



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Laura Silva Fernandes**

**Composição química e efeito antibiótico das frações diclorometânicas floral e foliar de  
*Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae Bercht. & J. Presl)**

**Juiz de Fora**  
**2019**

**Laura Silva Fernandes**

**Composição química e efeito antibiótico das frações diclorometânicas floral e foliar de  
*Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae Bercht. & J. Presl)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas - Área de concentração: Produtos Naturais Bioativos

Orientadora: Profa. Dra. Maria Silvana Alves  
Co-orientadores: Profa. Dra. Ana Lúcia Santos de Matos Araújo  
Prof. Dr. Ítalo Tuler Perroni

**Juiz de Fora**

**2019**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Fernandes, Laura Silva.

Composição química e efeito antibiótico das frações diclorometânicas floral e foliar de *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae Bercht. & J. Presl) / Laura Silva Fernandes. -- 2019. 119 f. : il.

Orientadora: Maria Silvana Alves

Coorientadora: Ana Lúcia Santos de Matos Araújo

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2019.

1. *Vernonia polyanthes*. 2. Asteraceae. 3. *Salmonella* spp. 4. Lupeol. 5. Antibiótico. I. Alves, Maria Silvana, orient. II. Araújo, Ana Lúcia Santos de Matos, coorient. III. Título.

Laura Silva Fernandes

**Composição química e efeito antibiótico das frações diclorometânicas floral e foliar de  
*Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae Bercht. & J. Presl)**

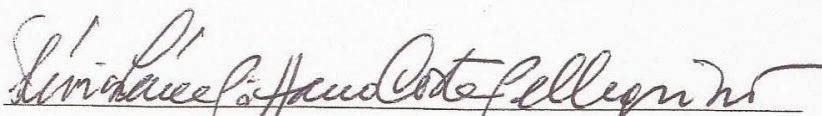
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas - Área de concentração: Produtos Naturais Bioativos

Aprovada em 08 de julho de 2019

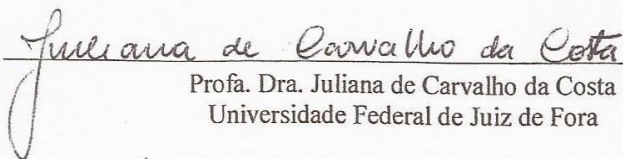
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Maria Silvana Alves - Orientadora  
Universidade Federal de Juiz de Fora



Profa. Dra. Flávia Lúcia Piffano Costa Pellegrino  
Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste



Profa. Dra. Juliana de Carvalho da Costa  
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico este trabalho aos meus amados pais!

## AGRADECIMENTOS

A Deus, meu Pai Amado, pela vida, por não me deixar desistir nas dificuldades, por iluminar meus caminhos me permitindo chegar até aqui;

Aos meus pais, Adilson e Cida, pelo amor incondicional, incentivo e força em todos os momentos;

Aos meus avós pelas orações, pelo apoio, amor e confiança;

Ao meu amor, Wagner, pelo carinho, paciência e amizade;

À minha família, aos meus sogros e minha cunhada pela torcida e incentivo;

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Silvana Alves, pela oportunidade, confiança, atenção, carinho e pelos valiosos ensinamentos. Admiro sua garra e agradeço suas palavras de motivação e incentivo que foram fundamentais nesta trajetória;

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Ana Lúcia Santos de Matos Araújo, pela disponibilidade, atenção, carinho e conhecimentos transmitidos;

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Ítalo Tuler Perrone, pela generosidade e todos os valiosos ensinamentos;

À toda equipe do Laboratório de Bioatividade Celular e Molecular da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), em especial, aos mestrandos Ygor Costa e Wesley Moraes, aos alunos de iniciação científica Alice Furtado, Sara Rodrigues, Nicole Moreira e Giovana Garcia e à querida farmacêutica, Técnica Administrativa em Educação (TAE) e Mestre em Ciências Farmacêuticas, Lívia Mara Silva, pelo apoio, amizade e parceria. A ajuda de vocês foi fundamental para a execução deste trabalho!

À querida amiga, farmacêutica, Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados e doutoranda em Genética e Biotecnologia Martha Eunice de Bessa, agradeço pelo carinho, amizade, cuidado, disponibilidade, conhecimentos compartilhados e parceria. Sua ajuda foi crucial para a finalização do trabalho!

Aos TAEs J3sus Sarmento, 3der Tostes, Jo3o Pablo Fortes e Lorena Riani pela disponibilidade;

À Profa. Dra. Cristiane Gonçaves de Oliveira (*in memoriam*), por possibilitar a utilização do Cromatógrafo em Fase Gasosa;

À Mestre Adriana L3cia Pires Ferreira, por gentilmente ceder as cepas bacterianas cl3nicas humanas utilizadas no estudo;

Aos professores do Programa de P3s-Graduaç3o em Ci3ncias Farmac3uticas e da Faculdade de Farm3cia da UFJF, pelos ensinamentos;

Aos secret3rios do Programa de P3s-Graduaç3o em Ci3ncias Farmac3uticas da UFJF, Arlem Martins de Rezende e Sullivan Ramos Moreira Andrade, pelo atendimento de qualidade;

À Fundaç3o de Amparo 3 Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo suporte financeiro por meio do aporte de recursos no projeto "Potencial antimicrobiano de produtos naturais frente 3s amostras de refer3ncia e detentoras de determinantes de resist3ncia de relev3ncia cl3nica" (CDS-APQ-04680-10), que viabilizou parcialmente a realizaç3o do presente estudo, 3 UFJF, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Cient3fico e Tecnol3gico (CNPq) e 3 Coordenaç3o de Aperfeiçoamento de Pessoal de N3vel Superior (CAPES) pelos aux3lios financeiros para participaç3o em eventos e pela bolsa concedida, respectivamente;

Ao Programa de P3s-Graduaç3o em Ci3ncias Farmac3uticas da UFJF, pela oportunidade e infraestrutura para realizaç3o dos experimentos propostos;

Aos funcion3rios do Centro de Pesquisas Farmac3uticas da Faculdade de Farm3cia da UFJF;

Finalmente, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribu3ram para a realizaç3o do presente estudo;

A todos voc3s, muito obrigada!

*"O investigador sofre decepções, os longos meses passados em uma direção errada, os fracassos. Mas as falhas também são úteis, porque, se bem analisadas, podem levar ao sucesso. E para o pesquisador não há alegria comparável à de uma descoberta, ainda que pequena."*

*Sir Alexander Fleming*



## RESUMO

*Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae Bercht & Presl.) é uma planta nativa da América do Sul, popularmente conhecida no Brasil como assa-peixe e tradicionalmente usada para o tratamento de gripe, resfriado, bronquite, problemas intestinais e renais, infecção uterina, úlceras e febre. O presente estudo teve como objetivo investigar as composições químicas e os efeitos antibióticos das frações diclorometânicas floral (DF-Vp) e foliar (DL-Vp) obtidas desta espécie vegetal. Folhas e flores foram extraídas em soluções hidroetanólicas 70% e submetidas a partição líquido/líquido com hexano (HF-Vp/HL-Vp) seguida de diclorometano (DF-Vp/DL-Vp). Inicialmente, foi realizada uma triagem do efeito antibiótico *in vitro* dos extratos e frações por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM), seguida pela classificação do efeito antibiótico frente as cepas de referência ATCC® *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™, ATCC® 29213™ e ATCC® 6538™), *Escherichia coli* (ATCC® 10536™ e ATCC® 25922™), *Salmonella Choleraesuis* (ATCC® 10708®), *Salmonella Typhimurium* (ATCC® 13311™) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 9027™ e ATCC® 27853™), que destacou DF-Vp e DL-Vp como as mais promissoras. Os perfis químicos de DF-Vp e DL-Vp foram estabelecidos por meio de cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM), que revelou a presença de terpenoides e flavonoides, marcadores quimiotaxonômicos de *V. polyanthes*. O efeito antibiótico de DL-Vp e DF-Vp foi aprofundado frente as cepas de referência *Salmonella Choleraesuis* (ATCC® 10708™) e *Salmonella Typhimurium* (ATCC® 13311™) e clínicas humanas *Salmonella Enteritidis* 1428260 e *Salmonella* spp. 1507708 por meio dos ensaios do efeito combinatório, tempo de morte bacteriana, viabilidade celular e extravasamento de substâncias absorvidas a 280 nm. Adicionalmente, foi investigado se o metabólito lupeol seria o principal responsável pelo efeito antibiótico desta espécie vegetal. DL-Vp foi ativo frente a *S. Choleraesuis* (ATCC® 10708™), *S. Typhimurium* (ATCC® 13311™) e *Salmonella* spp. 1502596 e 1266695, com CIM igual a 625 µg/mL, e *Salmonella* spp. 1553217 e 1507708 e *S. Enteritidis* 1428260, com CIM de 1250 µg/mL. DF-Vp se mostrou ativo frente a *Salmonella* spp. 1502596 (CIM = 625 µg/mL) e também inibiu o crescimento de *S. Choleraesuis* (ATCC® 10708™), *S. Typhimurium* (ATCC® 13311™) e *S. Enteritidis* 1428260 com CIM de 1250 µg/mL, e *Salmonella* spp. 1507708 e 1266695 (CIM = 2500 µg/mL). Com exceção de DL-Vp frente a *S. Typhimurium* (ATCC® 13311™) com CIM de 5000 µg/mL e efeito bactericida, os demais foram classificados como bacteriostáticos para ambas as frações e cepas testadas. O sinergismo entre DL-Vp e DF-Vp e os antibióticos se mostrou cepa dependente. O ensaio do tempo de morte bacteriana demonstrou que DL-Vp e DF-Vp diminuíram a densidade populacional bacteriana e, na maioria dos casos, os tratamentos com essas frações foram mais eficientes do que com os antibióticos. Finalmente, a citotoxicidade foi determinada pelo bioensaio com *Artemia salina* e as frações diclorometânicas foram classificadas como atóxicas. Os resultados revelaram o efeito antibiótico promissor de *V. polyanthes*, principalmente frente a *Salmonella*, incluindo cepas clínicas resistentes à levofloxacino e ampicilina. Além disso, constatou-se que lupeol não foi o principal responsável por esse efeito nesta espécie vegetal.

Palavras-chave: *Vernonia polyanthes*. Asteraceae. *Salmonella* spp. Lupeol. Antibiótico.

## ABSTRACT

*Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae Bercht & Presl.), is a native South American plant, popularly known in Brazil as "assa-peixe" and traditionally used in the treatment of flu, cold, bronchitis, intestinal and kidney disorders, uterine infection, ulcers and fever. Thus, the present study aimed to investigate the chemical compositions and antibiotic effects of floral (DF-Vp) and foliar (DL-Vp) dichloromethane fractions. Fresh leaves and flowers were extracted with hydroethanolic solutions 70% and subjected to liquid / liquid partition with hexane (HF-Vp / HL-Vp) and dichloromethane (DF-Vp / DL-Vp). Initially, an *in vitro* screening of the antibiotic effect of extracts and fractions from this plant species was established by determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC), followed by the classification of the antibiotic effect against *Staphylococcus aureus* (ATCC<sup>®</sup> 25923<sup>™</sup>, 29213<sup>™</sup> and 6538<sup>™</sup>), *Escherichia coli* (ATCC<sup>®</sup> 10536<sup>™</sup> and 25922<sup>™</sup>), *Salmonella Choleraesuis* (ATCC<sup>®</sup> 10708<sup>™</sup>), *Salmonella* Typhimurium (ATCC<sup>®</sup> 13311<sup>™</sup>) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC<sup>®</sup> 9027<sup>™</sup> and 27853<sup>™</sup>), revealing DF-Vp and DL-Vp as the most promising. DF-Vp and DL-Vp chemical profiles were analyzed by gas chromatography coupled to a mass spectrometry detector (GC-MS) that showed the presence of terpenoids and flavonoids, chemotaxonomic markers of *V. polyanthes*. The antibiotic effect of DL-Vp and DF-Vp was further investigated against *Salmonella Choleraesuis* (ATCC<sup>®</sup> 10708<sup>™</sup>), *Salmonella* Typhimurium (ATCC<sup>®</sup> 13311<sup>™</sup>) and *Salmonella* Enteritidis 1428260 and *Salmonella* spp. 1507708 clinical strains by the combinatorial effect, time kill, cellular viability and leakage of compounds absorbing at 280 nm assays. Additionally, we investigated if lupeol could be the main responsible for the antibiotic effect of this plant species. DL-Vp was active against *S. Choleraesuis* (ATCC<sup>®</sup> 10708<sup>™</sup>), *S. Typhimurium* (ATCC<sup>®</sup> 13311<sup>™</sup>), and *Salmonella* spp. 1502596 and 1266695, with MIC values of 625 µg/mL, and *Salmonella* spp. 1553217 and 1507708 and *S. Enteritidis* 1428260, with MIC of 1250 µg/mL. DF-Vp was active against *Salmonella* spp. 1502596 (MIC = 625 µg/mL) and also against *S. Choleraesuis* (ATCC<sup>®</sup> 10708<sup>™</sup>), *S. Typhimurium* (ATCC<sup>®</sup> 13311<sup>™</sup>) and *S. Enteritidis* 1428260 with MIC values of 1250 µg/mL, and *Salmonella* spp. 1507708 and 1266695 (MIC = 2500 µg/mL). With the exception of DL-Vp against *S. Typhimurium* (ATCC<sup>®</sup> 13311<sup>™</sup>) with MIC values of 5000 µg/mL and bactericidal effect, the other fractions were classified as bacteriostatic against the other strains. The synergism between DL-Vp and DF-Vp and the antibiotics was dependent strain. The time kill test showed that DL-Vp and DF-Vp decreased bacterial population density, and in most cases, treatments with these fractions were more efficient than the antibiotics. Finally, cytotoxicity was determined by *Artemia salina* bioassay and the dichloromethanic fractions were classified as nontoxic. The results revealed the promising antibiotic effect of *V. polyanthes*, mainly against *Salmonella*, including clinical strains that were resistant to levofloxacin and ampicillin. In addition, it was possible to affirm that it was observed that lupeol was not the main responsible for this effect in this plant species.

Keywords: *Vernonia polyanthes*. Asteraceae. *Salmonella* spp. Lupeol. Antibiotic.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Imagem ilustrativa das estruturas moleculares dos antibióticos derivados da penicilina ( $\beta$ -lactâmicos) e do ácido nalidíxico (quinolonas).....	29
Figura 2	- Representação esquemática dos principais fatores envolvidos no surgimento e disseminação da resistência aos antimicrobianos.....	32
Figura 3	- Linha do tempo com as datas de descoberta/patente de classes de antibióticos e, após 1987, o "vácuo de descoberta".....	34
Figura 4	- Representação esquemática da origem dos <i>building blocks</i> .....	37
Figura 5	- Representação esquemática das rotas biossintéticas envolvidas no metabolismo especial.....	38
Figura 6	- Imagem ilustrativa do esqueleto químico básico dos flavonoides.....	39
Figura 7	- Imagem ilustrativa das estruturas químicas dos subgrupos de flavonoides..	40
Figura 8	- Imagem ilustrativa da estrutura da unidade de isopreno ( $C_5$ ).....	41
Figura 9	- Esquema ilustrativo da classificação dos terpenos.....	42
Figura 10	- Mapa ilustrativo da distribuição mundial da <i>Vernonia polyanthes</i> .....	46
Figura 11	- Fotografia das flores e folhas de <i>Vernonia polyanthes</i> após coleta no Horto de Plantas Medicinais da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora.....	47
Figura 12	- Fotografia das folhas (A) e inflorescências (B) de <i>Vernonia polyanthes</i> durante o processo de secagem a temperatura ambiente.....	57
Figura 13	- Esquema ilustrativo do processo de extração e fracionamento a partir das folhas de <i>Vernonia polyanthes</i> .....	59
Figura 14	- Esquema ilustrativo do processo de extração e fracionamento a partir das flores de <i>Vernonia polyanthes</i> .....	60
Figura 15	- Esquema representativo do procedimento de diluição seriada realizado na microplaca.....	66
Figura 16	- Esquema ilustrativo dos controles do ensaio de microdiluição em caldo..	66
Figura 17	- Esquema ilustrativo da organização das microplacas para determinação da Concentração Inibitória Mínima pelo método de microdiluição em caldo dos extratos e frações florais e foliares de <i>Vernonia polyanthes</i> .....	67
Figura 18	- Esquema ilustrativo do procedimento para determinação da Concentração Bactericida Mínima e classificação do efeito antibiótico como bactericida ou bacteriostático.....	69

Figura 19	- Esquema ilustrativo da organização da microplaca para realização do ensaio do efeito combinatório.....	70
Figura 20	- Perfil cromatográfico da fração diclorometânica floral de <i>Vernonia polyanthes</i> (DF-Vp).....	76
Figura 21	- Perfil cromatográfico da fração diclorometânica foliar de <i>Vernonia polyanthes</i> (DL-Vp).....	76
Figura 22	- Perfil cromatográfico do padrão de n-alcenos (C <sub>7</sub> -C <sub>40</sub> ).....	76
Figura 23	- Curva do tempo de morte da <i>Salmonella</i> Typhimurium (ATCC® 13311™) na presença das frações diclorometânicas floral (DF-Vp) e foliar (DL-Vp), ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL), levofloxacino (LEVO) e combinações das frações com cloranfenicol (DL-Vp/DF-Vp + CHL).....	89
Figura 24	- Curva do tempo de morte da <i>Salmonella</i> Choleraesuis (ATCC® 10708™) na presença das frações diclorometânicas floral (DF-Vp) e foliar (DL-Vp), ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL), levofloxacino (LEVO) e combinações das frações com cloranfenicol (DL-Vp/DF-Vp + CHL).....	90
Figura 25	- Curva do tempo de morte da <i>Salmonella</i> Enteritidis 1428260 na presença das frações diclorometânicas floral (DF-Vp) e foliar (DL-Vp), ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL), levofloxacino (LEVO) e combinações das frações com cloranfenicol (DL-Vp/DF-Vp + CHL).....	91
Figura 26	- Curva do tempo de morte da <i>Salmonella</i> spp. 1507708 na presença das frações diclorometânicas floral (DF-Vp) e foliar (DL-Vp), ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL), levofloxacino (LEVO) e combinações das frações com ampicilina e levofloxacino (DL-Vp/DF-Vp + AMP e DL-Vp/DF-Vp + LEVO).....	92
Figura 27	- Representação gráfica do número de células bacterianas de <i>Salmonella</i> Typhimurium (ATCC® 13311™) viáveis com uma hora de tratamento na presença das frações diclorometânicas floral (DF-Vp) e foliar (DL-Vp), ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL), levofloxacino (LEVO) e combinações das frações com cloranfenicol (DL-Vp/DF-Vp + CHL).....	94
Figura 28	- Representação gráfica do número de células bacterianas de <i>Salmonella</i> Choleraesuis (ATCC® 10708™) viáveis com uma hora de tratamento na presença das frações diclorometânicas floral (DF-Vp) e foliar (DL-Vp),	

	ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL), levofloxacino (LEVO) e combinações das frações com cloranfenicol (DL-Vp/DF-Vp + CHL).....	94
Figura 29	- Representação gráfica do número de células bacterianas de <i>Salmonella</i> Enteritidis 1428260 viáveis com uma hora de tratamento na presença das frações diclorometânicas floral (DF-Vp) e foliar (DL-Vp), ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL), levofloxacino (LEVO) e combinações das frações com cloranfenicol (DL-Vp/DF-Vp + CHL) .....	95
Figura 30	- Representação gráfica do número de células bacterianas de <i>Salmonella</i> spp. 1507708 viáveis com uma hora de tratamento na presença das frações diclorometânicas floral (DF-Vp) e foliar (DL-Vp), ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL), levofloxacino (LEVO) e combinações das frações com ampicilina e levofloxacino (DL-Vp/DF-Vp + AMP ou LEVO).....	95
Figura 31	- Resultado do ensaio de extravasamento de substâncias que absorvem em 280 nm expresso como taxa relativa após tratamento da <i>Salmonella</i> Typhimurium (ATCC® 13311™) com frações diclorometânicas floral (DF-Vp) e foliar (DL-Vp), ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL), levofloxacino (LEVO) e combinações das frações com cloranfenicol (DL-Vp/DF-Vp + CHL).....	96
Figura 32	- Resultado do ensaio de extravasamento de substâncias que absorvem em 280 nm expresso como taxa relativa após tratamento da <i>Salmonella</i> Choleraesuis (ATCC® 10708™) com frações diclorometânicas floral (DF-Vp) e foliar (DL-Vp), ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL), levofloxacino (LEVO) e combinações das frações com cloranfenicol (DL-Vp/DF-Vp + CHL).....	97
Figura 33	- Resultado do ensaio de extravasamento de substâncias que absorvem em 280 nm expresso como taxa relativa após tratamento da <i>Salmonella</i> Enteritidis 1428260 com frações diclorometânicas floral (DF-Vp) e foliar (DL-Vp), ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL), levofloxacino (LEVO) e combinações das frações com cloranfenicol (DL-Vp/DF-Vp + CHL).....	97
Figura 34	- Resultado do ensaio de extravasamento de substâncias que absorvem em 280 nm expresso como taxa relativa após tratamento da <i>Salmonella</i> spp. 1507708 com frações diclorometânicas floral (DF-Vp) e foliar (DL-Vp), ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL), levofloxacino (LEVO) e	

	combinações das frações com ampicilina ou levofloxacino (DL-Vp/DF-Vp + AMP ou LEVO).....	98
Figura 35	- Curva do tempo de morte da <i>Salmonella</i> Typhimurium (ATCC® 13311™) na presença do lupeol, ampicilina (AMP), levofloxacino (LEVO) e cloranfenicol (CHL).....	99
Figura 36	- Curva do tempo de morte da <i>Salmonella</i> Choleraesuis (ATCC® 10708™) na presença do lupeol, ampicilina (AMP), levofloxacino (LEVO) e cloranfenicol (CHL).....	100
Figura 37	- Curva do tempo de morte da <i>Salmonella</i> Enteritidis 1428260 na presença do lupeol, ampicilina (AMP), levofloxacino (LEVO) e cloranfenicol (CHL).....	100
Figura 38	- Curva do tempo de morte da <i>Salmonella</i> spp. 1507708 na presença do lupeol, ampicilina (AMP), levofloxacino (LEVO) e cloranfenicol (CHL)..	101
Figura 39	- Representação gráfica do número de células bacterianas de <i>Salmonella</i> Typhimurium (ATCC® 13311™) viáveis com uma hora de tratamento na presença de lupeol, ampicilina (AMP), levofloxacino (LEVO) e cloranfenicol (CHL).....	101
Figura 40	- Representação gráfica do número de células bacterianas de <i>Salmonella</i> Choleraesuis (ATCC® 10708™) viáveis com uma hora de tratamento na presença de lupeol, ampicilina (AMP), levofloxacino (LEVO) e cloranfenicol (CHL).....	102
Figura 41	- Representação gráfica do número de células bacterianas de <i>Salmonella</i> Enteritidis 1428260 viáveis com uma hora de tratamento na presença de lupeol, ampicilina (AMP), levofloxacino (LEVO) e cloranfenicol (CHL).....	102
Figura 42	- Representação gráfica do número de células bacterianas de <i>Salmonella</i> spp. 1507708 viáveis com uma hora de tratamento na presença de lupeol, ampicilina (AMP), levofloxacino (LEVO) e cloranfenicol (CHL).....	102

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Classes de antibióticos descobertos na "era de ouro".....	30
Tabela 2	- Lista de patógenos prioritários publicada pela Organização Mundial da Saúde em 2017 para guiar a pesquisa, a descoberta e o desenvolvimento de novos antibióticos.....	35
Tabela 3	- Resumo das informações sobre atividades farmacológicas e uso popular de <i>Vernonia polyanthes</i> descritas na literatura.....	48
Tabela 4	- Dados das substâncias identificadas em <i>Vernonia polyanthes</i> descritas na literatura.....	51
Tabela 5	- Intervalo dos valores de Concentração Inibitória Mínima para controle de qualidade do Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos para organismos não fastidiosos.....	63
Tabela 6	- Descrição dos sistemas solvente/diluyente utilizados no preparo das soluções de uso dos extratos e frações de <i>Vernonia polyanthes</i> usadas no método de microdiluição em caldo.....	64
Tabela 7	- Descrição dos sistemas solvente/diluyente utilizados no preparo das soluções estoque e de uso dos antibióticos usados no método de microdiluição em caldo.....	64
Tabela 8	- Resultados da massa e do rendimento dos extratos e frações obtidas por partição dos extratos hidroetanólicos 70% foliar e floral de <i>Vernonia polyanthes</i> .....	75
Tabela 9	- Características da fração diclorometânica floral de <i>Vernonia polyanthes</i> (DF-Vp) analisadas por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM).....	77
Tabela 10	- Características da fração diclorometânica foliar de <i>Vernonia polyanthes</i> (DL-Vp) analisadas por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM).....	78
Tabela 11	- Valores da Concentração Inibitória Mínima dos extratos e frações de <i>Vernonia polyanthes</i> e dos antibióticos frente às cepas de referência ATCC® testadas.....	82
Tabela 12	- Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das frações diclorometânicas foliar (DL-Vp) e floral (DF-Vp) de <i>Vernonia polyanthes</i> e de ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL) e levofloxacino (LEVO) frente às cepas clínicas de <i>Salmonella</i> testadas.....	

Tabela 13 - Resultados do efeito combinatório das frações diclorometânicas floral (DF-Vp) e foliar (DL-Vp) com ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL) e levofloxacino (LEVO) frente às cepas ATCC <sup>®</sup> testadas.....	86
Tabela 14 - Resultados do efeito combinatório das frações diclorometânicas floral (DF-Vp) e foliar (DL-Vp) com ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL) e levofloxacino (LEVO) frente às cepas clínicas testadas.....	87
Tabela 15 - Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do lupeol, ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL) e levofloxacino (LEVO) frente às cepas de <i>Salmonella</i> .....	99



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C	Antes de Cristo
AMH	Ágar Müeller-Hinton
AMP	Ampicilina
ANOVA	do inglês, <i>Analysis of variance</i>
ANT	Antibiótico
BHI	do inglês, <i>Brain Heart Infusion</i>
CMH	Caldo Müeller-Hinton
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAS	do inglês, <i>Chemical American Society Registry Number</i>
CDC	do inglês, <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CESAMA	Companhia de Saneamento Municipal de Juiz de Fora
CESJ	Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora
CG-EM	Cromatografia em fase Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas
CHL	Cloranfenicol
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CTT	Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
DF-Vp	Fração diclorometânica floral de <i>Vernonia polyanthes</i>
d.i.	Diâmetro interno
DL-Vp	Fração diclorometânica foliar de <i>Vernonia polyanthes</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade ótica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EF-Vp	Extrato hidroetanólico 70% floral de <i>Vernonia polyanthes</i>
EL-Vp	Extrato hidroetanólico 70% foliar de <i>Vernonia polyanthes</i>
ETAR	Estação de tratamento de águas residuais
HF-VP	Fração hexânica floral de <i>Vernonia polyanthes</i>
HL-Vp	Fração hexânica foliar de <i>Vernonia polyanthes</i>
HPLC	do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
LEVO	Levofloxacino
Log	Logarítmo
Min	Minutos
NCBI	do inglês, <i>National Center for Biotechnology Information</i>

NIST	do inglês, <i>National Institute of Standards and Technology</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
P.A.	Para análise
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao Sistema Único de Saúde
RF-Vp	Fração remanescente floral de <i>Vernonia polyanthes</i>
RL-Vp	Fração remanescente foliar de <i>Vernonia polyanthes</i>
rpm	Rotações por minuto
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>
<i>S. Choleraesuis</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar. Choleraesuis
<i>S. Enteritidis</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar. Enteritidis
SE	Solução-estoque
serovar.	Soroveriedade
<i>S. Typhimurium</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar. Typhimurium
SU	Solução de uso
subsp.	Subespécie
SUS	Sistema Único de Saúde
T <sub>r</sub>	Tempo de retenção
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TSA	Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
<i>V. polyanthes</i>	<i>Vernonia polyanthes</i>
WHO	do inglês, <i>World Health Organization</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

Da	Dalton
EtOH	Etanol
eV	Elétron-Volt
g	Gramma
H <sub>2</sub> O	Água
kg	Quilograma
L	Litro
M	Molar
mA	Miliampere
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetro
N	Normal
NaCl	Cloreto de sódio
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de sódio
µg	Micrograma
µL	Microlitro
S	do inglês, <i>South</i>
V	Volt
W	do inglês, <i>West</i>
λ	Comprimento de onda
%	Porcentagem
°C	Grau Celsius

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	24
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	28
2.1	RESISTÊNCIA BACTERIANA: UM PROBLEMA GLOBAL DE SAÚDE PÚBLICA.....	28
2.2	METABOLISMO VEGETAL: IMPORTANTE FONTE DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS.....	35
2.2.1	Flavonoides.....	39
2.2.2	Terpenoides.....	41
2.3	CONTEXTUALIZAÇÃO DA ESPÉCIE VEGETAL ESTUDADA.....	42
2.3.1	Família Asteraceae Bercht. & J. Presl.....	42
2.3.2	Gênero <i>Vernonia</i> Schreb.....	44
2.3.3	Espécie <i>Vernonia polyanthes</i> Less.....	45
3	OBJETIVOS.....	56
3.1	GERAL.....	56
3.2	ESPECÍFICOS.....	56
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	57
4.1	MATERIAL VEGETAL.....	57
4.2	PROCESSO DE EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO.....	58
4.3	INVESTIGAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DAS FRAÇÕES DICLOROMETÂNICAS FLORAL E FOLIAR DE <i>Vernonia polyanthes</i> POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA A ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (CG-EM).....	60
4.4	INVESTIGAÇÃO DO EFEITO ANTIBIÓTICO <i>in vitro</i> DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>Vernonia polyanthes</i> .....	61
4.4.1	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	63
4.4.2	Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e classificação do efeito antibiótico da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	68
4.4.3	Avaliação do efeito combinatório.....	69
4.4.4	Determinação do tempo de morte bacteriana.....	71
4.4.5	Determinação da viabilidade celular bacteriana.....	71
4.4.6	Avaliação do extravasamento de substâncias que absorvem a 280 nm.....	72
4.5	INVESTIGAÇÃO DO EFEITO ANTIBIÓTICO <i>in vitro</i> DO LUPEOL.....	72

4.6	TRIAGEM DE CITOTOXICIDADE.....	73
4.6.1	<b>Determinação da toxidez aguda por meio do bioensaio com <i>Artemia salina</i>.....</b>	73
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	73
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	75
5.1	RENDIMENTO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES.....	75
5.2	INVESTIGAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DAS FRAÇÕES DICLOROMETÂNICAS FLORAL E FOLIAR DE <i>Vernonia polyanthes</i> POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA A ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (CG-EM).....	75
5.3	INVESTIGAÇÃO DO EFEITO ANTIBIÓTICO <i>in vitro</i> DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>Vernonia polyanthes</i> .....	81
5.3.1	<b>Determinação da Concentração Inibitória Mínima, da Concentração Bactericida Mínima e classificação do efeito antibiótico como bactericida ou bacteriostático.....</b>	81
5.3.2	<b>Avaliação do efeito combinatório.....</b>	85
5.3.3	<b>Determinação do tempo de morte bacteriana.....</b>	88
5.3.4	<b>Determinação da viabilidade celular bacteriana.....</b>	94
5.3.5	<b>Avaliação do extravasamento de substâncias que absorvem a 280 nm.....</b>	96
5.4	INVESTIGAÇÃO DO EFEITO ANTIBIÓTICO <i>in vitro</i> DO LUPEOL.....	99
5.5	TRIAGEM DE CITOTOXICIDADE.....	104
5.5.1	<b>Determinação da toxidez aguda por meio do bioensaio com <i>Artemia salina</i></b>	104
6	<b>CONCLUSÕES.....</b>	105
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	106
	<b>ANEXO A - Resultado do Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos (TSA) fornecido pelo sistema VITEK®2 para <i>Salmonella</i> spp. 1507708.....</b>	119
	<b>ANEXO B - Resultado do Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos (TSA) fornecido pelo sistema VITEK®2 para <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar. Enteritidis 1428260.....</b>	120
	<b>ANEXO C - Carta de aceite para apresentação do resumo intitulado "<i>Vernonia polyanthes</i> Less. (Asteraceae Bercht. &amp; J. Presl): a promising natural species with antibiotic effect" no 30° Congresso Brasileiro de Microbiologia, 06 a 09 de outubro de 2019, Maceió, Alagoas.....</b>	121
	<b>APÊNDICE A - Resumo intitulado "<i>Vernonia polyanthes</i> Less. (Asteraceae Bercht. &amp; J. Presl): a promising natural species with antibiotic effect" será</b>	

**apresentado na forma de pôster no 30° Congresso Brasileiro de 122  
Microbiologia, 06 a 09 de outubro de 2019, Maceió, Alagoas.....**

## 1 INTRODUÇÃO

---

A utilização de produtos oriundos da natureza como medicinais é uma prática milenar (BALUNAS; KINGHORN, 2005; CRAGG; NEWMAN, 2013). Esse fato pode ser constatado por meio de importantes registros com informações sobre plantas medicinais surgidos nos séculos XVIII a.C. e XVI a.C. (GURIB-FAKIM, 2006). Os árabes foram pioneiros nesta utilização e registravam remédios à base de ervas em placas de argilas (GURIB-FAKIM, 2006). Em 1700 a.C., por ordem do rei da Babilônia, babilônios, assírios e sumérios esculpiram, em pedra, o código Hamurabi, que incluía uma lista de vegetais com propriedades terapêuticas (GURIB-FAKIM, 2006). Em 1500 a.C., os egípcios documentaram, no Papiro de Ebers, em torno de 700 remédios populares originados de plantas (CRAGG; NEWMAN, 2013). Outros compêndios como a Matéria Médica Chinesa, documentos da medicina Ayurveda Indiana, bem como de personalidades gregas e romanas, destaques para o médico Dioscórides e para o professor de Farmácia e Medicina em Roma Galeno, que contribuíram substancialmente para o desenvolvimento racional do uso de ervas medicinais no velho mundo ocidental (CRAGG; NEWMAN, 2013). Inicialmente, os medicamentos originados de plantas eram utilizados na sua forma bruta como chás, pós, tinturas e outras formulações (BALUNAS; KINGHORN, 2005). O conhecimento sobre qual espécie vegetal deveria ser empregada no tratamento de determinada doença e suas formas de aplicação foram transmitidas de geração em geração, se constituindo em um saber popular (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

Na literatura mais recente, Newman e Cragg (2016) estimaram que, entre 1981 a 2014, 25 a 50% dos fármacos disponíveis no mercado foram originados, direta ou indiretamente, de produtos naturais. Segundo estes autores, considerando-se especificamente a pesquisa, a descoberta e o desenvolvimento de antibióticos, a influência dos produtos naturais e suas estruturas é marcante, fazendo com que esse setor seja considerado dependente dos mesmos (NEWMAN; CRAGG, 2016).

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), os antibióticos salvaram milhões de vidas e permitiram o sucesso de importantes procedimentos invasivos e cirúrgicos complexos desde sua introdução na clínica médica (WHO, 2017a). No entanto, a crescente disseminação da resistência bacteriana a estes fármacos e o surgimento de cepas multirresistentes têm ameaçado sua eficácia, resultando em infecções de difícil tratamento ou mesmo "intratáveis" (WHO, 2017a).

O documento publicado pela OMS intitulado "*Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis*" descreve a necessidade urgente de antibióticos preferencialmente inovadores, uma vez que os produtos em desenvolvimento clínico são insuficientes para combater a crescente ameaça de resistência. Conforme preconiza esta Organização, um antibiótico inovador deve cumprir alguns requisitos, tais como não apresentar resistência cruzada aos antibióticos já existentes, tratar-se de uma nova classe química ou possuir um novo alvo ou sítio de ligação ou mecanismo de ação (THEURETZBACHER, 2017; WHO, 2017a).

