formados diretamente através dos carboidratos. Assim sendo, esta via metabólica ocorre dentro de plastídeos, especialmente dentro de cloroplastos. Isso se deve, pois, a captação de radiação luminosa e posterior conversão em compostos reduzidos ($FADH_2$, $NADH$ e $NADPH$) pelos fotossistemas I e II permitem que no estroma (matriz intracelular dos plastídeos) ocorra a formação e armazenamento de sacarídeos que utiliza de CO_2 como matriz para a formação de moléculas bioativas (KREIS et al. 2017).

A segunda rota ocorre nos cloroplastos a partir da glicose, com a formação de intermediários-chave: 1-desoxi-D-xilulose e MEP – originado IPP e DMAPP, sendo está via metabólica conhecida como, a via do ácido mevalônico, derivando ciclo de Krebs, a qual é responsável pela oxidação de metabólitos primários (essencialmente carboidratos e lipídios) para formação de energia metabólica na forma de trifosfato de adenosina (ATP). A via ocorre utilizando de acetil-Coenzima A na degradação de metabólitos primários para formação de ácidos orgânicos. Nesse

aspecto, o ácido mevalônico sofre ação de outras enzimas, transformando em triterpenos, esteroides e sesquiterpenos. Essa via ocorre na matriz intracelular da mitocôndria. Em ambos os sistemas, os compostos formados são levados ao hialoplasma celular por meio de canais transmembrana, conferindo motilidade a esses metabólitos (SIMÕES, 2017; TAIZ *et al.*, 2017).

O IPP e o DMAPP reagem do clássico modelo “cabeça-cauda” iniciando a formação de esqueletos terpênicos organizados de acordo com o número de unidades isoprênicas (5C), monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), triterpenos (C₃₀), tetraterpenos (C₄₀) e politerpenos. A classificação ocorre conforme origem biogenética e de acordo com o número de ciclização exibidos por esqueleto estrutural. A figura 2 apresenta diterpenos policíclicos, tendo acíclicos (fitanos), bicíclicos (labdanos, halimanos, clerodanos), tricíclicos (pimaranos, abietanos, cassanos, rosanos, vouacapanos, podocarpanos), tetracíclicos (trachlobanos, cauranos, afidicolanos, estemodanos, estemaranos, beyeranos, atisanos, giberelanos), diterpenos macrocíclicos (taxanos, cembranos, dafnanos, tiglianos, ingenanos) e compostos mistos (HANSON, 2004, 2009).

Figura 2 - Estrutura de diterpenos A-bicíclicos (ex. labdano), B-tricíclicos (ex. abietano) e C-tetracíclicos (ex. caurano) respectivamente.



Fonte: Própria autora, 2023.

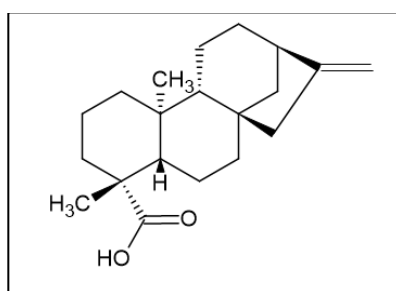
Dentre os terpenóides os diterpenos, tetracíclicos compostos por grupos de C₂₀ são moléculas de baixa volatilidade e pertencem a uma classe com ampla variedade de esqueletos, com ocorrência principalmente em plantas superiores e, associados às resinas. Entre diterpenos destaca-se as giberelinas, hormônios vegetais associados a germinação de semente, alongamento e cicatrização caulinar vegetal. Outro exemplo é o ácido caurenóico comum no gênero *Sphagneticola*,

Viguiera, Copaífera, Annona e Xylopia (DA COSTA,1996, FERNANDEZ-MARTIN, 2000; ARCIA, 2007).

1.4. ÁCIDO CAURENÓICO (AC)

O ácido caur-*ent*-16-em-19-oico (Figura 3) é um diterpeno caurânico tetracíclico (VILLA-RUANO et al., 2016) originado pela via de mevalonato, é um intermediário envolvido no metabolismo primário e secundário de planta. As evidências científicas destacam que este composto seja o mais relevante de origem natural, com atividade farmacológica, sendo um composto muito atraente para o desenvolvimento de novos medicamentos (CROTEAU et al., 2000). A ocorrência de AC foi comprovada em toda a planta *S. trilobata* (L.) Pruski, principalmente nas raízes (BACCARIN et al., 2009). Também isolados do guaco (*Mikania glomerata Sprengel*) (BANUTH, 1996) da copaíba (*Copaifera ssp*) (BIVIATTI, 2006) e da arnica brasileira (*Solidago chilensis*) (COOPER-DRIVER,1987, BOHLMANN, 1980).

Figura 3 - Estrutura molecular do Ácido caurenóico.



Fonte: Própria autora, 2023.

O AC é amplamente citado na literatura pela ação anti-inflamatória (PAIVA et al., 2002), inibição moderada de enzima Cox-1 e fracamente a Cox-2 (LIM

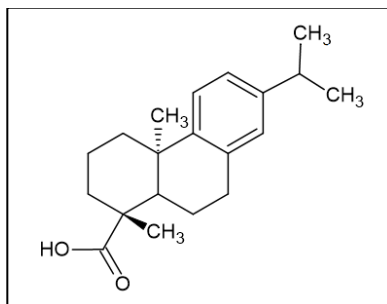
et al., 2009), bloqueando a produção de TNF- α e IL-1 β induzidos por carragenina (MIZOKAMI et al., 2012), entre outros mecanismos anti-inflamatórios.

Determinados estudos descreveram citotoxicidade contra certas linhagens de células tumorais *in vitro* (CAVALCANTI et al., 2006), assim como previne a asma induzida por antígenos através da desregulamentação das vias Th2 e NF κ B/citocinas-relacionadas (BORGHI, DOMICIANO, RASQUEL-OLIVEIRA, 2022). A substância também exibe ação diurética, vasodilatadora, hipoglicemiante (GARCIA, OLIVEIRA, BATISTA, 2007), relaxante muscular, atividade tripanocida (FUCINA et al., 2012), leishmanicida (CANDIDO, 2016), antifúngica contra *Candida albicans* e antibacteriana a *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis* (SANTOS, 2005).

1.5. ÁCIDO DESIDROABIÉTICO (AD)

O AD, comum nas Pinaceas, é um diterpeno abietano tricíclico, composto por 20 átomos de carbono (Figura 4) e, originam na via mevalonato na rota dos labdanos, sendo relatado principalmente em *Pinus elliotii* e outras coníferas como *Picea*, *Larix* e *Abies*, estando relacionada ao sistema de defesa. Diversos estudos científicos relatam inúmeras atividades como ação anti hipertensiva (JAEYOUNG et al., 2021), atividade antiparasitária para *Trypanosoma cruzi* e promastigotas de *L. braziliensis* e *L. infantum* (PERTINO et al., 2021), *L. donovani* e *T. cruzi* (VAHERMO et al., 2015), atuando nas formas promastigotas e amastigota de *L. amazonensis* (GONÇALVES, 2018) demonstrou atividade bacteriana contra *S. epidermidis*, numa cepa multirresistente (LEANDRO, 2014) e *S. aureus* (FALLARERO, 2013) atuou com ação antiinflamatória (KIM et al., 2014) e na regulação da proliferação das células do câncer gástrico (KIM et al., 2021).

Figura 4 - Estrutura do ácido desidroabiético



Fonte: Própria autora, 2023.

1.6 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

O isolamento e purificação de produtos naturais se procede de diversas técnicas, com destaque a cromatografia baseada em separação físico-química, fundamentada na migração diferencial dos componentes numa mistura devido a interações entre duas fases imiscíveis, denominadas de fase móvel e fase estacionária; a imensa variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias torna a técnica extremamente versátil e de ampla aplicação (DEGANI et al., 1998).

As técnicas utilizadas visando o isolamento de compostos naturais são: Cromatografia em Camada Delgada (CCD) Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDP), Cromatografia Líquida à Vácuo (CLV), Cromatografia Líquida de Média Pressão (CMP – cromatografia “flash”) e a Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE) e U-HPLC, acoplados a detectores específicos.

A cromatografia de camada delgada comparativa (CCDC) é uma técnica de rápido e fácil desempenho, sendo amplamente usada em laboratórios com amostras pequenas (1-100µg). Sendo útil para analisar a pureza de um composto, determinar o número de componentes em uma mistura, determinar o solvente para um ensaio cromatográfico e monitorar a separação de uma coluna cromatográfica ou acompanhar o desenvolvimento de uma reação. é baseada na adsorção líquido-sólido, seu mecanismo de separação acontece pela diferença de afinidade dos

componentes de uma mistura pela fase. Já a fase móvel é definida e acordo com a natureza da amostra, podendo ou não ser em gradiente. A sílica é principal fase estacionária utilizada na CCD e CLV (AMORIM, 2019).

São compostas, por uma fase móvel e uma fase estacionária, logo, é necessário a fase móvel passar pela amostra e interagir, conforme for eluindo a separação vai ocorrendo através da polaridade dos compostos e da interação com a fase móvel. A CLV e a Flash são colunares, muito utilizadas para isolamento de produtos, ambas as fases são acondicionadas em tubos cilíndricos, geralmente de vidro, de diâmetros variados são utilizadas diferentes sílicas como adsorvente para essas colunas requerendo, dessa forma, a utilização de um sistema de vácuo e bombeamento, respectivamente (DEGANI et al., 1998). É por estes motivos que a combinação de técnicas de cromatografia foi utilizada neste experimento para o isolamento e purificação do ácido caurenóico e ácido desidroabietico.

