



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

Jônatas Rodrigues Florencio

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.)

Juiz de Fora

2017

Jônatas Rodrigues Florencio

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.)

Dissertação de Mestrado 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

Juiz de Fora

2017

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

Rodrigues Florencio , Jônatas.

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.) / Jônatas Rodrigues Florencio . -- 2017.

122 f.

Orientadora: Maria Silvana Alves

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2017.

1. *Vernonia polyanthes*. 2. Asteraceae. 3. Glaucolídeo A. 4. Antibacterianos. 5. *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina.. I. Alves, Maria Silvana, orient. II. Título.

Jônatas Rodrigues Florencio

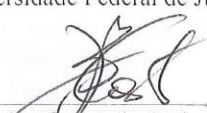
Análise do perfil químico e investigação do potencial antibacteriano e da toxidez *in vitro* dos extratos de lavagem foliar e floral de *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae Bercht. & Presl.)

Dissertação de Mestrado 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

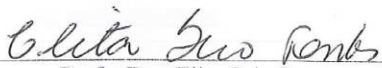
Aprovada em 27 de julho de 2017

BANCA EXAMINADORA

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



Prof. Dr. Fernando Batista da Costa
Universidade de São Paulo



Profa. Dra. Elita Scio Fontes
Universidade Federal de Juiz de Fora

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por essa oportunidade e por ter me dado força e me guiado até o fim;

Aos meus pais, Jair e Emília, por todo apoio e sacrifício que fizeram para eu poder concluir essa etapa da minha vida;

À minha amada Maria Clara Machado, pelo companheirismo, carinho, apoio e colaboração para a realização desse estudo. Sem sua inspiração nada seria possível;

À Profa. Dra. Maria Silvana Alves, por ter me aceito, pela paciência em me orientar e incentivo à carreira acadêmica, e por todo o esforço realizado para que eu pudesse concluir com qualidade essa importante etapa de minha qualificação profissional;

Ao Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa, por abrir as portas do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais, onde foram realizados os procedimentos de determinação dos teores de fenóis e flavonoides totais, e pela contribuição científica imprescindível na análise dos resultados obtidos;

Ao Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho, por abrir as portas do Núcleo de Identificação e Pesquisa de Princípios Ativos Naturais - NIPPAN, onde foram realizados os experimentos de isolamento e purificação de substâncias, e por sua colaboração científica essencial na interpretação dos dados;

À Profa. Dra. Elita Scio Fontes, pela colaboração científica e auxílio fornecidos desde minha Graduação, quando trilhei meus primeiros passos no desafio da pesquisa como bolsista de Iniciação Científica;

Aos Doutores Jucélia Barbosa da Silva e Nicolas de Castro Campos Pinto, pela amizade, interesse e disposição em me ajudar em vários momentos. Sou muito grato a vocês e espero que alcancem todos os seus objetivos;

Ao Mestre Oscar Alejandro Santos Mayorga, que se tornou meu amigo, irmão e parceiro, contribuindo em todas as etapas e execução desse estudo. Desejo-lhe todo sucesso e realização na sua vida profissional e pessoal;

Aos amigos do Laboratório de Bioatividade Celular e Molecular do Centro de Pesquisas Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora: Alice Campos Furtado, Carolina Feres Netto, Carolina Souza Ponciano, Damaris Salgueiro Dias da Silva, Dionnata Martins Pedrosa, Paula Fernandes da Costa Franklin e Ygor Ferreira Garcia da Costa, acadêmicos do Curso de Farmácia dessa Instituição, e Jordana Damasceno Gitirana de Santana, Mestre em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela amizade, boa vontade e disposição em me auxiliar sempre que foi preciso. Desejo-lhes sucesso nas suas trajetórias;

Aos Técnicos Administrativos em Educação (TAEs) Éder Luís Tostes, Fázia de Oliveira Sales e Jésus de Paula Sarmiento, pelo auxílio nos trabalhos e por serem muito prestativos no desempenho de suas funções;

Aos secretários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Arlem Martins de Rezende e Sullivan Ramos Moreira Andrade, por todo o auxílio e amizade durante esse período;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo suporte financeiro por meio do aporte de recursos no projeto "Potencial antimicrobiano de produtos naturais frente às amostras de referência e detentoras de determinantes de resistência de relevância clínica" (CDS-APQ-04680-10), o que viabilizou parcialmente a realização do presente trabalho, à Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelos auxílios financeiros para participação em eventos e pela bolsa concedida, respectivamente;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade e infraestrutura para realização dos trabalhos de pesquisa;

Ao meu grande amigo Prof. Dr. Rodrigo Luiz Fabri, pela oportunidade de iniciação à pesquisa e incentivo à carreira acadêmica, além de todo apoio;

Finalmente, a todos os amigos que, direta ou indiretamente, deram sua colaboração e amizade, tornando o caminho mais fácil de percorrer; muito obrigado!