Na busca por estas moléculas inovadoras, os metabólitos produzidos por produtos naturais, sejam plantas, organismos marinhos ou micro-organismos, representam uma importante e valiosa fonte natural dessas substâncias. Nesse seguimento, o Brasil é um país privilegiado por possuir a maior biodiversidade do mundo, contando com mais de 45.000 espécies de plantas superiores, o que representa 20 a 22% do total do planeta (BERLINK et al., 2017; BRASIL, 2009; DUTRA et al., 2016). Beneficiada por essa diversidade vegetal, a população brasileira tem uma antiga tradição de utilizar as plantas medicinais no tratamento de diversas doenças, prática essa oriunda do somatório dos conhecimentos dos indígenas, portugueses e africanos (BRAGA, 2011). A biodiversidade brasileira acrescida do saber popular sobre sua utilização vem chamando a atenção dos pesquisadores e do governo que, em 2009, elaborou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) (BRASIL, 2009; DUTRA et al., 2016). A RENISUS tem por objetivo orientar estudos e pesquisas com plantas medicinais a fim de fornecer para a população informações sobre sua segurança e eficácia, possibilitando o uso racional de fitoterápicos no tratamento de doenças (BRASIL, 2009).

Entre as 71 espécies vegetais que compõem a RENISUS, *Vernonia* spp. (*Vernonia ruficoma* ou *Vernonia polyanthes*) ocupa a 70ª posição (BRASIL, 2009). *V. polyanthes* Less. (Asteraceae Bercht. & J. Presl), conhecida como assa-peixe, é uma planta nativa do Brasil e popularmente utilizada para o tratamento de gripe, resfriado, bronquite, distúrbios gastrointestinais, problemas renais, infecção uterina, úlceras, febre, reumatismo inflamatório, entre outros (BARON et al., 2005; BRAGA, 1976; WALTRICH; HOSCHEID; PROCHNAU, 2015). A infusão das suas folhas secas é indicada como expectorante no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2011a).



A ampla utilização desta espécie na medicina popular devido as suas propriedades terapêuticas e o fato de se tratar de uma planta nativa com ampla ocorrência na região do Cerrado, em especial no estado de Minas Gerais, chamou a atenção do nosso grupo de pesquisa. Assim, desde 2010, temos nos dedicado ao aprofundamento das investigações sobre *V. polyanthes* a fim de contribuir cientificamente para sua utilização popular, inclusive com informações para seu uso seguro e eficaz. Recentemente, incluímos desenhos de estudo com a perspectiva nutracêutica dessa espécie vegetal visto que a procedência do nome assa-peixe se dá pelo fato de suas folhas, ao serem empanadas e fritas, lembrarem pequenos peixes, sendo, inclusive, classificada como uma Planta Alimentícia Não Convencional (PANC) (BREDARIOL, 2015).

Assim, como produtos científicos de nossa linha de pesquisa tendo esta espécie vegetal como objeto de estudo, podemos citar os relatos das atividades anti-inflamatória tópica e sistêmica, da propriedade cicatrizante e do potencial antioxidante dos extratos obtidos das folhas de *V. polyanthes* (MINATELI et al., 2017; RODRIGUES, 2016; TEMPONI et al., 2012). Vale destacar que, com base no significativo efeito cicatrizante observado, Minateli (2015) desenvolveu um creme dermatológico contendo extrato etanólico das folhas de *V. polyanthes* indicado para tratamentos de feridas, fissuras, escaras, úlceras, lesões de pé diabético, processos inflamatórios e infecciosos, que gerou um depósito de patente (SOUSA et al., 2016).

No entanto, ainda precisávamos esclarecer as dúvidas que tínhamos quanto ao potencial antibiótico desta planta medicinal sobre o (s) provável (is) responsável (is) por esse efeito e qual seria o provável modo de ação envolvido. Nesse sentido, Santana (2015), a partir do extrato de lavagem foliar de *V. polyanthes* isolou, purificou e caracterizou o composto majoritário presente nesse extrato, a lactona sesquiterpênica glaucolídeo A, e avaliou o efeito antibiótico dos extratos e desse composto. Em seguida, Florencio (2017), dando continuidade ao estudo anterior, concluiu que o glaucolídeo A não seria o principal responsável pelo efeito antibiótico frente às cepas testadas, e aprofundou a investigação microbiológica dos extratos de lavagem foliar e floral de *V. polyanthes* sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, inclusive demonstrando o provável modo de ação sobre a membrana celular nesse grupo bacteriano.

Considerando que há resultados a serem explorados obtidos com esta espécie vegetal tais como o efeito antibiótico observado sobre cepas Gram-negativas, em especial sobre *Salmonella*, e que ainda não há arcabouço científico para o uso popular de *V. polyanthes* para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, o presente estudo teve como objetivo aprofundar a

investigação do potencial antibiótico das frações diclorometânicas floral e foliar dessa planta medicinal por meio da determinação dos efeitos antibiótico e combinatório sobre *Salmonella*, da avaliação da cinética bacteriana desse patógeno na presença dessas frações e do provável modo de ação envolvido. Com o intuito de detectar o (s) provável (is) responsável (is) por este efeito, o composto lupeol foi inserido na investigação.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

---

O levantamento bibliográfico foi realizado, principalmente, na plataforma de busca Portal Periódicos CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior); nas bases de dados NCBI (do inglês, *National Center for Biotechnology Information*), *Scopus*, *ScienceDirect* e *Scielo* (do inglês, *Scientific Electronic Library Online*).

### 2.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA: UM PROBLEMA GLOBAL DE SAÚDE PÚBLICA

As infecções bacterianas influenciam significativamente o estado de saúde do ser humano e, por isso, continuam sendo foco de discussões entre profissionais da área da saúde (KING; SOBHANIFAR; STRYNADKA, 2014). Neste contexto, a descoberta dos antibióticos foi um marco na história da medicina e da existência humana (AMINOV, 2010; WHO, 2017a). Desde então, estes fármacos salvaram milhões de vidas possibilitando o controle de doenças infecciosas, reduzindo sua morbimortalidade e sendo cruciais para o sucesso de muitos procedimentos médicos, principalmente invasivos como as cirurgias (AMINOV, 2010; WHO, 2017a).

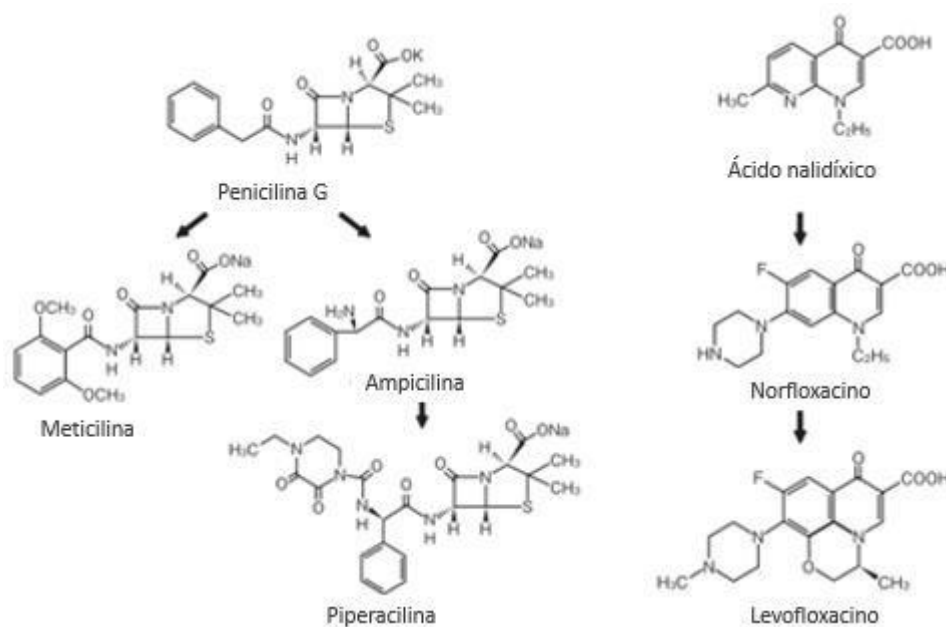
O início do século XX foi considerado a "era dos antibióticos", que ficaram conhecidos como "pílulas mágicas" (AMINOV, 2017; SAGA; YAMAGUCHI, 2009; ZAMAN et al., 2017). O termo "pílula mágica" foi introduzido por Paul Ehrlich com base na observação de que os antibióticos atingiam os micro-organismos causadores de doenças sem afetar o hospedeiro (SAGA; YAMAGUCHI, 2009; ZAMAN et al., 2017).

O grande marco da "era dos antibióticos" ocorreu em 1928 com a descoberta acidental da penicilina por Alexander Fleming (AMINOV, 2017; SAGA; YAMAGUCHI, 2009). Foi em uma cultura de *Staphylococcus aureus* contaminada por fungo do gênero *Penicilium* que Fleming observou zonas de inibição do crescimento bacteriano e as investigações começaram (AMINOV, 2017; SAGA; YAMAGUCHI, 2009). Este cientista verificou que o efeito antibiótico era proveniente de uma substância produzida pelo fungo contaminante, a chamada penicilina (AMINOV, 2017; SAGA; YAMAGUCHI, 2009).

O fato desta importante substância ser um metabólito produzido por micro-organismo motivou a pesquisa com produtos naturais e possibilitou a descoberta de outras moléculas com efeito antibiótico como estreptomicina, cloranfenicol, tetraciclina, macrolídeo

e glicopeptídeo, todas originadas de micro-organismos do solo (SAGA; YAMAGUCHI, 2009). Já em 1962, um antibiótico da classe das quinolonas derivado do ácido nalidíxico foi obtido por síntese orgânica (SAGA; YAMAGUCHI, 2009). A Figura 1 ilustra as moléculas dos antibióticos derivados da penicilina ( $\beta$ -lactâmicos) e do ácido nalidíxico (quinolonas).

Figura 1 - Imagem ilustrativa das estruturas moleculares dos antibióticos derivados da penicilina ( $\beta$ -lactâmicos) e do ácido nalidíxico (quinolonas)



Fonte: Adaptado de Saga e Yamaguchi (2009).

O surgimento crescente de novas substâncias com efeito antibiótico fez com que o período compreendido entre 1950 e 1970 fosse considerado a "era de ouro" na descoberta de novas classes de antibióticos (Tabela 1) (ZAMAN et al., 2017). No entanto, a eficácia destes fármacos estava ameaçada pelo seu uso excessivo, o que poderia levar ao desenvolvimento de resistência conforme já havia sido alertado por Fleming em 1945 e, em seguida, comprovado pela descrição das primeiras cepas resistentes de estreptococos hemolíticos do grupo A (*Streptococcus pyogenes*), *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium tuberculosis*, entre outras (FINLAND, 1955; VENTOLA, 2015). Posteriormente (1962), o primeiro caso de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) foi relatado no Reino Unido. Assim, em 1972, a vancomicina foi introduzida na prática médica visando tratar os pacientes acometidos por cepas MRSA com a promessa de ser um medicamento improvável para o desenvolvimento

de resistência. Porém, nos anos de 1979 e 1983 foram documentados casos de *Staphylococcus* coagulase negativa resistentes a este antibiótico (VENTOLA, 2015).

Tabela 1 - Classes de antibióticos descobertos na "era de ouro"

<b>Classe Química</b>	<b>Alvo</b>	<b>Modo de Ação</b>	<b>Exemplos</b>
Sulfonamida*	Síntese do folato	Bacteriostático	Sulfonamida
$\beta$ -lactâmico**	Síntese da parede celular	Bactericida	Penicilinas / Cefalosporinas / Carbapenêmicos
Aminoglicosídeo**	Síntese proteica	Bactericida	Estreptomicina / Neomicina
Tetraciclina**	Síntese proteica	Bacteriostático	Tetraciclina / Doxiciclina
Cloranfenicol**	Síntese proteica	Bacteriostático	Cloranfenicol
Macrolídeo**	Síntese proteica	Bacteriostático	Eritromicina / Claritromicina
Glicopeptídeo**	Síntese da parede celular	Bactericida	Vancomicina / Teicoplanina
Oxazolidinona*	Síntese proteica	Bacteriostático	Linezolida
Ansamicina**	Síntese de RNA	Bactericida	Rifamicina
Quinolona*	Síntese de DNA	Bactericida	Ciprofloxacino
Estreptogramina**	Síntese proteica	Bactericida	Pristinamicina

\*Síntese química; \*\*Produto natural.

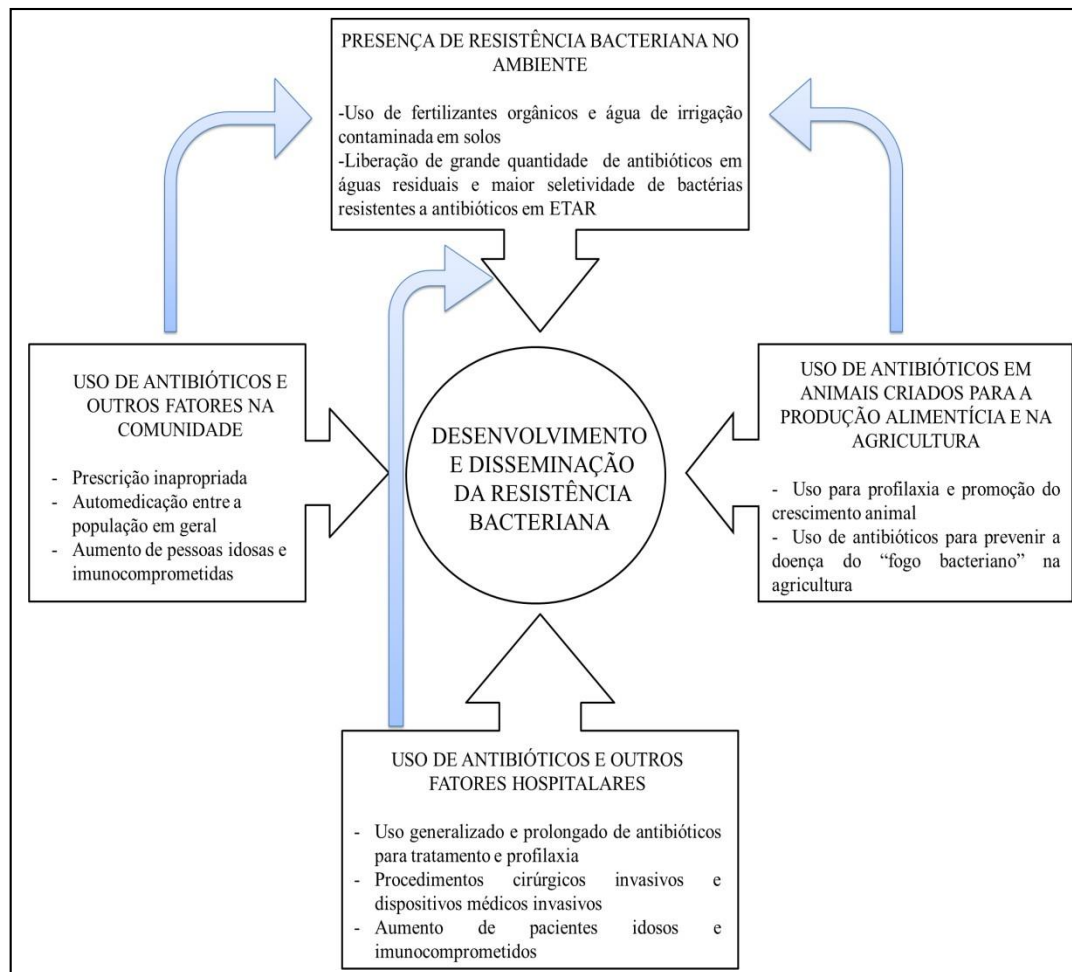
Fonte: Adaptado de Brown e Wright (2016).

Com o passar dos anos, os micro-organismos se tornaram resistentes a quase todos os antibióticos disponíveis na clínica médica e as doenças infecciosas voltaram a preocupar os indivíduos (BROWN; WRIGHT, 2016; VENTOLA, 2015).

A resistência bacteriana é um fenômeno natural e inevitável que pode ocorrer quando o micro-organismo é exposto ao antibiótico (WHO, 2017a; ZAMAN et al., 2017). Na presença do fármaco as bactérias sensíveis são mortas ou inibidas, enquanto as cepas que apresentam resistência são capazes de sobreviver e se multiplicar mesmo nos níveis terapêuticos do medicamento (PRESTINACI; PEZZOTTI; PANTOSTI, 2015; WHO, 2017a; ZAMAN et al., 2017). Apesar de não ser um fenômeno recente, os números de casos de resistência bacteriana têm aumentado ao longo dos anos, favorecidos pelo uso inapropriado e exacerbado de antibióticos, principalmente nos países em que a venda ocorre sem prescrição médica (DOERNBERG et al., 2017; LEVY; BONNIE, 2004; WHO, 2015). Ciente da gravidade e dimensão do problema, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determinou, por meio da publicação da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 20/2011 que, no Brasil, a dispensação de medicamentos à base de antimicrobianos ocorrerá somente mediante retenção de receita médica (BRASIL, 2011b).

Prestinaci, Pezzotti e Pantosti (2015) enumeraram quatro fatores principais para o surgimento e disseminação da resistência bacteriana, a saber: 1) medicina humana na comunidade e hospitalar; 2) criação animal; 3) agricultura; e 4) condições ambientais. Todos estes fatores estão interligados conforme representado no esquema da Figura 2.

Figura 2 - Representação esquemática dos principais fatores envolvidos no surgimento e disseminação da resistência aos antimicrobianos



ETAR = Estação de tratamento de águas residuais.  
Fonte: Adaptado de Prestinaci; Pezzotti e Pantosti (2015).

As bactérias podem ser portadoras de determinantes de resistência intrínsecos (propriedade inata do gênero ou espécie bacteriana; transferência vertical) ou adquiridos (propriedade específica da cepa devido às modificações mutacionais nos genes cromossômicos ou aquisição de determinantes genéticos externos de resistência; transferência horizontal) (MUNITA; ARIAS, 2016; VAN DUIJKEREN et al., 2018). A grande preocupação gira em torno dos micro-organismos com componentes de resistência adquiridos uma vez que essas populações seriam naturalmente sensíveis aos compostos antimicrobianos, e por alterações genéticas, muitas vezes resultantes da pressão seletiva exercida pelo ambiente, a situação se inverteria (BLAIR et al., 2015; MUNITA; ARIAS, 2016).

Considerando esta abordagem genética, a resistência aos fármacos pode ser disseminada por incorporação de material genético externo ou pela transferência dos genes de

resistência de bactéria para bactéria por meio de mecanismos tais como transformação, incorporação do DNA nu, transdução mediada por bacteriófago, e conjugação por meio da transferência de plasmídeos ou transposons pelo "pili sexual" bacteriano (LEVY; BONNIE, 2004; MUNITA; ARIAS, 2016).

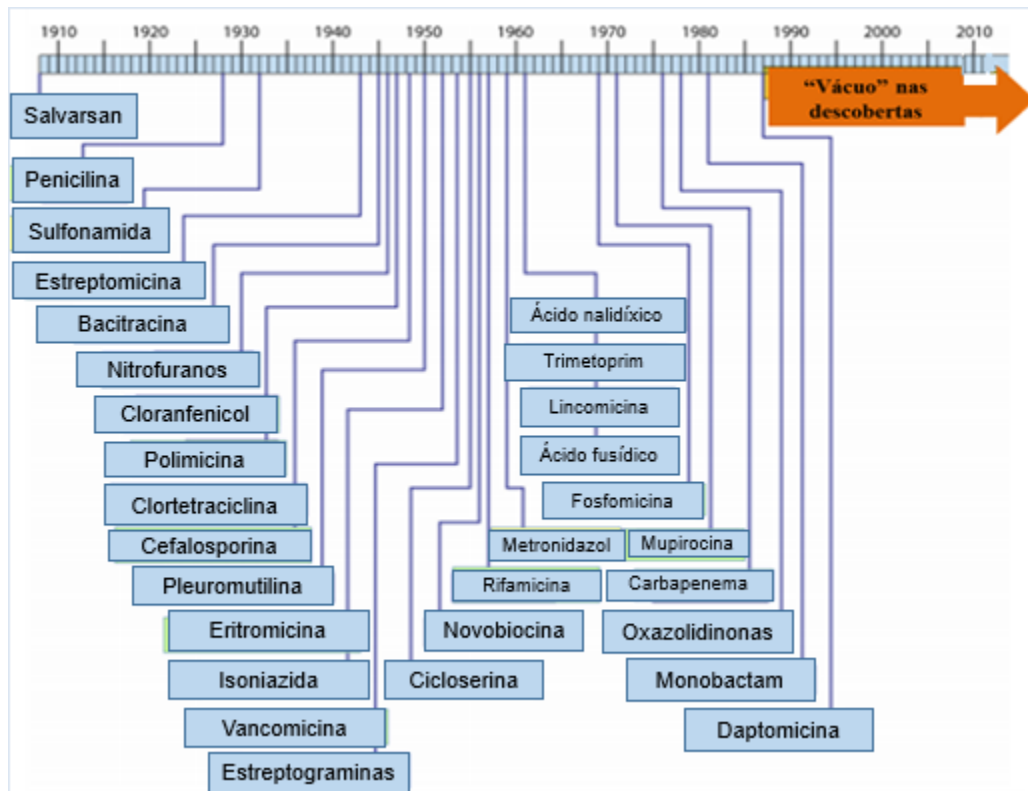
Em relação à expressão dos mecanismos biológicos de resistência, a bactéria pode desenvolver diferentes estratégias dependendo da modificação genética. As principais descritas são alteração do sítio alvo do fármaco reduzindo sua afinidade, tradução de enzimas que degradam ou modificam os antibióticos e ativação de sistemas de efluxo para a expulsão da molécula prejudicial (LEVY; BONNIE, 2004; MUNITA; ARIAS, 2016). É importante salientar que diferentes genes podem codificar um mesmo tipo de mecanismo biológico de resistência (LEVY; BONNIE, 2004; VAN DUIJKEREN et al., 2018).

Ciente da dimensão do problema, a OMS alertou sobre a necessidade urgente de mudanças de comportamento a nível global a fim de se evitar que o mundo enfrente a chamada "era pós-antibiótica", onde infecções simples e facilmente tratáveis podem, novamente, tornarem-se fatais aos seres humanos (WHO, 2017b). No entanto, se nenhuma atitude for tomada, inclusive com a adoção de medidas políticas de intervenção neste cenário, o número de mortes estimadas atribuídas à resistência bacteriana chegará a 10 milhões em 2050, superando a estimativa de mortalidade por câncer nesse mesmo ano (8,2 milhões) (O'NEILL, 2016).

Em contrapartida ao crescimento acelerado de casos de resistência bacteriana, há uma escassez no desenvolvimento de novos antibióticos. Conforme mostra a Figura 3, desde 1987 há um "vácuo" na descoberta de novas classes desses fármacos (BROWN; WRIGHT, 2016; SILVER, 2011). A análise do cenário atual revela que a *pipeline* de antibióticos clínicos das indústrias farmacêuticas continua sendo insuficiente para erradicar a ameaça da resistência (BROWN; WRIGHT, 2016; WHO, 2017a).



Figura 3 - Linha do tempo com as datas de descoberta/patente de classes de antibióticos e, após 1987, o "vácuo de descoberta"



Fonte: Adaptado de Silver (2011).

Vale ressaltar que uma das preocupações globais mais graves sobre este tema é que a resistência aos antibióticos surgiu em muitos patógenos, incluindo o *Mycobacterium tuberculosis*. Dessa forma, a OMS publicou uma lista de patógenos prioritários para guiar a pesquisa, a descoberta e o desenvolvimento de novos antibióticos que classifica 20 bactérias em três grupos estratificados como prioridade crítica (1), alta (2) e média (3) (Tabela 2) (WHO, 2017c).

Tabela 2 - Lista de patógenos prioritários publicada pela Organização Mundial da Saúde em 2017 para guiar a pesquisa, a descoberta e o desenvolvimento de novos antibióticos

Prioridade 1 CRÍTICA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Acinetobacter baumannii</i> resistente à carbapenema</li> <li>• <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente à carbapenema</li> <li>• Enterobacteriaceae resistente à carbapenema, resistente às cefalosporinas de 3ª geração</li> </ul>
Prioridade 2 ALTA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Enterococcus faecium</i> resistente à vancomicina</li> <li>• <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina, com sensibilidade intermediária e resistente à vancomicina</li> <li>• <i>Helicobacter pylori</i> resistente à claritromicina</li> <li>• <i>Campylobacter</i> resistente à fluoroquinolona</li> <li>• <i>Salmonella</i> spp. resistente à fluoroquinolona</li> <li>• <i>Neisseria gonorrhoeae</i> resistente às cefalosporinas de 3ª geração, resistente à fluoroquinolona</li> </ul>
Prioridade 3 MÉDIA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Streptococcus pneumoniae</i> sem susceptibilidade à penicilina</li> <li>• <i>Haemophilus influenzae</i> resistente à ampicilina</li> <li>• <i>Shigella</i> spp. resistente à fluoroquinolona</li> </ul>

Fonte: Adaptado de WHO (2017c).

Sendo assim, a necessidade de medicamentos inovadores leva a um retorno na investigação de substâncias oriundas de produtos naturais visto que o metabolismo vegetal é uma fonte promissora de substâncias ativas, inclusive com efeito antibiótico (BROWN; WRIGHT, 2016).

## 2.2 METABOLISMO VEGETAL: IMPORTANTE FONTE DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS

Os organismos vivos necessitam de energia na forma de ATP (do inglês, *adenosine triphosphate*) e de compostos orgânicos como carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos para suprirem suas necessidades celulares. Estas classes de compostos são denominadas metabólitos primários e são produzidas por meio de um conjunto de reações reguladas por enzimas que compõem o metabolismo primário (DEWICK, 2009). As vias bioquímicas do metabolismo primário são semelhantes entre os diferentes seres vivos, pois sintetizam, transformam e interconvertem macromoléculas essenciais para o desenvolvimento das suas funções vitais. Um exemplo é a degradação de carboidratos por reações oxidativas durante a glicólise e o ciclo de Krebs, resultando em liberação de energia (DEWICK, 2009).

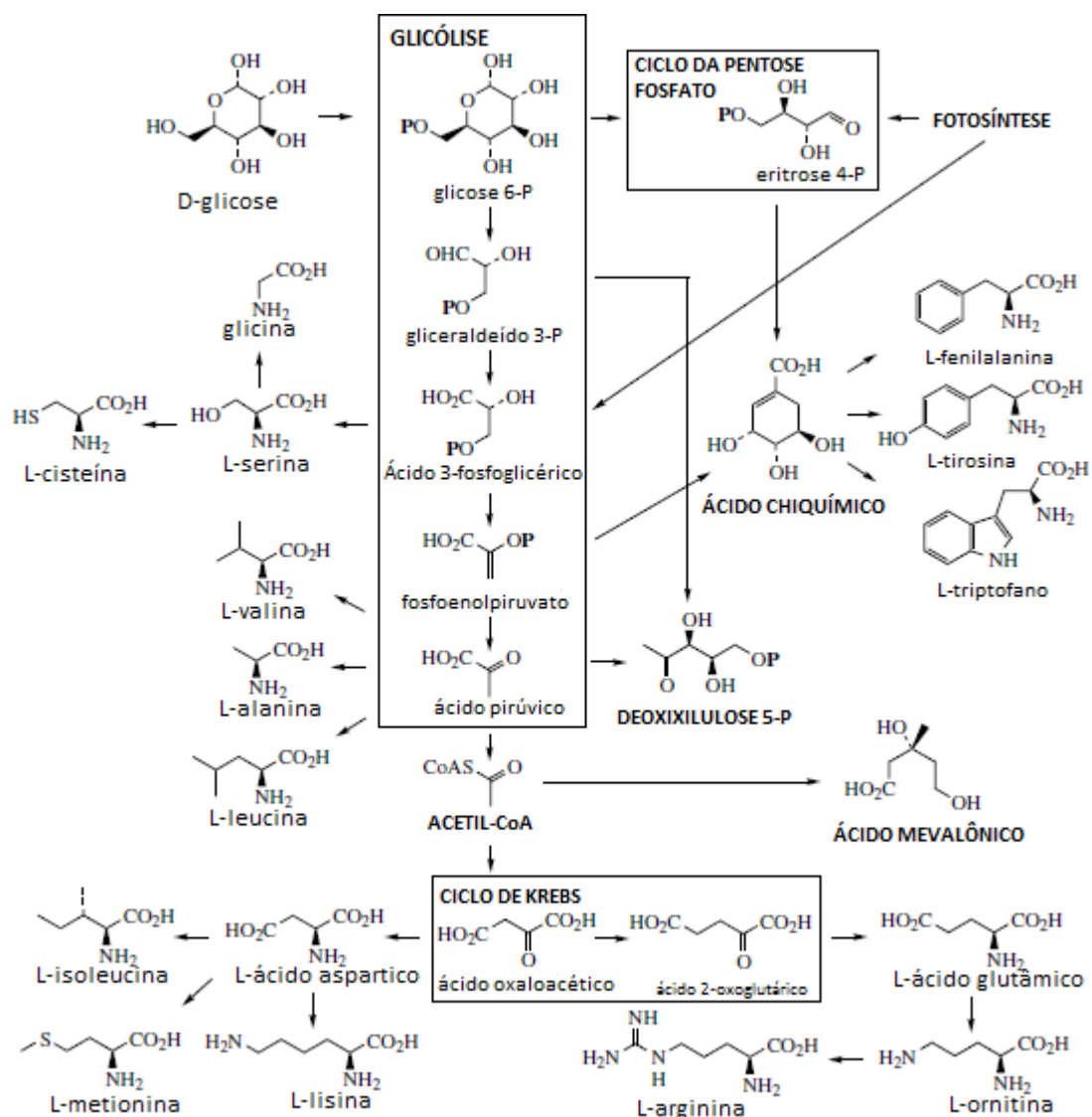
Os vegetais são capazes de produzir substâncias a partir de reações menos gerais que compõem o metabolismo secundário ou especial. Os metabólitos especiais são indispensáveis à vida, porém conferem certa vantagem para a sobrevivência do organismo no seu habitat (DEWICK, 2009; SIMÕES et al., 2007).

Ao contrário do metabolismo primário, o metabolismo especial ocorre em condições específicas e/ou como resposta ao enfrentamento de situações de estresse. Grande número de substâncias são produtos deste metabolismo e muitas delas são interessantes como moléculas farmacologicamente ativas (DEWICK, 2009; SIMÕES et al., 2007).

Apesar da divisão didática na abordagem, os dois tipos de metabolismo não são independentes. As reações bioquímicas do metabolismo primário fornecem os blocos construtores (do inglês, *building blocks*) para o metabolismo especial os quais são derivados dos intermediários acetil-coenzima A (acetil-CoA), ácido chiquímico, ácido mevalônico e 1-deoxixilulose 5-fosfato utilizados, respectivamente, para as vias do acetato, chiquimato, mevalonato e fosfato de deoxixilulose (DEWICK, 2009).

A descarboxilação oxidativa do ácido pirúvico, produto da via glicolítica, e a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, sintetizam a acetil-CoA. Três moléculas de acetil-CoA reunidas resultam no ácido mevalônico. O fosfoenolpiruvato, intermediário da via glicolítica, e a eritrose 4-fosfato, da via das pentoses, originam o ácido chiquímico. Já a deoxixilulose 5-fosfato é produto da reação entre o ácido pirúvico e o gliceraldeído 3-fosfato (DEWICK, 2009). Na Figura 4 estão esquematizadas as origens dos blocos construtores a partir do metabolismo primário.

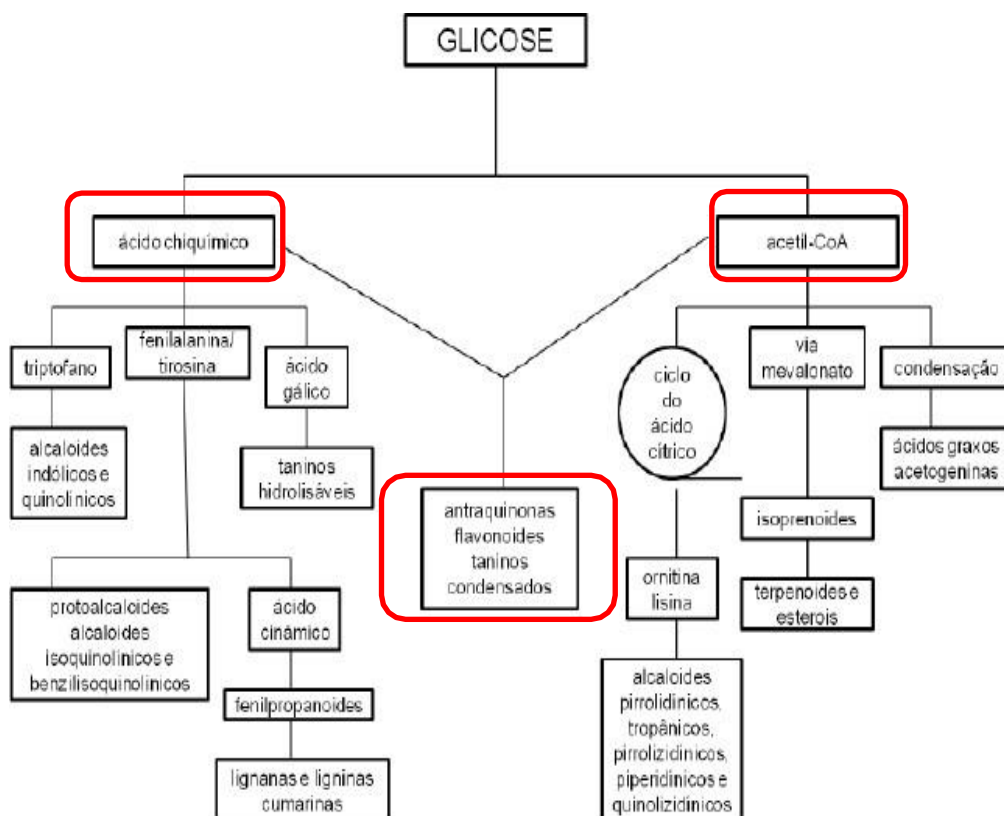
Figura 4 - Representação esquemática da origem dos *building blocks*



Fonte: Dewick (2009).

Conforme supramencionado, as moléculas de glicose e os compostos intermediários resultantes do seu metabolismo são fundamentais para a síntese dos metabólitos especiais (DEWICK, 2009; SIMÕES et al., 2007). A Figura 5 mostra suas vias biossintéticas.

Figura 5 - Representação esquemática das rotas biossintéticas envolvidas no metabolismo especial



Fonte: Simões e colaboradores (2007).

Ao observar as rotas biossintéticas, é possível afirmar que a maioria das classes de metabólitos especiais é sintetizada a partir de uma única via. Porém, as antraquinonas, flavonoides e taninos condensados são sintetizados a partir da combinação entre a via do ácido chiquímico e do acetato (SIMÕES et al., 2007) (Figura 5 - sinalização na cor vermelha). Também é importante considerar que a presença destes metabólitos nos vegetais pode ocorrer na forma livre ou ligada aos resíduos de açúcares, os chamados heterosídeos (SIMÕES et al., 2007).

Outro aspecto crucial que deve ser considerado ao se estudar as substâncias sintetizadas pelas espécies vegetais, principalmente as resultantes do metabolismo secundário, é a ponderação dos fatores que possam interferir nas reações biossintéticas. Em um artigo de revisão, Gobbo-Neto e Lopes (2007) reuniram os principais fatores que influenciam o conteúdo de metabólitos, sendo eles sazonalidade, ritmo circadiano, desenvolvimento da planta, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, herbivoria, entre outros.

Considerando a variedade dos compostos existentes nos vegetais (Figura 5) e o conhecimento dos marcadores quimiotaxonômicos flavonoides e terpenoides na espécie *V.*

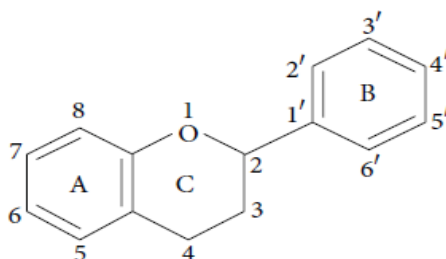
*polyanthes* (IGUAL et al., 2013), segue abaixo uma breve revisão dessas duas classes de metabólitos secundários, diretamente relacionadas ao presente desenho de estudo.