1.7. NANOPARTÍCULA DE PRATA BIOGÊNICA

O desenvolvimento e utilização das nanopartículas têm crescido cada vez mais e possibilitando novas intervenções terapêuticas (HAMED et al., 2017). A biossíntese das nanopartículas (NP) ocorre de diversas formas, seja por métodos químicos, físicos ou biológicos, sendo o sistema biológico denominado de biogênicas (BioAgNPs). Os métodos químicos são desvantajosos devido ao alto custo com reagentes tóxicos e soluções, alto gasto de água, instabilidade das nanopartículas (ZHANG et al., 2011; SINTUBIN et al., 2012).

A busca por métodos de produção verde, denominada de métodos “ecoeficientes”, têm preferência pela vantagem em apresentar as rotas de síntese simples, econômicas, ecologicamente corretas com alto rendimento utilizando tecnologia verde, gerando produtos não-tóxicos (DURÁN 2011; SANKAR et al., 2013; SINGH et al., 2014). Porém, as desvantagens da utilização de microrganismos na biossíntese de nanopartículas de prata incluem o controle do crescimento microbiano,

a heterogeneidade do meio de cultivo, controle do tamanho de nanopartículas e ampliação de escala (QUESTER et al., 2013).

As nanopartículas de prata apresentam diversas vantagens como estabilidade química, maleabilidade, atividade catalítica, relativo baixo custo de produção e principalmente potente ação antimicrobiana. Dessa forma, as BioAgNP são amplamente utilizadas em várias aplicações como alimentos, cosmetologia, no recobrimento de dispositivos médicos, na confecção de fórmulas semi-sólidas (DURÁN et al., 2010). O mecanismo bactericida não é claramente compreendido; sugere-se que há múltiplos mecanismos de ação (HERMAN, 2014). Entre mecanismo investigado, salienta-se a desintegração e aumento da permeabilidade de superfície celular, conduzindo a inativação de enzimas bacterianas pela interação com grupos de tiol, exaustão de ATP intracelular, danos no DNA, induzindo formação radicais livres (LI et al., 2010; KIM et al., 2011; THEOPHEL et al., 2014). Embora as BioAgNP apresentem excelentes propriedades antimicrobianas, as bactérias podem desenvolver resistência à prata por alterações genéticas (LOSASSO et al., 2014; GRAVES et al., 2015), sugerindo a importância de diversas combinações antimicrobianas para minimizar o surgimento de resistência (FISCHBACH, 2011; BASS et al., 2015; BOLLENBACH, 2015).

1.8. MICRORGANISMOS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA

Os microrganismos de nossa microbiota natural tendem a ser os responsáveis pelas patologias causadas por desequilíbrio multifatorial, nesse aspecto a *Staphylococcus aureus*, uma bactéria Gram-positiva muito relevante, já que é um desafio à saúde pública pela alta taxa de prevalência e letalidade, além de importância clínica e epidemiológica, é responsável por infecções adquiridas na comunidade e hospitalares (DIEKEMA et al., 2001; SALES e SILVA, 2012), estando associado a episódios graves de pneumonia, osteomielite, endocardite e outras manifestações clínicas (MALTEZOU e GIAMARELLOU, 2006). *S. aureus* também faz parte dos ESKAPEE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*,

Acinetobacter baumannii, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.* e *Escherichia coli*(MULANI et al., 2019) sendo cepas multirresistentes já detectas em diversos ambientes, preocupante à saúde populacional (VIVAS et al., 2019 ; RODRÍGUEZ-SERRANO et al., 2020).

Entre bactérias Gram-negativas, *E. coli* é a principal representante da classe, é encontrada no trato gastrointestinal humano, também causam abscessos, meningite, podendo levar a sepse. Problemas adicionais decorrem de cepas multirresistentes, podendo ser encontradas em alimento, e são capazes causar infecções alimentares em humano (DIEKEMA et al. 2001).

Um representante importante entre fungo leveduriforme é *Candida albicans*, um oportunista agente de candidemia tendo como fator de risco, os cateteres venosos centrais em ala hospitalares, permitindo atingir à corrente sanguínea (SPELBERG et al., 2012).

Embora cada uma dessas doenças tenha tratamento específico, é de suma importância descobrir novas alternativas terapêuticas para alcançar um tratamento efetivo e seguro, visto que os medicamentos convencionais existentes no mercado são ineficazes e desafiadores à Organização Mundial da Saúde (OMS), devendo estudos a avaliar novas alternativas (KARROUCHI et al., 2018).

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Isolar e identificar terpenóides de *S. trilobata* L. Pruski, analisar a atividade antimicrobiana do AC e a associação do AC com a BioAgNP e avaliar frente a *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e purificar o ácido caurenóico e ácido desidroabiético proveniente do extrato hexânico da *S. trilobata* L. Pruski;
- Identificar a estrutura química destes compostos através de métodos espectroscópicos;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do AC frente a *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*;
- Determinar da atividade antimicrobiana da associação da BioAgNP com AC.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. EQUIPAMENTOS E REAGENTE

Ressonância Magnética Nuclear (RMN) procedeu-se por Espectrômetro Bruker Modelo Avance III operando a 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , equipado com uma sonda multinuclear inversa (BBI) de 5 mm, sendo análise realizada no Laboratório de Espectroscopia da Central Multiusuária de Laboratório de Pesquisa (CMLP) da PROPPG/UEL. Rota evaporador com banho maria acoplado Yamato scientific, BM500; Ultrassom Ecosonics EN631, Q38/40 Brasil, 2012; Capela exaustora de gases Lucadema LUCA-80/216, 2012. Brasil; Sílica gel 60 para CLV 0,063-0.2mm de 70 a 230 mesh, Macherey-Nagel, Alemanha; Microplaca 96 poços, de fundo plano, KASVI.

3.2 LOCAL DE ESTUDO

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotransformação de Fitoterápicos (LabBiotransfito) - DCF/CCS, Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada (LBBA/UEL) da Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR.

3.3 COLETA DE *SPHAGNETICOLA TRILOBATA(L.) PRUSKI*

As raízes foram coletadas na ACEL (Associação Cultural Esportiva de Londrina) - Estrada Major Archilles Pimpão, 2300 - Jardim Vale Verde, 86040-020, no município de Londrina-PR, Brasil ("832 m de altitude, 23°20'20.87" Latitude S e 51°7'11.96" Longitude O) no período de outubro a novembro de 2013, correspondente

a época de florescência. O material foi depositado sob identificação (FUEL 49306) no Herbário do Departamento de Botânica do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, e o projeto vinculado ao Sisgen sob número de Cadastro: AC32DE6.

3.4 PREPARO DO EXTRATO BRUTO

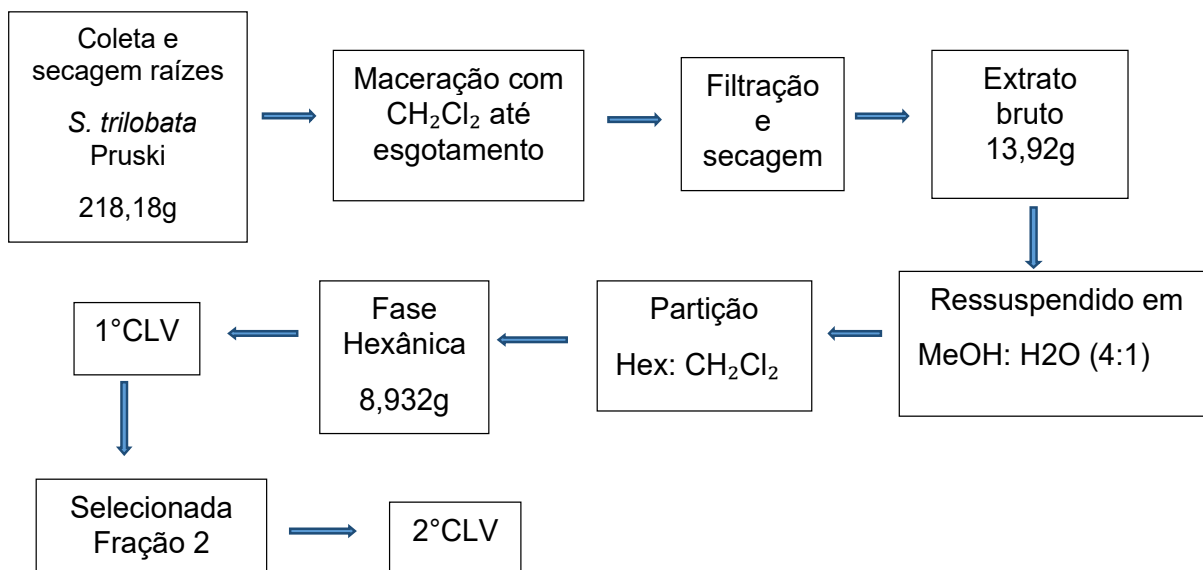
As raízes (218,18g) da *S. trilobata* (L.) Pruski foram secas a 40°C até total estabilização, trituradas e maceradas até a exaustão com diclorometano e seco sob pressão reduzida a 60°C (35,83 g). O extrato bruto foi ressuspendido em clorofórmio e particionado com metanol/água (4:1), seguido de partição hexano e diclorometano, para separar substâncias de maior polaridade.

3.5 FRACIONAMENTO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA A VÁCUO

A fase hexânica foi seca e solubilizada em clorofórmio, incorporado a sílica gel 60H (300g) e submetido à CLV, obtendo-se 9 frações com os eluentes (Hex:AcOEt) em gradiente crescente de polaridade (Tabela 1), secas e monitoradas por Cromatografia de Camada Delgada Comparativa (CCDC), reveladas com anisaldeído sulfúrico a 100°C.