*"Pisando na grama, roubando rosas
As melhores ideias são as perigosas
Se acomode ou se incomode
A fé não vale de nada pra mente preguiçosa."
Filipe Ret*

RESUMO

Vernonia polyanthes Less. (Asteraceae Bercht. & Presl.), popularmente conhecida como assa-peixe, é uma espécie vegetal nativa da América do Sul, especialmente no Brasil, sendo tradicionalmente usada em processos infecciosos e inflamatórios. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo analisar o perfil químico e investigar o potencial antibacteriano e a toxidez *in vitro* dos extratos de lavagem foliar (EL-Vp) e floral (EF-Vp) de *V. polyanthes*. O perfil químico foi analisado por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) e, espectrofotometricamente, através da quantificação de fenóis e flavonoides totais. A atividade antibacteriana *in vitro* foi avaliada por meio das determinações da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) seguida da classificação do efeito antibacteriano como bactericida ou bacteriostático frente a oito cepas de referência ATCC® e dez de rotina. O efeito combinatório foi investigado pelo método de *checkerboard*, enquanto o modo de ação foi analisado por meio dos testes de *time kill*, viabilidade celular bacteriana e extravasamento (*leakage*) de compostos absorvidos a 280 nm. A toxidez foi estabelecida através dos testes de toxicidade aguda pelo bioensaio de *Artemia salina* e de viabilidade celular pelo método de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). A análise do perfil cromatográfico por CLAE-DAD em 230 nm revelou a presença de quatro picos em EL-Vp e três no EF-Vp, sendo que glaucolídeo A [pico 1, com tempo de retenção (t_R) de 20,3 min] foi o provável majoritário em ambos os extratos. Os espectros UV obtidos sugeriram a presença de lactonas e flavonoides. Os teores de fenóis e flavonoides totais foram de $1,41 \pm 0,04$ e $2,16 \pm 0,04$ g/100 g e de $16,55 \pm 0,01$ e $6,28 \pm 0,01$ g/100 g, nessa ordem, para EL-Vp e EF-Vp, respectivamente. EF-Vp e EL-Vp foram ativos frente à *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC® 25923™), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC® 29213™), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853™), *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) 1485279, 1605677, 1664534, 1688441 e 1830466, com CIM variando de 78 a 5000 µg/mL. Ainda, EL-Vp inibiu o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 9027™) (CIM = 5000 µg/mL) e glaucolídeo A foi ativo frente a *S. aureus* (ATCC® 25923™) e *S. aureus* (ATCC® 29213™) (CIM = 750 µg/mL). Com base nos valores de CIM obtidos, a atividade antibacteriana foi considerada significativa, moderada ou fraca, na dependência da cepa bacteriana testada. Combinados, EF-Vp e cloranfenicol (CHL) revelaram sinergismo parcial frente à *S. aureus* (ATCC® 29213™) e sem efeito frente à *S. aureus* (ATCC® 25923™) e MRSA 1485279, com redução de 50% da CIM de CHL no caso do efeito sinérgico parcial. O ensaio de *time kill* mostrou a redução da taxa de multiplicação bacteriana dependendo da concentração e da cepa testada e efeito bactericida em 24 h de observação. O teste de viabilidade celular bacteriana, realizado para determinar o número de Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC/mL) capaz de sobreviver após uma hora de exposição à EL-Vp ou EF-Vp, demonstrou que EF-Vp foi mais ativo que EL-Vp, inviabilizando um maior número de células bacterianas. O extravasamento de compostos absorvidos a 280 nm revelou que ambos os extratos provavelmente causam dano na membrana celular, permitindo a liberação do conteúdo da célula bacteriana. Quanto à toxidez, no bioensaio com *A. salina*, EL-Vp, EF-Vp e glaucolídeo A apresentaram valores de CL_{50} iguais a 3706, 2655 e 2653 µg/mL, respectivamente, sendo considerados atóxicos frente a esses microcrustáceos com base no critério de Meyer e colaboradores (1982) ($CL_{50} > 1000$ µg/mL). O teste de viabilidade celular com MTT, por sua vez, revelou que EL-Vp (30 µg/mL) e glaucolídeo A (10 e 20 µg/mL) inviabilizaram as células RAW 264.7 de forma significativa quando comparados a DMSO 5%, mostrando-se tóxicos. Os resultados obtidos sugerem que *V. polyanthes* é uma fonte natural de substâncias com potencial antibacteriano demonstrado por meio dos efeitos antibiótico e sinérgico, inviabilizando as células bacterianas por provável desestabilização da membrana celular, especialmente das cepas *S. aureus* e MRSA testadas, e que o glaucolídeo A, isoladamente, parece não ser o responsável por essa atividade antibacteriana.