### 2.2.1 Flavonoides

Os flavonoides são uma grande e importante classe de substâncias polifenólicas de baixo peso molecular produzidas pelos vegetais (NIJVELDT et al., 2001; PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016). Estão amplamente distribuídos na natureza contando com mais de 9000 variedades identificadas (NIJVELDT et al., 2001; PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016). Nas plantas, são responsáveis pelas cores atrativas das flores, frutos e folhas, controlam as espécies reativas de oxigênio (ERO) oriundas da fotossíntese, influenciam na sinalização de hormônios vegetais e estão envolvidos nos mecanismos de defesa contra a radiação ultravioleta (UV), ataque de herbívoros e infecção microbiana (BUER; IMIN; DJORDJEVIC, 2010; NIJVELDT et al., 2001; PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016).

Como descrito anteriormente, estes compostos são biossintetizados pela combinação das vias metabólicas do ácido chiquímico e acetato (DEWICK, 2009; FERREYRA; RIUS; CASATI, 2012; KUMAR; PANDEY, 2013). A fenilalanina, resultante da via do ácido chiquímico, é transformada por meio de reações enzimáticas em 4-coumaroil-coenzima A (CoA) (DEWICK, 2009; FERREYRA; RIUS; CASATI, 2012). Esta molécula, por sua vez, condensa-se a três unidades de malonil-CoA, originando a chalcona precursora de todos os flavonoides (DEWICK, 2009; FERREYRA; RIUS; CASATI, 2012). Estruturalmente, possuem um esqueleto básico de 15 carbonos formado por dois anéis aromáticos (A e B) ligados a um anel pirano (C) (KUMAR; PANDEY, 2013) (Figura 6).

Figura 6 - Imagem ilustrativa do esqueleto químico básico dos flavonoides



Fonte: Kumar e Pandey (2013).

De acordo com o nível de oxidação e o padrão de substituição do anel C, os flavonoides são divididos em subgrupos, a saber: flavonas, flavonois, flavanonas, flavanonóis, flavanois ou catequinas, antocianinas e chalconas (KUMAR; PANDEY, 2013; PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016) (Figura 7). Os subgrupos, por sua vez, diferem entre si conforme o padrão de substituição dos anéis A e B (KUMAR; PANDEY, 2013).

Nas espécies vegetais, é comum que os flavonoides estejam conjugados com moléculas de açúcar formando O-heterosídeos (açúcares ligados ao grupo hidroxila) ou C-heterosídeos (açúcares ligados ao carbono) (KUMAR; PANDEY, 2013; SIMÕES, et al., 2007). Os carboidratos mais comuns nestas ligações são L-ramnose, D-glicose, glicoramnose, galactose ou arabinose (KUMAR; PANDEY, 2013).

Figura 7 - Imagem ilustrativa das estruturas químicas dos subgrupos de flavonoides

Subgrupo	Estrutura	Exemplos		
Flavonas				
Flavonois				
Flavanona				
Flavanonol				
Isoflavonas				
Flavan-3-ols				

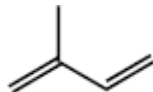
Fonte: Kumar e Pandey (2013).

Os flavonoides possuem atividades farmacológicas que são benéficas à saúde humana, merecendo destaque as propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, hepatoprotetora, antitrombogênica, antimutagênica e anticancerígena (KUMAR; PANDEY, 2013; PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016).

## 2.2.2 Terpenoides

Os terpenos ou terpenoides representam a maior classe de metabólitos secundários devido a sua diversidade estrutural, sendo que mais de 40.000 desses compostos já foram isolados (DEWICK, 2009; SKALICKA-WOZ'NIAK; GARRARD, 2014). Sua estrutura química é composta por unidades de isopreno ( $C_5$ ) (Figura 8) bioquimicamente ativas, os isômeros dimetilalilfosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP) (DEWICK, 2009; SKALICKA-WOZ'NIAK; GARRARD, 2014). Estas unidades são sintetizadas a partir de duas rotas biossintéticas, mevalonato (via clássica) e deoxixilulose fosfato (DEWICK, 2009).

Figura 8 - Imagem ilustrativa da estrutura da unidade de isopreno ( $C_5$ )

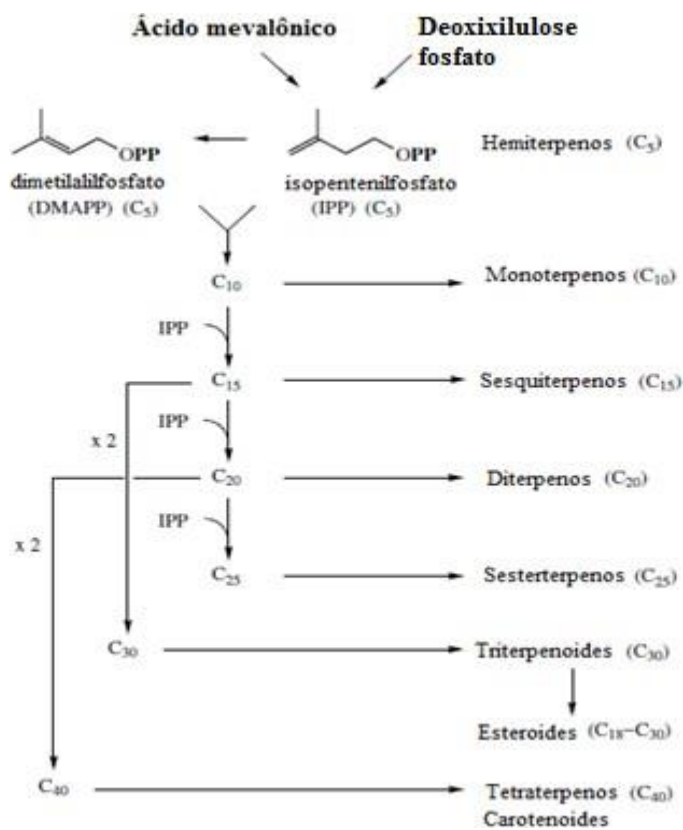


Fonte: Dewick (2009).

Estes compostos são classificados conforme os números de unidades isoprenoides em hemiterpenos ( $C_5$ ), monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), diterpenos ( $C_{20}$ ), sesterpenos ( $C_{25}$ ), triterpenos ( $C_{30}$ ) e tetraterpenos ( $C_{40}$ ) (DEWICK, 2009) (Figura 9).



Figura 9 - Esquema ilustrativo da classificação dos terpenos



Fonte: Dewick (2009).

Os terpenoides são substâncias com elevado potencial terapêutico, destacando-se as atividades antimicrobiana, antiparasitária, antialérgica, antiespasmódica, anti-hiperglicêmica, anti-inflamatória, anticancerígena e imunomoduladora (AJIKUMAR et al., 2008). Além disso, podem ser utilizados como inseticidas naturais e adjuvantes de formulações com o objetivo de intensificar a penetração cutânea devido a sua lipofilicidade (AJIKUMAR et al., 2008).

## 2.3 CONTEXTUALIZAÇÃO DA ESPÉCIE VEGETAL ESTUDADA

### 2.3.1 Família Asteraceae Bercht. & J. Presl

A família Asteraceae Bercht. & J. Presl, também conhecida como Compositae Giseke, contempla uma diversidade de espécies vegetais vasculares distribuídas em praticamente todos os continentes, com exceção da Antártida, sendo sua disseminação mais

representativa nas regiões temperadas e semiáridas dos trópicos e subtropicais (GARCÍA-SÁNCHEZ; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ; VILLASEÑOR, 2014; ROQUE; BAUTISTA, 2008; TRÓPICOS, 2019b).

Mundialmente, dados estatísticos fornecidos pelo *The Plant List* (2019) mostram que a Asteraceae abrange 1911 gêneros e 32913 espécies, demonstrando, com maior clareza, a dimensão da sua riqueza vegetal (THE PLANT LIST, 2019). No Brasil, o projeto Flora do Brasil 2020 mapeou 289 gêneros e 2095 espécies desta família, distribuídas em todo território nacional e nos diferentes biomas (FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO, 2019; ROQUE; BAUTISTA, 2008).

As plantas da família Asteraceae podem ser ervas, arbustos, subarbustos ou pequenas árvores, geralmente terrestres. Suas folhas são alternas ou opostas, raramente verticiladas, simples, glabras ou glabrescentes com tricomas tectores e/ou glandulares e margem inteira ou serrada. A maioria das espécies possui caule cilíndrico sendo menos comum a presença de caule alado (ROQUE; BAUTISTA, 2008). Uma das características mais marcantes das plantas desta família é a organização das inflorescências em capítulos contendo centenas de flores individuais sésses e circundadas por um involúcro de brácteas (GARCÍA-SÁNCHEZ; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ; VILLASEÑOR, 2014; ROQUE; BAUTISTA, 2008).

O sucesso evolutivo e a distribuição cosmopolita das Asteráceas podem estar relacionados à síntese de metabólitos secundários, por exemplo, derivados fenólicos e terpenoides, que funcionam como um sistema de defesa (ROQUE; BAUTISTA, 2008; THE PLANT LIST, 2019). Além disso, a produção dos metabólitos secundários está relacionada com suas propriedades medicinais e, conforme relatado por Fabri e colaboradores (2011), as plantas desta família são utilizadas na medicina tradicional como anti-helmíntico, anti-inflamatório, adstringente, anti-hemorrágico, antimicrobiano, diurético, analgésico e antiespasmódico (FABRI et al., 2011).

As Asteráceas têm grande potencial econômico e, além das suas propriedades terapêuticas citadas acima, várias espécies são utilizadas na alimentação humana, tais como *Lactuca sativa* (alface) e *Cichorium intybus* (chicória), na produção cosmética como *Calendula officinalis* (calêndula) e *Matricaria chamomilla* (camomila), na ornamentação como *Helianthus annuus* (girassol) e, ainda, fornecem néctar e pólen para a apicultura (*Vernonia polyanthes*). Por outro lado, muitas espécies são desprezadas na agricultura e pecuária por serem invasoras

de lavouras e pastagens, sendo consideradas daninhas (BERETTA et al., 2008; FABRI et al., 2011; ROQUE; BAUTISTA, 2008; SOUZA et al., 2017; THE PLANT LIST, 2019).

Entre esta diversidade vegetal destaca-se o gênero *Vernonia*, que inclui a espécie *V. polyanthes*, que será apresentado no próximo tópico.

### **2.3.2 Gênero *Vernonia* Schreb.**

O gênero *Vernonia* Schreb. se destaca por ser um dos maiores e mais importantes gêneros da família Asteraceae, contando com mais de 1500 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África e América (DEMATTEIS, 1998; MAIA et al., 2010; MARTUCCI et al., 2014).

Muitas espécies deste gênero são utilizadas na alimentação e na medicina popular (ATANGWHO et al., 2013; TOYANG; VERPOORTE, 2013). Suas propriedades medicinais estão relacionadas com a produção de metabólitos bioativos dos quais 81 compostos já foram identificados, dentre eles ácidos clorogênicos, flavonoides, derivados fenólicos, terpenoides, alcaloides, cumarinas, lactonas sesquiterpênicas e saponinas (LIU et al., 2010; MARTUCCI et al., 2014; TOYANG; VERPOORTE, 2013; VASSALLO et al., 2013).

A espécie *Vernonia amygdalina* é uma das mais estudadas do gênero, sendo popularmente utilizada no tratamento de doenças como malária, diabetes, distúrbios gastrointestinais, verminoses, infecções, sarampo, catapora, problemas de pele, hepatite, entre outras (ATANGWHO et al., 2013; SOLDATI et al., 2017; TOYANG; VERPOORTE, 2013).

As atividades farmacológicas deste gênero são mundialmente conhecidas. A *Vernonia anthelmintica* é utilizada com sucesso no tratamento de vitiligo na China (WANG et al., 2017). A *Vernonia nigritana* é uma erva ou arbusto anual distribuído no oeste da África onde é popularmente empregada no tratamento de inflamações e infecções de pele, reumatismo, febre, dor de cabeça e insuficiência digestiva (VASSALLO et al., 2013). No sudeste da Ásia, a *Vernonia cineria* é tradicionalmente utilizada no tratamento de malária, febre e doença hepática (YOUN et al., 2012). Segundo Pollo e colaboradores (2013), *Vernonia scorpioides*, erva comum no Brasil, é empregada na medicina popular para o tratamento de afecções de pele como alergia, parasitas de pele, irritação, injúria crônica e comichão.

Estudo anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisa relatou o potencial antioxidante de *Vernonia condensata* que pode ser atribuído à presença de compostos bioativos

como substâncias fenólicas e flavonoides, principalmente apigenina e luteolina detectadas nas amostras investigadas (SILVA et al., 2013). Ainda, Temponi e colaboradores (2012) relataram as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva de *V. polyanthes* em modelos animais, corroborando os resultados obtidos por Rodrigues e colaboradores (2016), que descreveram o potencial anti-inflamatório tópico dessa espécie vegetal.

Finalmente, estudos de etnofarmacologia relataram atividade expectorante das folhas de *V. polyanthes* conforme indicado no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2011a). As folhas, brotos e partes aéreas dessa espécie vegetal são amplamente utilizadas na medicina tradicional brasileira (BRASIL, 2014). Várias das suas propriedades medicinais já foram relatadas na literatura. No entanto, ainda há muito a se estudar, principalmente no que diz respeito ao efeito antibiótico desta espécie vegetal.

### **2.3.3 Espécie *Vernonia polyanthes* Less.**

*V. polyanthes* Less., sinônimo de *Vernonanthura phosphorica* (Vell.) H. Rob. (<http://www.theplantlist.org/tp1.1/record/gcc-102424>, acessado em 01 de janeiro de 2019) é uma planta nativa do território brasileiro popularmente conhecida como assa-peixe, assa-peixe branco, estanca-sangue, tramanhém, mata-pasto, cambará-guassu, cambará-do-branco, erva-preá e enxuga (FONSECA; NUNES; NUNES, 2012; GOMES et al., 2015; GUERRA-SANTOS et al., 2016; LORENZI; MATOS, 2002). Esta espécie, que se espalha por sementes fotoblásticas preferenciais, é distribuída no Brasil principalmente nos biomas de Cerrado e Mata Atlântica, sendo encontrada nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Rio de Janeiro, Paraná, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás, e em outros países da América do Sul tais como Bolívia, Venezuela, Argentina e Equador, conforme apresentado na Figura 10 (GOMES et al., 2015; LORENZI; MATOS, 2002; TRÓPICOS, 2019a).

Figura 10 - Mapa ilustrativo da distribuição mundial da *Vernonia polyanthes*



As áreas de cor verde sinalizadas no mapa representam a distribuição geográfica de *Vernonia polyanthes*. A intensidade da cor usada como referência corresponde à frequência dessa espécie vegetal. Fonte: (<http://www.tropicos.org/MapsCountry.aspx?maptype=3&lookupid=2708839#>, acessado em 13 de janeiro de 2019).

*V. polyanthes* é facilmente encontrada em terrenos abertos, pastagens, beira de rios e de estradas. Apesar de ser considerada planta daninha em atividades agrícolas e pecuária, é bastante interessante para apicultores por fornecer um néctar de qualidade, e para a população, por suas propriedades medicinais (ALVES, 2010; LORENZI; MATOS, 2002).

Macroscopicamente, esta espécie se apresenta como arbusto ou arvoreta, perene, atingindo em média 2,5 metros de altura com caules lenhosos de ramos angulosos e densamente pilosos (LORENZI; MATOS, 2002) (Figura 11). Possui folhas simples com aproximadamente 13 cm de comprimento e 3 cm de largura, disposição alterna, curtamente pecioladas, lanceoladas, com margens inteiras ou levemente serradas na parte apical, ásperas na face adaxial e pilosa na face abaxial com coloração mais clara (ALVES; NEVES, 2003; LORENZI; MATOS, 2002). Sua inflorescência é composta por flores brancas ou rosadas localizadas no ápice dos ramos, com capítulos pequenos formados por 10 a 15 flores reunidas em panículas escorpioides cujo néctar pode ser utilizado pelas abelhas para produzir mel (ALVES; NEVES, 2003; LORENZI; MATOS, 2002). Suas floradas contemplam um período de aproximadamente três meses (julho, agosto e setembro), sendo agosto o período de maior intensidade de floração (DUTRA, 2011).

Figura 11 - Fotografia das flores e folhas de *Vernonia polyanthes* após coleta no Horto de Plantas Medicinais da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Por ser amplamente utilizada na medicina popular, *V. polyanthes* foi incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) desde sua publicação em 2009 (BRASIL, 2009). Na literatura científica, a importância medicinal desta espécie já havia sido descrita em 1946, por Penna, no Dicionário Brasileiro de Plantas Medicinais, conforme citado por Silveira, Rúbio e Alves (2000).

Tradicionalmente, esta espécie é utilizada como diurética, balsâmica, antirreumática, antiulcerogênica, anti-inflamatória e, principalmente, no tratamento de infecções uterinas, bronquite, pneumonia, tosse, gripe, resfriado e distúrbios gastrointestinais (BRAGA, 1976; CONDE et al., 2014; LORENZI; MATOS, 2002; MOREIRA et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2015; RODRIGUES et al., 2016). A Tabela 3 apresenta um resumo das atividades farmacológicas e do uso popular de *V. polyanthes* descritos até o momento.

Tabela 3 - Resumo das informações sobre atividades farmacológicas e uso popular de *Vernonia polyanthes* descritas na literatura

<b>Parte da Planta</b>	<b>Extração</b>	<b>Atividade Farmacológica / Uso Popular</b>	<b>Resultado</b>	<b>Referência</b>
ND	ND	Distúrbios gastrointestinais	-	BRAGA, 1976
Folha	Extrato hidroalcoólico	Anti-hipertensiva	Diminuição da pressão arterial e aumento na taxa de filtração glomerular <i>in vivo</i>	DA SILVEIRA et al., 2003
Raiz	Extrato hidroalcoólico	Antimicobacteriana	Ativo contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> cepa H37Rv (ATCC® 27294™)	OLIVEIRA et al., 2007
Folha/Raiz	ND	Reumatismo / Bronquite / Tosse	-	BRAGA et al., 2007
Folha	Extrato metanólico	Leishmanicida	Ativo contra <i>Leishmania amazonenses</i> (IC <sub>50</sub> = 4 µg/mL)	BRAGA et al., 2007
Partes aéreas	Extrato metanólico / clorofórmico	Antiulcerogênica	Efeito gastroprotetor dose-dependente <i>in vivo</i> contra lesões gástricas induzidas por etanol e piroxicam	BARBASTEFANO et al., 2007

ND: não descrito na literatura consultada; -: não apresenta resultado por se tratar de relato de uso popular.

Tabela 3 (Continuação) - Resumo das informações sobre atividades farmacológicas e uso popular de *Vernonia polyanthes* descritas na literatura

<b>Parte da Planta</b>	<b>Extração</b>	<b>Atividade Farmacológica / Uso Popular</b>	<b>Resultado</b>	<b>Referência</b>
Folha	Óleo essencial	Leishmanicida	Ativo contra <i>Leishmania infantum</i> (IC <sub>50</sub> = 19,4 µg/mL)	MOREIRA et al., 2017
Folha	Extrato hidroalcoólico	Antibacteriana	Ativo frente <i>Bacillus cereus</i> (ATCC® 11778™), <i>Escherichia coli</i> (ATCC® 8739™), <i>Proteus mirabilis</i> (ATCC® 25933™), <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC® 6538™), <i>Salmonella Typhimurium</i> (ATCC® 14028™) e <i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC® 19615™)	JORGETTO et al., 2011
ND	Extrato metanólico / óleo essencial	Antibacteriana	Ativo frente <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	SILVA et al., 2012
Folha	Extrato etanólico	Antinociceptiva / Anti-inflamatória	Efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório <i>in vivo</i>	TEMPONI et al., 2012
Flor	Fração em acetato de etila do extrato etanólico e aquoso	Antibacteriana	Ativo frente <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC® 27853™)	WALTRICH; HOSCHEID; PROCHNAU, 2015

ND: não descrito na literatura consultada; -: não apresenta resultado por se tratar de relato de uso popular.



Tabela 3 (Continuação) - Resumo das informações sobre atividades farmacológicas e uso popular de *Vernonia polyanthes* descritas na literatura

<b>Parte da Planta</b>	<b>Extração</b>	<b>Atividade Farmacológica / Uso Popular</b>	<b>Resultado</b>	<b>Referência</b>
Folhas	Extrato aquoso	Antigenotóxica	Não apresentou potencial mutagênico em células somáticas de <i>Drosophila melanogaster</i> , mas aumentou a genotoxicidade da doxorubicina	GUERRA-SANTOS et al., 2016
Folhas	Extrato aquoso	Antifúngica	Inativo frente <i>Candida albicans</i> (ATCC® 28367™) e <i>Candida parapsilosis</i> (ATCC® 22019™)	GUERRA-SANTOS et al., 2016
ND	Extrato etanólico/hexânico /acetato de etila	Antitumoral	Inibição da proliferação de células tumorais contra linhagens celulares HTC-11, OVCAR8 e SF-295	DE CARVALHO, 2013

ND: não descrito na literatura consultada; -: não apresenta resultado por se tratar de relato de uso popular.

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Estudos fitoquímicos da espécie relatam a presença de flavonoides, ácidos clorogênicos, ácidos fenólicos, antraquinonas, chalconas, taninos, cumarinas, terpenoides, esteróis, ácidos fixos, saponinas, alcaloides e lactonas sesquiterpênicas (GUERRA-SANTOS et al., 2016; RODRIGUES et al., 2016; TEMPONI et al., 2012).

A Tabela 4 apresenta um resumo com as substâncias isoladas de *V. polyanthes* descritas na literatura até o momento.

Tabela 4 - Dados das substâncias identificadas em *Vernonia polyanthes* descritas na literatura

<b>Substância</b>	<b>Classe</b>	<b>N° registro CAS</b>	<b>Parte da Planta</b>	<b>Referência</b>
Mirceno	Terpeno	123-35-3	Folhas	MOREIRA et al., 2017; PUBCHEM, 2019
Germacreno D	Sesquiterpeno	37839-63-7	Partes aéreas e raízes	BOHLMANN et al., 1981; PUBCHEM, 2019
Germacreno B	Sesquiterpeno	15423-57-1	Folhas	PUBCHEM, 2019; SILVA et al., 2012
Biciclogermacreno	Sesquiterpeno	67650-90-2	Partes aéreas	BOHLMANN et al., 1981; PUBCHEM, 2019
$\epsilon$ -cariofileno	Sesquiterpeno	-	Folhas	PUBCHEM, 2019; SILVA et al., 2012
$\alpha$ -humuleno	Sesquiterpeno	6753-98-6	Partes aéreas e raízes	BOHLMANN et al., 1981; PUBCHEM, 2019
Zerumbono	Sesquiterpeno	471-05-6	Folhas	MOREIRA et al., 2017; PUBCHEM, 2019
Vernopoliantofurano	Sesquiterpeno	79081-60-0	Partes aéreas e raízes	BOHLMANN et al., 1981; BOHLMANN et al., 1983; PUBCHEM, 2019
Vernopoliantona	Sesquiterpeno	79081-59-7	Partes aéreas e raízes	BOHLMANN et al., 1981; BOHLMANN et al., 1983; PUBCHEM, 2019
6,7E-dihidrovernopolianto furano	Sesquiterpeno	6855-99-8	Partes aéreas	BOHLMANN et al., 1983; PUBCHEM, 2019
$\alpha$ -amirina*	Triterpeno	638-95-9	Folhas	BENFATTI et al., 2007; PUBCHEM, 2019

Tabela 4 (Continuação) - Dados das substâncias identificadas em *Vernonia polyanthes* descritas na literatura

<b>Substância</b>	<b>Classe</b>	<b>N° registro CAS</b>	<b>Parte da Planta</b>	<b>Referência</b>
$\beta$ -amirina*	Triterpeno	559-70-6	Folhas	BENFATTI et al., 2007; PUBCHEM, 2019
Lupeol	Triterpeno	545-47-1	Folhas	BENFATTI et al., 2007; PUBCHEM, 2019
Acetato de lupeol	Triterpeno	1617-68-1	Partes aéreas e raízes	BOHLMANN et al., 1981; PUBCHEM, 2019
10 $\alpha$ -acetóxi-8 $\alpha$ - metilacrilóiloxi-1 $\alpha$ - 13-O-acetato (1)	Lactona sesquiterpênica	-	Partes aéreas	BOHLMANN et al., 1983
1 $\beta$ - metóxihirsutinólídeo- 13-Oacetato (2)  (Hisurtinólídeos epiméricos)	Lactona sesquiterpênica	-	Partes aéreas	BOHLMANN et al., 1981; BOHLMANN et al., 1983
8 $\beta$ -2 metilacrilóiloxiisohirsutinólídeo	Lactona sesquiterpênica	-	Partes aéreas	BOHLMANN et al., 1981; BOHLMANN et al., 1983
Piptocarфина A	Lactona sesquiterpênica	76248-63-0	Folhas	IGUAL et al., 2013; PUBCHEM, 2019
Piptocarфина B	Lactona sesquiterpênica	76215-49-1	Folhas	MARTUCCI; GOBBO-NETO, 2016; PUBCHEM, 2019
Glaucolídeo A	Lactona sesquiterpênica	11091-29-5	Folhas	IGUAL et al., 2013; PUBCHEM, 2019

Tabela 4 (Continuação) - Dados das substâncias identificadas em *Vernonia polyanthes* descritas na literatura

<b>Substância</b>	<b>Classe</b>	<b>Nº registro CAS</b>	<b>Parte da Planta</b>	<b>Referência</b>
Estigmasterol	Esteróide	83-48-7	Partes aéreas	BOHLMANN et al., 1981; PUBCHEM, 2019
Ácido 4,5-di-O-(E)-cafeoilquínico	Ácido clorogênico	57378-72-0	Folhas	IGUAL et al., 2013; PUBCHEM, 2019
Ácido 3,5-di-O-(E)-cafeoilquínico	Ácido clorogênico	89919-62-0	Folhas	IGUAL et al., 2013; PUBCHEM, 2019
Ácido 3,4-di-O-(E)-cafeoilquínico	Ácido clorogênico	14534-61-3	Folhas	MARTUCCI; GOBBO-NETO, 2016; PUBCHEM, 2019
Ácido 5-O-(E)-cafeoilquínico	Ácido clorogênico	906-33-2	Folhas	MARTUCCI; GOBBO-NETO, 2016; PUBCHEM, 2019
Ácido 3-O-(E)-cafeoilquínico	Ácido clorogênico	327-97-9	Folhas	MARTUCCI; GOBBO-NETO, 2016; PUBCHEM, 2019
Ácido protocatecuico	Ácido polifenólico	99-50-3	Folhas	IGUAL et al., 2013; PUBCHEM, 2019
3,7-dimetóxi-5,3',4'-trihidroxiflavona	Flavonoide	-	Folhas	IGUAL et al., 2013; PUBCHEM, 2019
Luteolina	Flavonoide	491-70-3	Folhas	IGUAL et al., 2013; PUBCHEM, 2019
Quercetina	Flavonoide	117-39-5	Folhas	IGUAL et al., 2013; PUBCHEM, 2019
Quercetina-3-O- $\beta$ -glucosídeo	Flavonoide	21637-25-2	Folhas	IGUAL et al., 2013; PUBCHEM, 2019

Tabela 4 (Continuação) - Dados das substâncias identificadas em *Vernonia polyanthes* descritas na literatura

<b>Substância</b>	<b>Classe</b>	<b>Nº registro CAS</b>	<b>Parte da Planta</b>	<b>Referência</b>
Apigenina	Flavonoide	520-36-5	Folhas	IGUAL et al., 2013; PUBCHEM, 2019
Isoramnetina	Flavonoide	480-19-3	Folhas	IGUAL et al., 2013; PUBCHEM, 2019
3'4'-dimetóxiluteolina	Flavonoide	4712-12-3	Folhas	IGUAL et al., 2013; PUBCHEM, 2019
Luteolina-7-O-glicuronídeo	Flavonoide	29741-10-4	Folhas	MARTUCCI; GOBBO-NETO, 2016; PUBCHEM, 2019
Apigenina-7-O-glicuronídeo	Flavonoide	29741-09-1	Folhas	MARTUCCI; GOBBO-NETO, 2016; PUBCHEM, 2019
Crisoeriol-7-O-glicuronídeo	Flavonoide	19993-32-9	Folhas	MARTUCCI; GOBBO-NETO, 2016; PUBCHEM, 2019
Acacetina-7-O-glicuronídeo	Flavonoide	-	Folhas	MARTUCCI; GOBBO-NETO, 2016; PUBCHEM, 2019
Eriodictiol-glicuronídeo	Flavonoide	133360-47-1	Folhas	MARTUCCI et al., 2014; PUBCHEM, 2019
Isoquercetina	Flavonoide	482-35-9	Folhas	MARTUCCI et al., 2014; PUBCHEM, 2019
Rutina	Flavonoide	153-18-4	Folhas	PUBCHEM, 2019; RODRIGUES et al., 2016

ND: não descrito na literatura consultada; \*: obtido em mistura; -: informação não disponível.

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Quanto ao efeito antibiótico, ao realizar uma busca no *Pubmed* utilizando como palavras-chave *antibacterial activity* e *Vernonia polyanthes* bem como *antibacterial activity* e *Vernonanthura phosphorica*, não foi encontrada nenhuma publicação científica (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=antibacterial+activity+of+vernonia+polyanthes>, acessado em 26 de maio de 2019; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=antibacterial+activity+of+vernonanthura+phosphorica>, acessado em 26 de maio de 2019). Por sua vez, ao efetuar a revisão de literatura nas bases de dados descritas no item 2 utilizando as palavras-chave *Vernonia polyanthes* e sua sinónímia *Vernonanthura phosphorica* foram encontrados quatro artigos, a saber: Oliveira e colaboradores (2007); Jorgetto e colaboradores (2011); Silva e colaboradores (2012) e Waltrich, Hoscheid e Prochnau (2015). No entanto, nenhum deles explica o mecanismo pelo qual os respectivos extratos ou óleo essencial obtidos de *V. polyanthes* interferem na estrutura bacteriana, fato que justifica a importância do presente estudo para a elucidação do provável mecanismo de ação responsável pelo efeito antibiótico das frações bioativas obtidas da espécie vegetal foco deste estudo.

### 3 OBJETIVOS

---

#### 3.1 GERAL

O presente estudo teve como objetivo geral aprofundar a investigação do efeito antibiótico *in vitro* por meio da cinética bacteriana, efeito combinatório e modo de ação das frações diclorometânicas floral e foliar de *V. polyanthes* Less. frente às cepas de *Salmonella*. Além disso, realizar a caracterização química destas frações visando estabelecer o (s) provável (is) composto (s) responsável (is) pelo efeito antibiótico, introduzindo o lupeol para contribuir no esclarecimento desse propósito.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Obter os extratos hidroetanólicos 70% das folhas e flores de *V. polyanthes* por meio de maceração estática;
- Obter as frações dos extratos hidroetanólicos 70% das folhas e flores de *V. polyanthes* por meio da partição líquido/líquido com solventes de diferentes polaridades;
- Obter o perfil cromatográfico das frações diclorometânicas floral e foliar de *V. polyanthes*;
- Investigar o efeito antibiótico *in vitro* dos extratos e frações florais e foliares de *V. polyanthes* e do lupeol;
- Investigar o efeito combinatório das frações diclorometânicas floral e foliar de *V. polyanthes* com ampicilina ou cloranfenicol ou levofloxacino frente às cepas de *Salmonella* de referência ATCC® e clínicas humanas;
- Investigar o efeito das frações diclorometânicas floral e foliar de *V. polyanthes* e do lupeol frente às cepas de *Salmonella* de referência ATCC® e clínicas humanas por meio da análise da curva de crescimento bacteriano;
- Investigar se as frações diclorometânicas floral e/ou foliar de *V. polyanthes* provocam dano na membrana celular bacteriana por meio dos ensaios de viabilidade celular bacteriana e extravasamento de substâncias que são absorvidas a 280 nm;
- Avaliar a citotoxicidade das frações diclorometânicas floral e foliar por meio da determinação da toxidez aguda.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

---

### 4.1 MATERIAL VEGETAL

Folhas e inflorescências de *V. polyanthes* foram coletadas da planta cultivada no Horto de Plantas Medicinais da Faculdade de Farmácia da UFJF, Juiz de Fora, Minas Gerais, 21°46' S, 43°22' W, entre 07:00 e 08:00 horas do dia 17 de agosto de 2017. Uma exsicata (CESJ n° 10.329), identificada pela Dra. Fátima Regina Gonçalves Salimena, está depositada no Herbário Leopoldo Krieger (CESJ) do Instituto de Ciências Biológicas da UFJF. A espécie vegetal foi coletada no mês de agosto por ser o período de maior intensidade de floração e menor índice pluviométrico uma vez que chuvas contínuas podem levar a perda de metabólitos hidrossolúveis por lixiviação (CESAMA, 2019; DUTRA, 2011; GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

As folhas e flores foram selecionadas pela exclusão daquelas deterioradas ou com presença de materiais distintos. Em seguida, foram submetidas à secagem em temperatura ambiente (~25 °C) em local sombreado e ventilado por sete dias (Figura 12). O processo de secagem é uma importante etapa após a colheita do material vegetal por reduzir sua atividade de água e dificultar o crescimento de fungos e bactérias, além de evitar a degradação de metabólitos por enzimas hidrolíticas (CORRÊA et al., 2004). Após a secagem, as folhas foram trituradas em moinho de facas SL-32 (SOLAB, São Paulo, Brasil) com peneira de aço inox e malha de 10 *mesh*. Por serem pouco densas, as inflorescências secas não puderam ser trituradas desta forma, e por esse motivo, as flores foram retiradas da disposição original manualmente.

Figura 12 - Fotografia das folhas (A) e inflorescências (B) de *Vernonia polyanthes* durante o processo de secagem a temperatura ambiente



Fonte: Elaborado pela autora (2019).



## 4.2 PROCESSO DE EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO

Os procedimentos de obtenção dos extratos e frações de *V. polyanthes* foram realizados no Laboratório de Química Biomedicinal e Farmacologia Aplicada da Faculdade de Farmácia da UFJF, sob responsabilidade do Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa e da Profa. Dra. Ana Lucia Santos de Matos Araújo, onde foram disponibilizados os seguintes equipamentos:

- Rotaevaporador RII (Buchi<sup>®</sup> Labortechnik AG, Flawil, Suíça)
- Bomba V-700 (Buchi<sup>®</sup> Labortechnik AG, Flawil, Suíça)
- Balança Analítica AY220 (Shimadzu<sup>®</sup>, Barueri, São Paulo, Brasil)

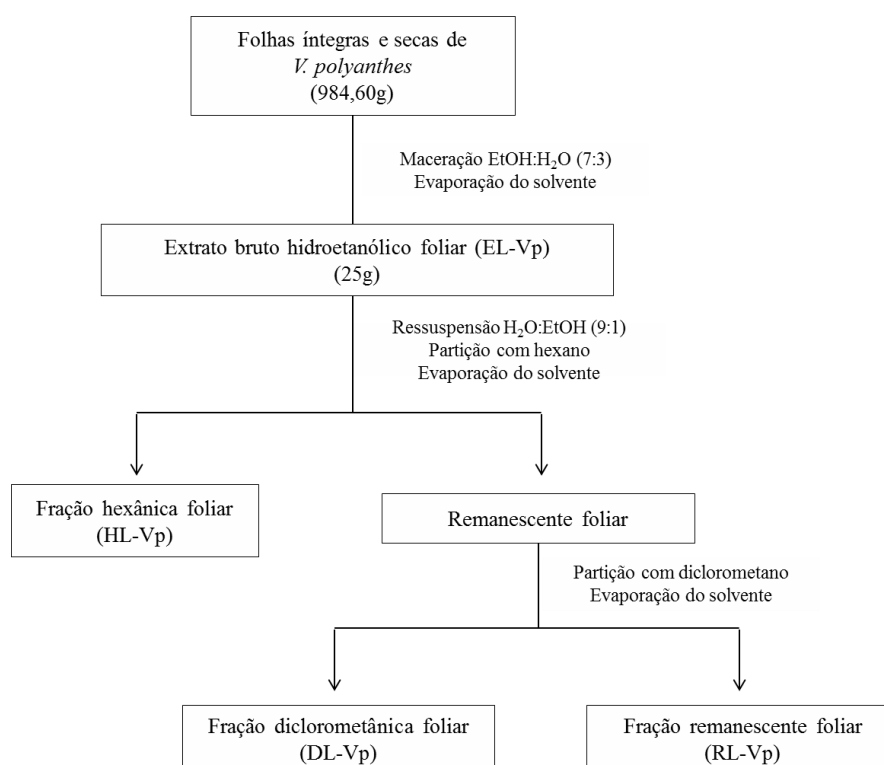
Nosso grupo de pesquisa havia optado por um método de extração que favorecesse a obtenção de terpenoides a partir de *V. polyanthes*. No entanto, como descrito na Revisão da Literatura, os marcadores quimiotaxonômicos desta espécie vegetal são flavonoides e terpenoides (IGUAL et al., 2013). Diante disso, no presente estudo procedeu-se a um ajuste no método extrativo visando a obtenção de ambas as classes de metabólitos a fim de contribuir com a elucidação do (s) provável (is) responsável (is) pelo efeito antibiótico observado para esta espécie vegetal. A hipótese de que a lactona sesquiterpênica glaucolídeo A, composto majoritário observado em extratos anteriormente obtidos e investigados seria a responsável pelo efeito antibiótico, já havia sido descartada (FLORENCIO, 2017; SANTANA, 2015).