Após CCDC, avaliou-se o rendimento e quantidade de manchas, sendo a fração 2 selecionada para prosseguir com segunda CLV utilizando o gradiente e polaridade (Tabela 2). A seguir, procedendo CCDC, as subfrações, 3 (96:04 – Hex:AcOEt) e 6 (90:10 – Hex:AcOEt) apresentaram um composto majoritário em cada uma, sendo em ambos de fácil isolamento.

Figura 5: Fluxograma representativo das etapas do isolamento de moléculas ativas:



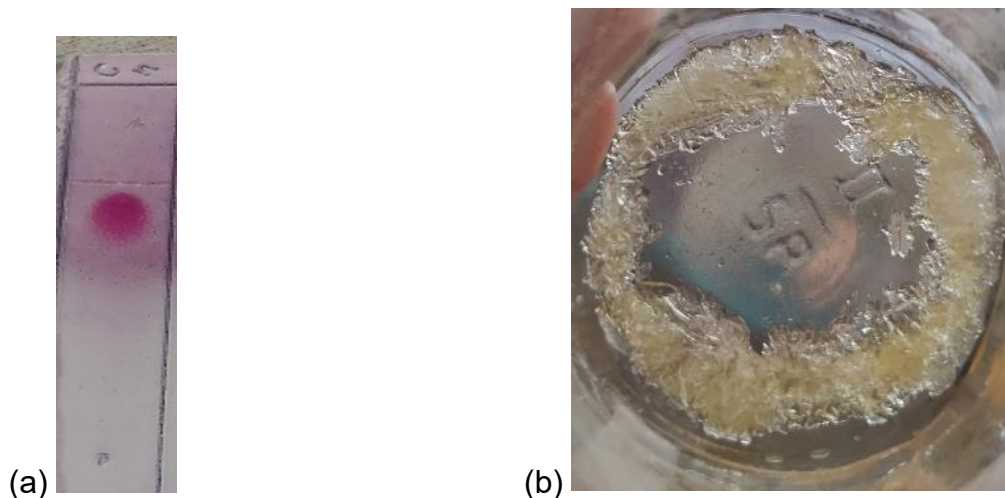
Fonte: Própria autora, 2023.

3.6 PROCESSO DE ISOLAMENTO

3.6.1 A FRAÇÃO 3 (96:04 – HEX:ACOET)

A fração 3 foi submetida à uma nova CLV com fase móvel 9:1 Hex:AcOEt, massa de 70g de sílica gel 60. Após CCD foi realizada a junção das frações com o perfil cromatográfico. O compilado foi lavado com MeOH gelado (2°C) e mantido a 2°C por 72hrs. Em seguida o cristal foi lavado por 3 vezes com etanol e o resíduo não-solubilizado foi descartado, obtendo-se purificado totalmente cristalina, encaminhado para análise por ressonância magnética nuclear (RMN) (Figura 6a e 6b).

Figura 6 - Placa cromatográfica com composto já isolado (a); Cristal isolado antes de ser submetido ao processo de lavagem, obtido das raízes de *S. trilobata* (L.) Pruski após CLV, subfração 3 na proporção de 96:04 Hex:AcOEt (b).



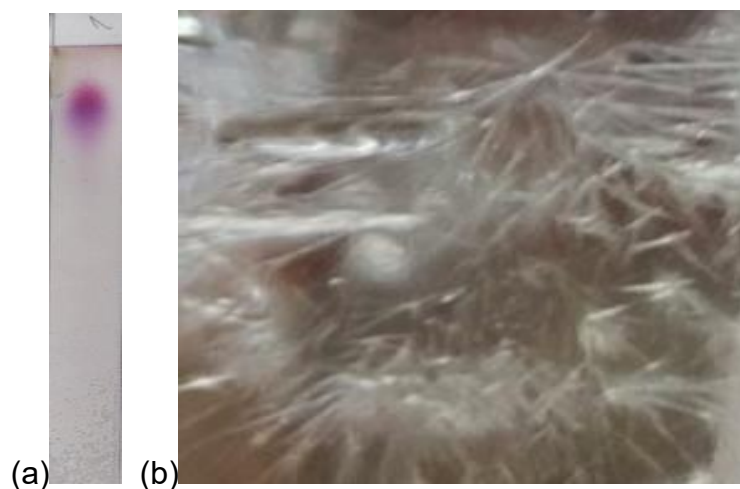
Fonte: Própria autora, 2023.

3.6.2 A FRAÇÃO 6 (90:10 – HEX:ACOET)

A CCDC visualizou 2 compostos com R_f muito próximo, requerendo cromatografia adicional para isolamento (Figura 7a). Procedeu-se então a Cromatografia de Camada Delgada Preparativa (CCDP) com a sílica ativada a 105°C por 10 minutos e, submetida a corrida com a fase móvel Hex:AcOEt: CHCl₃ (6:2:2); a fração 6 obtida foi solubilizada em diclorometano (PRASNIEWSKI, 2019).

Após a corrida, as placas foram lidas sob UV (254 nm), onde foi possível realizar a visualização e separação dos compostos eluidos sobre a sílica. Posteriormente fez-se a separação da sílica e submetendo-se a sob ultrassom, com diclorometano, para eluir o isolado adsorvido na sílica (em triplicata). A seguir procedeu-se a filtração, em funil de vidro, o volume final obtido foi submetido à secagem em temperatura ambiente, a fração cristalizada (Figura 7b) foi submetida à análise de RMN ¹H e ¹³C.

Figura 7 - Placa cromatográfica com antes de submeter a fração a CCDP(a); Cristal isolado das raízes de *S. trilobata* (L.) Pruski após CCDP, subfração 6 na proporção de 90:10 Hex:AcOEt (b).



Fonte: Própria autora, 2023.

3.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA(CIM)

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados no Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada (LBBA) com a colaboração de Prof. Dr. Gerson Nakazato. Os microrganismos utilizados foram *Candida albicans* (ATCC 10231), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), sendo os ensaios realizados em duplicata e nos Padrões de protocolo estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institut (CLSI)*.

3.7.1 DETERMINAÇÃO DE CIM PARA BACTÉRIA (CLSI, 2018)

Para ativação as culturas foram ativadas transferindo o inóculo em caldo Mueller Hinton (MH) e incubadas em 36,5 °C por 24h, seguida de semeadura por

técnica de esgotamento em placas de Petri com MH e incubadas sob as mesmas condições. Determinadas colônias isoladas foram transferidas para um tubo de ensaio contendo 5mL de solução salina a 0,85%, a suspensão homogeneizada até a turbidez equivalente 0,5 da escala de Mac Farland, correspondente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL e armazenada. Na placa, fez se as diluições seriadas, adicionou 100 μ L da solução estoque de cada antimicrobiano na primeira linha (A) e descendo com as diluições até (H) de forma a obter concentrações finais baixas para AC e BioAgNP. Posteriormente as culturas de *S. aureus* e *E. coli*. já preparadas anteriormente, foram dispensadas em todos os poços da microplaca(100 μ L) de forma a obter ao final uma concentração de 10^4 UFC/poço. As placas com cada uma das bactérias foram incubadas a 36,5 °C por 24 h. A concentração bactericida mínima(CBM) foi determinada pela contagem de UFC (Unidade formadora de colônia) dos poços da microplaca do ensaio de microdiluição em caldo, sendo a CBM a menor concentração que reduz 99,9% da população bacteriana.

3.7.2 DETERMINAÇÃO DE MIC PARA FUNGO (CLSI, 2019).

Candida albicans ATCC 10231 foi ativado em caldo BHI a 37°C por 24 horas, seguida de contagem na câmara de Neubauer para obter concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. O ensaio foi realizado em placa de 96 poços testando o AC e BioAgNP em diferentes concentrações. Fez se a mesma sequência de aplicação do ativo e inóculo, assim como descrito anteriormente e adição de caldo Mueller Hinton (MH). A microplaca foi incubada a 37 °C por 24 horas, a CIM foi determinada através da observação do crescimento microbiano nos poços pela turbidez.

3.8 DETERMINAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE AC E BIOAGNPS

A nanopartícula de prata biogênica da GRAL Bioativos LTDA foi cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Gerson Nakazato no Departamento de Microbiologia, do Centro de Ciências Biológicas, da UEL e está sob patente BR1 20210163755 depositada no INPI . A BioAgNP tem diâmetro médio: 82,73nm, síntese: biológica por planta, potencial zeta: 23,27 mV, concentração 10mM.

A concentração inibitória mínima da combinação da BioAgNP e AC foi feita utilizando-se a técnica de Cherkerboard, em placas de 96 poços (ODDS, 2003). Todos os testes foram realizados em triplicata.

3.8.1 ENSAIO CHERKERBOARD PARA BACTÉRIAS (CLSI, 2018),

Com base nos valores obtidos da CIM, foram preparadas soluções dos agentes antimicrobianos em concentrações as quais variaram na CIM para os ativos respectivamente. As suspensões bacterianas foram diluídas em salina na escala 0,5 de Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), e depois diluídas 1:100 em caldo MH, foram inoculadas nos poços, na concentração final de $5,0 \times 10^5$ UFC/mL. de cada uma das diluições desses agentes antimicrobianos foram depositados 50 μ L na placa. O BioAgNP na orientação vertical (1 a 12) e o AC na orientação horizontal (A a H). Em seguida, 100 μ L da suspensão bacteriana padronizada em 10^6 UFC/mL foram dispensados em todos os poços da placa (LORIAN, 2005). A placa foi incubada a 36,5°C por 24 horas, o resultado é determinado através da observação do crescimento microbiano, logo pela turbidez. Os controles negativos (apenas as nanopartículas) e positivos (apenas as bactérias) foram utilizados perante viabilidade e esterilidade dos testes.