Desta forma, após a realização das etapas descritas no item 4.1, os materiais vegetais foliares (984,60 g) e florais (468,13 g) foram submetidos à extração por maceração estática em solvente hidroetanólico 70% por quatro dias com agitação manual de um minuto e trinta segundos a cada 24 horas em temperatura ambiente (~25 °C) e protegidos da luz (Adaptado de SEO et al., 2014). O solvente hidroetanólico foi preparado com o auxílio de uma proveta, utilizando-se álcool etílico absoluto 99,8% P.A. (Neon<sup>®</sup>, SP, Brasil) e água destilada (7:3). Após quatro dias de maceração, a mistura de material vegetal e solvente foi filtrada em papel de filtro e concentrada em evaporador rotativo com temperatura máxima de 40 °C. O processo de extração por maceração estática da folha e da flor foi seguido por seis remacerações cada um, e os materiais vegetais concentrados secos foram armazenados em dois frascos de vidro protegidos da luz devidamente identificados, obtendo-se o extrato bruto hidroetanólico foliar de *V. polyanthes* (EL-Vp) e o extrato bruto hidroetanólico floral de *V. polyanthes* (EF-Vp), nessa ordem.

O processo de fracionamento foi realizado com o material vegetal foliar e floral, separadamente, a partir de 25 g do EL-Vp e do EF-Vp secos, respectivamente. EL-Vp e EF-Vp foram ressuspensos em água destilada e álcool etílico absoluto 99,8% P.A. (Neon<sup>®</sup>, SP, Brasil)

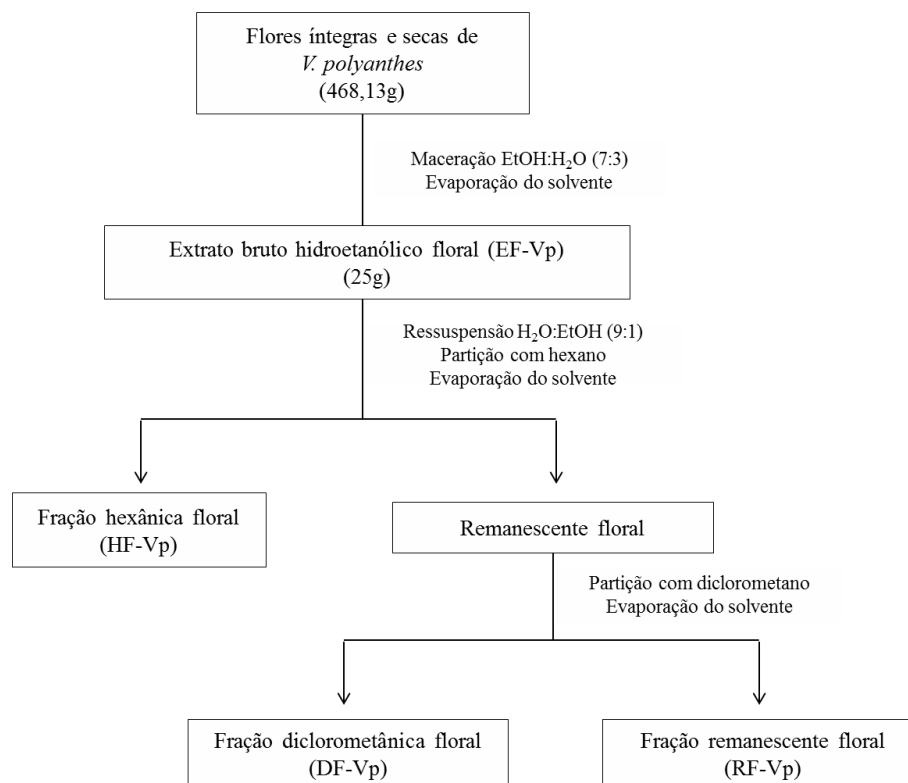
(9:1) seguido de partição líquido/líquido com solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade, hexano P.A. (Neon<sup>®</sup>, SP, Brasil) e diclorometano P.A. (Synth<sup>®</sup>, SP, Brasil). Dessa forma, foram obtidas as frações hexânica foliar (HL-Vp), diclorometânica foliar (DL-Vp), remanescente foliar (RL-Vp), hexânica floral (HF-Vp), diclorometânica floral (DF-Vp) e remanescente floral (RF-Vp) (Figuras 13 e 14). O fracionamento conforme descrito foi realizado duas vezes para cada extrato.

Figura 13 - Esquema ilustrativo do processo de extração e fracionamento a partir das folhas de *Vernonia polyanthes*



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Figura 14 - Esquema ilustrativo do processo de extração e fracionamento a partir das flores de *Vernonia polyanthes*



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

#### 4.3 INVESTIGAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DAS FRAÇÕES DICLOROMETÂNICAS FLORAL E FOLIAR DE *Vernonia polyanthes* POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA A ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (CG-EM)

As análises por CG-EM foram realizadas no Laboratório de Análise Instrumental de Alimentos, localizado no Departamento de Nutrição do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFJF, sob responsabilidade da Profa. Dra. Cristiane Gonçalves de Oliveira (*in memoriam*).

Para investigação do perfil químico de DL-Vp e DF-Vp por CG-EM foi utilizado cromatógrafo Shimadzu® GCMS-QP2010 Plus, auto-injetor AOC-20i e coluna Restek® Rtx-5MS capilar de sílica fundida (5% de difenilsiloxano e 95% de dimetilpolisiloxano; 30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 µm de filme). As amostras foram preparadas pesando-se 10 mg de DL-Vp e DF-Vp que, após, foram solubilizados em 2 mL de etanol grau HPLC (Panreac®, Barcelona, Espanha), seguido de banho ultrassônico (Limp Sonic, SP, Brasil), sem aquecimento, por cinco minutos e centrifugação a 1500 rpm por quinze minutos em centrífuga refrigerada NT815 (Novatécnica®, SP, Brasil) à 17 °C. Após centrifugação, o sobrenadante foi filtrado diretamente

para o interior do "vial" com filtro de seringa PTFE-hidrofóbico (Agilent<sup>®</sup>, CA, EUA) contendo membrana com porosidade de 0,22 µm. A análise ocorreu na seguinte condição cromatográfica: temperatura do forno iniciou com 60 °C e atingiu a temperatura máxima de 290 °C (de 60 °C até 84 °C, taxa de aquecimento de 2 °C/minuto; de 84 °C até 150 °C, taxa de aquecimento de 5 °C/minuto; de 150 °C até 180 °C, taxa de aquecimento de 2 °C/minuto; de 180 °C até 290 °C, taxa de aquecimento de 3 °C/minuto e platô de 3 minutos em 290 °C); temperatura do injetor foi de 240 °C no modo *splitless*; temperatura da fonte de íon, 280 °C; gás hélio como gás de arraste; fluxo da coluna de 1 mL/minuto com injeção de 1 µL de amostra. O espectrômetro de massas operou em modo de ionização eletrônica (70 eV) e o detector foi programado para registrar taxas de massas entre 40 e 500 Da. O padrão de n-alcenos (C<sub>7</sub>-C<sub>40</sub>) (Supelco<sup>®</sup>, PA, EUA) na concentração de 0,1 mg/mL foi analisado nestas mesmas condições cromatográficas.

#### 4.4 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO ANTIBIÓTICO *in vitro* DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Vernonia polyanthes*

O efeito antibiótico *in vitro* de EL-Vp, HL-Vp, DL-Vp, RL-Vp, EF-Vp, HF-Vp, DF-Vp e RF-Vp foi investigado por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) empregando o método de microdiluição em caldo seguindo as recomendações do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) descritas nos documentos M07-A9 (CLSI, 2012) e M100-S24 (CLSI, 2014). Posteriormente, foi também determinada a Concentração Bactericida Mínima (CBM) seguida da classificação do efeito antibiótico como bactericida ou bacteriostático segundo o método descrito por Andrews (2001), com ajuste do meio de cultura utilizado [IsoSensitest Agar (ISA; Oxoid, Basingstoke, UK) foi substituído por Ágar Müeller Hinton (AMH; Difco<sup>®</sup> Laboratories, Spark, MD, USA)].

Os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de Bioatividade Celular e Molecular localizado no Centro de Pesquisas Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFJF, sob responsabilidade da Profa. Dra. Maria Silvana Alves e do Prof. Dr. José Otávio do Amaral Corrêa, com auxílio dos seguintes equipamentos: cabine de segurança biológica classe II B2 (Veco<sup>®</sup>, SP, Brasil), estufa bacteriológica (Quimis<sup>®</sup>, SP, Brasil), autoclave (Primatec<sup>®</sup>, SP, Brasil), micropipetas (Thermo Scientific<sup>®</sup>, MA, EUA), centrífuga refrigerada (Thermo Scientific<sup>®</sup>, MA, EUA), estufa de secagem e esterilização (Limatec, RJ, Brasil), forno de micro-ondas (LG Electronics<sup>®</sup> Brasil, SP, Brasil), equipamento de osmose reversa (Permutation<sup>®</sup>, PR, Brasil), pHmetro digital (Hanna<sup>®</sup> Instruments Brasil, SP, Brasil), banho de água com termostato (Biothec, SP, Brasil), refrigeradores (Eletrolux<sup>®</sup> Brasil, SP,

Brasil), agitador tipo vórtex (Arsec, SP, Brasil), balança analítica (EduTec, PR, Brasil), entre outros.

Para a realização destes ensaios foram empregadas cepas de referência da *American Type Culture Collection* (ATCC®), na segunda passagem, obtidas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil, representativas de grupos bacterianos Gram-positivos e Gram-negativos fermentadores e não fermentadores. A construção do painel bacteriano apresentado abaixo se baseou na lista de patógenos prioritários para a pesquisa, a descoberta e o desenvolvimento de novos antibióticos elaborada e divulgada pela OMS em 2017 (WHO, 2017c):

- *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC® 6538™)
- *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC® 25923™)
- *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC® 29213™)
- *Escherichia coli* (ATCC® 10536™)
- *Escherichia coli* (ATCC® 25922™)
- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. Choleraesuis (ATCC® 10708™)
- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. Typhimurium (ATCC® 13311™)
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 9027™)
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853™)

Com o propósito de aprofundar a investigação do efeito antibiótico de DL-Vp e DF-Vp foram realizados ensaios adicionais empregando cepas clínicas humanas de *Salmonella*, classificadas como alta prioridade conforme a lista de patógenos prioritários da OMS (WHO, 2017c). Assim, foram investigadas cepas clínicas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. Enteritidis, *Salmonella* spp. e *Salmonella* spp. resistente à fluoroquinolona, isoladas de infecções sanguíneas e urinárias de pacientes atendidos no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, identificadas pelo sistema automatizado VITEK®2 (BioMérieux, Durham, NC, EUA) e gentilmente cedidas pela Mestre Adriana Lúcia Pires Ferreira, responsável pelo Laboratório de Bacteriologia do Serviço de Patologia Clínica dessa Instituição:

- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. Enteritidis 1406591
- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. Enteritidis 1418594
- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. Enteritidis 1428260
- *Salmonella* spp. 1266695
- *Salmonella* spp. 1507708

Em relação ao controle e garantia de qualidade dos ensaios, os documentos M07-A09 e M100-S24 (CLSI, 2012, 2014) estabelecem as cepas recomendadas para garantir e validar o Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos (TSA) para organismos não fastidiosos, a saber: *S. aureus* (ATCC® 29213™), *E. coli* (ATCC® 25922™) e *P. aeruginosa* (ATCC® 27853™). A Tabela 5 mostra os intervalos dos valores de CIM estabelecidos pelo CLSI (2014) para essas cepas frente à ampicilina sódica (AMP) e cloranfenicol (CHL), antibióticos (ANTs) selecionados como controle positivo dos testes supramencionados. A escolha por esses ANTs teve como critério de inclusão o distinto modo de ação de cada um deles, inibição das sínteses do peptidoglicano (AMP) e proteica (CHL), que confere o efeito antibiótico dessas substâncias sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Na etapa de aprofundamento do estudo foi adicionado levofloxacino (LEVO) (Inlab, SP, Brasil) cujo modo de ação é a inibição da replicação do DNA (SILVER, 2011).

Tabela 5 - Intervalo dos valores de Concentração Inibitória Mínima para controle de qualidade do Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos para organismos não fastidiosos

ANT	Concentração Inibitória Mínima (CIM) (µg/mL)		
	<i>S. aureus</i> (ATCC® 29213™)	<i>E. coli</i> (ATCC® 25922™)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC® 27853™)
AMP	0,5 - 2,0	2,0 - 8,0	Não reportado
CHL	2,0 - 16	2,0 - 8,0	Não reportado

ANT: antibiótico; AMP: ampicilina; CHL: cloranfenicol.

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

O armazenamento das cepas de referência e clínicas foi feito por meio da manutenção das mesmas como suspensões em solução contendo leite desnatado a 10% (p/v) acrescido de glicerol a 10% (v/v) (solução LDG). Para cada cepa foi preparada uma suspensão densa (obtida a partir de crescimento de 24 horas) diretamente em 1 mL de solução LDG previamente distribuída em tubos plásticos com tampa de rosca próprios para congelamento (Inlab, SP, Brasil). A seguir, estes tubos foram armazenados em uma temperatura de cerca de 20 °C negativos até a realização dos ensaios.

#### 4.4.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As CIMs foram determinadas empregando o método de microdiluição em caldo conforme descrito no documento M07-A09 (CLSI, 2012). Soluções dos extratos e frações de *V. polyanthes* e dos ANTs foram preparadas com diferentes sistemas solvente/diluyente,

obtendo-se concentrações finais de 10 mg/mL e 1 mg/mL para as amostras vegetais e ANTs, respectivamente, conforme apresentado nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6 - Descrição dos sistemas solvente/diluyente utilizados no preparo das soluções de uso dos extratos e frações de *Vernonia polyanthes* usadas no método de microdiluição em caldo

Solução de uso	Massa (mg)	Solvente	Diluyente	Concentração Final (mg/mL)
EL-Vp/ HL-Vp/ DL-Vp/ RL-Vp/ EF-Vp/ HF-Vp/ DF-Vp/ RF-Vp	10	20 µL DMSO + 20 µL Tween 80	100 µL EtOH 99,5% + 860 µL Água Destilada	10

EL-Vp: extrato hidroetanólico 70% foliar de *V. polyanthes*; EF-Vp: extrato hidroetanólico 70% floral de *V. polyanthes*; HL-Vp: fração hexânica foliar de *V. polyanthes*; HF-Vp: fração hexânica floral de *V. polyanthes*; DL-Vp: fração diclorometânica foliar de *V. polyanthes*; DF-Vp: fração diclorometânica floral de *V. polyanthes*; RL-Vp: fração remanescente foliar de *V. polyanthes*; RF-Vp: fração remanescente floral de *V. polyanthes*; DMSO: dimetilsulfóxido; EtOH: álcool etílico absoluto 99,8% P.A. Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Tabela 7 - Descrição dos sistemas solvente/diluyente utilizados no preparo das soluções-estoque e de uso dos antibióticos usados no método de microdiluição em caldo

Solução	Antibiótico	
	AMP	CHL
Solução-estoque (SE)	<b>AMP<sub>1</sub> (10 mg/mL)</b>	<b>CHL<sub>1</sub> (10 mg/mL)</b>
	10 mg Ampicilina anidra cristalina (Sigma-Aldrich® Co., St. Louis, USA)	10 mg Cloranfenicol cristalino (Sigma-Aldrich® Co., St. Louis, USA)
	1000 µL tampão pH 8,0	500 µL EtOH 95% 500 µL Água destilada estéril
Solução de uso (SU)	<b>AMP<sub>2</sub> (1 mg/mL)</b>	<b>CHL<sub>2</sub> (1 mg/mL)</b>
	100 µL AMP <sub>1</sub> 900 µL tampão pH 6,0	100 µL CHL <sub>1</sub> 900 µL Água destilada estéril

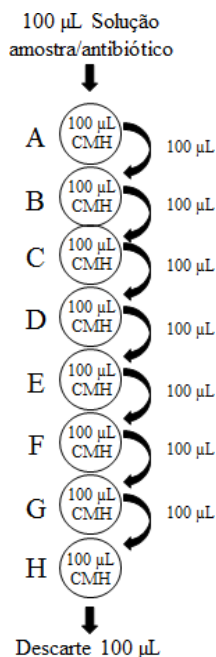
Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Os extratos e frações foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth, SP, Brasil), respeitando-se o limite máximo de 1% dessa substância no poço da microplaca, conforme recomendação descrita no documento M100-S24 (CLSI, 2014). Com o intuito de melhorar a solubilidade destas amostras, foi acrescentado Tween 80 como solvente. Os controles dos sistemas solvente/diluyente mostraram que Tween 80 na concentração utilizada

não interferiu no crescimento bacteriano. Após o preparo, as soluções das amostras ficaram em banho ultrassônico (Limp Sonic, SP, Brasil) sem aquecimento por dez minutos. Conforme apresenta a Tabela 7, as SEs e SUs dos ANTs utilizados foram preparadas com os solventes/diluentes descritos no documento M100-S24 (CLSI, 2014). Inicialmente, as cepas ATCC® foram ativadas em caldo BHI (do inglês, *Brain Heart Infusion*) (Acumedia®, SP, Brasil) e incubadas por 18 a 24 horas em estufa bacteriológica a 37 °C, em aerobiose. Após este tempo, o repique foi realizado em AMH seguido de incubação por mais 18 a 24 horas em estufa bacteriológica a 37 °C, em aerobiose. A suspensão bacteriana foi preparada em solução salina estéril (NaCl 0,9% p/v) a partir de 3 - 5 colônias isoladas crescidas no AMH, e ajustada para 0,5 da escala de McFarland [ $1 - 2 \times 10^8$  Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mL]. A turbidez do inóculo bacteriano foi quantificada por densidade óptica em espectrofotômetro (Bel Spectro S05) (BEL® Photonics do Brasil, SP, Brasil). Para aferir o padrão 0,5 de McFarland, a leitura de absorvância da suspensão bacteriana deve estar entre 0,08 e 0,13 no comprimento de onda de 625 nm (CLSI, 2012). Em seguida, o ensaio para a determinação da CIM foi realizado em microplacas de 96 poços de fundo chato (Inlab, SP, Brasil). A partir das SUs dos extratos, frações e ANTs foram realizadas diluições seriadas diretamente nas microplacas, resultando em um gradiente de concentração de 5000 a 40 µg/mL e de 500 a 4 µg/mL, para as amostras e ANTs, nessa ordem (Figura 15). Foram adicionados 100 µL de caldo Mueller-Hinton (CMH) (Difco® Laboratories, Spark, MD, USA) em todos os poços da microplaca e 100 µL das SUs das amostras e ANTs nos poços 1 a 7 da fileira A. Após homogeneização, foram transferidos 100 µL da fileira A para B, e assim sucessivamente até a fileira H. Dos poços da fileira H foram descartados 100 µL, remanescendo igual volume em toda a coluna. Após o término das diluições seriadas das amostras e ANTs, em quadruplicata e triplicata, respectivamente, foram adicionados 10 µL da suspensão bacteriana padronizada.



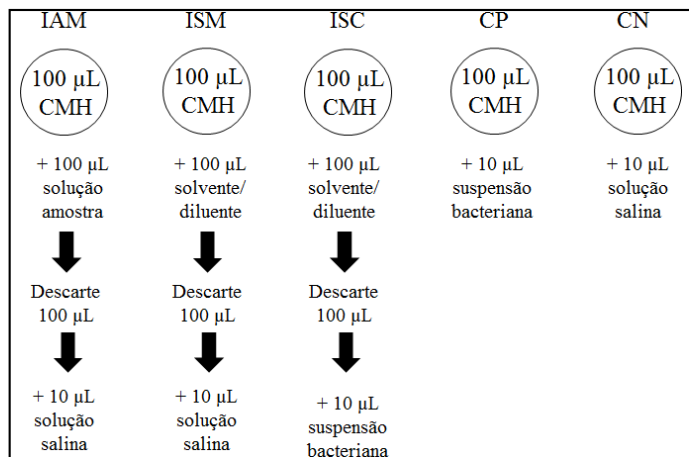
Figura 15 - Esquema representativo do procedimento de diluição seriada realizado na microplaca



Fonte: Adaptado de Temponi, 2012.

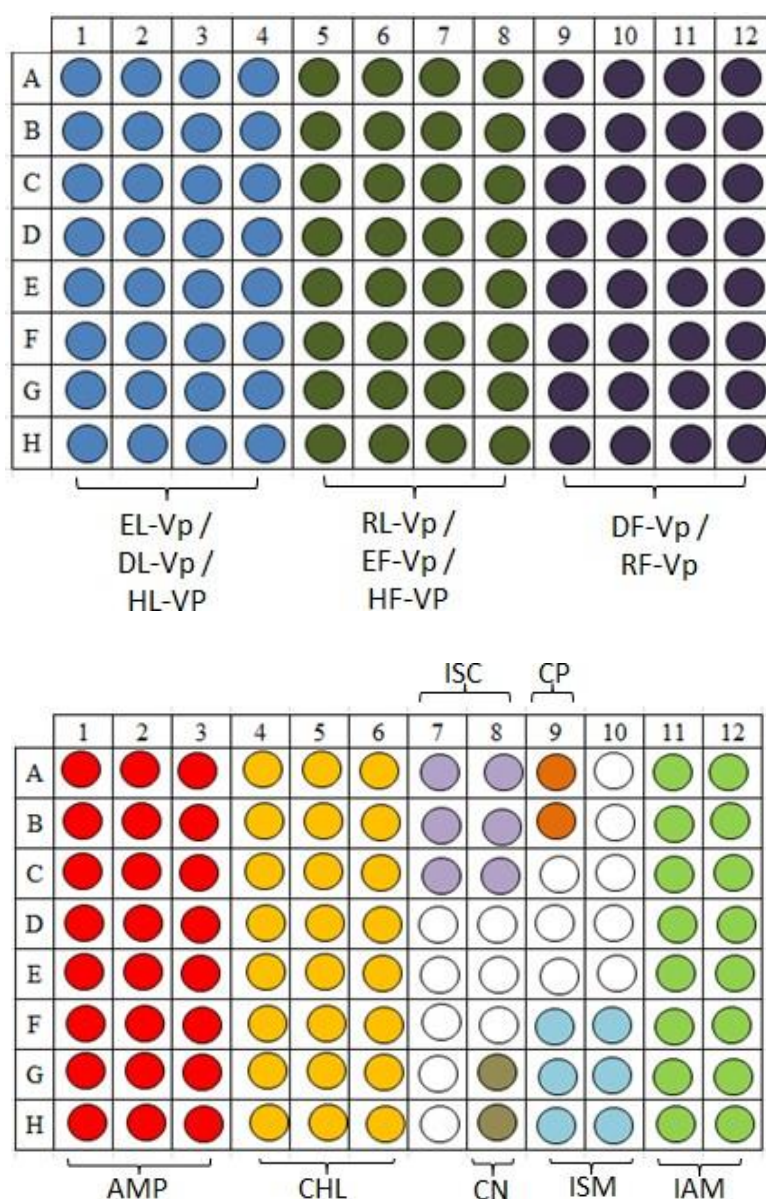
Com o objetivo de garantir a qualidade do teste, foi preparada uma microplaca controle para cada cepa testada a fim de avaliar a interferência das amostras (extratos, frações e ANTs) sobre o CMH (meio) (IAM), dos sistemas solvente/diluyente sobre o CMH (ISM) e sobre o crescimento bacteriano (ISC), e controles positivo (CP) e negativo (CN), conforme esquema ilustrativo da Figura 16. As microplacas utilizadas no método de microdiluição em caldo para cada cepa bacteriana testada foram organizadas conforme esquema ilustrativo da Figura 17.

Figura 16 - Esquema ilustrativo dos controles do ensaio de microdiluição em caldo



Fonte: Adaptado de Santana, 2015.

Figura 17 - Esquema ilustrativo da organização das microplacas para determinação da Concentração Inibitória Mínima pelo método de microdiluição em caldo dos extratos e frações florais e foliares de *Vernonia polyanthes*



EL-Vp: extrato hidroetanólico 70% foliar de *V. polyanthes*; DL-Vp: fração diclorometânica foliar de *V. polyanthes*; HL-Vp: fração hexânica foliar de *V. polyanthes*; RL-Vp: fração remanescente foliar de *V. polyanthes*; EF-Vp: extrato hidroetanólico 70% floral de *V. polyanthes*; DF-Vp: fração diclorometânica floral de *V. polyanthes*; HF-Vp: fração hexânica floral de *V. polyanthes*; RF-Vp: fração remanescente floral de *V. polyanthes*; AMP: ampicilina; CHL: cloranfenicol; CN: controle negativo; ISM: controle da interferência do sistema solvente/diluyente sobre o meio; IAM: controle da interferência das amostras/antibiótico sobre o meio; ISC: controle da interferência dos sistemas solvente/diluyente sobre o crescimento; CP: controle positivo. Fonte: Adaptado de Santana, 2015.

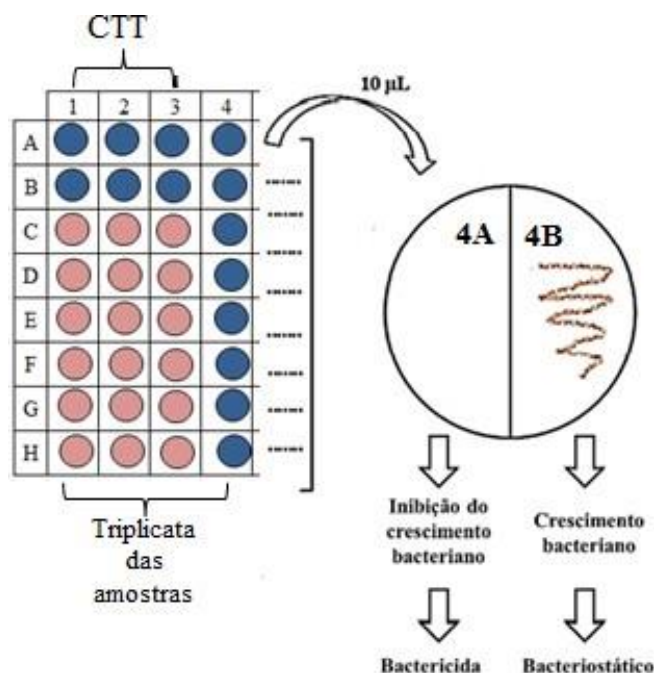
Após incubação a  $35^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ , por 16 a 20 horas, em aerobiose, foram realizadas as leituras das microplacas com adição de 20  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (CTT) (Vetec Química Fina Ltda, RJ, Brasil) a 1 mg/mL (p/v) (indicador

biológico) em todos os poços, exceto na coluna correspondente à quadruplicata das amostras, cujos conteúdos foram utilizados para a determinação da CBM e para a classificação do efeito antibiótico como bactericida ou bacteriostático. Após a adição do indicador biológico, as microplacas foram incubadas por 30 minutos, nas mesmas condições descritas anteriormente. Após incubação, os poços com coloração rosa ou avermelhada indicaram crescimento bacteriano. A CIM foi determinada como "a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento visível de um micro-organismo em um teste de susceptibilidade em caldo", conforme conceito descrito no documento M07-A09 (CLSI, 2012). Este mesmo procedimento foi utilizado para a determinação da CIM pelo método de microdiluição em caldo frente às cepas clínicas.

#### **4.4.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e classificação do efeito antibiótico da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

A partir dos conteúdos dos poços das colunas das microplacas que não receberam a solução de CTT e nos quais não foi observado crescimento bacteriano, foram retirados 10 µL com auxílio de uma micropipeta e transferidos para placas de Petri contendo AMH. Estas placas foram incubadas em estufa à  $35^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ , por 18 a 20 horas, em aerobiose. Após incubação, foi analisada, visualmente, a presença ou ausência de crescimento de colônias bacterianas. Desta forma, as concentrações dos extratos e frações testados que permitiram o crescimento bacteriano no AMH foram definidas como bacteriostáticas e aquelas que o inibiram como bactericidas (Figura 18). Assim, a CBM foi determinada como a menor concentração capaz de impedir o crescimento bacteriano no AMH. Este procedimento também foi utilizado para a determinação da CBM frente às cepas clínicas.

Figura 18 - Esquema ilustrativo do procedimento para determinação da Concentração Bactericida Mínima e da classificação do efeito antibiótico como bactericida ou bacteriostático



Neste exemplo, o resultado da CIM foi obtido em 4B, o efeito antibiótico foi classificado como bacteriostático e a CBM foi determinada em 4A.

Fonte: Adaptado de Santana, 2015.

#### 4.4.3 Avaliação do efeito combinatório

O efeito combinatório entre DL-Vp, DF-Vp, AMP, CHL e LEVO frente às *S. Choleraesuis* (ATCC® 10708™), *S. Typhimurium* (ATCC® 13311™), *S. Enteritidis* 1428260 e *Salmonella* spp. 1507708 foi avaliado pelo método de combinação de substâncias e pelo cálculo do índice de redução da dose (IRD) (Adaptado de FADLI et al., 2012).

Para este ensaio foram utilizadas microplacas de 96 poços de fundo chato (Inlab, SP, Brasil) contendo CMH com concentrações de DL-Vp ou DF-Vp de 1/8x a 8x CIM e de AMP, CHL ou LEVO em concentrações variando de 1/8x a 2x CIM. As diluições seriadas de DL-Vp ou DF-Vp e dos ANT's foram misturadas de modo que cada linha (e coluna) contivessem uma concentração do primeiro agente e concentração crescente do segundo. As SUs de DL-Vp, DF-Vp, AMP e CHL foram preparadas conforme mostrado anteriormente pelas Tabelas 6 e 7. A SU do LEVO foi preparada com água destilada estéril e gotas de uma solução de NaOH 0,1 mol/L segundo protocolo descrito no documento M100-S24 (CLSI, 2014). O inóculo bacteriano foi padronizado na turbidez de 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente  $1 - 2 \times 10^8$  UFC/mL) por espectrofotometria (Bel Spectro S05) (BEL® Photonics do Brasil, SP, Brasil) a partir de cultura de 18 a 20 horas em AMH, a 37 °C, em aerobiose. Em seguida, todos os poços

da microplaca foram preenchidos com 80 µL de CMH. Conforme apresenta a Figura 19, 50 µL das diluições de DL-Vp ou DF-Vp e de AMP, CHL ou LEVO foram pipetados nos poços específicos das colunas 2 a 11 e linhas A até G, respectivamente. Sendo assim, a coluna 1 até a linha G continha DL-Vp ou DF-Vp acrescida de CMH e a linha H somente CMH. Adicionalmente, foram distribuídos 20 µL da suspensão bacteriana em cada poço. A leitura das microplacas ocorreu com a adição de 10 µL de solução de CTT a 1 mg/mL (p/v) em todos os poços após 24 horas de incubação a 35° ± 2 °C, em aerobiose. O IRD foi calculado de acordo com a fórmula:

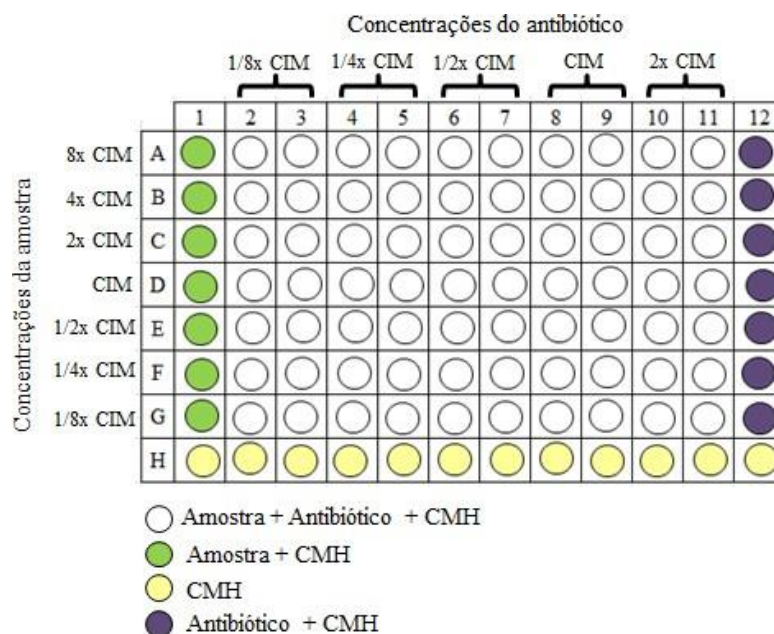
$$IRD = \frac{\text{CIM A} \cdot \text{CIM B}}{\text{CIM A/B}} + \frac{\text{CIM B/A}}{\text{CIM B}}$$

sendo CIM A = CIM do composto A sozinho e CIM A/B = CIM do composto A em combinação com o composto B; CIM B = CIM do composto B sozinho e CIM B/A = CIM do composto B em combinação com o composto A (FADLI et al., 2012).

Com base nos valores de IRD, Odds (2003) propôs a seguinte interpretação:

- Sinergismo:  $IRD \leq 0,5$ ;
- Ausência de interação:  $0,5 < IRD < 4$ ;
- Antagonismo:  $IRD > 4$ .

Figura 19 - Esquema ilustrativo da organização da microplaca para realização do ensaio do efeito combinatório



Fonte: Adaptado de Silva (2017).

#### 4.4.4 Determinação do tempo de morte bacteriana

O tempo de morte bacteriana foi determinado após exposição de cada cepafrente à DL-Vp ou DF-Vp nas concentrações de 0,5x CIM, 1x CIM e 2x CIM, à AMP, CHL ou LEVO na concentração de 1x CIM, e à combinação DL-Vp ou DF-Vp + AMP, CHL ou LEVO nas respectivas concentrações com efeito sinérgico, segundo método preconizado por Bessa (2019).

Para tanto, em tubos Falcon contendo 2,5 mL de CMH, foram adicionados 2,5 mL das soluções das frações ou ANTs nas concentrações testadas. O tubo do controle do crescimento bacteriano continha 5 mL de CMH. Logo após, em cada tubo foram adicionados 50 µL do inóculo bacteriano padronizado na escala 0,5 de McFarland, exceto nos tubos referentes aos brancos da cor das frações em que esse volume foi substituído por solução salina 0,9%. A hora exata do momento da pipetagem do inóculo nos tubos foi considerada o tempo zero hora do experimento. Alíquotas de 50 µL foram retiradas de cada tubo e transferidas em triplicata para poços de uma microplaca contendo 150 µL de solução salina 0,9%. Após a retirada das alíquotas, os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a  $35^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ , em aerobiose. As absorvâncias das soluções-teste transferidas para a microplaca foram lidas em leitora automática de microplacas TP-READER (Thermo Scientific<sup>®</sup>, Waltham, MA, EUA) no comprimento de onda de 630 nm. Este procedimento foi realizado no tempo zero hora e nos tempos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 24 e 28 horas de incubação. Com os resultados da absorvância x tempo de incubação foi elaborada uma curva utilizando o *software Excel<sup>®</sup> for Windows* mostrando a cinética bacteriana de cada cepa testada e em cada tratamento.

#### 4.4.5 Determinação da viabilidade celular bacteriana

Para avaliação da viabilidade celular bacteriana foram realizadas diluições seriadas das soluções-teste preparadas conforme descrito no item 4.4.4 no tempo de 1 hora (fase *lag*) e posterior contagem das UFC em placa de Petri contendo AMH, de acordo com o protocolo descrito por Bessa (2019). Assim, foram retirados 100 µL de cada tubo Falcon contendo as soluções-teste e transferidos para *ependorfs* contendo 900 µL de solução salina 0,9% a fim de se obter a diluição  $10^{-1}$ . Do *ependorf* contendo a diluição  $10^{-1}$  foram retirados 100 µL que foram transferidos para outro *ependorf* contendo 900 µL de solução salina 0,9% a fim de se obter a diluição  $10^{-2}$ , e assim foram realizadas diluições sucessivas das soluções-teste. Das diluições de cada fração ou ANT foram dispensados 10 µL em formato de gota (aplicando a técnica *Drop plate*) em placas de Petri contendo AMH. As placas foram incubadas em estufa

bacteriológica a  $35^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ , em aerobiose, por 18 a 24 horas, e após esse tempo, foram realizadas as contagens das UFC. O resultado foi expresso graficamente como Log (UFC/mL) utilizando o *software Excel<sup>®</sup> for Windows*.

#### **4.4.6 Avaliação do extravasamento de substâncias que absorvem a 280 nm**

O ensaio do extravasamento de substâncias que absorvem a 280 nm foi realizado segundo protocolo descrito por Kim e colaboradores (2015), com adaptações. Células bacterianas subcultivadas em AMH foram ressuspensas em solução salina estéril 0,9% e padronizadas à densidade ótica de 0,7 em espectrofotômetro (Bel Spectro S05) (BEL<sup>®</sup> Photonics do Brasil, SP, Brasil) no comprimento de onda de 610 nm. Em seguida, 1 mL dessas células padronizadas foram adicionadas a 19 mL de tampão fosfato pH 7,1 (50 mM) estéril contendo ou não 0,5x CIM, 1x CIM e 2x CIM das frações. A interferência dos sistemas solvente/diluyente foi verificada por meio do controle das células bacterianas na presença dos sistemas utilizados no preparo das soluções das frações e dos ANTs. O teste de extravasamento também foi realizado com AMP, CHL e LEVO na concentração de 1x CIM e frações e ANTs combinados na concentração do sinergismo. Os tubos de ensaio contendo as frações e ANTs combinados, tampão fosfato pH 7,1 e suspensões bacterianas foram incubados por 1 hora, a  $35^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ , em aerobiose. Após incubação, foi retirada uma alíquota de 1 mL e centrifugada em microcentrífuga (Thermo Scientific<sup>®</sup>, Waltham, MA, EUA) (10.000 x g por 10 minutos). A absorbância do sobrenadante foi determinada no comprimento de onda de 280 nm em espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu<sup>®</sup>, SP, Brasil). O resultado foi expresso graficamente como a razão entre células tratadas e não tratadas utilizando o *software Excel<sup>®</sup> for Windows*.

#### **4.5 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO ANTIBIÓTICO *in vitro* DO LUPEOL**

Conforme descrito na Revisão da Literatura, os marcadores quimiotaxonômicos de *V. polyanthes* são os terpenoides e flavonoides (IGUAL et al., 2013). Diante disso, o lupeol, metabólito especial representante da classe dos terpenoides, teve seu efeito antibiótico investigado com o propósito de avaliar se ele poderia ser o principal responsável por esse efeito dos extratos ou frações desta espécie vegetal, visto que a lactona sesquiterpêncica glaucolídeo A havia sido descartada (FLORENCIO, 2017; SANTANA, 2015). Desta forma, lupeol  $\geq 94\%$ , CAS 545-47-1 (Sigma-Aldrich<sup>®</sup> Co., St. Louis, USA) foi submetido aos ensaios descritos nos itens 4.4.1, 4.4.2, 4.4.4 e 4.4.5.

## 4.6 TRIAGEM DE CITOTOXICIDADE

### 4.6.1 Determinação da toxidez aguda por meio do bioensaio com *Artemia salina*

A determinação da toxidez aguda de DL-Vp e DF-Vp frente ao microcrustáceo *Artemia salina* foi realizada de acordo com o método proposto por Meyer e colaboradores (1982), com pequenas adaptações. A água marinha artificial foi preparada a partir de uma mistura comercial de composição aproximada ao sal marinho natural (OceanTech Premium Reef Salt - Blue Treasure<sup>®</sup>), obedecendo a proporção recomendada pelo fabricante (6,7 kg para 190 L de água destilada, ou seja, 35,263 g/L). Após a dissolução completa do sal na água foram aferidos pH (entre 8,0 e 9,0) e temperatura (entre 23° e 28 °C) e realizada a aeração da solução por 30 minutos com uma bomba simples para garantia da eclosão e sobrevivência dos ovos de *A. salina*. A água marinha artificial foi também utilizada no preparo das soluções de DL-Vp e DF-Vp (1000, 2000, 3000, 4000 e 5000 µg/mL) e controles positivo (timol 5, 10, 20 e 25 µg/mL) e negativo (sistema solvente/diluyente). Os ovos de *A. salina* (50 mg) em água salina artificial foram incubados em estufa a 20 °C por 48 horas para a eclosão (MEYER et al., 1982). Um volume de 5 mL de cada concentração de DL-Vp e DF-Vp e dos controles foram transferidos para tubos de ensaio, e em cada tubo foram adicionadas 10 larvas de *A. salina*. Para garantir que não houve mortes ocasionadas por inanição, cada tubo recebeu 50 µL de suspensão de fermento biológico seco em água marinha (0,6 mg/mL). Após 24 horas de incubação foi realizada a contagem das larvas mortas e para o cálculo da porcentagem de morte (M%) utilizou-se a fórmula:

$$\square \% = \frac{\square \square \square \square \square \square \square \square - \square \square \square \square \square \square \square \square \square \square \square \square}{\square \square \square \square \square \square \square \square \square \square \square \square} \times 100$$

O resultado foi expresso em CL<sub>50</sub>, definida como a concentração de amostra vegetal ou controle positivo responsável por matar 50% das larvas.

## 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados de viabilidade e extravasamento celular foi realizada utilizando o *software GraphPad Prism*<sup>®</sup> (versão 5.0). Os resultados foram analisados comparando os diferentes grupos por análise de variância (ANOVA), seguido de teste de comparações múltiplas de Tukey. Foram consideradas diferenças significativas os valores de p < 0,05.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

### 5.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

Após coleta e preparo da *V. polyanthes*, as folhas e flores íntegras dessa espécie vegetal foram submetidas ao processo de extração. Essa etapa é crucial para qualquer estudo que envolva planta, pois seleciona os metabólitos vegetais de acordo com a afinidade química por solventes orgânicos de diferentes polaridades, interferindo na composição química do extrato que está sendo preparado (AZWANIDA, 2015; ZHANG; LIN; YE, 2018).

Sob esta ótica, estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa tendo *V. polyanthes* como foco de investigação indicaram que a extração com diclorometano apresentou atividades biológicas promissoras, mostrando-se a mais ativa microbiologicamente (FLORENCIO, 2017; RODRIGUES, 2013; SANTANA, 2015; TEMPONI, 2012). Florencio (2017) e Santana (2015), por meio do método de lavagem foliar de *V. polyanthes* com diclorometano, que favorece a extração de terpenoides, conseguiram isolar, purificar e caracterizar uma lactona sesquiterpênica, o glaucolídeo A. No entanto, estes autores reportaram que esse metabólito não seria o principal responsável pelo efeito antibiótico desta planta medicinal frente às cepas testadas (FLORENCIO, 2017; SANTANA, 2015). Diante disso, o procedimento de extração foi reavaliado e modificado no presente estudo para propiciar a extração das duas classes de marcadores quimiotaxonômicos desta espécie vegetal, terpenoides e flavonoides (IGUAL et al., 2013), na tentativa de esclarecer o (s) provável (is) responsável (is) pelo seu efeito antibiótico e melhor avaliar essa atividade. Assim, EL-Vp e EF-Vp foram preparados com solvente hidroetanólico 70% devido a sua facilidade de permeação na parede celular vegetal favorecendo a extração diversificada de metabólitos (SARKER; LATIF; GRAY, 2006). Após, com o intuito de separar os compostos em três grandes grupos pela diferença de polaridade, foi realizada uma partição líquido/líquido com hexano e diclorometano. Desta forma, obteve-se, a partir de EL-Vp e EF-Vp, as frações hexânicas (HL-Vp e HF-Vp), diclorometânicas (DL-Vp e DF-Vp) e remanescentes (RL-Vp e RF-Vp).

Pela análise dos resultados das massas e rendimentos (Tabela 8), observa-se que entre EL-Vp e EF-Vp, o rendimento de EF-Vp (14,17%) (a partir de 468,13 g de flores secas) foi maior que de EL-Vp (9,32%) (a partir de 984,60 g das folhas secas). Conforme mostra esta Tabela, após ressuspensão de 50,0 g de EL-Vp e EF-Vp seguida de partição líquido/líquido com solventes de polaridades crescentes foram obtidos 4,32; 3,68; 4,68 e 3,72 g de HL-Vp, DL-Vp, HF-Vp e DF-Vp, nessa ordem. Assim, entre as frações nota-se que as hexânicas (HL-Vp e HF-

Vp) apresentaram maior rendimento e as remanescentes (RL-Vp e RF-Vp) o menor. Durante o processo de secagem à temperatura ambiente (~ 25 °C), parte das frações RL-Vp e RF-Vp apresentaram crescimento fúngico provavelmente devido à elevada atividade de água dessas amostras. Por esse motivo, acreditamos que o rendimento de RL-Vp (2,42 g) e de RF-Vp (2,60 g) tenha sido subestimado, uma vez que o cálculo foi efetuado a partir de uma pequena quantidade das frações que não apresentaram contaminação.

Tabela 8 - Resultados da massa e do rendimento dos extratos e frações obtidas por partição dos extratos hidroetanólicos 70% foliar e floral de *Vernonia polyanthes*

<b>Extrato ou Fração</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
Extrato hidroetanólico 70% foliar (EL-Vp)	91,72	6,32
Extrato hidroetanólico 70% floral (EF-Vp)	66,32	14,17
Hexânica foliar (HL-Vp)	4,32	8,64
Diclorometânica foliar (DL-Vp)	3,68	7,36
Remanescente foliar (RL-Vp)	2,42	4,84
Hexânica floral (HF-Vp)	4,68	9,36
Diclorometânica floral (DF-Vp)	3,72	7,44
Remanescente floral (RF-Vp)	2,60	5,20

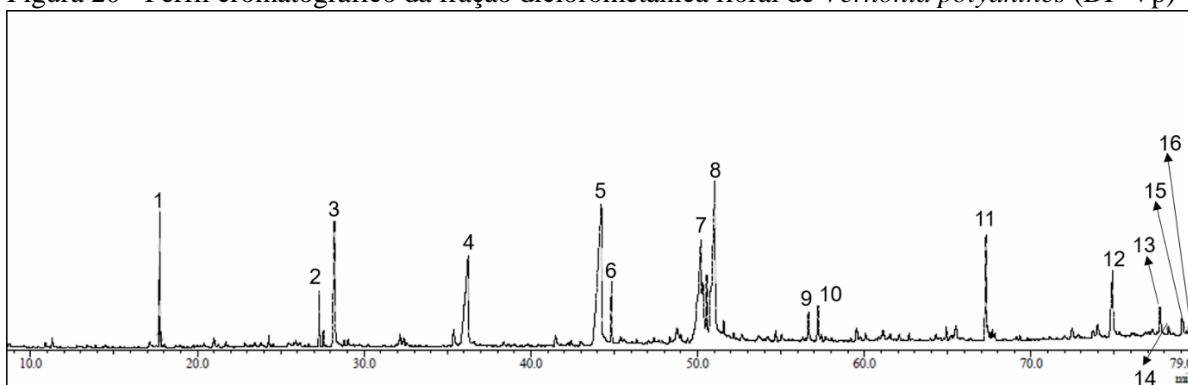
Fonte: Elaborado pela autora (2019).

## 5.2 INVESTIGAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DAS FRAÇÕES DICLOROMETÂNICAS FLORAL E FOLIAR DE *Vernonia polyanthes* POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA A ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (CG-EM)

Em virtude dos resultados microbiológicos obtidos e que serão apresentados e discutidos posteriormente, a composição química de DF-Vp e DL-Vp foi determinada por CG-EM e os seus perfis cromatográficos bem como o perfil do padrão de n-alcenos (C<sub>7</sub>-C<sub>40</sub>) estão representados nas Figuras 20, 21 e 22, respectivamente.

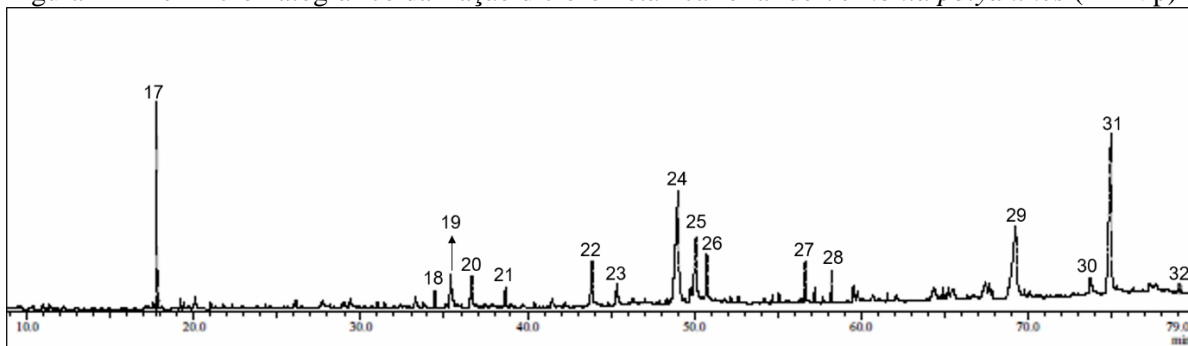
Para a identificação dos compostos detectados nestas frações foram considerados alguns parâmetros importantes como índice de retenção fornecido pelo aparelho, índice de retenção calculado em relação a n-alcenos (C<sub>7</sub>-C<sub>40</sub>), espectro de massas fornecido pelo equipamento, relação massa/carga (*m/z*), pico base e comparação desses dados com aqueles da NIST 11 e descritos na literatura e bibliotecas espectrais para cada composto.

Figura 20 - Perfil cromatográfico da fração diclorometânica floral de *Vernonia polyanthes* (DF-Vp)



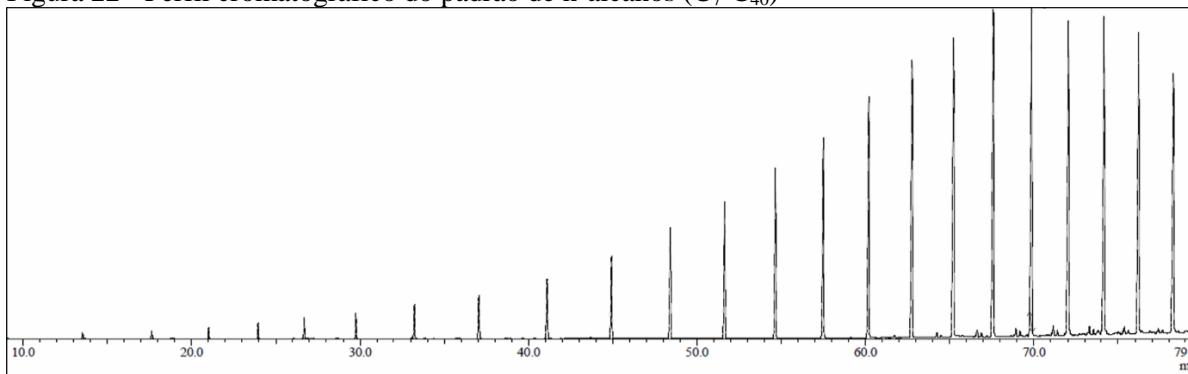
Fonte: *Software GCMS Solution* (2019).

Figura 21 - Perfil cromatográfico da fração diclorometânica foliar de *Vernonia polyanthes* (DL-Vp)



Fonte: *Software GCMS Solution* (2019).

Figura 22 - Perfil cromatográfico do padrão de n-alcenos (C<sub>7</sub>-C<sub>40</sub>)



Fonte: *Software GCMS Solution* (2019).

Pela análise das Figuras 20 e 21, observa-se um total de 32 picos gerados nos perfis cromatográficos de DF-Vp e DL-Vp, sendo que 27 deles puderam ser identificados conforme mostram as Tabelas 9 e 10.

Tabela 9 - Características da fração diclorometânica floral de *Vernonia polyanthes* (DF-Vp) analisadas por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM)

No.	Nome do Composto	Fórmula	CAS	T <sub>R</sub> (min)	m/z <sup>a</sup>	IR <sub>exp</sub>	IR <sub>lit</sub>	Referência
1	Estragol	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O	140-67-0	17,750	148; 121; 77	1202	1196	ADAMS, 2007
2	2,4-di-tert-butifenol	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O	96-76-4	27,305	191; 57; 206	1520	1502	TIRILLINI et al., 2000
3	Álcool homovanilil	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	2380-78-1	28,218	137; 168; 122	1549	1534	DE SIMÓN et al., 2009
4	Ácido mirístico	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	544-63-8	36,237	73; 60; 43	1779	1780	PINO et al., 2005
5	Ácido palmítico	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	57-10-3	44,215	73; 43; 60	1981	1984	PRIESTAP et al., 2003
6	Etil éster do ácido palmítico	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	628-97-7	44,848	88; 101; 43	1998	1991	PINO et al., 2005
7	Ácido oleico	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	112-80-1	50,201	55; 69; 41	2155	2141	PINO et al., 2005
8	Ácido esteárico	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	57-11-4	51,038	73; 43; 57	2181	2172	PINO et al., 2005
9	Oleamida	C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> NO	301-02-0	56,660	59; 72; 55	2370	2375	ZHAO et al., 2008
10	Não identificado	-	-	57,236	69; 41; 43	2390	-	-
11	Oleamida	C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> NO	301-02-0	56,660	59; 72; 55	2398	2397	PUBCHEM, 2019
12	Piloin	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	32174-62-2	74,887	314; 285; 315	2935	2791	CHEMSPIDER, 2019
13	Estigmasterol	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O	83-48-7	77,734	55; 83; 69	3273	3205	IVANOV et al., 2018
14	Beta-amirina	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O	559-70-6	78,278	218; 203; 69	3300	3313	COLLIN, 2016
15	Beta-sitosterol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	83-46-5	79,068	43; 107; 95	3416	3408	ALBERTS et al., 1992
16	Acetato de lupeol	C <sub>32</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub>	1617-68-1	79,567	95; 107; 109	3357	3320	IVANOV et al., 2018

T<sub>R</sub>: tempo de retenção; IR<sub>exp</sub>: índice de retenção determinado em relação a n-alcanos (C<sub>7</sub>-C<sub>40</sub>) em coluna Rtx-5MS; IR<sub>lit</sub>: índice de retenção descrito na literatura em coluna idêntica ou similar a Rtx-5MS; <sup>a</sup>A primeira relação m/z é o pico base. Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Tabela 10 - Características da fração diclorometânica foliar de *Vernonia polyanthes* (DL-Vp) analisadas por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM)

No.	Nome do Composto	Fórmula	CAS	T <sub>R</sub> (min)	m/z <sup>a</sup>	IR <sub>exp</sub>	IR <sub>lit</sub>	Referência
17	Estragol	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O	140-67-0	17,766	148; 121; 77	1202	1196	ADAMS, 2007
18	Espatulenol	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	77171-55-2	34,445	43; 41; 91	1631	1640	SOTOMAYOR et al., 2004
19	Álcool E-conferil	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	-	35,405	137; 180; 124	1756	1745	LALEL; SINGH; TAN, 2003
20	Não identificado	-	-	36,656	43; 111; 41	1789	-	-
21	Não identificado	-	-	38,677	68; 42; 95	1840	-	-
22	Ácido palmítico	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	57-10-3	43,885	73; 43; 60	1972	1984	PRIESTAP et al., 2003
23	Não identificado	-	-	45,365	210; 167; 77	2013	-	-
24	Não identificado	-	-	49,035	163; 208; 136	2119	-	-
25	Ácido linolênico	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	463-40-1	50,105	79; 67; 41	2152	2158	PUBCHEM, 2019
26	Ácido esteárico	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	57-11-4	50,772	73; 43; 57	2173	2172	PINO et al., 2005
27	Oleamida	C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> NO	301-02-0	56,667	59; 72; 55	2371	2375	ZHAO et al., 2008
28	Tri(2-butoxietil)fosfato	C <sub>18</sub> H <sub>39</sub> O <sub>7</sub> P	78-51-3	58,251	57; 45; 85	2427	2421	PUBCHEM, 2019
29	Piloin	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	32174-62-2	69,288	314; 285; 315	2941	2791	CHEMSPIDER, 2019
30	Apigenina 7-metil éter	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	437-64-9	73,765	284; 255; 285	2602	2964	PUBCHEM, 2019
31	Piloin	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	32174-62-2	74,887	314; 285; 315	2941	2791	CHEMSPIDER, 2019
32	Beta-sitosterol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	83-46-5	79,071	43; 107; 95	3418	3408	ALBERTS et al., 1992

T<sub>R</sub>: tempo de retenção; IR<sub>exp</sub>: índice de retenção determinado em relação a n-alcanos (C<sub>7</sub>-C<sub>40</sub>) em coluna Rtx-5MS; IR<sub>lit</sub>: índice de retenção descrito na literatura em coluna idêntica ou similar a Rtx-5MS; <sup>a</sup>A primeira relação m/z é o pico base. Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Conforme mostra esta Tabela, em ambas as frações o componente majoritário foi o estragol ou metilchavicol (picos nº 1 e nº 17 nas Figuras 20 e 21, nessa ordem). Lopez e colaboradores (2011) já haviam relatado a presença desse fenilpropanoide no óleo essencial de *Tagetes filifolia*, uma espécie também pertencente à família Asteraceae. Adicionalmente, foram detectados cinco ácidos graxos em DF-Vp (ácidos mirístico, palmítico, etil éster do ácido palmítico, oleico e esteárico) e três em DL-Vp (ácidos palmítico, linolênico e esteárico). Semelhante a este estudo, a monografia dessa espécie vegetal elaborada pelo Ministério da Saúde e ANVISA reportou que "o ácido graxo de maior abundância em todos os farmacógenos foi o hexadecanoico (ácido palmítico), sendo encontrado em maior abundância nas folhas e flores" (BRASIL, 2014), corroborando nossos achados. Bohlmann e colaboradores (1981) identificaram estigmasterol e acetato de lupeol nas partes aéreas de *V. polyanthes*, estando em consonância com o presente estudo que as detectou nas flores. Zanon e colaboradores (2008), por fracionamento cromatográfico em diclorometano a partir do extrato etanólico das folhas de *Vernonia tweediana* Baker, isolaram os compostos alfa-amirina, beta-amirina, lupeol, beta-sitosterol, estigmasterol e espinasterol. No presente estudo, considerando a similaridade do gênero e também do solvente utilizado no fracionamento, foi possível detectar beta-amirina nas flores e beta-sitosterol nas folhas e flores. Benfatti e colaboradores (2007) identificaram a presença de beta-amirina nas folhas de *V. polyanthes*. No entanto, esses autores descreveram alfa e beta-amirina presentes em mistura no extrato clorofórmico das folhas da planta. Igual e colaboradores (2013) e Martucci e Gobbo-Neto (2016), a partir de um extrato metanólico das folhas de *V. polyanthes*, isolaram por HPLC (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*) e identificaram os flavonoides apigenina e apigenina-7-O-glicuronídeo, respectivamente. Ao analisar por CG-EM a fração DL-Vp detectou-se a presença de apigenina 7-metil éter. Outro flavonoide identificado em DL-Vp e DF-Vp foi o pilloin, uma flavona que já havia sido relatada em plantas da família Asteraceae (SCHMIDT; WILLUHN, 2000). Quanto a classe dos sesquiterpenos, o espatulenol se manteve nas folhas secas mesmo após a preparação da fração diclorometânica e, anteriormente, só havia sido descrito no óleo essencial extraído de folhas frescas (DA SILVA et al., 2015).

### 5.3 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO ANTIBIÓTICO *in vitro* DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Vernonia polyanthes*

#### 531 Determinação da Concentração Inibitória Mínima, da Concentração Bactericida Mínima e classificação do efeito antibiótico como bactericida ou bacteriostático

Após coleta e preparo do material vegetal seguidos do processo de extração e fracionamento, o presente estudo foi conduzido de forma bioguiada utilizando o efeito antibiótico *in vitro* como atividade biológica marcadora. EF-Vp, EL-Vp, HL-Vp, HF-Vp, DL-Vp, DF-Vp, RL-Vp e RF-Vp foram investigados frente à *S. aureus* (ATCC<sup>®</sup> 6538<sup>™</sup>, ATCC<sup>®</sup> 25923<sup>™</sup> e ATCC<sup>®</sup> 29213<sup>™</sup>), *E. coli* (ATCC<sup>®</sup> 10536<sup>™</sup> e ATCC<sup>®</sup> 25922<sup>™</sup>), *S. Choleraesuis* (ATCC<sup>®</sup> 10708<sup>™</sup>), *S. Typhimurium* (ATCC<sup>®</sup> 13311<sup>™</sup>) e *P. aeruginosa* (ATCC<sup>®</sup> 9027<sup>™</sup> e ATCC<sup>®</sup> 27853<sup>™</sup>). Nesta etapa de triagem do potencial antibiótico e com base nos valores de CIM obtidos (Tabela 11) verificou-se que, entre os extratos e frações analisadas, DL-Vp e DF-Vp foram as mais ativas frente as cepas testadas. Conforme também se observa na Tabela 11, não foi possível determinar a CBM para todos os extratos e frações em função do gradiente de concentração estabelecido (5000 µg/mL). Vale ressaltar que DL-Vp e DF-Vp revelaram CBM variando de 1250 a 2500 µg/mL, sendo que DL-Vp foi bactericida para *S. aureus* (ATCC<sup>®</sup> 6538<sup>™</sup>) e *P. aeruginosa* (ATCC<sup>®</sup> 9027<sup>™</sup>) e DF-Vp somente para essa segunda cepa, sendo o efeito para ambas as frações frente as demais cepas testadas classificado como bacteriostático. Em recente artigo de revisão, Santos e colaboradores (2019) descreveram que alguns estudos demonstraram a atividade bactericida de extratos de plantas contra *Salmonella*. A maioria destes estudos mostrou CBM até quatro vezes maior que a CIM, com valores variando de 0,8 mg/mL para o extrato aquoso das folhas de *Shorea robusta* contra *S. Typhi* a 25,0 mg/mL para extratos aquosos de frutas de *Vaccinium oxycoccos* contra *S. Enteritidis*, demonstrando a eficácia de alguns extratos vegetais em inibir o crescimento bacteriano em vez de matá-los. Esses resultados são semelhantes aos que obtivemos com as cepas de *Salmonella* testadas, com valores de CIM variando de 0,625 mg/mL a > 5 mg/mL e efeito bacteriostático (Tabelas 11 e 12).

Após uma extensa revisão da literatura, foram encontradas poucas publicações a respeito do efeito antibiótico de *V. polyanthes*. Oliveira e colaboradores (2007) descreveram a atividade antimicobacteriana do extrato hidroalcoólico da raiz desta espécie usado como bebida pela comunidade indígena Vanuüre. Jorgetto e colaboradores (2011) relataram o efeito bacteriostático do extrato hidroalcoólico das folhas desta planta frente a *Bacillus cereus*

(ATCC<sup>®</sup> 11778<sup>TM</sup>), *Escherichia coli* (ATCC<sup>®</sup> 8739<sup>TM</sup>) e *Proteus mirabilis* (ATCC<sup>®</sup> 25933<sup>TM</sup>). Silva e colaboradores (2012) demonstraram que o extrato metanólico e o óleo essencial de *V. polyanthes* foram ativos frente à *S. aureus* e *E. coli*. Waltrich e colaboradores (2015) avaliaram o efeito dos extratos aquoso e metanólico e das frações hexânica, diclorometânica e em acetato de etila de flores de *V. polyanthes* frente à *E. coli* (ATCC<sup>®</sup> 25922<sup>TM</sup>), *S. aureus* (ATCC<sup>®</sup> 25923<sup>TM</sup>) e *P. aeruginosa* (ATCC<sup>®</sup> 27853<sup>TM</sup>). Porém, estes artigos descreveram os valores de CIM frente à essas cepas e nenhum deles abordou o efeito antibiótico sobre *Salmonella*, principalmente com a inclusão de cepas clínicas. Ainda, não foram localizadas publicações sobre a determinação do efeito combinatório de extratos ou frações ou o estabelecimento do provável modo de ação envolvido. Quanto aos valores de CIM, Santos e colaboradores (2019) reportaram que extratos aquosos têm mostrado efeito antibiótico em concentrações de poucos µg/mL a mg/mL (0,5 µg/mL a 712 mg/mL), dependendo da sorovariedade de *Salmonella* testada, da parte da planta utilizada e das espécies vegetais investigadas. Esses autores também não localizaram nenhuma publicação sobre *V. polyanthes* e sua atividade antibacteriana sobre *Salmonella*, demonstrando o ineditismo de nosso estudo.



Tabela 11 - Valores da Concentração Inibitória Mínima dos extratos e frações de *Vernonia polyanthes* e dos antibióticos frente às cepas de referência ATCC® testadas

Cepa bacteriana	Concentração Inibitória Mínima (CIM) (µg/mL)									
	Extratos e frações de <i>Vernonia polyanthes</i>								Antibiótico	
	EL-VP	HL-VP	DL-VP	RL-VP	EF-VP	HF-VP	DF-VP	RF-VP	AMP*	CHL*
<i>S. aureus</i> (ATCC® 6538™)	> 5000	5000 <sup>2</sup>	2500 <sup>1</sup>	> 5000	5000 <sup>2</sup>	2500 <sup>2</sup>	625 <sup>2</sup>	> 5000	< 4	8
<i>S. aureus</i> (ATCC® 29213™)	5000 <sup>1</sup>	5000 <sup>2</sup>	1250 <sup>2</sup>	> 5000	> 5000	2500 <sup>2</sup>	1250 <sup>2</sup>	> 5000	< 4 <sup>a</sup>	16 <sup>b</sup>
<i>S. aureus</i> (ATCC® 25923™)	5000 <sup>2</sup>	5000 <sup>2</sup>	1250 <sup>2</sup>	> 5000	> 5000	2500 <sup>2</sup>	1250 <sup>2</sup>	> 5000	< 4	16
<i>E. coli</i> (ATCC® 10536™)	> 5000	5000 <sup>2</sup>	625 <sup>2</sup>	> 5000	> 5000	5000 <sup>2</sup>	1250 <sup>2</sup>	> 5000	< 4	< 4
<i>E. coli</i> (ATCC® 25922™)	> 5000	1250 <sup>1</sup>	625 <sup>2</sup>	> 5000	> 5000	> 5000	625 <sup>2</sup>	> 5000	< 4 <sup>c</sup>	< 4 <sup>c</sup>
<i>S. Choleraesuis</i> (ATCC® 10708™)	> 5000	2500 <sup>2</sup>	625 <sup>2</sup>	> 5000	> 5000	> 5000	1250 <sup>2</sup>	> 5000	< 4	< 4
<i>S. Typhimurium</i> (ATCC® 13311™)	> 5000	2500 <sup>2</sup>	625 <sup>2</sup>	> 5000	> 5000	> 5000	1250 <sup>2</sup>	> 5000	< 4	< 4
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC® 9027™)	5000 <sup>1</sup>	2500 <sup>1</sup>	1250 <sup>1</sup>	> 5000	> 5000	5000 <sup>1</sup>	2500 <sup>1</sup>	> 5000	> 500	8
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC® 27853™)	> 5000	5000 <sup>2</sup>	2500 <sup>2</sup>	> 5000	> 5000	> 5000	2500 <sup>2</sup>	> 5000	> 500 <sup>d</sup>	8 <sup>d</sup>

> 5000 = valores de CIM acima da maior concentração testada; \*Os valores de CIM obtidos com AMP e CHL estão de acordo com os intervalos de controle de qualidade reportados para organismos não fastidiosos pelo CLSI (2014), conforme documento M100-S24: (a) 0,5 - 2 µg/mL; (b) 2 - 16 µg/mL; (c) 2 - 8 µg/mL; (d) não reportado; 1 = efeito bactericida; 2 = efeito bacteriostático; a cor azul destaca as amostras que revelaram efeito bactericida. Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Com base nestes resultados, DL-Vp e DF-Vp foram selecionadas para a caracterização química e para o aprofundamento dos ensaios microbiológicos, visto que se mostraram as mais promissoras para o estudo do efeito antibiótico de *V. polyanthes*. Adicionalmente, a triagem do potencial antibiótico destas frações mostrou que elas foram capazes de inibir tanto cepas Gram-positivas quanto Gram-negativas, inclusive com atividade antibacteriana moderada (625 µg/mL) conforme classificação de Kuate (2010) sobre várias delas. Segundo este autor, a atividade antibacteriana de extratos de plantas pode ser classificada como significativa (CIM < 100 µg/mL), moderada (100 < CIM ≤ 625 µg/mL) ou fraca (CIM > 625 µg/mL) (KUETE, 2010).

Assim, considerando-se que: 1) *V. polyanthes* é uma planta medicinal tradicionalmente utilizada no tratamento de distúrbios gastrointestinais (BRAGA, 1976); 2) as diarreias infecciosas mais graves são causadas predominantemente por bactérias e, entre elas, os casos de salmonelose não tifoidal são globalmente difundidos (PETROV et al., 2017). Ainda, cepas de *Salmonella* não tifoidal resistentes a fluoroquinolona foram responsáveis pela maioria das mortes por intoxicação gastrointestinal (*foodborne diseases*) causadas por agente bacteriano em 2010 em nível global (WHO, 2017c); 3) a OMS enfatiza a necessidade da pesquisa, descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos contra bactérias comunitárias comuns e classifica *Salmonella* spp. resistente a fluoroquinolona como um patógeno de alta prioridade (WHO, 2017c); 4) *V. polyanthes* ou assa-peixe é uma planta alimentícia não convencional (PANC) (KINUPP, 2007), e especula-se que o consumo de suas folhas poderia contribuir positivamente na prevenção de intoxicação gastrointestinal; e 5) DL-Vp e DF-Vp foram ativas frente à *S. Choleraesuis* (ATCC® 10708™) e à *S. Typhimurium* (ATCC® 13311™), foram adicionadas cepas clínicas de *Salmonella* (*Salmonella* spp. 1553217, *Salmonella* spp. 1507708, *Salmonella* spp. 1502596, *S. Enteritidis* 1428260 e *Salmonella* spp. 1266695) para o aprofundamento do presente estudo (Tabela 12).