3.8.2 ENSAIO CHERKERBOARD PARA FUNGO (CLSI, 2019)

Com base nos valores obtidos da CIM. Na placa de 96 poços recebeu combinações diferentes em dissoluções seriadas dos ativos, com 50µL de meio de cultura RPMI 1640 e 50µL cada ativo e 100µL do inóculo. Os ativos foram distribuídos da seguinte na sequencia descrita acima. O BioAgNP na orientação vertical (1 a 12) e o AC na orientação horizontal (A a H). Incubado em estufa a 36,5 °C (± 0,5) durante 24 horas. O resultado foi verificado pela inibição de crescimento

Os critérios de interpretação para a associação de AC e BioAgNP, foram obtidos através do índice da concentração inibitória fracionada (CIF), obtido a partir da seguinte equação:

$$\text{Índice CIF} = \frac{\text{CIM do AC em associação}}{\text{CIM do AC isolado}} + \frac{\text{CIM das BioAgNp em associação}}{\text{CIM das BioAgNp isolado}}$$

Fonte: YADAY et al. (2013)

A interpretação é feita da seguinte forma:

- Sinérgica, se $FICI \leq 0,5$, ou seja, é quando o efeito combinado é maior que a soma dos efeitos produzidos pelos ativos testados;
- Aditivos, se $>0,5$ e ≤ 1 , ou seja, é quando o seu efeito é igual à soma dos efeitos dos ativos individuais;
- Indiferente (sem interação), se >1 e ≤ 2 , o efeito conjugado é igual ao efeito de qualquer um dos ativos individuais;
- Antagonista, se >2 , ou seja, é o efeito combinado menos do que a soma dos efeitos dos ativos individuais ou mais fraco do que o efeito de qualquer um dos ativos individuais (SUCHER, 2014).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ISOLAMENTO DE TERPENÓIDES

Primeiramente, o fracionamento do extrato bruto das raízes de *S. trilobata* (L.) Pruski resultou em 9 frações, conforme apresentado na Tabela 1 com as respectivas fases móveis e rendimentos.

Tabela 1 - Proporções utilizadas de fases moveis e frações obtidas da primeira CLV do extrato das raízes de *S. trilobata* (L.) Pruski

FRAÇÕES	SOLVENTES	PROPORÇÃO	RENDIMENTO (G)
1	Hexano	100%	1,52
2	Hex: AcOEt	90%: 10%	4,85
3	Hex: AcOEt	80%: 20%	1,15
4	Hex: AcOEt	70%: 30%	0,12
5	Hex: AcOEt	60%: 40%	0,13
6	Hex: AcOEt	50%: 50%	0,45
7	Hex: AcOEt	30%: 70%	0,34
8	Acetato de Etila	100%	0,15
9	Metanol	100%	1,17

Fonte: Própria autora, 2023.

De acordo com os resultados da CCDC das frações obtidas na CLV, a fração 2 (Hex: AcOEt 90:10) foi selecionada por apresentar melhor rendimento, com compostos de fácil isolamento. Fez-se então a segunda CLV utilizando o gradiente de polaridade (Tabela 2).

Tabela 2 - Proporções utilizadas das fases móveis e frações obtidas da segunda CLV realizada do extrato das raízes de *S. trilobata* (L.) Pruski.

FRAÇÃO	SOLVENTES	PROPORÇÃO	RENDIMENTO (g)
1	Hexano	100%	0,37
2	Hex: AcOEt	98%: 2%	0,77
3	Hex: AcOEt	96%: 4%	0,90
4	Hex: AcOEt	94%: 6%	0,37
5	Hex: AcOEt	92%: 8%	0,21
6	Hex: AcOEt	90%: 10%	0,77
7	Hex: AcOEt	80%: 20%	0,34
8	Hex: AcOEt	70%: 30%	0,14
9	Hex: AcOEt	50%: 50%	0,36
10	Acetato de Etila	100%	0,43
11	Metanol	100%	0,19

Fonte: Própria autora, 2023.

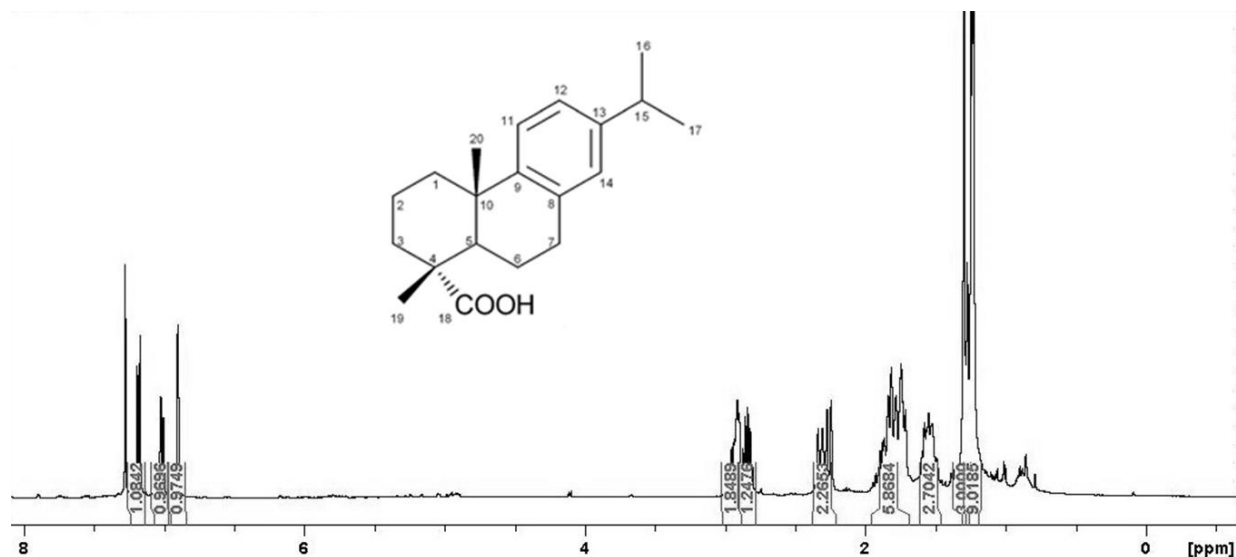
A CCDC indicou que a subfração 3 (Hex:AcOEt 96:04) (Figura 6) e a subfração 6 (Hex:AcOEt 90:10) (Figura 7) demonstraram-se acessíveis para a purificação. Conseqüentemente, após todas as etapas obteve-se os isolados destinados à espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C , sendo os dados comparados com os espectros descritos na literatura.

4.1.1 ISOLAMENTO AD

A análise por RMN de ^1H (Figura 8) caracterizou a presença dos sinais: H_{11} em δ 7,19, H_{12} δ 7,01 e H_{14} δ 6,90 ppm correspondentes ao anel aromático. Os hidrogênios alifáticos H_1 a H_7 na região de δ 1,49 a 2,99 ppm, correspondentes aos dois anéis saturados, os sinais dos hidrogênios metílicos, H_{16} e H_{17} em δ 1,24 e H_{19} δ 1,30 ppm, além do hidrogênio H_{15} da cadeia lateral alifática em δ 2,84 ppm observou

um hepteto com $J = 6,83$ Hz. Os sinais dos hidrogênios metílicos correspondentes ao H_{20} foram observados no espectro de 1H na região δ 1,23 ppm, porém com sobreposição parcial com os H_{16} e H_{17} .

Figura 8 - Espectro de RMN de 1H do ácido desidroabiético isolado, proveniente de uma subfração 6 (90:10 Hex: AcOEt) das raízes de *S. trilobata* (L.) Pruski.



Fonte: Própria autora, 2023.

Tabela 3 – Dados de RMN de ^1H (400,13 MHz, CDCl_3) do cristal isolado de uma subfração 6 (90:10 Hex: AcOEt) das raízes de *S. trilobata* (L.) Pruski.