Tabela 12 - Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das frações diclorometânicas foliar (DL-Vp) e floral (DF-Vp) de *Vernonia polyanthes* e de ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL) e levofloxacino (LEVO) frente às cepas clínicas de *Salmonella* testadas

Cepa Bacteriana	CIM (µg/mL)				
	DL-VP	DF-VP	AMP	CHL	LEVO
<i>Salmonella</i> spp. 1553217	<b>1250<sup>2</sup></b>	> 5000	< 4	< 4	< 4
<i>Salmonella</i> spp. 1507708	<b>1250<sup>2</sup></b>	<b>2500<sup>2</sup></b>	> 500	8	8
<i>Salmonella</i> spp. 1502596	<b>625<sup>2</sup></b>	<b>625<sup>2</sup></b>	< 4	< 4	< 4
<i>Salmonella</i> Enteritidis 1428260	<b>1250<sup>2</sup></b>	<b>1250<sup>2</sup></b>	< 4	< 4	< 4
<i>Salmonella</i> spp. 1266695	<b>625<sup>2</sup></b>	<b>2500<sup>2</sup></b>	< 4	< 4	< 4

2 = efeito bacteriostático.

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Conforme apresenta a Tabela 12, com exceção do resultado obtido com DF-Vp frente à *Salmonella* spp. 1553217, DL-Vp e DF-Vp foram capazes de inibir o crescimento bacteriano das cepas clínicas testadas com valores de CIM variando de 625 (atividade moderada) a 2500 µg/mL (atividade fraca), e efeito bacteriostático. Vale lembrar que estas cepas foram isoladas principalmente de infecções sanguíneas de pacientes atendidos no HUCFF/UFRJ, e que os resultados dos TSA fornecidos pelo sistema VITEK<sup>®</sup>2 (ANEXOS A e B) demonstraram poucas opções terapêuticas para condução desses casos, o que corrobora a relevância dos nossos achados. Assim, optou-se por avançar nas investigações microbiológicas utilizando-se a cepa clínica *Salmonella* spp. 1507708 por apresentar o perfil mais resistente pelo TSA em relação às demais, apesar da fraca atividade obtida com DL-Vp e DF-Vp, e a *S. Enteritidis* 1428260, que revelou maior sensibilidade nesse mesmo teste.

### 532 Avaliação do efeito combinatório

Com o intuito de verificar se a combinação de DL-Vp ou DF-Vp potencializaria a ação antibiótica de AMP, CHL ou LEVO por meio da redução dos valores de CIM dessas substâncias, procedeu-se à avaliação do efeito combinatório entre essas frações e ANTs frente às cepas *S. Choleraesuis* (ATCC<sup>®</sup> 10708<sup>TM</sup>), *S. Typhimurium* (ATCC<sup>®</sup> 13311<sup>TM</sup>), *S. Enteritidis*

1428260 e *Salmonella* spp. 1507708. A partir do cálculo do IRD e dos parâmetros estabelecidos por Odds (2003) foi possível determinar se havia uma relação de sinergismo, antagonismo ou ausência de interação entre as frações e os ANTs.

As Tabelas 13 e 14 apresentam os resultados obtidos neste ensaio. Pela análise dessas Tabelas, podemos observar que os resultados demonstram sinergismo entre DL-Vp e DF-Vp com CHL para *S. Typhimurium* (ATCC® 13311™), *S. Choleraesuis* (ATCC® 10708™) e *S. Enteritidis* 1428260. Ainda, DL-Vp e DF-Vp mostraram-se sinérgicas quando combinadas com AMP e LEVO frente a *Salmonella* spp. 1507708.

De acordo com Reda, El-Zawahry e Omar (2017), os sinergismos resultantes da combinação de extratos vegetais com ANTs comerciais reduzem os efeitos colaterais, o custo e as CIMs de ambos. Conforme se observa pelos resultados obtidos no presente estudo, houve uma redução de 10x a CIM do CHL (de 2,0 para 0,2 µg/mL quando combinado com DL-Vp ou DF-Vp), de 16x da AMP (de 2000 para 125 µg/mL) e de 4x da LEVO (de 4 para 1 µg/mL). Dadas as devidas proporções, efeito semelhante foi observado com extrato de folhas secas de *Camellia sinensis* (chá verde) (Theaceae) (0,62 mg/mL) combinado com ácido nalidíxico, que sofreu uma redução de 8x (de 256 para 32 µg/mL) (FAROOQUI et al., 2015). Anteriormente, Wagner (2011) havia reportado que, a partir dos dados *in vitro* e *in vivo* disponíveis, poderia se concluir que o progresso na pesquisa do sinergismo forneceria não somente nova legitimação para a fitoterapia, mas também aumentaria a possibilidade do uso de novos fitomedicamentos sozinhos ou combinados com quimioterápicos para o tratamento de doenças que foram tratadas anteriormente apenas através de quimioterapia.

Tabela 13- Resultados do efeito combinatório das frações diclorometânicas floral (DF-Vp) e foliar (DL-Vp) com ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL) e levofloxacino (LEVO) frente às cepas ATCC® testadas

Cepa Bacteriana	Fração Diclorometânica/ Antibiótico	CIM (µg/mL)		IRD	Efeito Combinatório
		Sozinho	Combinado		
<i>S. Typhimurium</i> (ATCC® 13311™)	DL-VP	625	78	1,12	Sem efeito
	AMP	0,2	0,2		
	DL-VP	625	10	0,22	<b>Sinergismo</b>
	CHL	2,0	0,2		
	DL-VP	625	10	1,12	Sem efeito
	LEVO	0,2	0,2		
	DF-VP	625	78		
	AMP	0,2	0,2	1,12	Sem efeito
	DF-VP	625	78	0,22	<b>Sinergismo</b>
	CHL	2,0	0,2		
	DF-VP	625	10	1,12	Sem efeito
	LEVO	0,2	0,2		
<i>S. Choleraesuis</i> (ATCC® 10708™)	DL-VP	625	78	1,12	Sem efeito
	AMP	0,2	0,2		
	DL-VP	625	10	0,17	<b>Sinergismo</b>
	CHL	4,0	0,2		
	DL-VP	625	78	1,12	Sem efeito
	LEVO	0,2	0,2		
	DF-VP	625	78		
	AMP	0,2	0,2	1,12	Sem efeito
	DF-VP	625	10	0,22	<b>Sinergismo</b>
	CHL	2,0	0,2		
	DF-VP	625	10	1,12	Sem efeito
	LEVO	0,2	0,2		

CIM = Concentração Inibitória Mínima.

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Tabela 14 - Resultados do efeito combinatório das frações diclorometânicas floral (DF-Vp) e foliar (DL-Vp) com ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL) e levofloxacino (LEVO) frente às cepas clínicas testadas

Cepa Bacteriana	Fração Diclorometânica/ Antibiótico	CIM (µg/mL)		IRD	Efeito Combinatório
		Sozinho	Combinado		
<i>Salmonella</i> Enteritidis 1428260	DL-VP	1250	156	1,12	Sem efeito
	AMP	0,2	0,2		
	DL-VP	1250	156	0,22	<b>Sinergismo</b>
	CHL	2,0	0,2		
	DL-VP	1250	156	1,12	Sem efeito
	LEVO	0,2	0,2		
	DF-VP	1250	156	1,12	Sem efeito
	AMP	0,2	0,2		
	DF-VP	1250	156	0,22	<b>Sinergismo</b>
	CHL	2,0	0,2		
	DF-VP	1250	156	1,12	Sem efeito
	LEVO	0,2	0,2		
<i>Salmonella</i> spp. 1507708	DL-VP	1250	156	0,19	<b>Sinergismo</b>
	AMP	2000	125		
	DL-VP	1250	1250	2	Sem efeito
	CHL	1,0	1,0		
	DL-VP	1250	156	0,37	<b>Sinergismo</b>
	LEVO	4,0	1,0		
	DF-VP	2500	156	0,31	<b>Sinergismo</b>
	AMP	2000	125		
	DF-VP	2500	156	1,12	Sem efeito
	CHL	1,0	1,0		
	DF-VP	2500	156	0,37	<b>Sinergismo</b>
	LEVO	4,0	1,0		

CIM = Concentração Inibitória Mínima.

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

### 533 Determinação do tempo de morte bacteriana

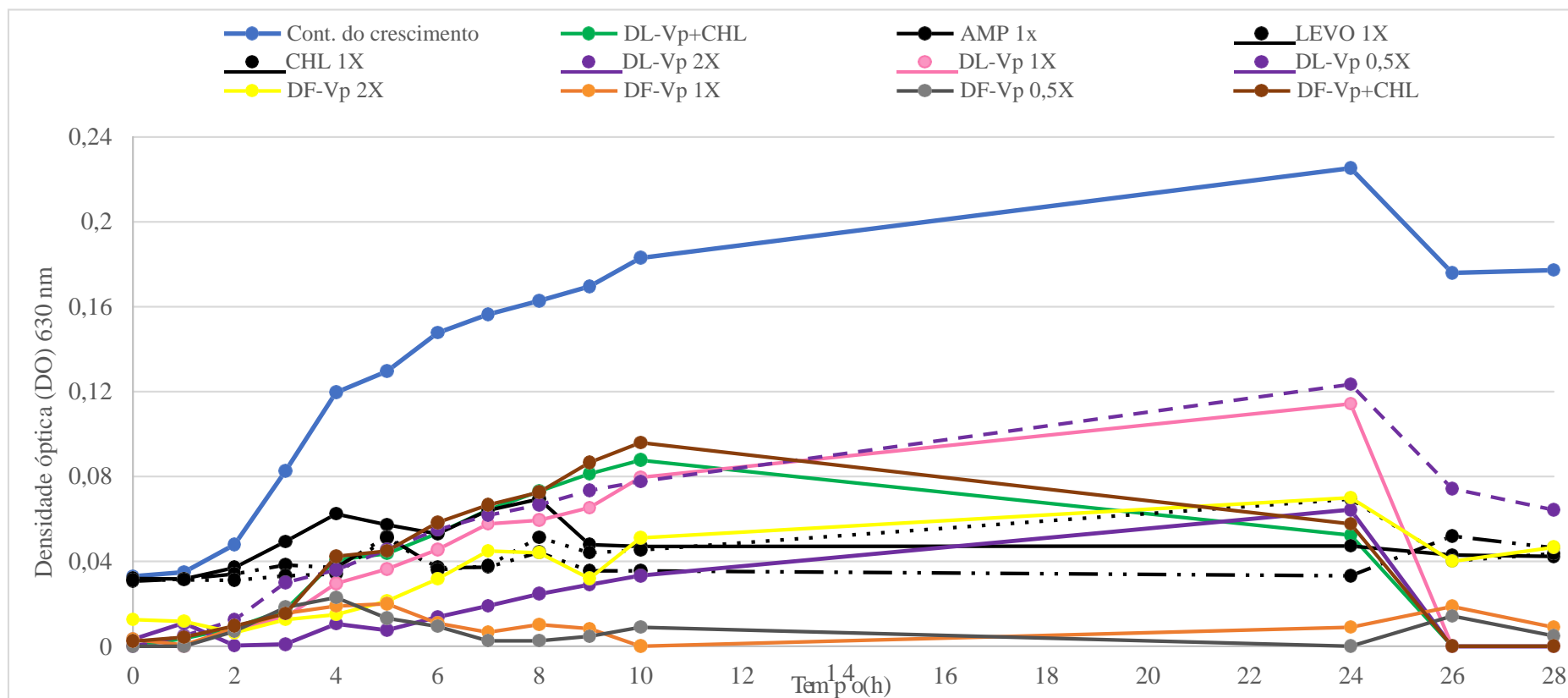
Para a avaliação da capacidade de DL-Vp e DF-Vp reduzirem, *in vitro*, a densidade populacional de *S. Choleraesuis* (ATCC® 10708™), *S. Typhimurium* (ATCC® 13311™), *S. Enteritidis* 1428260 e *Salmonella* spp. 1507708 expostas a essas frações em intervalos de tempo pré-estabelecidos, foi realizado o ensaio da determinação do tempo de morte bacteriana (Figuras 23, 24, 25 e 26).

Considerando as cepas ATCC®, conforme mostra a Figura 23, DL-Vp 0,5x, 1x e 2x CIM, DF-Vp 0,5x, 1x e 2x CIM, AMP 1x CIM, CHL 1x CIM, LEVO 1x CIM, DL-VP + CHL

e DF-Vp + CHL foram capazes de reduzir a densidade populacional de *S. Typhimurium* (ATCC® 13311™), em maior ou menor intensidade, sendo que DF-Vp 0,5x e 1x CIM mostraram-se mais eficientes, sendo mais ativas do que os ANTs testados. Foi detectado efeito bactericida com DL-Vp 1x CIM, DL-Vp 2x CIM, DF-Vp + CHL e DL-Vp + CHL após 26 horas de observação. Pela análise desta Figura observa-se, ainda, a) a redução da população bacteriana na dependência da CIM da fração utilizada; b) a eficiência de DF-Vp em relação às demais amostras testadas; e c) a comprovação do efeito sinérgico de DF-Vp + CHL e DL-Vp + CHL. A Figura 24 apresenta os resultados obtidos com *S. Choleraesuis* (ATCC® 10708™) quando exposta às mesmas condições. Pela observação do gráfico podemos verificar que, dadas as devidas proporções, os dados são similares, demonstrando a eficiência das frações e combinações em relação aos ANTs testados contra essa cepa e a habilidade de DL-Vp 1x e 2x em inviabilizar esse patógeno em 26 horas de observação.

Em relação às cepas clínicas, a Figura 25 mostra os resultados obtidos com *S. Enteritidis* 1428260 quando exposta à DL-Vp 0,5x, 1x e 2x CIM, DF-Vp 0,5x, 1x e 2x CIM, AMP 1x CIM, CHL 1x CIM, LEVO 1x CIM, DL-Vp + CHL e DF-Vp + CHL. Pela análise desta Figura, nota-se que houve redução da densidade populacional quando esta cepa foi exposta a todas as amostras testadas. Porém, após 24 horas de observação, com exceção de DL-Vp 1x e 2x CIM que promoveram uma redução mais drástica da população após 24 horas, as demais amostras não mantiveram seu efeito, visualizando-se uma tendência a nova multiplicação celular, inclusive na presença de AMP e CHL, excetuando-se LEVO. Vale lembrar que *S. Enteritidis* 1428260 mostrou-se sensível à ciprofloxacina e ampicilina pelo TSA (ANEXO B; pág. 118). Quando as frações, ANTs e combinações foram testadas frente à *Salmonella* spp. 1507708 (Figura 26), observou-se que todas as amostras foram capazes de reduzir a densidade populacional dessa cepa, sendo que as frações e combinações se mostraram mais eficientes que os ANTs. Ainda, DL-Vp 1x e 2x CIM foi capaz de inviabilizar este patógeno em 28 horas de observação. Chimnoi e colaboradores (2018) descreveram CIM de 2 mg/mL para o óleo essencial das folhas de *Ocimum gratissimum* (OGEO) contra *S. Typhimurium* (ATCC® 13311™), e por meio das curvas do tempo de morte, demonstraram que *S. Typhimurium* foram mortas em quatro, duas e duas horas após exposição à 1x CIM, 2x CIM e 4x CIM do OGEO.

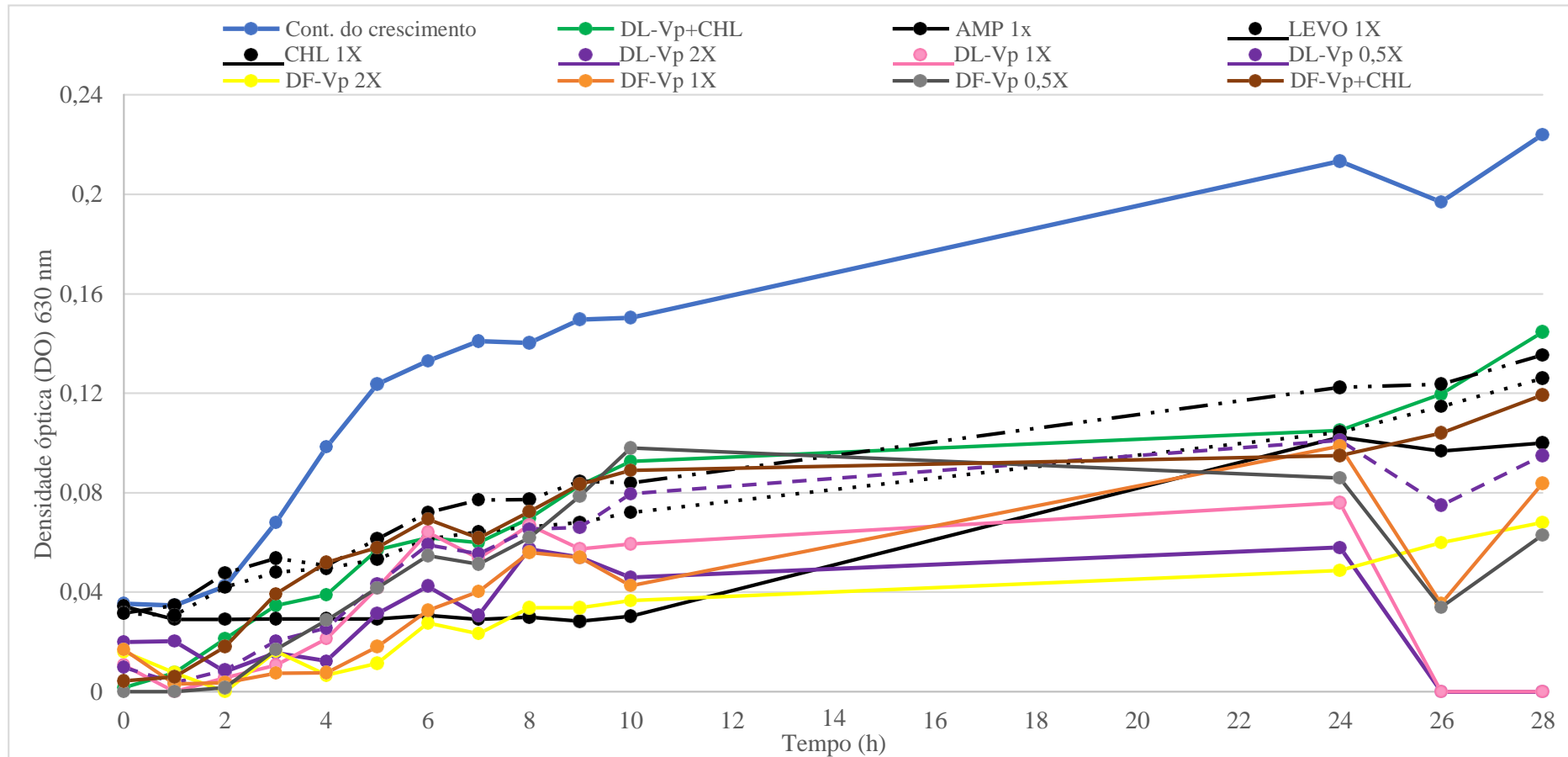
Figura 23 - Curva do tempo de morte da *Salmonella Typhimurium* (ATCC® 13311™) na presença das frações diclorometânicas floral (DF-Vp) e foliar (DL-Vp), ampilicilina (AMP), cloranfenicol (CHL), levofloxacino (LEVO) e combinações das frações com cloranfenicol (DL-Vp/DF-Vp + CHL)



Cont. do crescimento = controle do crescimento; 2X = 2x CIM da fração; 1X = 1x CIM da fração ou antibiótico; 0,5X = 0,5x CIM da fração; DL-Vp + CHL / DF-Vp + CHL = CIM do sinergismo da fração com antibiótico. Fonte: Elaborado pela autora (2019).

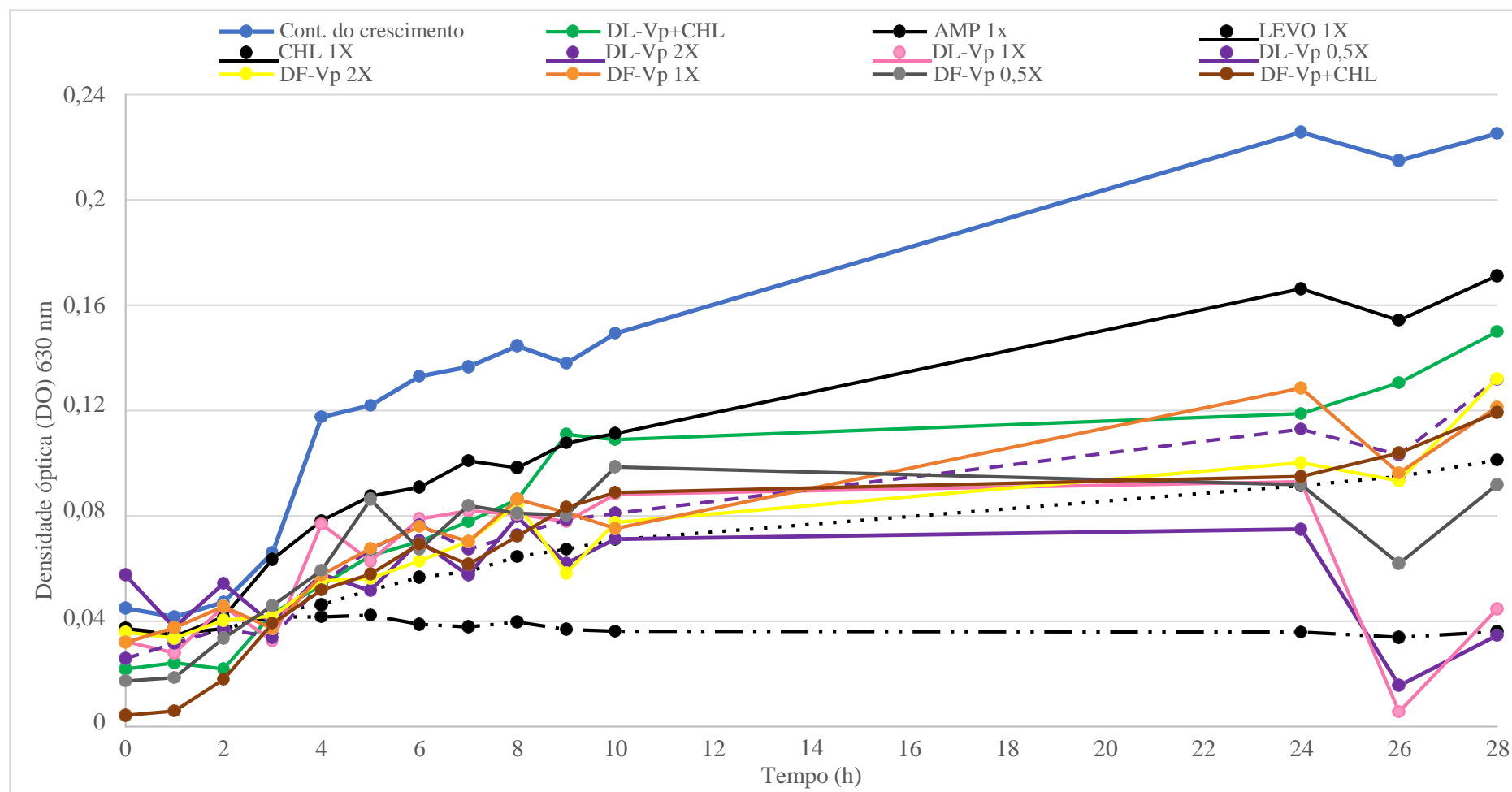


Figura 24 - Curva do tempo de morte da *Salmonella Choleraesuis* (ATCC® 10708™) na presença das frações diclorometânicas floral (DF-Vp) e foliar (DL-Vp), ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL), levofloxacino (LEVO) e combinações das frações com cloranfenicol (DL-Vp/DF-Vp + CHL)



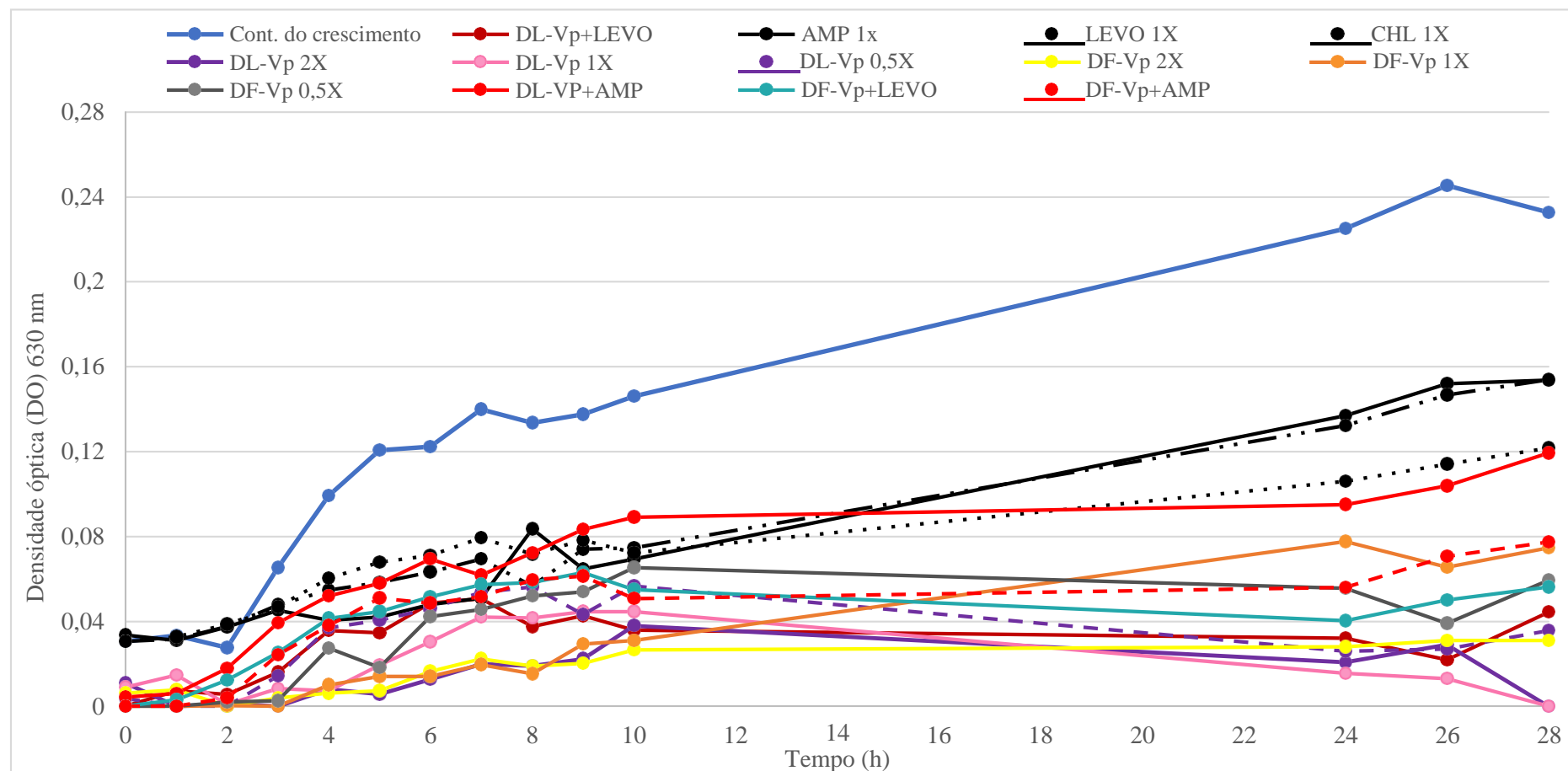
Cont. do crescimento = controle do crescimento; 2X = 2x CIM da fração; 1X = 1x CIM da fração ou antibiótico; 0,5X = 0,5x CIM da fração; DL-Vp + CHL / DF-Vp + CHL = CIM do sinergismo da fração com antibiótico. Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Figura 25 - Curva do tempo de morte da *Salmonella* Enteritidis 1428260 na presença das frações diclorometânicas floral (DF-Vp) e foliar (DL-Vp), ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL), levofloxacino (LEVO) e combinações das frações com cloranfenicol (DL-Vp/DF-Vp + CHL)



Cont. do crescimento=controle do crescimento; 2X = 2x CIM da fração; 1X = 1x CIM da fração ou antibiótico; 0,5X = 0,5x CIM da fração; DL-Vp + CHL / DF-Vp + CHL = CIM do sinergismo da fração com antibiótico. Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Figura 26 - Curva do tempo de morte da *Salmonella* spp. 1507708 na presença das frações diclorometânicas floral (DF-Vp) e foliar (DL-Vp), ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL), levofloxacino (LEVO) e combinações das frações com ampicilina e levofloxacino (DL-Vp/DF-Vp + AMP e DL-Vp/DF-Vp + LEVO)



Cont. do crescimento = controle do crescimento; 2X = 2x CIM da fração; 1X = 1x CIM da fração ou antibiótico; 0,5X = 0,5x CIM da fração; DL-Vp/DF-Vp + AMP ou LEVO = CIM do sinergismo da fração com antibiótico. Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Conforme revisado por Santos e colaboradores (2019), extratos de plantas, inclusive aquosos, são misturas complexas de compostos bioativos, e certamente podem envolver vários mecanismos de ação, o que também pode limitar a aquisição de resistência por bactérias. Segundo estes autores, o mecanismo ou alvo preciso da maioria dos compostos bioativos das plantas contra bactérias, em geral, ainda não está elucidado. No entanto, existem vários mecanismos sugeridos e que podem estar envolvidos, nomeadamente a ruptura das membranas, interrupção da síntese e função do DNA/RNA, interferência no metabolismo intermediário, indução da coagulação dos constituintes citoplasmáticos e a interrupção da comunicação celular normal (*Quorum Sensing*). Entretanto, a maior parte da literatura sobre a ação antimicrobiana de compostos bioativos, em geral, aponta que seu principal local alvo é a membrana citoplasmática, afetando sua estrutura e integridade, permeabilidade ou funcionalidade de diferentes maneiras (SANTOS et al., 2019).

Nexte contexto, com base nos resultados do efeito antibiótico de DL-Vp e DF-Vp frente à *S. Choleraesuis* (ATCC® 10708™), *S. Typhimurium* (ATCC® 13311™), *S. Enteritidis* 1428260 e *Salmonella* spp. 1507708, foram realizados os ensaios de determinação da viabilidade celular bacteriana e do extravasamento de substâncias que absorvem a 280 nm para verificação do provável modo de ação, que serão apresentados a seguir.

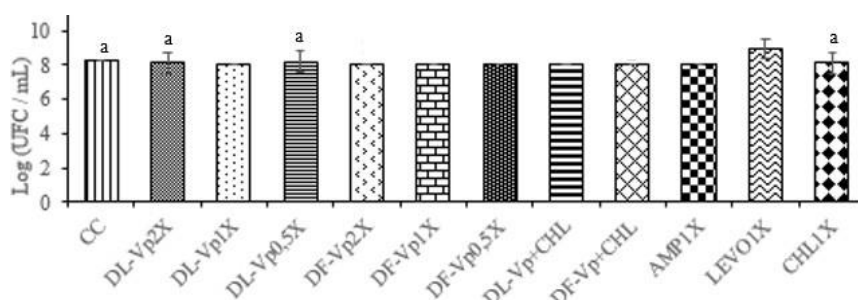
### **534 Determinação da viabilidade celular bacteriana**

O teste da viabilidade celular bacteriana foi conduzido para determinar a densidade populacional de células capazes de sobreviver ao tratamento com DL-Vp, DF-Vp, combinações dessas frações com CHL, AMP e LEVO, e somente com ANTs 1x CIM com uma hora de exposição (fase *lag*) (Figuras 27, 28, 29 e 30).

A Figura 27 mostra que 1x CIM DL-Vp, 0,5x, 1x e 2x CIM DF-Vp, DL-Vp + CHL e DF-Vp + CHL inviabilizaram um maior número de células de *S. Typhimurium* (ATCC® 13311™) quando comparadas à LEVO, tendo efeito semelhante à AMP e CHL. Vale lembrar que o principal alvo dos compostos bioativos é a membrana citoplasmática (SANTOS et al., 2019). A Figura 28 mostra que não houve diminuição considerável de UFCs de *S. Choleraesuis* (ATCC® 10708™) após o tratamento com as frações, as combinações entre frações + ANTs e os ANTs sozinhos quando comparado com o controle do crescimento. Já frente a *S. Enteritidis* 1428260, a redução populacional ocorreu após tratamento com DF-Vp 2x e DL-Vp + CHL, conforme mostra a Figura 29. Quanto à *Salmonella* spp. 1507708, não foi observada morte bacteriana com uma hora de tratamento, seja com as frações, combinações ou ANTs sozinhos

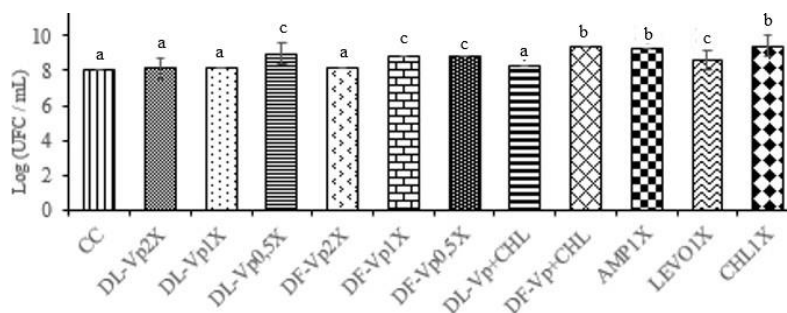
(Figura 30), o que corrobora a dificuldade de inviabilizar esse patógeno, inclusive demonstrado pelos dados de susceptibilidade obtidos por meio do TSA, que reportaram resistência à AMP, ciprofloxacino, LEVO e ácido nalidíxico, entre outros (ANEXO A).