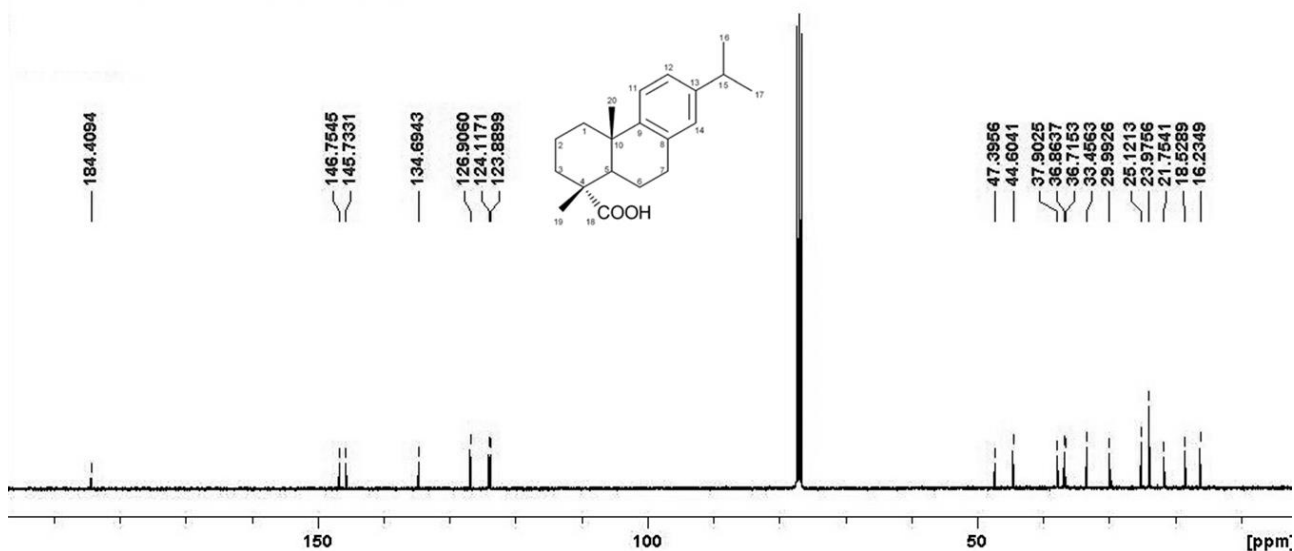
H	Van Beek (2007) δ_{H} (ppm)	AD δ_{H} (ppm), I, m, J (Hz)
1 α	1,51	1,49 – 1,59 (1H, m)
1 β	2,31	2,32 (1H, d, J= 12,59)
2 α	1,75	1,71-1,94 (5H, m)
2 β	1,80	1,71-1,94 (5H, m)
3 α	1,80	1,71-1,94 (5H, m)
3 β	1,71	1,71-1,94 (5H, m)
5	2,24	2,26 (1H, dd, J= 12,36; 1,59)
6 α	1,55	1,49 – 1,59 (1H, m)
6 β	1,86	1,71-1,94 (5H, m)
7 α	2,93	2,90-2,99 (1H, m)
7 β	2,88	2,90-2,99 (1H, m)
11	7,18	7,19 (1H, d, J= 8,18)
12	7,00	7,01 (1H, dd, J= 8,03; 1,22)
14	6,89	6,90 (1H, s)
15	2,83	2,84 (1H, st, J= 6,83)
16	1,23	1,24 (9H, d, J= 6,81)
17	1,23	1,24 (9H, d, J= 6,81)
19	1,29	1,30 (3H, s)
20	1,22	1,23 (9H, s)

Fonte: Própria autora, 2023.

A caracterização por RMN de ^{13}C (Figura 9) detectou o sinal do C_{18} em δ 184,41 ppm correspondente à carbonila, dos carbonos C_8 e C_9 em δ 134,69 e 146,75 ppm respectivamente, C_{11} - C_{14} entre δ 123,88 a 145,73 ppm correspondentes ao anel aromático, e os sinais dos carbonos C_1 - C_{10} entre δ 18,72 a 134,69 ppm, característicos aos dois anéis saturados, além dos carbonos metílicos C_{16} , C_{17} , C_{19} e C_{20} entre δ 16,20

e 25,12 ppm. Todos os sinais de RMN de ^1H e de ^{13}C obtidos foram comparados com os dados relatados por VAN BEEK et al.(2007) conforme Tabela 3 e 4, identificando um diterpeno da classe de abietanos conhecido como ácido desidroabiético (Figura 4)

Figura 9 - Espectro de RMN de ^{13}C do ácido desidroabiético isolado, proveniente de uma subfração 6 (90:10 Hex: AcOEt) das raízes de *S. trilobata* (L.) Pruski.



Fonte: Própria autora, 2023.

Tabela 4 –Comparação dos Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ em ppm) de cristal isolado da subfração 6 (90:10 Hex: AcOEt) das raízes de *S. trilobata* (L.) Pruski, em relação à literatura.

C	Van Beek (2007) δ_c (ppm)	AD δ_c (ppm)	C	Van Beek (2007) δ_c (ppm)	AD δ_c (ppm)
1	37,90	37,90	11	124,2	124,11
2	18,50	18,72	12	123,9	123,88
3	36,70	36,71	13	145,8	145,73
4	47,50	47,39	14	126,9	126,9
5	44,60	44,60	15	33,50	33,45
6	21,80	21,75	16	24,00	23,97
7	30,00	29,99	17	24,00	23,97
8	134,7	134,69	18	185,4	184,41
9	146,8	146,75	19	16,20	16,23
10	36,90	36,86	20	25,20	25,12

Fonte: Própria autora, 2023.

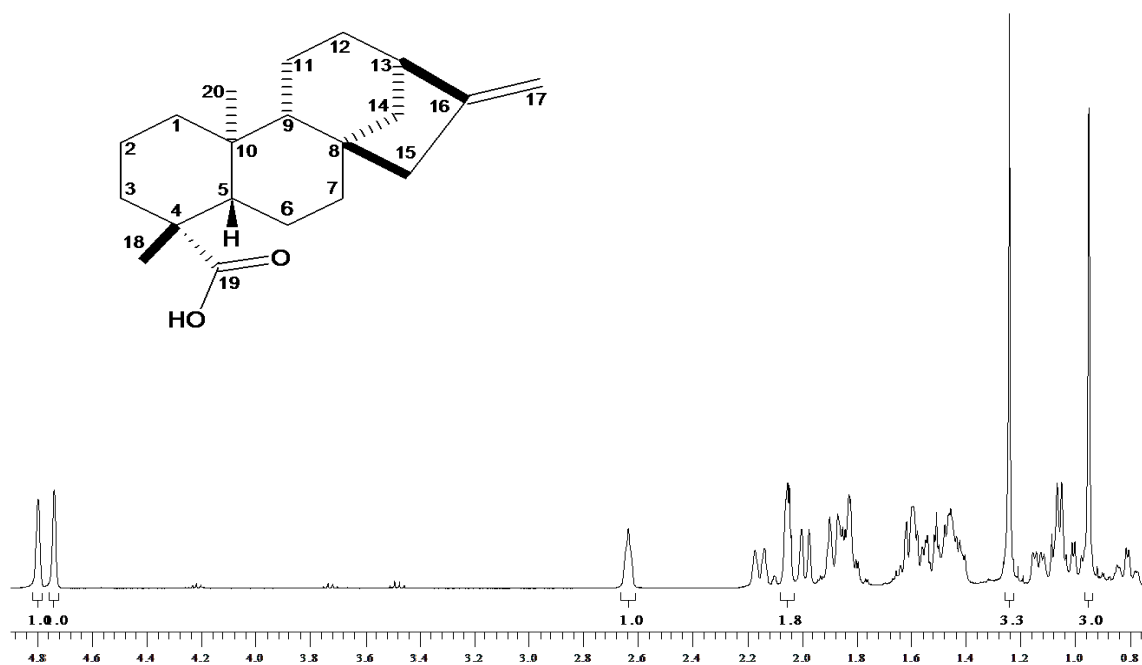
Foi constatado que o composto isolado é o AD, porém a quantidade obtida foi insuficiente para realização dos ensaios biológicos (15mg). Entretanto, não foi relatado na literatura o isolamento do AD na *S. trilobata* (L.) Pruski, logo, o isolamento pode ser justificado através do processo de formação das moléculas bioativas, especificadamente os diterpenos. Por sua vez, possuem diferentes graus de funcionalização, portanto, no momento do fechamento dos esqueletos terpênicos, na presença dos fitohormônios e condições ambientais, sugere-se que a ciclização dos anéis, ocorra a formação do AD (PETERS, 2010). Um estudo com foco na abordagem metabólica, pode corroborar para reforçar a presença do AD (AZIZAN et al, 2016).

4.1.2 ISOLAMENTO AC

No espectro de RMN ^1H , (Figura 10) a molécula apresentou poucos

sinais desprotegidos, indicando presença de um sistema cíclico pouco oxigenado e/ou pouco insaturado. A análise do perfil permitiu deduzir que a substância trata-se de um diterpeno, já detectado em diversas espécies de gênero *Sphagneticola* (BLOCK et al., 1998). Os singletos em δ 4,79 e 4,75 (^1H cada) podem ser atribuídos a dois hidrogênios pertencentes à ligação dupla exocíclica, típica de derivados do AC que ocorre entre C16-C17. Observa-se também a presença de um *s*lem δ 2,63 atribuído ao H13 (alílico) e a existência de dois singletos integrados para 3H cada em δ 1,24 e 0,95, indicando a presença de dois grupos metilas, atribuídos aos hidrogênios H18 e H₂O (ARAKAWA, 2003).

Figura 10 – Espectro RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ em ppm, *mult.* e *J* em Hz) de cristal isolado de uma subfração 3 (96:04 Hex: AcOEt) das raízes de *S. trilobata* (L.) Pruski.



Fonte: Própria autora, 2023.