Figura 27 - Representação gráfica do número de células bacterianas de *Salmonella* Typhimurium (ATCC® 13311™) viáveis com uma hora de tratamento na presença das frações diclorometânicas floral (DF-Vp) e foliar (DL-Vp), ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL), levofloxacino (LEVO) e combinações das frações com cloranfenicol (DL-Vp/DF-Vp + CHL)



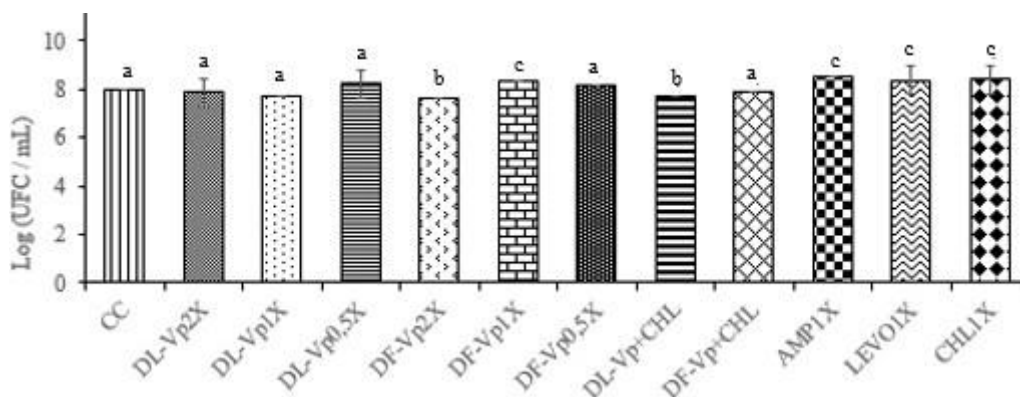
CC = controle do crescimento; 2X = 2x CIM da fração; 1X = 1x CIM da fração ou antibiótico; 0,5X = 0,5x CIM da fração; DL-Vp + CHL / DF-Vp + CHL = CIM do sinergismo da fração com antibiótico; letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre eles. Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Figura 28 - Representação gráfica do número de células bacterianas de *Salmonella* Choleraesuis (ATCC® 10708™) viáveis com uma hora de tratamento na presença das frações diclorometânicas floral (DF-Vp) e foliar (DL-Vp), ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL), levofloxacino (LEVO) e combinações das frações com cloranfenicol (DL-Vp/DF-Vp + CHL)



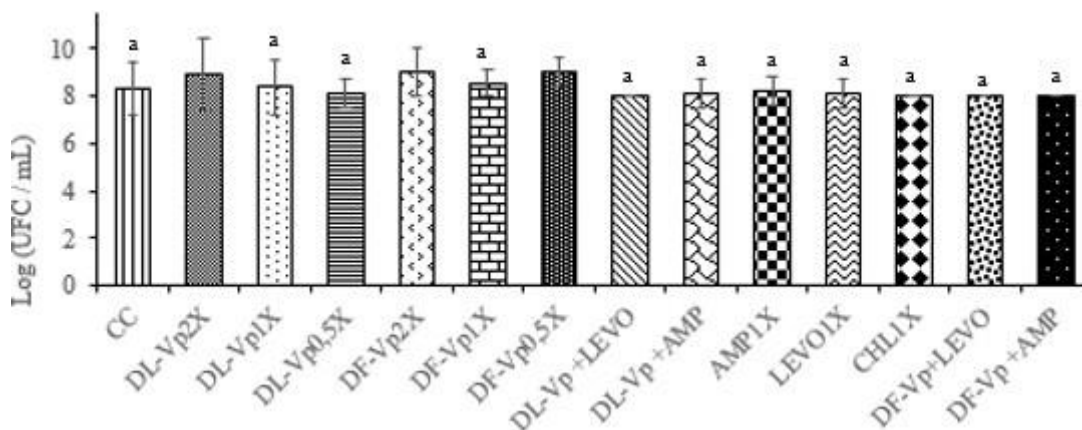
CC = controle do crescimento; 2X = 2x CIM da fração; 1X = 1x CIM da fração ou antibiótico; 0,5X = 0,5x CIM da fração; DL-Vp + CHL / DF-Vp + CHL = CIM do sinergismo da fração com antibiótico; letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre eles. Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Figura 29 - Representação gráfica do número de células bacterianas de *Salmonella* Enteritidis 1428260 viáveis com uma hora de tratamento na presença das frações diclorometânicas floral (DF-Vp) e foliar (DL-Vp), ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL), levofloxacino (LEVO) e combinações das frações com cloranfenicol (DL-Vp/DF-Vp + CHL)



CC = controle do crescimento; 2X = 2x CIM da fração; 1X = 1x CIM da fração ou antibiótico; 0,5X = 0,5x CIM da fração; DL-Vp + CHL / DF-Vp + CHL = CIM do sinergismo da fração com antibiótico; letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre eles. Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Figura 30 - Representação gráfica do número de células bacterianas de *Salmonella* spp. 1507708 viáveis com uma hora de tratamento na presença das frações diclorometânicas floral (DF-Vp) e foliar (DL-Vp), ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL), levofloxacino (LEVO) e combinações das frações com ampicilina e levofloxacino (DL-Vp/DF-Vp + AMP ou LEVO)



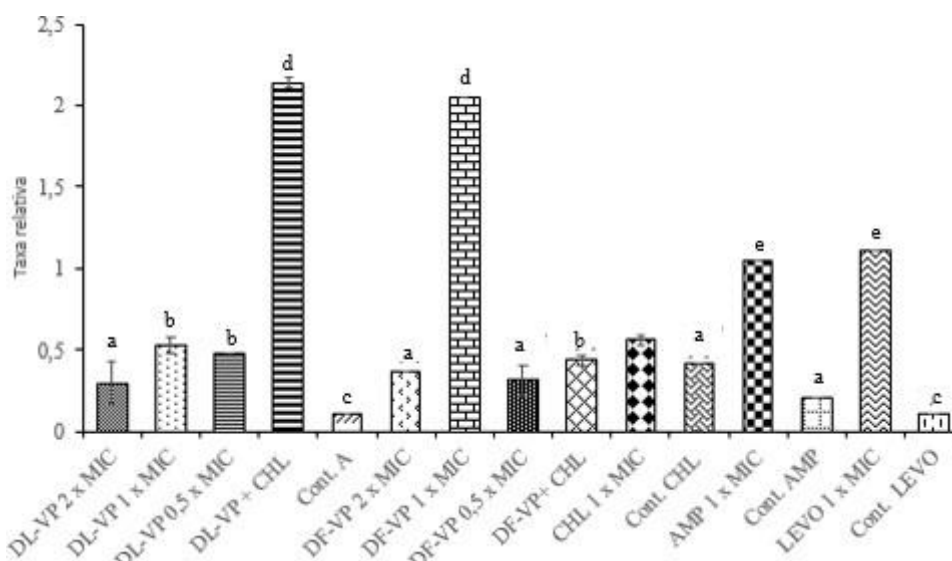
CC = controle do crescimento; 2X = 2x CIM da fração; 1X = 1x CIM da fração ou antibiótico; 0,5X = 0,5x CIM da fração; DL-Vp / DF-Vp + AMP ou LEVO = CIM do sinergismo da fração com antibiótico; letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre eles. Fonte: Elaborado pela autora (2019).

### 535 Avaliação do extravasamento de substâncias que absorvem a 280 nm

O ensaio para avaliação do extravasamento de substâncias intracelulares absorvidas a 280 nm, que indica lise celular e formação de poros não seletivos demonstrando dano na

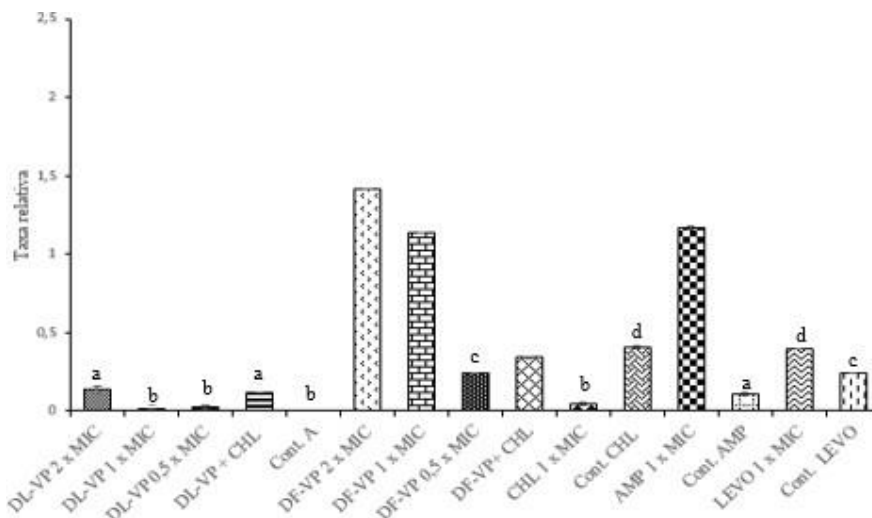
membrana (ZHOU et al., 2008), também foi realizado. Segundo Kim e colaboradores (2015), este extravasamento está principalmente relacionado à perda de proteínas celulares que são normalmente retidas pela membrana celular. Os resultados foram liberados como a taxa relativa entre as células tratadas e não tratadas e são apresentados pelas Figuras 31 a 34. Pela análise dessas Figuras, podemos observar que o provável efeito de rompimento da membrana celular após tratamento com DL-Vp e DF-Vp foi cepa dependente. Segundo Chen e Cooper (2002), o extravasamento de componentes intracelulares com baixo peso molecular, tais como íons de potássio e fosfato, seguido por grandes moléculas, como DNA e RNA, são uma indicação de danos à membrana.

Figura 31 - Resultado do ensaio de extravasamento de substâncias que absorvem em 280 nm expresso como taxa relativa após tratamento da *Salmonella* Typhimurium (ATCC® 13311™) com frações diclorometânicas floral (DF-Vp) e foliar (DL-Vp), ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL), levofloxacino (LEVO) e combinações das frações com cloranfenicol (DL-Vp/DF-Vp + CHL)



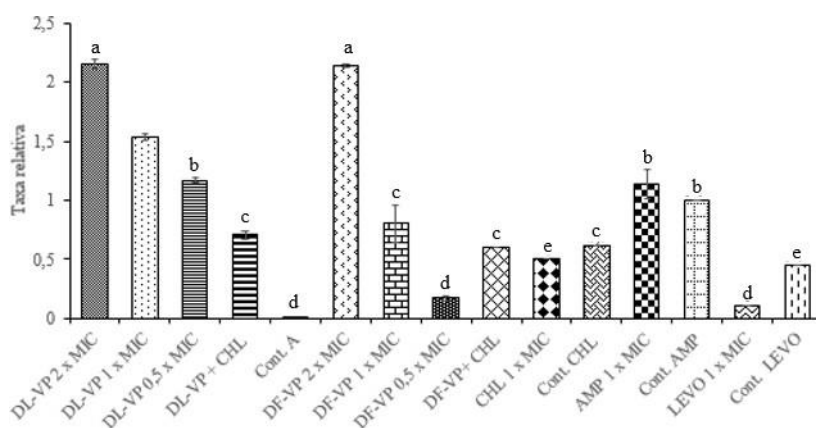
Cont. A = controle solvente/diluído da fração; Cont. CHL = controle solvente/diluído do cloranfenicol; Cont. AMP = controle solvente/diluído da ampicilina; Cont. LEVO = controle solvente/diluído da levofloxacino; 2X = 2x CIM da fração; 1X = 1x CIM da fração ou antibiótico; 0,5X = 0,5x CIM da fração; DL-Vp + CHL / DF-Vp + CHL = CIM do sinergismo da fração com antibiótico; letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre eles. Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Figura 32 - Resultado do ensaio de extravasamento de substâncias que absorvem em 280 nm expresso como taxa relativa após tratamento da *Salmonella Choleraesuis* (ATCC® 10708™) com frações diclorometânicas floral (DF-Vp) e foliar (DL-Vp), ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL), levofloxacino (LEVO) e combinações das frações com cloranfenicol (DL-Vp/DF-Vp + CHL)



Cont. A = controle solvente/diluyente da fração; Cont. CHL = controle solvente/diluyente do cloranfenicol; Cont. AMP = controle solvente/diluyente da ampicilina; Cont. LEVO = controle solvente/diluyente da levofloxacino; 2X = 2x CIM da fração; 1X = 1x CIM da fração ou antibiótico; 0,5X = 0,5x CIM da fração; DL-Vp + CHL / DF-Vp + CHL = CIM do sinergismo da fração com antibiótico; letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre eles. Fonte: Elaborado pela autora (2019).

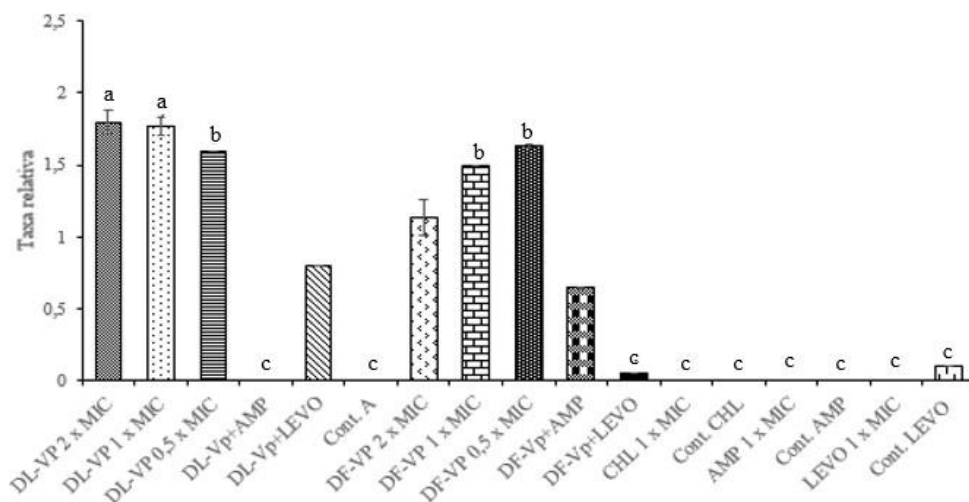
Figura 33 - Resultado do ensaio de extravasamento de substâncias que absorvem em 280 nm expresso como taxa relativa após tratamento da *Salmonella Enteritidis* 1428260 com frações diclorometânicas floral (DF-Vp) e foliar (DL-Vp), ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL), levofloxacino (LEVO) e combinações das frações com cloranfenicol (DL-Vp/DF-Vp + CHL)



Cont. A = controle solvente/diluyente da fração; Cont. CHL = controle solvente/diluyente do cloranfenicol; Cont. AMP = controle solvente/diluyente da ampicilina; Cont. LEVO = controle solvente/diluyente da levofloxacino; 2X = 2x CIM da fração; 1X = 1x CIM da fração ou antibiótico; 0,5X = 0,5x CIM da fração; DL-Vp + CHL / DF-Vp + CHL = CIM do sinergismo da fração com antibiótico; letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre eles. Fonte: Elaborado pela autora (2019).



Figura 34 - Resultado do ensaio de extravasamento de substâncias que absorvem em 280 nm expresso como taxa relativa após tratamento da *Salmonella* spp. 1507708 com frações diclorometânicas floral (DF-Vp) e foliar (DL-Vp), ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL), levofloxacino (LEVO) e combinações das frações com ampicilina ou levofloxacino (DL-Vp/DF-Vp + AMP ou LEVO)



Cont. A = controle solvente/diluyente da fração; Cont. CHL = controle solvente/diluyente do cloranfenicol; Cont. AMP = controle solvente/diluyente da ampicilina; Cont. LEVO = controle solvente/diluyente da levofloxacino; 2X = 2x CIM da fração; 1X = 1x CIM da fração ou antibiótico; 0,5X = 0,5x CIM da fração; DL-Vp/DF-Vp + LEVO ou AMP = CIM do sinergismo da fração com antibiótico; letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre eles. Fonte: Elaborado pela autora (2019).

#### 5.4 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO ANTIBIÓTICO *in vitro* DO LUPEOL

Após verificar o efeito antibiótico promissor de DL-Vp e DF-Vp sentiu-se a necessidade de definir qual substância presente nestas frações seria a responsável por tal atividade biológica. Neste sentido, realizou-se um estudo bibliográfico a respeito das substâncias já isoladas de *V. polyanthes* e o lupeol foi selecionado para prosseguir com a investigação. A escolha foi justificada pelo fato de que o desenvolvimento de antibióticos que atuam contra cepas Gram-negativas é um grande desafio (WHO, 2017c) e, anteriormente, o lupeol se mostrou ativo frente as 18 cepas clinicamente relevantes de *P. aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (GALLO; SARACHINE, 2009). Além disso, no teste por difusão em disco apresentou zonas de inibição para *S. Typhi* e *E. coli* (GALLO; SARACHINE, 2009). No presente estudo, a CIM do lupeol foi de 250 µg/mL frente a *S. Choleraesuis* (ATCC® 10708™) e *S. Typhimurium* (ATCC® 13311™) e de 500 µg/mL frente *S. Enteritidis* 1428260. Não foi possível determinar a CIM deste composto frente a *Salmonella* spp. 1507708 por estar acima do gradiente de concentração estabelecido (Tabela 15). Entretanto, ao analisar os dados obtidos

no ensaio do tempo de morte bacteriana, o lupeol foi capaz de reduzir a densidade populacional somente da *S. Typhimurium* (ATCC® 13311™), e não teve ação sobre as outras cepas testadas (Figuras 36 - 42). Estes resultados convergem para o fato de que o lupeol não seria o principal responsável pelo efeito antibiótico promissor de DL-Vp e DF-Vp.

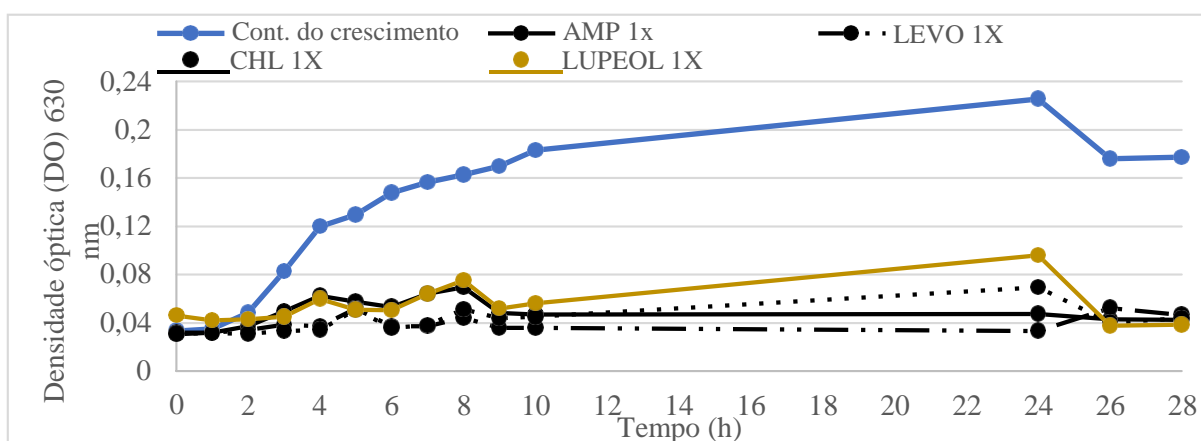
Tabela 15 - Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do lupeol, ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL) e levofloxacino (LEVO) frente às cepas de *Salmonella*

Cepa Bacteriana	CIM (µg/mL)			
	LUPEOL	AMP	CHL	LEVO
<i>S. Choleraesuis</i> (ATCC® 10708™)	250 <sup>2</sup>	< 4	< 4	< 4
<i>S. Typhimurium</i> (ATCC® 13311™)	250 <sup>2</sup>	< 4	< 4	< 4
<i>S. Enteritidis</i> 1428260	500 <sup>2</sup>	< 4	< 4	< 4
<i>Salmonella</i> spp. 1507708	> 500	> 500	8	8

2 = efeito bacteriostático.

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

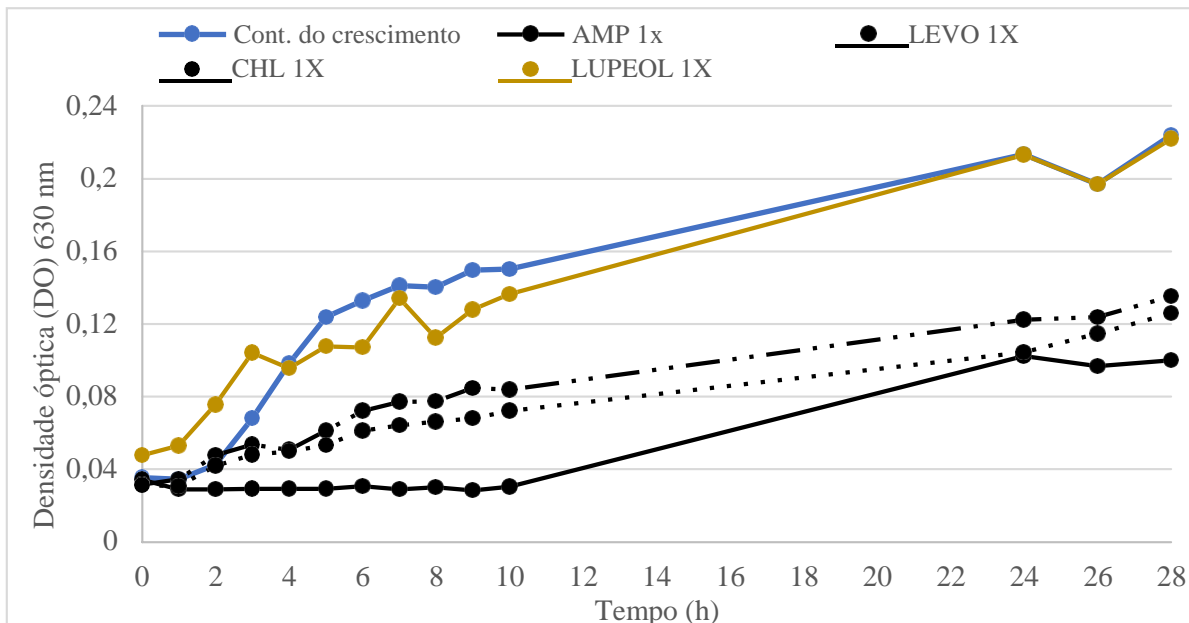
Figura 35 - Curva do tempo de morte da *Salmonella* Typhimurium (ATCC® 13311™) na presença do lupeol, ampicilina (AMP), levofloxacino (LEVO) e cloranfenicol (CHL)



Cont. do crescimento = controle do crescimento; 1X = 1x CIM do lupeol ou antibiótico.

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

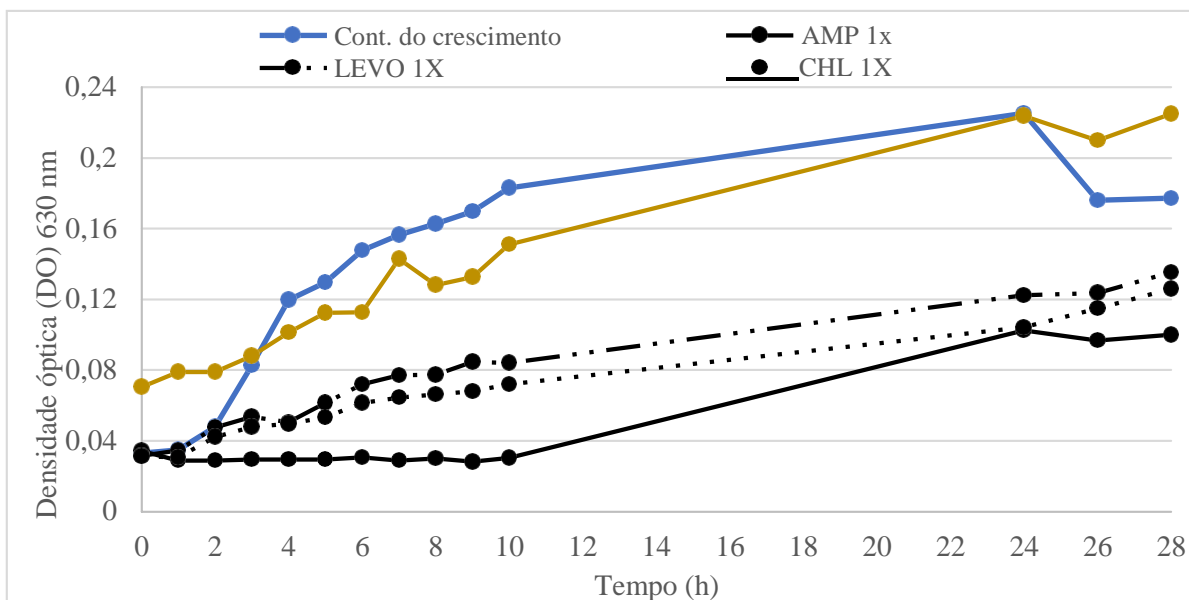
Figura 36 - Curva do tempo de morte da *Salmonella Choleraesuis* (ATCC® 10708™) na presença do lupeol, ampicilina (AMP), levofloxacino (LEVO) e cloranfenicol (CHL)



Cont. do crescimento = controle do crescimento; 1X = 1x CIM do lupeol ou antibiótico.

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

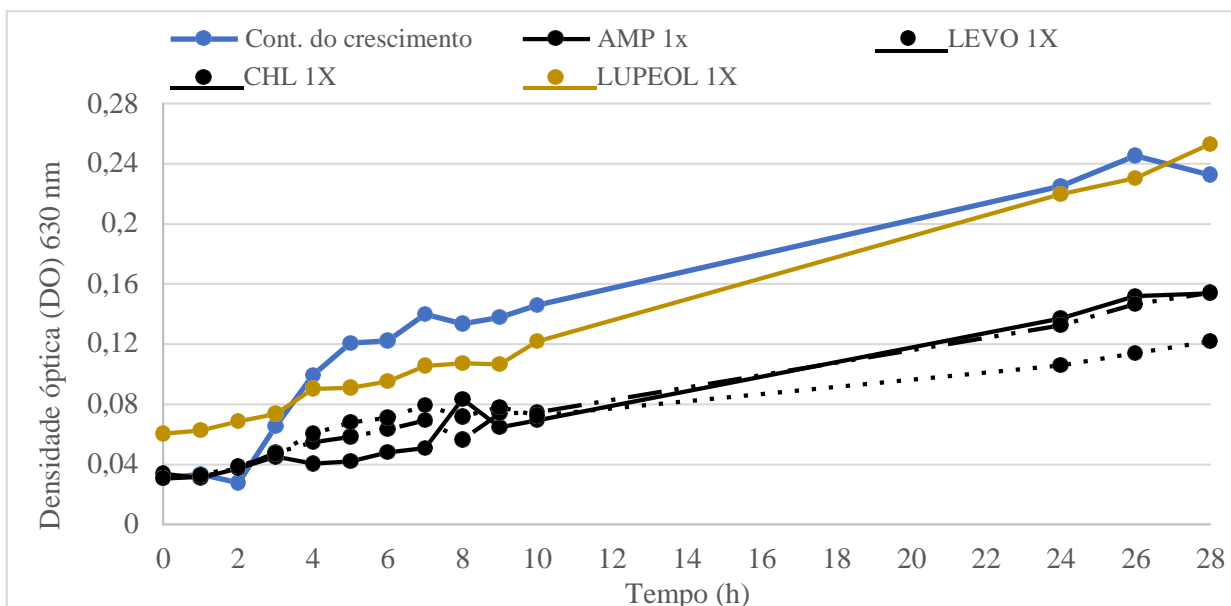
Figura 37 - Curva do tempo de morte da *Salmonella Enteritidis* 1428260 na presença do lupeol, ampicilina (AMP), levofloxacino (LEVO) e cloranfenicol (CHL)



Cont. do crescimento = controle do crescimento; 1X = 1x CIM do lupeol ou antibiótico.

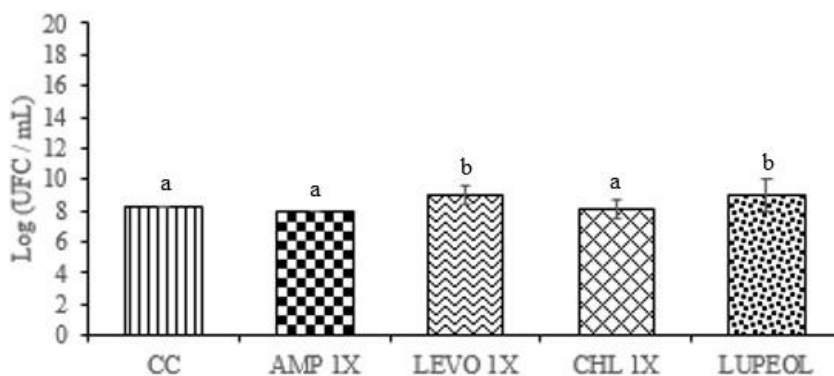
Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Figura 38 - Curva do tempo de morte da *Salmonella* spp. 1507708 na presença do lupeol, ampicilina (AMP), levofloxacino (LEVO) e cloranfenicol (CHL)



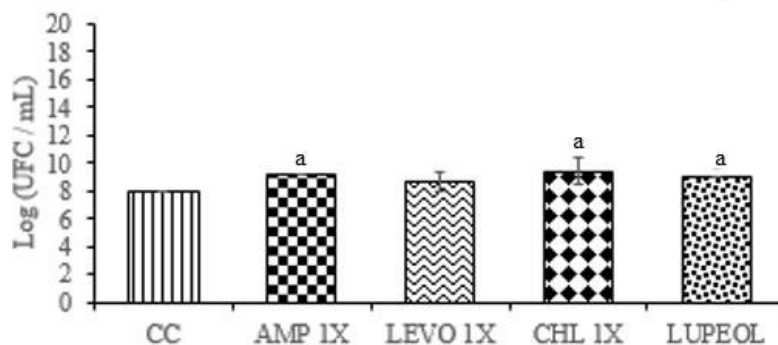
Cont. do crescimento = controle do crescimento; 1X= 1x CIM do lupeol ou antibiótico.  
 Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Figura 39 - Representação gráfica do número de células bacterianas de *Salmonella* Typhimurium (ATCC® 13311™) viáveis com uma hora de tratamento na presença de lupeol, ampicilina (AMP), levofloxacino (LEVO) e cloranfenicol (CHL)



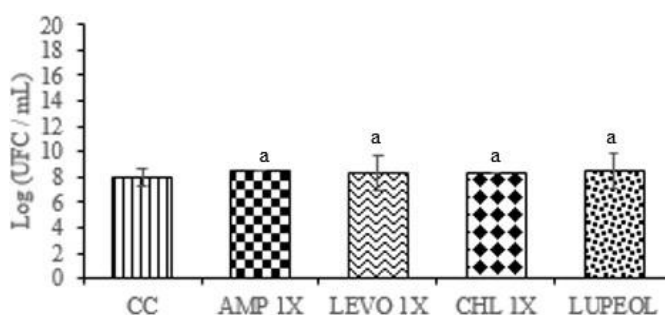
CC = controle do crescimento; 1X = 1x CIM do lupeol ou antibiótico; letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre eles. Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Figura 40 - Representação gráfica do número de células bacterianas de *Salmonella Choleraesuis* (ATCC® 10708™) viáveis após uma hora de tratamento na presença de lupeol, ampicilina (AMP), levofloxacino (LEVO) e cloranfenicol (CHL)



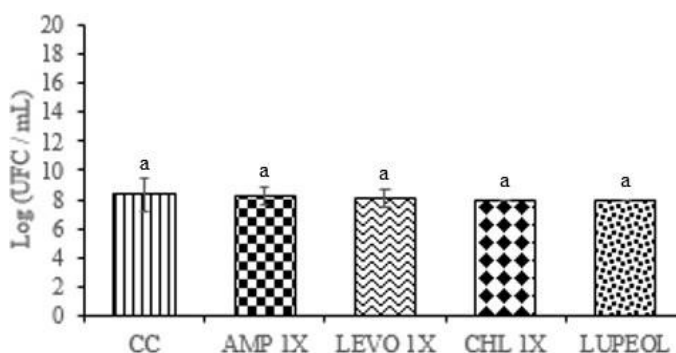
CC = controle do crescimento; 1X = 1x CIM do lupeol ou antibiótico; letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre eles. Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Figura 41 - Representação gráfica do número de células bacterianas de *Salmonella Enteritidis* 1428260 viáveis após uma hora de tratamento na presença de lupeol, ampicilina (AMP), levofloxacino (LEVO) e cloranfenicol (CHL)



CC = controle do crescimento; 1X = 1x CIM do lupeol ou antibiótico; letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre eles. Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Figura 42 - Representação gráfica do número de células bacterianas de *Salmonella* spp. 1507708 viáveis com uma hora de tratamento na presença de lupeol, ampicilina (AMP), levofloxacino (LEVO) e cloranfenicol (CHL)



CC = controle do crescimento; 1X = 1x CIM do lupeol ou antibiótico; letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre eles. Fonte: Elaborado pela autora (2019).

## 5.5 TRIAGEM DE CITOTOXICIDADE

### **5.5.1 Determinação da toxidez aguda por meio do bioensaio com *Artemia salina***

A partir das porcentagens de morte (M%) de *A. salina* e análise por regressão linear foram estimados os prováveis valores de CL<sub>50</sub> para DL-Vp e DF-Vp, 1090 e 1101 µg/mL, respectivamente. O timol (controle positivo) revelou CL<sub>50</sub> de 3,6 µg/mL, sendo considerado altamente tóxico, e os controles negativos não mataram as larvas. Segundo Meyer e colaboradores (1982), valores de CL<sub>50</sub> > 1000 µg/mL para extratos vegetais são considerados atóxicos frente a este microcrustáceo. Assim, as frações DL-Vp e DF-Vp foram consideradas atóxicas após investigação da toxidez *in vitro* por meio do bioensaio com o microcrustáceo *A. salina* (MEYER, 1982).

## 6 CONCLUSÕES

---

De acordo com os resultados apresentados, foi possível obter as seguintes conclusões:

- A caracterização química de DL-Vp e DF-Vp por CG-EM sugeriu, principalmente, a presença de ácidos graxos, triterpenos, sesquiterpenos e flavonoides;
- Os resultados microbiológicos revelaram o efeito antibiótico promissor de *V. polyanthes*, principalmente frente às cepas de *Salmonella* spp., incluindo cepas clínicas, sensíveis e resistentes à LEVO e AMP;
- O lupeol não seria o principal responsável pelo efeito antibiótico de DL-Vp e DF-Vp em virtude dos resultados obtidos nos ensaios do tempo de morte bacteriana e viabilidade celular;
- A avaliação da citotoxicidade demonstrou que DL-Vp e DF-Vp são atóxicos no ensaio empregado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ADAMS, R. P. **Essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry**. 4<sup>a</sup> ed. Illinois: Allured publishing, 2007.

AJIKUMAR, P. K.; TYO, K.; CARLSEN, S.; MUCHA, O.; PHON, T. H.; STEPHANOPOULOS, G. Terpenoids: opportunities for biosynthesis of natural product drugs using engineered microorganisms. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, p. 167-190, 2008.

ALBERTS, A. C.; SHARP, T. R.; WERNER, D. I.; WELDON, P. J. Seasonal variation of lipids in femoral gland secretions of male green iguanas (*Iguana iguana*). **Journal of Chemical Ecology**, v. 18, p. 703-712, 1992.

ALVES, V. F. G.; NEVES, L. J. Anatomia foliar de *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae). **Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida**, v. 22, p. 1-8, 2003.

AMINOV, R. History of antimicrobial drug discovery: major classes and health impact. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 4-19, 2017.

AMINOV, R. I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. **Frontiers in Microbiology**, v. 1, p. 1-7, 2010.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 5-16, 2001.

ATANGWHO, I. J.; EGBUNG, G. E.; AHMAD, M.; YAMA, M. F.; ASMAWI, M. Z. Antioxidant *versus* anti-diabetic properties of leaves from *Vernonia amygdalina* Del. growing in Malaysia. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3428-3434, 2013.

AZWANIDA, N. N. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 4, p. 1-6, 2015.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 43-441, 2005.

BARBASTEFANO, V.; COLA, M.; LUIZ-FERREIRA, A.; FARIAS-SILVA, E.; HIRUMA-LIMA, C. A.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; SOUZA-BRITO, A. R. M. *Vernonia polyanthes* as a new source of antiulcer drugs. **Fitoterapia**, v. 78, p. 545-551, 2007.

BARON, D.; GRACIANO, D. S.; PORTELLA, R. O.; MANTOAN, L. P. B.; DE ALMEIDA, L. F. R.; BOARO, C. S. F. The ecophysiological performance of *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae) in conserved and degraded forests in the brazilian cerrado. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, p. 1702, 2005.

BENFATTI, A. C.; BARBASTEFANO, V.; RODRIGUES, J.; RINALDO, D.; SANTOS, L. C.; BRITO, A. R. M. S. Estudo químico do extrato clorofórmico das folhas de *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 30., 2007, Águas de Lindoia. *Anais eletrônicos...* Águas de Lindoia: SBQ, 2007. Disponível em:



<<https://sec.s bq.org.br/cdrom/30ra/listaresumos.htm>>. Acesso em 11 set. 2017.

BERETTA, M. E.; FERNANDES, A. C.; SCHNEIDER, A. A.; RITTER, M. R. A família Asteraceae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 6, p. 189-216, 2008.

BERLINCK, R. G. S.; BORGES, W. S.; SCOTTI, M. T.; VIEIRA, P. C. A química de produtos naturais do Brasil do século XXI. **Química Nova**, v. 40, p. 706-710, 2017.

BESSA, M. E. **Avaliação da ingestão de alimento elaborado com Bactérias Ácido Lácticas (BAL) e espécie vegetal *Pereskia aculeata* Miller (Cactaceae) sobre as desordens metabólicas de ratos Wistar causadas por superalimentação.** 2019. 84 f. Projeto de Qualificação (Doutorado em Ciências Biológicas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2019.

BLAIR, J. M. A.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D. O.; PIDDOCK, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, p. 42-51, 2015.

BOHLMANN, F.; JAKUPOVIC, J.; GUPTA, R. K.; KING, R. M.; ROBINSON, H. Allenic germacranolides, bourbonene derived lactones and other constituents from *Vernonia* species. **Phytochemistry**, v. 20, p. 473-480, 1981.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; KING, R. M.; ROBINSON, H. Further hirsutinolides from *Vernonia polyanthes*. **Phytochemistry**, v. 22, p. 2863-2864, 1983.