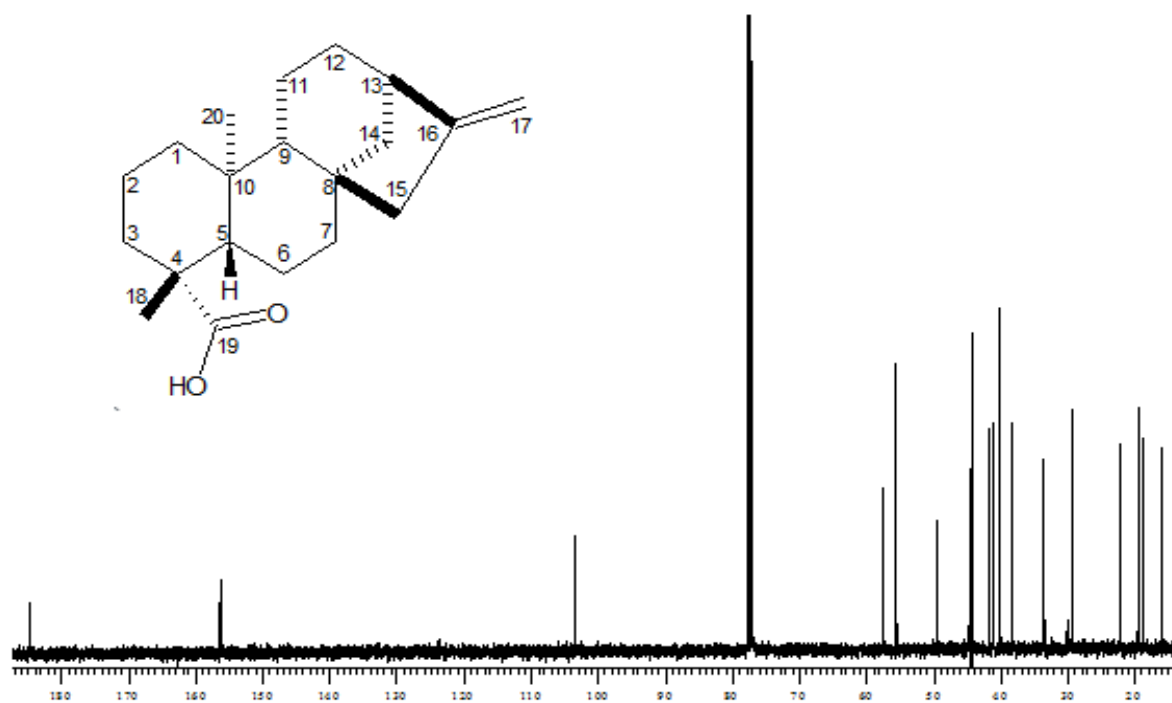
Tabela 5 - Comparação dos Espectro de RMN ^1H da substância (300 MHz, CDCl_3 , δ em ppm, *mult.* *J* em Hz) isolado da subfração 3 (96:04 Hex: AcOEt) das raízes de *S. trilobata* (L.) Pruski, em relação à literatura.

Hidrogênio	Dados Teóricos*	Deslocamento Químico do AC (δ)
3	2,62; sl	2,63; sl
15	2,08; sl	2,15; sl
17a	4,66; s	4,75; s
17b	4,72; s	4,79; s
18	1,16; s	1,24; s
20	0,87; s	0,95; s

Fonte: (Da Costa, 1996)

O espectro de RMN ^{13}C da substância (Figura 11) indicou a presença de 20 sinais, reforçando a possibilidade de se tratar de um diterpeno. Um sinal em δ 184,2 foi atribuído ao carbono de uma carboxila, geralmente presente em C19; outro sinal em δ 155,8 foi atribuído ao carbono olefínico C16 e, o carbono metilênico C17 foi relacionado a um sinal em δ 102,9. Estes dados confirmaram que a substância isolada seja possivelmente um diterpeno do tipo caurano, mais precisamente o ácido *ent*-caur-16-*en*-19-óico.

Figura 11 – Espectro RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ em ppm) de cristal isolado da subfração 3 (96:04 Hex: AcOEt) das raízes de *S. trilobata* (L.) Pruski.



Fonte: Própria autora, 2023.

Tabela 6 – Comparação dos Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ em ppm) de cristal isolado de uma subfração 3 (96:04 Hex: AcOEt) das raízes de *S. trilobata* (L.) Pruski, em relação à literatura.

Carbono	Dados Teóricos (δ ,ppm)	Deslocamento Químico (δ ,ppm)
1	40,7	40,7
2	19,0	19,0
3	37,7	37,8
4	43,8	43,7
5	57,0	57,0
6	21,8	21,8
7	41,3	41,2
8	44,2	44,2
9	55,0	55,1
10	39,7	39,6
11	18,4	18,4
12	33,0	33,0
13	43,9	43,8
14	39,7	39,6
15	48,9	48,9
16	155,8	155,8
17	103,0	102,9
18	29,0	28,9
19	185,0	184,2
20	15,5	15,5

Fonte: (Da Costa, 1996).

4.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

4.2.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO AC FRENTE OS MICRORGANISMO

4.2.1.1 COM RELAÇÃO AO ÁCIDO CAURENOICO

Conforme os resultados da CIM, o AC isolado demonstrou ser efetivo sobre *S. aureus* com uma CIM de 125µM (Tabela 8). Tendo em vista que a molécula do AC tem o pka 4.70. Logo, se trata de um ácido fraco o que pode facilitar no transporte de prótons através da membrana e o rompimento da membrana celular bacteriana (COSTA, et al. 2015). As bactérias Gram-positiva possuem uma espessura maior de peptideoglicanos que compõe a parede celular, embora mais fina, dispõe de maior permeabilidade quando comparada as Gram-negativas. Outro ponto importante em relação a estrutura do AC, é a presença do ácido carboxílico (C 19) tem um papel fundamental na interação nos sítios de ligação das Gram-positivas (WILKENS, 2002).

Por outro lado, o AC isolado não apresentou atividade satisfatória frente a *E. coli* e *C. albicans* ambos 500 µM, baseado com a literatura (WILKENS, SILVA et al., 2002). Uma possível justificativa com relação a *C. albicans* sugere que a inatividade esteja relacionada o ergosterol presente na membrana, que bloqueia a entrada de moléculas ácidas como o AC. Já em relação a *E. coli*, as Gram-negativas, apresentam na sua estrutura externa da membrana, lipopolissacarídeos (LPS) e proteínas, logo, têm uma superfície hidrofílica, que promove uma barreira eletrônica, repelindo a entrada de moléculas hidrofóbicas. Além disso, as moléculas podem ter dificuldade para permear, devido à baixa fluidez das cadeias de hidrocarbonetos presentes na estrutura do LPS e as fortes interações entre elas (ZENGIN; BAYSAL, 2014).

4.2.1.1 COM RELAÇÃO AO BIOAGNP

A BioAgNP isolado para *S. aureus* apresentou uma CIM de 125 μ M, para *E. coli* uma CIM de 31,25 μ M, e para *C. albicans* uma CIM de 7,81 μ M. Os valores encontrados na literatura, tendo em vista de outros estudos feitos para *E. coli* 62,5 μ M (NAKAZATO, 2019), *S. aureus* 428 μ M (HAMED et al. 2017). Um estudo foi capaz de inibir totalmente a *E. coli* e *S. aureus* na concentração de 40 μ M e insignificante para *C. albicans* (LAZIC et al. 2019).

O mesmo BioAgNP usado neste trabalho por Scandorieiro et al. 2022 mostrou que *E. coli* ATCC 25922 tornou-se resistente em 12 dias de tratamento diário, aumentando assim o valor MIC de 15,7 para > 252 μ M demonstrando assim a necessidade de estudos alternativos de se fazer a associação com outros compostos e para reduzir o desenvolvimento de resistência as AgNP já que a utilização de nanopartículas isoladas, tende a adquirir resistência muito mais rápido.

Outro ponto importante é a análise da interação do BioAgNP com *Staphylococcus aureus* demonstrada por microscopia eletrônica, além da destruição da parede celular e da membrana plasmática, foram detectadas várias rachaduras, rugas, danos e deformações na superfície celular, indicando que a redução na densidade eletrônica diminuída, pela liberação de conteúdo celular. O íon Ag que compõe a BioAgNP pode ser liberada e se ligar as moléculas de grupos sulfidríla, presentes nas enzimas e proteínas (DESPAX et al., 2011; NINGANAGOUDA et al. 2014 QING et al., 2018). Embora seu mecanismo de ação não seja totalmente compreendido, sabe-se quais estruturas bacterianas são afetadas pelo BioAgNP, e geram danos às membranas bacterianas, através da dissipação da força próton motriz, colapso do potencial de membrana, danos à cadeia respiratória e desestabilização da membrana externa da parede celular (KIM et al., 2011 ;QING et al., 2018).

A forma, tamanho e a estrutura física mostraram correlação com a atividade antibacteriana dos AgNPs, pois em concentrações mais altas de AgNPs esféricos mostraram atividade antibacteriana mais intensa, devido à fácil liberação

de íons Ag (CHEON et al, 2019). Nesse aspecto, o tamanho também é importante, uma vez que, quanto menor a partícula, maior a chance de interagir com outras partículas, podendo aumentar sua eficiência antimicrobiana. Por outro lado, se permear o tecido cutâneo, pode apresentar maior toxicidade. Entretanto, de forma geral, são características ajustáveis e que interferem na atividade antimicrobiana (THAKKAR, MHATRE & PARIKH, 2010).

A estabilidade das nanopartículas, conhecida como potencial zeta (PZ), foi utilizada para caracterizar a carga superficial, que reflete o potencial elétrico e depende da composição. O potencial zeta dos BioAgNPs aplicados é: 23,27 mV, são estáveis, portanto, é próximo ao valor citado na literatura entre (+/-) 30 mV apresentam estabilidade em suspensão, pois a superfície o carregamento evita a agregação das nanopartículas (MOHANRAJ & CHEN, 2006).

De forma geral há diversos estudos que demonstram atividade da BioAgNP, porém, há diversos fatores, como, a origem biossintética, tamanho, a característica estrutural entre outros aspectos que diferem na sua atividade antimicrobiana, necessitando estender cada vez mais a amplitude desses estudos, afim de adequar a aplicabilidade.