BRAGA, F. G.; BOUZADA, M. L. M.; FABRI, R. L.; MATOS, M. O.; MOREIRA, F. O.; SCIO, E.; COIMBRA, E. S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 396-402, 2007.

BRAGA, M. C. **Histórico da utilização de plantas medicinais.** 2011. 24 f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso do Curso de Licenciatura em Biologia a Distância) - Consórcio Setentrional de Educação a Distância, Universidade de Brasília, Universidade Estadual de Goiás, Brasília, 2011

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

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira.** Brasília, 2011a. 126 p.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da Diretoria Colegiada nº 20, de 05 de maio de 2011. Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição, isoladas ou em associação... Brasília: Diário Oficial da União, 09 mai. 2011b. n. 87, Seção 1, p. 39.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE E AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Monografia da espécie *Vernonia polyanthes* (“assa-peixe”).** Brasília, 2014. 65 p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. 2009. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms\\_relacao\\_plantas\\_medicinais\\_sus\\_0603.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf)>. Acesso em 01 jan 2019.

BREDARIOL, L. R. **Levantamento e caracterização das Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC'S) espontâneas presentes em um sistema agroflorestal no município de Rio Claro - SP**. 2015. 44 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Ecologia). Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2015.

BROWN, E. D.; WRIGHT, G. D. Antibacterial drug discovery in the resistance era. **Nature**, v. 529, p. 336-343, 2016.

BUER, C. S.; IMIN, N.; DJORDJEVIC, M. A. Flavonoids: new roles for old molecules. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 52, p. 98-111, 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **About Antimicrobial Resistance**. 2017. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>>. Acesso em 13 jan. 2019.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013**. Atlanta: CDC, 2013.

CHEN, C. Z. S.; COOPER, S. L. Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes. **Biomaterials**, v. 23, p. 3359-3368, 2002.

CHEMSPIDER, 2019. Disponível em: <<https://www.chemspider.com>>. Acesso em: 10 jun. 2019.

CHIMNOI, N.; REUK-NGAM, N.; CHUYSINUAN, P.; KHLAYCHAN, P.; KHUNNAWUTMANOTHAM, N.; CHOKCHAICHAMNANKIT, D.; THAMNIYOM, W.; KLAYRAUNG, S.; MAHIDOL, C.; TECHASAKUL, S. Characterization of essential oil from *Ocimum gratissimum* leaves: antibacterial and mode of action against selected gastroenteritis pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 118, p. 290-300, 2018.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard – Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne, PA, 2014.

COLLIN, G.; ST-GELAIS, A.; TURCOTTE, M.; GAGNON, H. Composition of the essential oil and of some extracts of the aerial parts of *Artemisia ludoviciana* var. *latiloba* Nutt. **American Journal of Essential Oils and Natural Products**, v. 4, p. 28-38, 2016.

COMPANHIA DE SANEAMENTO MUNICIPAL DE JUIZ DE FORA. **Hidrografia em Juiz de Fora**. 2013. Disponível em: <http://www.cesama.com.br/?pagina=hidrografia>. Acesso em 13 jan. 2019.

CONDE, B. E.; SIQUEIRA, A. M.; ROGÉRIO, I. T. S.; MARQUES, J. S.; BORCARD, G. G.; FERREIRA, M. Q.; CHEDIER, L. M.; PIMENTA, D. S. Synergy in ethnopharmacological data collection methods employed for communities adjacent to urban forest. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 425-432, 2014.

CORRÊA, R. M.; BERTOLUCCI, S. K. B.; PINTO, J. E. B. P.; REIS, E. S.; ALVES, T. L. Rendimento de óleo essencial e caracterização organoléptica de folhas de assa-peixe submetidas a diferentes métodos de secagem. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, p. 339-344, 2004.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.

DA SILVA, J. L.; DE SOUZA, P. E.; ALVES, E.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; FREITAS, M. L. O.; DE ANDRADE, C. C.; RESENDE, M. L. V. Essential oil of *Cymbopogon flexuosus*, *Vernonia polyanthes* and potassium phosphite in control of bean anthracnose. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, p. 243-253, 2015.

DA SILVEIRA, R. R.; FOGLIO, M. A.; GONTIJO, J. A. R. Effect of the crude extract of *Vernonia polyanthes* Less. on blood pressure and renal sodium excretion in unanesthetized rats. **Phytomedicine**, v. 10, p. 127-131, 2003.

DE CARVALHO, C. C.; MACHADO, K. N.; FERREIRA, P. M. P. F.; PESSOA, C.; FONSECA, T.; H.; S.; GOMES, M. A.; DO NASCIMENTO, A. M. Biological screening of extracts of brazilian Asteraceae plants. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 7, p. 2000-2005, 2013.

DEMATTEIS, M. Chromosome studies of some *Vernonia* species (Asteraceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, p. 1-6, 1998.

DE SIMÓN, B. F.; ESTERUELAS, E.; MUÑOZ, A. M.; CADAHÍA, E.; SANZ, M. Volatile compounds in acacia, chestnut, cherry, ash, and oak woods, with a view to their use in cooperage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 3217-3227, 2009.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 3<sup>a</sup> ed. Londres: John Wiley, 2009.

DOERNBERG, S. B.; LODISE, T. P.; THADEN, J. T.; MUNITA, J. M.; COSGROVE, S. E.; ARIAS, C. A.; BOUCHER, H. W.; COREY, G. R.; LOWY, F. D.; MURRAY, B.; MILLER, L. G.; THOMAS L. Gram-positive bacterial infections: research priorities, accomplishments, and future directions of the antibacterial resistance leadership group. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, p. S24-S29, 2017.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

DUTRA, S. R. **Inventário polínico do entorno de um apiário localizado em Conceição da Aparecida, (21°5'39.47"S e 46°10'21.97"W), Minas Gerais.** 2011. 131 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-graduação em Entomologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

FABRI, R. L.; NOGUEIRA, M. S.; DUTRA, L. B.; BOUZADA, M. L. M.; SCIO, E. Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 183-189, 2011.

FADLI, M.; SAAD, A.; SAYADI, S.; CHEVALIER, J.; MEZRIOUI, N. E.; PAGÈS, J. M.; HASSANI, L. Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection – bacteria and their synergistic potential with antibiotics. **Phytomedicine**, v. 19, p. 464-471, 2012.

FAROOQUI, A.; KHAN, A.; BORGHETTO, I.; KAZMI, S. U.; RUBINO, S.; PAGLIETTI, B. Synergistic antimicrobial activity of *Camellia sinensis* and *Juglans regia* against multidrug-resistant bacteria. **PLoS One**, v. 10, p. e0118431, 2015.

FERREYRA, M. L. F.; RIUS, S. P. R.; CASATI, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Frontiers in plant Science**, v. 3, p. 1-15, 2012.

FINLAND, M. Emergence of antibiotic-resistant bacteria. **The New England Journal of Medicine**, v. 253, p. 909-922, 1955.

FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 13 jan. 2019.

FLORENCIO, J. R. **Análise do perfil químico e investigação do potencial antibacteriano e da toxidez *in vitro* dos extratos de lavagem foliar e floral de *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae Bercht. & Presl).** 2017. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2017.

FONSECA, P. G.; NUNES, U. R.; NUNES, S. C. P. Aspectos da germinação de sementes de assa-peixe (*Vernonia polyanthes* Less.). **Ciência Rural**, v. 42, p.633-637, 2012.

GALLO, M. B. C.; SARACHINE, M. J. Biological activities of lupeol. **International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 46-66, 2009.

GARCÍA-SÁNCHEZ, C. A.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, A.; VILLASEÑOR, J. L. La familia Asteraceae en el Parque Nacional Los Mármoles, Hidalgo, México. **Acta Botanica Mexicana**, v. 106, p. 97-116, 2014.

GOBBO-NETO, L. G.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.

GOMES, J. A. O.; TEIXEIRA, D. A.; MARQUES, A. P. S.; BONFIM, F. P. G. Diferentes substratos na propagação por estaquia de assa-peixe (*Vernonia polyanthes* Less). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 1177-1181, 2015.

GUERRA-SANTOS, I. J.; ROCHA, J. D.; VALE, C. R.; SOUSA, W. C.; TELES, A. M.; CHEN-CHEN, L.; CARVALHO, S.; BAILÃO, E. F. L. C. *Vernonanthura polyanthes* leaves aqueous extract enhances doxorubicin genotoxicity in somatic cells of *Drosophila melanogaster* and presents no antifungal activity against *Candida* spp. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, p. 928-936, 2016.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1-93, 2006.

IGUAL, M. O.; MARTUCCI, M. E. P.; DA COSTA, F. B.; GOBBO-NETO, L. Sesquiterpene lactones, chlorogenic acids and flavonoids from leaves of *Vernonia polyanthes* Less (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 51, p. 94-97, 2013.

IVANOV, I.; DINCHEVA, I.; BADJAKOV, I.; PETKOVA, N.; DENEV, P.; PAVLOV, A. GC-MS analysis of unpolar fraction from *Ficus carica* L. (fig) leaves. **International Food Research Journal**, v. 25, p. 282-286, 2018.

JORGETTO, G. V.; BORIOLO, M. F. G.; SILVA, L. M.; NOGUEIRA, D. A.; JOSÉ, T. D. S.; RIBEIRO, G. E.; OLIVEIRA, N. M. S.; FIORINI, J. E. Ensaio de atividade antimicrobiana *in vitro* e mutagênica *in vivo* com extrato de *Vernonia polyanthes* Less (assa-peixe). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, p. 53-61, 2011.

KIM, S.; LEE, H.; LEE, S.; YOON, S.; CHOI, K. H. Antimicrobial action of oleanolic acid on *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecium*, and *Enterococcus faecalis*. **PLOS ONE**, v. 10, p. 0118800, 2015.

KING, D. T.; SOBHANIFAR, S.; STRYNADKA, N. C. J. **Handbook of antimicrobial resistance**. New York: Springer New York, 2014.

KINUPP, V. F. **Plantas alimentícias não convencionais da região metropolitana de Porto Alegre, RS**. 2007. 590 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

KUETE, V. Potential of Cameroonian plant and derived products against microbial infections: a review. **Planta Medica**, v. 76, p. 1479-1491, 2010.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1-16, 2013.

LALEL, H. J. D.; SINGH, Z.; TAN, S. C. Glycosidically-bound aroma volatile compounds in the skin and pulp of 'Kensington pride' mango fruit at different stages of maturity. **Postharvest Biology and Technology**, v. 29, p. 205-218, 2003.

LEVY, S. B.; BONNIE, M. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature Medicine**, v. 10, p. S122-S129, 2004.

LIU, Y.; NUGROHO, A. E.; HIRASAWA, Y.; NAKATA, A.; KANEDA, T.; UCHIYAMA, N.; GODA, Y.; SHIROTA, O.; MORITA, H.; AISA, H. A. Vernodalidimers A and B, novel orthoester elemanolide dimers from seeds of *Vernonia anthelmintica*. **Tetrahedron Letters**, v. 51, p. 6584-6587, 2010.

LOPEZ, S. B.; LOPEZ, M. L.; ARAGON, L. M.; TERESCHUK, M. L.; SLANIS, A. C.; FERESIN, G. E.; ZYGADLO, J. A.; TAPIA, A. A. Composition and anti-insect activity of essential oils from *Tagetes* L. species (Asteraceae, Helenieae) on *Ceratitis capitata* Wiedemann and *Triatoma infestans* Klug. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 5286-5292, 2011.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 1ª ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

MAIA, A. I. V.; TORRES, M. C. M.; PESSOA, O. D. L.; MENEZES, J. E. S. A.; COSTA, S. M. O.; NOGUEIRA, V. L. R.; MELO, V. M. A.; SOUZA, E. B.; CAVALCANTE, M. G. B.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R. Óleos essenciais das folhas de *Vernonia remotiflora* e *Vernonia brasiliiana*: composição química e atividade biológica. **Química Nova**, v. 33, p. 584-586, 2010.

MARTUCCI, M. E. P.; GOBBO-NETO, L. Differential secondary metabolite accumulation and performance of *Chlosyne lacinia* fed with *Tithonia diversifolia* or *Vernonia polyanthes*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 68, p. 156-162, 2016.

MARTUCCI, M. E. P.; VOS, R. C. H.; CAROLLO, C. A.; GOBBO-NETO, L. Metabolomics as a potential chemotaxonomical tool: application in the genus *Vernonia* Schreb. **Plos One**, v. 9, p. 1- 8, 2014.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MINATELI, M. M.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; YAMAMOTO, C. H.; ARAÚJO, A. L. S. M.; RODARTE, M. P.; ALVES, M. S.; SOUSA, O. V. Phytochemical contents and biological properties of *Vernonia polyanthes* Less. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 8, p. 1427-1436, 2017.

MINATELI, M. M. **Investigação do potencial toxicológico e atividades farmacológicas de *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae)**. 2015. 174 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2015.

MOREIRA, R. R. D.; MARTINS, G. Z.; VARANDAS, R.; COGO, J.; PEREGO, C. H.; RONCOLI, G.; SOUSA, M. D. C.; NAKAMURA, C. V.; SALGUEIRO, L.; CAVALEIRO, C. Composition and leishmanicidal activity of the essential oil of *Vernonia polyanthes* Less (Asteraceae). **Natural Product Research**, v. 31, p. 2905-2908, 2017.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 4, p. 1-37, 2016.

NASCIMENTO, A. M.; SOARES, M. G.; TORCHELSEN, F. K. S.; DE ARAUJO, J. A.; LAGE, P. S.; DUARTE, M. C.; ANDRADE, P. H.; RIBEIRO, T. G.; COELHO, E. A.; DO NASCIMENTO, A. M. Antileishmanial activity of compounds produced by endophytic fungi

derived from medicinal plant *Vernonia polyanthes* and their potential as source of bioactive substances. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 1793-800, 2015.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629-661, 2016.

NIJVELDT, R. J.; VAN NOOD, E.; VAN HOORN, D. E.; BOELEN, P. G.; VAN NORREN, K.; VAN LEEUWEN, P. A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, p. 418-25, 2001.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 1, 2003.

OLIVEIRA, D. G.; PRINCE, K. A.; HIGUCHI, C. T.; SANTOS, A. C. B.; LOPES, L. M. X.; SIMÕES, M. J. S.; LEITE, C. Q. F. Antimycobacterial activity of some brazilian indigenous medicinal drinks. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, p.165-169, 2007.

O'NEILL, J. **The Review on Antimicrobial Resistance. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations**. London: HM Government and welcometrust, 2016.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, p. 1-15, 2016.

PETROV, M. M.; PETROVA, A.; STANIMIROVA, I.; MIRCHEVA-TOPALOVA, M.; KOYCHEVA, L.; VELCHEVA, R.; STOYCHEVA-VARTIGOVA, M.; RAYCHEVA, R.; ASSEVA, G.; PETROV, P.; KARDJEVA, V.; MURDJEVA, M. Evaluation of antimicrobial resistance among *Salmonella* and *Shigella* isolates in the University Hospital "St. George," Plovdiv, Bulgaria. **Folia Microbiologica**, v. 62, p. 117-125, 2017.

PINO, J. A.; MESA, J.; MUÑOZ, Y.; MARTI, M. P.; MARBOT, R. Volatile components from mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2213-2223, 2005.

POLLO, L. A. E.; BOSI, C. F.; LEITE, A. S.; RIGOTTO, C.; KRATZ, J.; SIMÕES, C. M. O.; FONSECA, D. E. P.; COIMBRA, D.; CARAMORI, G.; NEPEL, A.; CAMPOS, F. R.; BARISON, A.; BIAVATTI, M. W. Polyacetylenes from the leaves of *Vernonia scorpioides* (Asteraceae) and their antiproliferative and antiherpetic activities. **Phytochemistry**, v. 95, p. 375-383, 2013.

PUBCHEM, 2019. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 06 jun. 2019.

PRESTINACI, F.; PEZZOTTI, P.; PANTOSTI, A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. **Pathogens and Global Health**, v. 109, p. 309-318, 2015.

PRIESTAP, H. A.; VAN BAREN, C. M.; LIRA, P. L.; COUSSIO, J. D.; BANDONI, A. L. Volatile constituents of aristolochia argentina. **Phytochemistry**, v. 63, p. 221-225, 2003.

REDA, F. M.; EL-ZAWAHRY, Y.; OMAR, A. Synergistic effect of combined antibiotic and methanol extract of *Eucalyptus camaldulensis* leaf against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Applied Sciences and Biotechnology**, v. 5, p. 486-497, 2017.

RODRIGUES, K. C. M. **Caracterização química e investigação das atividades antibacteriana e anti-inflamatória tópica de *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae)**. 2013. 165 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

RODRIGUES, K. C. M.; CHIBLI, L. A.; SANTOS, B. C. S.; TEMPONI, V. S.; PINTO, N. C. C.; SCIO, E.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; ALVES, M. S.; SOUSA, O. V. Evidence of bioactive compounds from *Vernonia polyanthes* leaves with topical anti-inflammatory potential. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 1-16, 2016.

ROQUE, N.; BAUTISTA, H. P. **Asteraceae: caracterização e morfologia floral**. 10ª ed. Salvador: Editora da Universidade Federal da Bahia, 2008.

SAGA, T.; YAMAGUCHI, K. History of antimicrobial agents and resistant bacteria. **Japan Medical Association Journal**, v. 52, p. 103-108, 2009.

SANTANA, J. D. G. **Investigação da atividade antibacteriana do extrato de lavagem foliar e do glaucólido A de *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae)**. 2015. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2015.

SANTOS, S. A. O.; MARTINS, C.; PEREIRA, C.; SILVESTRE, A. J. D.; ROCHA, S. M. Current challenges and perspectives for the use of aqueous plant extracts in the management of bacterial infections: the case-study of *Salmonella enterica* serovars. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 940, 2019.

SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. I. **Natural products isolation**. 2ª ed. New Jersey: Humana Press Inc., 2006.

SCHMIDT, T. J.; WILLUHN, G. Sesquiterpene lactone and flavonoid variability of the *Arnica angustifolia* aggregate (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, p. 132-142, 2000.

SEO, J.; LEE, S.; ELAM, M. L.; JOHNSON, S. A.; KANG, J.; ARJMANDI, B. H. Study to find the best extraction solvent for use with guava leaves (*Psidium guajava* L.) for high antioxidant efficacy. **Food Science & Nutrition**, v. 2, p. 174-180, 2014.

SILVA, J. B. **Atividades hepatoprotetora *in vivo* e antibacteriana e anti-inflamatória *in vitro* de *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae Bencht. & Presl)**. 2017. 145 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2017.

SILVA, J. B.; TEMPONI, V. S.; GASPARETTO, C. M.; FABRI, R. L.; ARAGÃO, D. M. O.; PINTO, N. C. C.; RIBEIRO, A.; SCIO, E.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; DE SOUSA, O. V.;



ALVES, M. S. *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae): A promising source of antioxidants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 13, p. 1-9, 2013.

SILVA, N. C. C.; BARBOSA, L.; SEITO, L. N.; FERNANDES JUNIOR, A. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of crude extracts and essential oils from medicinal plants. **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters**, v. 26, p. 1510-1514, 2012.

SILVEIRA, R. R.; RÚBIO, C. R.; ALVES, M. J. Q. F. Modificações da diurese e da pressão arterial em ratos Wistar anestesiados, após a administração oral de infuso de assa-peixe (*Vernonia polyanthes* Less.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 2, p. 31-35, 2000.

SILVER, L. L. Challenges of antibacterial discovery. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, p. 71-109, 2011.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao Medicamento**. 6<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 2007.

SKALICKA-WOZ'NIAK, K.; GARRARD, I. Counter-current chromatography for the separation of terpenoids: a comprehensive review with respect to the solvent systems employed. **Phytochemistry Reviews: Proceedings of the Phytochemical Society of Europe**, v. 13, p. 547-572, 2014.

SOLDATI, G. T.; DE MEDEIROS, P. M.; DUQUE-BRASIL, R.; COELHO, F. M. G.; ALBUQUERQUE, U. P. How do people select plants for use? Matching the ecological apparency hypothesis with optimal foraging theory. **Environment, Development and Sustainability**, v. 19, p. 2143-2161, 2017.

SOTOMAYOR, J. A.; MARTINEZ, R. M.; GARCIA, A. J.; JORDAN, M. J. *Thymus zygis* subsp. *gracilis*: watering level effect on phytomass production and essential oil quality. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 5418-5424, 2004.

SOUSA, O. V.; MINATELI, M. M.; ALVES, M. S.; DENADAI, A. M. L.; SILVA FILHO, A. A.; YAMAMOTO, C. H.; AMARAL, M. P. H.; DEL-VECHIO VIEIRA, G. **Creme dermatológico contendo extrato etanólico de *Vernonia polyanthes* com efeito cicatrizante**. Depositante: Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) e FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS. BR 10 2016 029593 9. Depósito: 16 dez. 2016.

SOUZA, P. V. R.; MAZZEI, J. L.; SIANI, A. C.; BEHRENS, M. D. *Vernonia polyanthes* (Spreng.) Less.: uma visão geral da sua utilização como planta medicinal, composição química e atividades farmacológicas. **Revista Fitos**, v. 1, p. 105-115, 2017.

TEMPONI, V. S. **Investigação química e atividades farmacológicas de *Vernonia polyanthes* Less.** 2012. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2015.

TEMPONI, V. S.; SILVA, J. B.; ALVES, M. S.; RIBEIRO, A.; PINHO, J. J. R. G.; YAMAMOTO, C. H.; PINTO, M. A. O. P.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; SOUSA, O. V.

Antinociceptive and anti-inflammatory effects of ethanol extract from *Vernonia polyanthes* leaves in rodents. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 3887-3899, 2012.

TOYANG, N. J.; VERPOORTE, R. A review of the medicinal potentials of plants of the genus *Vernonia* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, p. 681-723, 2013.

THE PLANT LIST (2019). Compositae Family. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Compositae/>> Acesso em: 13 jan. 2019.

THEURETZBACHER, U. Antibiotic innovation for future public health needs. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 23, p. 713-717, 2017.

TIRILLINI, B.; VERDELLI, G.; PAOLOCCI, F.; CICCIOLO, P.; FRATTONI, M.; The volatile organic compounds from the mycelium of *Tuber borchii* Vitt. **Phytochemistry**, v. 55, p. 983-985, 2000.

TRÓPICOS, 2019a. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/MapsCountry.aspx?maptype=3&lookupid=2708839#>>. Acesso em: 13 jan. 2019.

TRÓPICOS, 2019b. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/50255940>>. Acesso em 13 jan. 2019.

VAN DUIJKEREN, E.; SCHINK, A.; ROBERTS, M. C.; WANG, Y.; SCHWARZ, S. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. **Microbiology Spectrum**, v. 6, p. 1-31, 2018.

VASSALLO, A.; DE TOMMASI, N.; MERFORT, I.; SANOGO, R.; SEVERINO, L.; PELIN, M.; LOGGIA, R. D.; TUBARO, A.; SOSA, S. Steroids with anti-inflammatory activity from *Vernonia nigritiana* Oliv. & Hiern. **Phytochemistry**, v. 96, p. 288-298, 2013.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **P & T : A peer-reviewed journal for formulary management**, v. 40, p. 277-83, 2015.

WAGNER, H. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Fitoterapia**, v. 82, p. 34-37, 2011.

WALTRICH, K. K.; HOSCHIED, J.; PROCHNAU I. S. Antimicrobial activity of crude extracts and fractions of *Vernonia polyanthes* Less (assa-peixe) flowers. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.17, p.909-914, 2015.

WANG, J. Y.; CHEN, H.; WANG, Y. Y.; WANG, X. Q.; CHEN, H. Y.; ZHANG, M.; TANG, Y.; ZHANG, B. Network pharmacological mechanisms of *Vernonia anthelmintica* (L.) in the treatment of vitiligo: isorhamnetin induction of melanogenesis via up-regulation of melanin-biosynthetic genes. **BMC Systems Biology**, v. 11, p. 103-115, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis**. Geneva, 2017a. 48 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Antibiotic resistance**. 2017b. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/>>. Acesso em: 21 jan. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis**. Geneva, 2017c. 88p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance**. Geneva, 2015. 50 p.

YOUN, U. J.; PARK, E.; KONDRATYUK, T. P.; SIMMONS, C. J.; BORRIS, R. P.; TANAMATAYARAT, P.; WONGWIWATTHANANUKIT, S.; TOYAMA, O.; SONGSAK, T.; PEZZUTO, J. M.; CHANG, L. C. Anti-inflammatory sesquiterpene lactones from the flower of *Vernonia cinerea*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 5559-5562, 2012.

ZAMAN, S. B.; HUSSAIN, M. A.; NYE, R.; MEHTA, V.; MAMUN, K. T.; HOSSAIN, N. A review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing. **Cureus**, v. 9, p. 1-9, 2017.

ZANON, B. R.; PEREIRA, D. F.; BOSCHETTI, T. K.; DOS SANTOS, M.; ATHAYDE, M. L. Phytoconstituents isolated from dichloromethane fraction of *Vernonia tweediana* Baker leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 226-229, 2008.

ZHANG, Q.; LIN, L.; YE, W. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. **Chinese Medicine**, v. 13, p. 1-26, 2018.

ZHAO, Y.; LI, J.; XU, Y.; DUAN, H.; FAN, W.; ZHAO, G. Extraction, preparation and identification of volatile compounds in Changyu XO brandy. **Chinese Journal of Chromatography**, v. 26, p. 212-222, 2008.

ZHOU, K.; ZHOU, W.; LI, P.; LIU, G.; ZHANG, J.; DAI, Y. Mode of action of pentocin 31-1: an antilisteria bacteriocin produced by *Lactobacillus pentosus* from Chinese traditional ham. **Food Control**, v. 19, p. 817-822, 2008.

**ANEXO A - Resultado do Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos (TSA) fornecido pelo sistema VITEK®2 para *Salmonella* spp. 1507708**

Hospital Universitario Clementino Fraga Filho - UFRJ  
 Serviço de Patologia clinica  
 Laboratorio de Bacteriologia

**Patient Report (Default)**

Nome, Sobrenome: [REDACTED]  
 Prontuario: [REDACTED]  
 Prontuario Alt: 436187  
 ...

Data de nascimento:  
 Sexo: Masculino  
 Serviço: Emergência  
 Localização/Enf:  
 Numero de amostras: 2  
 N. de Amostras Positivas: 2  
 Data de recebimento: 13/05/2011 02:55 PM  
 Tipo de Exame: Hemocultura  
 Resultado da cultura: Positive

Especime Clinico: Sangue  
 Sitio da coleta: periferico  
 Data da coleta: 13/05/2011 02:55 PM  
 Reg. do Laboratorio: 1507708  
 Comentarios:

Numero do  
 Isolado: 1  
 Salmonella group <salgrp>

	1 salgrp	
	MIC	Cat.
Amicacina	<=2	R
Amoxicilina/Ácido clavulânico	8	S
Ampicilina	>=32	R
Cefepima	<=1	S
Cefotaxima	<=1	S
Cefoxitina	<=4	R
Ceftazidima	<=1	S
Ciprofloxacina	>=4	R
Ertapenem	<=0.5	S
Gentamicina	>=16	R
Levofloxacina	>=8	R
Meropenem	<=0.25	S
Nitrofurantoína	<=16	S
Piperacilina/Tazobactam	16	S
Trimetoprim/Sulfametoxazol	>=320	R
Ácido Nalidixico	>=32	R

\*Deduced

**ANEXO B - Resultado do Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos (TSA) fornecido pelo sistema VITEK®2 para *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. Enteritidis 1428260**

Laboratorio de bacteriologia

Cliente bioMerieux: 123  
Nº do Sistema: 123

Relatório do Laboratório

Impresso a 13/Fev/2017 09:55 GMT-03:00  
Impresso por: adriana

Nome do Doente: [REDACTED]  
Grupo de Isolados: 1428260-1

ID do Doente: 467186

Bionúmero: 0015810461006200  
Microorganismo Seleccionado: Salmonella ser. Enteritidis

Informações de Sensibilidade	Carta:	AST-N105	Nº de Lote:	415146410	Data de Validade:	Dec 17, 2010 12:00 GMT-03:00
	Concluído:	Aug 13, 2010 19:08 GMT-03:00	Estado:	Final	Hora da Análise:	7,25 Horas
<b>Antibiótico</b>	<b>CMI</b>	<b>Interpretação</b>	<b>Antibiótico</b>	<b>CMI</b>	<b>Interpretação</b>	
ESBL			Aztreonam	<= 1	S	
Ampicillin	<= 2	S	Ertapenem	<= 0.5	S	
Ampicillin/Sulbactam	<= 2	S	Imipenem	<= 1	S	
Piperacillin/Tazobactam	<= 4	S	Meropenem	<= 0.25	S	
Cefalotin	<= 2	*R	Amikacin	<= 2	*R	
Cefoxitin	<= 4	*R	Gentamicin	<= 1	*R	
Cefotaxime	<= 1	S	Ciprofloxacin	<= 0.25	S	
Ceftazidime	<= 1	S	Tigecycline	1	S	
Cefepime	<= 1	S	Colistin	<= 0.5	S	

+ = Antibiótico Deduzido \* = Modificação do AES \*\* = Modificado pelo Utilizador

Resultados AES:	Última Modificação: May 11, 2010 11:40 GMT-03:00	Conjunto de Parâmetros: Copy of Global+Natural Resistance
Nível de Confiança:	Consistent	

Ação	Nome (ID Utilizador)	Data/Hora	Comentário
Revisto por:	(Elizabeth)	Aug 17, 2010 10:00 GMT-03:00	
Revisto por:	(leomar)	Aug 25, 2010 07:43 GMT-03:00	

**ANEXO C - Carta de aceite para apresentação do resumo intitulado "*Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae Bercht. & J. Presl): a promising natural species with antibiotic effect" no 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 06 a 09 de outubro de 2019, Maceió, Alagoas**

**30º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA  
2019**

Centro Cultural e de Exposições Ruth Cardoso  
De 06 de outubro de 2019 a 09 de outubro de 2019 Maceió - Alagoas

[ [Menu Principal](#) / [Menú Principal](#) / [Main Menu](#) ]

Prezado(a) Ygor Ferreira Garcia da Costa

**Carta de Aceite**

Declaramos que o resumo submetido por FERNANDES, L. S. <sup>1</sup>, COSTA, Y. F. G. <sup>1</sup>, MORAES, W. G. <sup>1</sup>, FURTADO, A. C. <sup>1</sup>, RODRIGUES, S. P. <sup>1</sup>, MOREIRA, N. F. <sup>1</sup>, SCIO, E. <sup>1</sup>, SOUSA, O. V. <sup>1</sup>, ARAÚJO, A. L. S. M. <sup>1</sup>, ALVES, M. S. <sup>1</sup> UFJF - Universidade Federal de Juiz de Fora (R. José Lourenço Kelmer s/n, Campus Universitário, São Pedro, Juiz de Fora - MG), intitulado **Vernonia polyanthes LESS. (ASTERACEAE BERCHT. & J. PRESL): A PROMISING NATURAL SPECIES WITH ANTIBIOTIC EFFECT** foi aceito para apresentação em forma de pôster no **30º Congresso Brasileiro de Microbiologia 2019** que será realizado de 6 a 9 de outubro de 2019 no Centro Cultural e de Exposições Ruth Cardoso em Maceió, Alagoas, Brasil.

Área: Microbiologia Clínica e Infecção Hospitalar

Subárea: Teste de sensibilidade aos antibacterianos

Número do Painel: Em breve

Data de apresentação: Em breve ( **NÃO SERÁ POSSÍVEL ALTERAR A DATA DA APRESENTAÇÃO** )

Local: Centro Cultural e de Exposições Ruth Cardoso



**APÊNDICE A - Resumo intitulado "*Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae Bercht. & J. Presl): a promising natural species with antibiotic effect" será apresentado na forma de pôster no 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 06 a 09 de outubro de 2019, Maceió, Alagoas**

**TITLE:** *Vernonia polyanthes* LESS. (ASTERACEAE BERCHT. & J. PRESL): A PROMISING NATURAL SPECIES WITH ANTIBIOTIC EFFECT

**AUTHORS:** FERNANDES, L. S.<sup>1</sup>; COSTA, Y. F. G.<sup>1</sup>; MORAES, W. G.<sup>1</sup>; FURTADO, A. C.<sup>1</sup>; RODRIGUES, S. P.<sup>1</sup>; MOREIRA, N. F.<sup>1</sup>; SCIO, E.<sup>2</sup>; SOUSA, O. V.<sup>3</sup>; ARAÚJO, A. L. S. M.<sup>3</sup>; ALVES, M. S.<sup>1</sup>

**INSTITUTION:** <sup>1</sup>LABORATÓRIO DE BIOATIVIDADE CELULAR E MOLECULAR, CENTRO DE PESQUISAS FARMACÊUTICAS, FACULDADE DE FARMÁCIA, UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA, RUA JOSÉ LOURENÇO KELMER S/N, CAMPUS UNIVERSITÁRIO, SÃO PEDRO, 36036-900, JUIZ DE FORA, MINAS GERAIS, BRAZIL; <sup>2</sup>LABORATÓRIO DE PRODUTOS NATURAIS BIOATIVOS, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA, RUA JOSÉ LOURENÇO KELMER S/N, CAMPUS UNIVERSITÁRIO, SÃO PEDRO, 36036-900, JUIZ DE FORA, MINAS GERAIS, BRAZIL; <sup>3</sup>LABORATÓRIO DE QUÍMICA BIOMEDICINAL E FARMACOLOGIA APLICADA, FACULDADE DE FARMÁCIA, UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA, RUA JOSÉ LOURENÇO KELMER S/N, CAMPUS UNIVERSITÁRIO, SÃO PEDRO, 36036-900, JUIZ DE FORA, MINAS GERAIS, BRAZIL

**ABSTRACT:**

*Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae Bercht. & J. Presl), popularly known in Brazil as "assa-peixe", is a Brazilian native species widely used in the Traditional and Complementary Medicine. Traditionally, this medicinal plant is used to treat cold, flu, bronchitis, gastrointestinal and kidney disorders, uterine infections, ulcers and fever. With this context in mind, the present study aimed to realize the chemical characterization and to evaluate the antibiotic potential of dichloromethane fractions from leaves (DL-Vp) and flowers (DF-Vp) of *V. polyanthes*. The chemical characterization was carried out by High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection (HPLC-DAD). The antibiotic potential was determined by the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) using the broth microdilution method according to Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines, and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) followed by the classification of the antibiotic effect using Andrews' method. The ATCC<sup>®</sup> reference strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC<sup>®</sup> 6538<sup>™</sup>, ATCC<sup>®</sup> 25923<sup>™</sup> and ATCC<sup>®</sup> 29213<sup>™</sup>), *Escherichia coli* (ATCC<sup>®</sup> 10536<sup>™</sup> and ATCC<sup>®</sup> 25922<sup>™</sup>), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis (ATCC<sup>®</sup> 10708<sup>™</sup>), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (ATCC<sup>®</sup> 13311<sup>™</sup>), and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC<sup>®</sup> 9027<sup>™</sup> and ATCC<sup>®</sup> 27853<sup>™</sup>) were tested. The chemical characterization of DL-Vp and DF-Vp suggested the presence of flavones and flavonols in both of them. Considering these fractions, DL-Vp revealed the most expressive activity, being active against *E. coli* (ATCC<sup>®</sup> 10536<sup>™</sup> and ATCC<sup>®</sup> 25922<sup>™</sup>), *S. Choleraesuis* (ATCC<sup>®</sup> 10708<sup>™</sup>), and *S. Typhimurium* (ATCC<sup>®</sup> 13311<sup>™</sup>), with MIC values of 625 µg/mL and bacteriostatic effect. Probably, the antibiotic effect is related to the presence of flavones and flavonols. These results suggest that *V. polyanthes* is a promising natural source of bioactive substances, like flavones and flavonols, with antibiotic potential which confer scientific support for its popular use mainly in gastrointestinal disorders caused by *E. coli* or *Salmonella* strains.

**Keywords:** *Vernonia polyanthes*; Flavonoids; Gastrointestinal diseases; *Salmonella*; *Escherichia coli*.