Tabela 7 - CIM para o AC e BioAgNP isolados e associados no ensaio do Checkerboard frente os microrganismos testados:

Microrganismo	CIM ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)					Interação
	AC	AC/BioAgNP	BioAgNP	BioAgNP/AC	FICI	
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	125	11,71	125	2,4	0,11	Sinergismo
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	500	1000	31,25	1,25	2	Antagonista
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	1000	250	7,81	5	0,64	Aditivo

Valores de FICI: “sinérgico” se $FICI \leq 0,5$; “aditivo” se $>0,5$ e ≤ 1 ; “indiferente” (sem interação) se >1 e ≤ 2 e “antagonista” se >2 .

CIF: corresponde a concentração inibitória fracionada quando associada com a AgNPs.

$FICI \leq 0,5$ (sinergismo); $FICI >0,5$ e ≤ 1 (aditivo); $FICI >1$ e ≤ 2 (indiferente) e $FICI >2$. (antagonista)

ATCC :coleção do tipo celular americano

Fonte: Própria autora, 2023.

4.3 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO BIOAGNP COM O AC

Observou-se atividade sinérgica, ou seja, o efeito combinado foi maior que a soma dos efeitos produzidos pelos ativos testado, ou tiveram sua atividade potencializada na associação da BioAgNP com AC em para *S. aureus*. Para *E. coli* apresentou o efeito antagonista, ou seja, o efeito combinado foi menor do que a soma dos efeitos dos valores de CIM de BioAgNP e AC individuais ou mais fraco do que o efeito de qualquer um dos ativos individuais. Efeito aditivo frente *C. albicans*, ou seja, o seu efeito foi igual à soma dos efeitos dos ativos individuais.

Em suma, até o momento não há informação sobre esse tipo de associação na literatura, sendo necessário, realizar mais estudos. Um outro aspecto importante da BioAgNP, demonstrou que não apresentaram citotoxicidade usado em associação com terpenóides (SCANDORIEIRO, et al 2022), sendo interessante,

realizar esse teste para ver a relação com o AC, para um possível desenvolvimento de uma forma farmacêutica para uso tópico, afim de usufruir da atividade da associação dos 2 ativos.

5. CONCLUSÃO

- As técnicas cromatográficas desenvolvidas se demonstram eficientes no processo de isolamento;
- A análise de RMN confirmou que as moléculas isoladas são o AC e o AD;
- A molécula de AD foi isolada em quantidade insuficiente para realizar os ensaios biológicos, entretanto, é a primeira vez que foi isolada na *S. trilobata* (L.) Pruski;
- A técnica do CIM se demonstrou eficiente para avaliação do teste frente a microrganismos,
- Ação do AC frente foi relevante somente para *S. aureus*;
- Ação de BioAgNP foi relevante para *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*;
- Em relação ao ensaio de associação entre a BioAgNP e o AC, demonstrou sinérgico frente *S. aureus*, antagonista para *E. coli* e aditivo para *C. albicans*.

6. REFERÊNCIA

AMORIM, A.F.V. Livro de Química de Métodos Cromatográficos. 1a Edição, Editora da Universidade Estadual do Ceará – EdUECE 03/05/2019

ARAKAWA, N. S. *Viguiera robusta* Gardn. (Asteraceae): investigação fitoquímica do extrato de lavagem foliar e ensaios biológicos. 2003 Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

AZIZAN, K. A., et al. LC-MS Based Metabolomics Analysis to Identify Potential Allelochemicals in *Wedelia trilobata* **Records Natural Product** 10:6 (2016) 788-793

BACCARIN, T., et al. Análise morfoanatômica das partes aéreas de *Wedelia paludosa* DC. (*Acmela brasiliensis*, *Sphagneticola trilobata*), Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 19, 612-16. (2009)

BALBINO, E. E., et al. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 2010.

BALEKAR, N., et al. Wound healing activity of ent-kaura-9(11),16-dien-19-oic acid isolated from *Wedelia trilobata* (L.) leaves. **Phytomedicine**, 19, 1178-84. 2012

BANUTH, V.L. O Desenvolvimento de Programas Municipais de Fitoterapia. Fitoterápicos: Projeto Farmácia Viva de Arealva – SP. In: WORKSHOP DE PLANTAS MEDICINAIS DE BOTUCATÚ, II, Botucatu – SP, 14 - 15 /06/1996. Anais, Botucatu, P.49 – 53.

BASS, S. N., et al. Mortality risk factors for critically ill patients with carbapenem-resistant bacteremia: impact of combination antimicrobial therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 59, 3748–3753. doi: 10.1128/AAC.00091-15. 2015.

BIVIATTI, M.V., et al. Análise de óleos-resinas de copaíba: contribuição para o seu controle de qualidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 2006, vol.16, n.2, pp.230-235. ISSN 0102-695X.

BLOCK, L.C. Determinação dos princípios ativos de *Wedelia paludosa* D.C., (*Compositae*). Itajaí, 63p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação)-Curso de Farmácia, Universidade do Vale do Itajaí 1997.

BOHLMANN, F., et al. Sesquiterpene and diterpene derivatives from *Solidago* species. **Phytochemistry** 19, 2655. (1980).

BOLLENBACH, T. Antimicrobial interactions: mechanisms and implications for drug discovery and resistance evolution. **Current Opinion in Microbiology**. 27, 1–9. doi: 10.1016/j.mib.2015.05.008 (2015).

BORGHI, S. M. et al. *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski-derived kaurenoic acid prevents ovalbumin-induced asthma in mice: Effect on Th2 cytokines, STAT6/GATA-3 signaling, NFκB/Nrf2 redox sensitive pathways, and regulatory T cell phenotype markers, **Journal of Ethnopharmacology**, Volume 283,2022,114708, ISSN 0378-8741, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114708>.

CANDIDO, A.C.B.B., et al. Avaliação da atividade leishmanicida do diterpeno ácido caurenóico contra *Leishmania amazonenses* v. 15, n. 6 (2016)

CAVALCANTI, B.C., et al. Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico do ácido caurenóico, um diterpeno isolado da planta *Copaifera langsdorffii* desf. (leguminosae), [Dissertação de Mestrado] 2006.

CHEON J.Y., et al. Atividades antimicrobianas dependentes da forma de nanopartículas de prata. **International Journal of Nanomedicine**. 2019;14:2773-2780 <https://doi.org/10.2147/IJN.S196472>

COOPER-DRIVER, G., et al. Kaurane Derivatives from Leaves of *Solidago nemoralis*. **Journal of Natural Product**. 50, 327. (1987)

COSTA, A.R.M., et al. *Copaifera langsdorffii* supercritical fluid extraction: Chemical and functional characterization by LCQMS and *in vitro* assays. **The Journal of Supercritical Fluids**, v;100, n;5, p.86-96, 2015

CROTEAU, R., et al. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. Biochemistry & molecular biology of plants. Rockville: **American Society of Plant Physiologists**, 2000

DA COSTA, F.B., et al. W. Constituents of *Viguiera aspillioides* and *V. robusta*. **Biochemical Systematics and Ecology**., 24, 6, 585 – 87, 1996.

DESPAX, B., et al. Microscopia eletrônica de transmissão para elucidar o impacto de tratamentos à base de prata (prata iônica versus revestimento contendo nanoprata) no modelo de levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Nanotecnologia** 22:175101. doi: 10.1088/0957-4484/22/17/175101. 2011

DURÁN, N., et al. Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants. Appl. **Journal of Microbiology and Biotechnology** 90, 1609–1624. doi: 10.1007/s00253-011-3249-8 (2011).

DURÁN, N., et al. Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. Soc. 21, 949–959. doi: 10.1590/S0103-50532010000600002.(2010).

FALLARERO, A., et al. O ácido (+)-desidroabiético, um diterpeno do tipo abietano, inibe os biofilmes de *Staphylococcus aureus in vitro* Int. **Journal of Molecular Sciences** 14 (2013), pp. 12054-12072, 10.3390 / [ijms140612054](https://doi.org/10.3390/ijms140612054)

FERNANDES, A. C., et al. A família Asteraceae no Morro Santana, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, n. 4, p. 395–439, 2009.

FERNANDEZ-MARTIN, R. et al. Ent-Kaurene and squalene synthesis in *Fusarium fujikuroi* cell-free extracts. **Phytochemistry**, 54, 723 – 28. (2000).

FISCHBACH, M. A. Combination therapies for combating antimicrobial resistance **Current Opinion in Microbiology**. 14, 519–523. doi: 10.1016/j.mib.2011.08.003. (2011)

GARCIA, P.A., et al. Occurrence, biological activities and synthesis of kaurane diterpenes and their glycosides. **Molecules**. v.12, p.455-483, 2007.

GONÇALVES, M. D. et al. Dehydroabietic acid isolated from *Pinus elliottii* exerts in vitro antileishmanial action by pro-oxidant effect, inducing ROS production in promastigote and downregulating Nrf2/ferritin expression in amastigote forms of *Leishmania amazonensis*, **Fitoterapia**. Volume 128,2018, Pages 224-232, ISSN 0367-326X, <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.05.027>.

GRAVES, J. L. JR., et al. (2015). Rapid evolution of silver nanoparticle resistance in *Escherichia coli* **Frontiers in Genetics**. 6:42. doi: 10.3389/fgene.2015.00042

HAMED, S., et al. Silver nanoparticles: Antimicrobial activity, cytotoxicity, and synergism with N-acetyl cysteine. **Journal of Basic Microbiology** 2017;57(8):659-68

HANSON, JR. Diterpenoids. **Natural Products Reports**, v. 21, p. 785-793, 2004.

HANSON, JR Diterpenoids. **Natural Products Reports**, v. 26, p. 1156-1171, 2009.

HERMAN, A., et al. Nanoparticles as antimicrobial agents: their toxicity and mechanisms of action. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. 14, 946–957. doi: 10.1166/jnn.2014.9054. 2014

KARROUCHI, K., et al. Synthesis and pharmacological activities of pyrazole derivatives: a review. **Molecules**, v.23, p.134-219, 2018.

KIM , W.J., et al. Ácido desidroabiético é um novo inibidor de survivina para câncer gástrico. **Plantas (Basileia)**. 2021 junho; 10(6): 1047.Publicado online em 22 de maio de 2021. doi: 10.3390/plants10061047. PMID: 34067279. PMCID: PMC8224772

KIM S. H., et al (2011). Antibacterial activity of silver-nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. 39, 77–85. [[Google Scholar](#)].

KIM, E., et al. O ácido desidroabiético suprime a resposta inflamatória através da supressão das vias mediadas por Src, Syk e TAK1. **International Journal Molecular Science**. 29 de março de 2019;20(7):1593.PMID: 30934981, PMCID: PMC6480320, DOI: 10.3390/ijms20071593

KIM, S.H., et al. Atividade antibacteriana de nanopartículas de prata contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. 39, 77–85. 2011.

KIM, W.J., et al. O ácido dehidroabiético inibe o crescimento de células cancerígenas gástricas via apoptose induzida e parada do ciclo celular. **Molecular and Cellular Toxicology**. 2021; 17 :133-139. doi: 10.1007/s13273-021-00118-9.

KREIS, W., et al. Biossíntese de metabólitos primários e secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. 7ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 147-165.

LAZIĆ, V. , et al. Atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata suportadas por magnetita. 10 de abril de 2019 <https://doi.org/10.1002/slct.201900628>.

LEANDRO, L. F., et al. Atividade antibacteriana de *Pinus elliottii* e seu composto majoritário, ácido desidroabiético, contra cepas multirresistentes **Journal of Medical Microbiology** 2014 dez;63(Pt 12):1649-1653. doi: 10.1099/jmm.0.081711-0. Epub 2014 Set 26.

LÓPEZ, C. A. A. Considerações Gerais Sobre Plantas Medicinais. Ambiente: Gestão e Desenvolvimento. v. 1, p. 19-27. Boa Vista. 2006

LOSASSO, C. et al. (2014). Antibacterial activity of silver nanoparticles: sensitivity of different *Salmonella* serovars. **Frontiers in Microbiology** . 5:227. doi: 10.3389/fmicb.2014. 00227

MEENA, A.K., et al. Pharmacological and Phytochemical Evidences for the Plants of *Wedelia* Genus– A Review Asian **Journal of Pharmaceutical Research** 1:07-12. 2011.

MIZOKAMI, S., et al. O ácido caurenóico de *Sphagneticola trilobata* inibe a dor inflamatória: efeito sobre a produção de citocinas e a ativação da via de sinalização de canais de potássio sensíveis a GMP-proteína-quinase, GMP-Cíclica NO-cíclica. **Journal of Natural Products** 75 (5), 896-904. 2012. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22574649/>

MONDIN, C. A., et al. *Sphagneticola* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015.

MOHANRAJ, V. J., CHEN, Y. A Review. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, **Nanoparticles** 5(1), 561-573. (2006).

MULANI, M.S., et al. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. **Frontiers in Microbiology** 2019 Apr 1;10:539. doi: 10.3389/fmicb.2019.00539. PMID: 30988669; PMCID: PMC6452778.

NAKAZATO, G. et al. Ag system Violacein@Biogenic: synergistic antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* **Springer Nature** B.V. 2019

NINGANAGOUDA, S., et al. Cinética de crescimento e ação mecanística de espécies reativas de oxigênio liberadas por nanopartículas de prata de *Aspergillus niger* sobre *Escherichia coli*. **BioMed Research International**. 2014:753419. doi: 10.1155/2014/753419

ODDS F.C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 52:1. (2003) <https://doi.org/10.1093/jac/dkg301>

PAIVA, L.A., et al. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorff* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascular Pharmacology** 39; 303-307, 2002.

PERTINO, M.W., et al. Atividade antiprotozoária de derivados triazólicos de ácido desidroabiético e ácido oleanólico *Molécula*, 22 (2017) pp. 1-10 10,3390 / [moléculas22030369](https://doi.org/10.3390/mol22030369)

PETERS, R.J. Two rings in them all: the labdane-related diterpenoids. **Natural Product Reports**. 2010 Nov;27(11):1521-30. doi: 10.1039/c0np00019a. Epub 2010 Oct 1. PMID: 20890488; PMCID: PMC3766046.

PRASNIEWSKI, A. Isolamento de compostos bioativos das folhas de jambo (*Syzygium malaccense*). 2019. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2019.

QING, Y. et al. Potencial mecanismo antibacteriano de nanopartículas de prata e otimização de implantes ortopédicos por tecnologias avançadas de modificação. **International Journal of Nanomedicine**. 13, 3311–3327. doi: 10.2147/IJN.S16512. 2018

QUESTER, K., et al. Biosynthesis and microscopic study of metallic nanoparticles. **Micron**, v. 54–55, p. 1–27, 2013.

ROCHA, C. A. M. As pernas do caranguejo: cancer crura. Belém: [editor autor], 2013. 114 p.

RODRÍGUEZ-SERRANO, C. et al. Biossíntese de nanopartículas de prata por *Fusarium scirpi* e seu potencial como agente antimicrobiano contra biofilmes uropatogênicos de *Escherichia coli*. **Plos One** 15:e0230275. (2020). doi: 10.1371/journal.pone.0230275

SANKAR, R., et al. Mediated biosynthesis of silver nanoparticles for its antibacterial and anticancer activity. **Colloids Surfaces B Biointerfaces** (2013).108, 80–84. doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.02.033

SANTOS, F. P., et al. Verificação da ocorrência de plantas com potencial de toxicidade nos jardins do campus Mooca da Universidade São Judas Tadeu (São Paulo/SP). Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista, v. 11, n. 8, 4 dez. 2015. DOI: 10.17271/1980082711820151200.

SANTOS, S.C. Caracterização cromatográfica de extratos medicinais de guaco: *Mikania laevigata*

SCANDORIEIRO, S., et al. Nanopartículas biogênicas de prata combinadas estrategicamente com derivados de *Origanum vulgare*: mecanismo antibacteriano de ação e efeito em cepas multirresistentes. **Frontiers Microbiology**. 13:842600. doi: 10.3389/fmicb.2022.842600. 2022.

SILVA, R. Z., et al. Investigação fitoquímica e avaliação da atividade antibacteriana da *Mikania lanuginosa* DC (ASTERACEAE) Visão Acadêmica, Curitiba, v. 3, n. 2, pág. 59-64, Jul.-Dez./2002 DOI: <http://dx.doi.org/10.5380/acd.v3i2.502>

SIMÕES, C. M. O., et al. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: **Artmed**, 486 p. 2017

SINGH, K., et al. Green silver nanoparticles of *Phyllanthus amarus*: as an antibacterial agent against multi drug resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Nanobiotechnology**. 12:40. doi: 10.1186/s12951-014-0040-x. 2014.

SINTUBIN, L. et al. Biologically produced nanosilver: Current state and future perspectives. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 10, p. 2422–2436, 2012.

SUCHER, N.J. Searching for Synergy in silico, in vitro and in vivo. **Sinergy**, v.1, p.30-43, 2014

TAIZ, L; et al. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. 6.ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2017. 888 p.

THAKKAR, K. N., et al. Biological synthesis of metallic nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 2, p. 257–262, 2010.

THEOPHEL, K., et al. The importance of growth kinetic analysis in determining bacterial susceptibility against antibiotics and silver nanoparticles. **Frontiers Microbiology**. 5:544. 10.3389/fmicb.2014.00544 (2014).

TÔRRES, A.R., et al. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.4, p.373-380, 2005.

VAHERMO, M. et al. Atividade antiprotozoária de derivados do ácido desidroabiético contra *Leishmania donovani* e *Trypanosoma cruzi* **Medicinal Química Comum.**, 7 (2015), pp. 1 - 3, [10.1039/C5MD00498E](https://doi.org/10.1039/C5MD00498E)[11]

VILLA-RUANO, N.; et al. Ácido Kaurenóico: um diterpeno com uma ampla gama de atividades biológicas. AU Rahman (Ed.) Estudos em Química de Produtos Naturais, **Elsevier**, Amsterdã. 2016. pp. 151-171, 10.1016 / B978-0-444-63932-5.00003-6

VIVAS, M.C., et al. Ocorrência de isolados de bactérias Gram-negativas produtoras de β -lactamase em fontes de água na cidade de Cali, Colômbia. **International Journal of Microbiology**. 2019:1375060. doi: 10.1155/2019/1375060.2019.

WILKENS, M.; et al.; Characterization of the bactericidal activity of the natural diterpene kaurenoic acid. **PlantMed**, v.68, n.5, p.452-454, 2002.

ZENGIN, H.; BAYSAL, A.H. Atividade antibacteriana e antioxidante de terpenos de óleo essencial contra bactérias patogênicas e formadoras de deterioração e relações entre estrutura e atividade celular avaliadas por microscopia SEM. **Molecules** , 19 , 17773-17798. 2014. <https://doi.org/10.3390/molecules191117773>

ZHANG, X., et al. Synthesis of nanoparticles by microorganisms and their application in enhancing microbiological reaction rates. **Chemosphere**, v. 82, n. 4, p. 489–494, 2011.