Palavras-chave: *Vernonia polyanthes*. Asteraceae. Glaucolídeo A. Antibacterianos. *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina.

ABSTRACT

Vernonia polyanthes Less. (Asteraceae Bercht. & Presl.), popularly known as "assa-peixe", is a South America native species, especially in Brazil, being traditionally used in infectious and inflammatory processes. In this context, the current study aimed to analyze the chemical profile and investigate the *in vitro* antibacterial potential and toxicity of *V. polyanthes* leaves (EL-Vp) and flowers (EF-Vp) rinse extracts. The chemical profile was analyzed by High Performance Liquid Chromatography coupled with Diode Array Detection (HPLC-DAD) and, spectrophotometrically, through the quantification of total phenol and flavonoid. The *in vitro* antibacterial activity was evaluated through the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (MBC), followed by the classification of the antibacterial effect as bactericidal or bacteriostatic against eight ATCC[®] references and ten routine strains. The combinatory effect was investigated by the checkerboard method, while the mode of action was analyzed through the time kill, bacterial cell viability and leakage of compounds absorbing at 280 nm assays. The toxicity was established through the acute toxicity by brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay and cell viability using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method. The chromatographic profile analysis by HPLC-DAD at 230 nm revealed the presence of four peaks in EL-Vp and three in EF-Vp, and glaucolide A [peak 1, with retention time (t_R) of 20.3 min] was the probable majority in both extracts. The UV spectra suggested the presence of lactones and flavonoids. Total phenol and flavonoid contents were 1.41 ± 0.04 and 2.16 ± 0.04 g/100 g and 16.55 ± 0.01 and 6.28 ± 0.01 g/100 g, in this order, for EL-Vp and EF-Vp, respectively. EF-Vp and EL-Vp were active against *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC[®] 25923[™]), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC[®] 29213[™]), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC[®] 27853[™]), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 1485279, 1605677, 1664534, 1688441 and 1830466, with MIC ranging from 78 to 5000 $\mu\text{g/mL}$. In addition, EL-Vp inhibited the growth of *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC[®] 9027[™]) (MIC = 5000 $\mu\text{g/mL}$) and glaucolide A was active against *S. aureus* (ATCC[®] 25923[™]) and *S. aureus* (ATCC[®] 29213[™]) (MIC = 750 $\mu\text{g/mL}$). Based on the MIC values, the antibacterial activity was considered significant, moderate or weak, depending on the bacterial strain tested. Combined, EF-Vp and chloramphenicol (CHL) revealed partial synergism against *S. aureus* (ATCC[®] 29213[™]) and no effect against *S. aureus* (ATCC[®] 25923[™]) and MRSA 1485279, with a 50% reduction of MIC CHL in the case of the partial synergistic effect. The time kill assay showed a reduction in bacterial growth rate depending on the concentration and strain tested and bactericidal effect in 24 h of observation. The bacterial cell viability test performed to determine the number of colony forming units per mL (CFU/mL), capable of surviving after one h of EL-Vp or EF-Vp exposure, demonstrated that EF-Vp was more active than EL-Vp, reducing a greater number of bacterial cells. The leakage of compounds absorbing at 280 nm revealed that both extracts probably cause damage in the cell membrane, allowing the release of the bacterial cell content. Regarding the toxicity, in the brine shrimp bioassay, EL-Vp, EF-Vp and glaucolide A presented LC₅₀ values equal to 3706, 2655 and 2653 $\mu\text{g/mL}$, respectively, being considered nontoxic against *A. salina* based on Meyer et al. (1982) criteria (LC₅₀ > 1000 $\mu\text{g/mL}$). On the other hand, the MTT cell viability test revealed that EL-Vp (30 $\mu\text{g/mL}$) and glaucolide A (10 and 20 $\mu\text{g/mL}$) significantly impaired RAW 264.7 cells when compared to 5% DMSO. These results suggest that *V. polyanthes* is a natural source of substances with antibacterial potential demonstrated by the antibiotic and synergistic effects, making bacterial cells unfeasible due to the probable destabilization of the cell membrane, especially of *S. aureus* and MRSA strains tested, and that glaucolide A, alone, does not appear to be responsible for this antibacterial activity.

Keywords: *Vernonia polyanthes*. Asteraceae. Glaucolide A. Anti-Bacterial Agents. *Staphylococcus aureus*. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mapa da distribuição geográfica mundial de <i>Vernonia polyanthes</i>	26
Figura 2 - Fotografia (A) das inflorescências e (B) das partes aéreas de <i>Vernonia polyanthes</i> coletadas no Horto Medicinal da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora em agosto de 2015.....	27
Figura 3 - Fotografia do tricoma glandular, sinalizado pela seta de cor preta, presente na face adaxial da folha de <i>Vernonia polyanthes</i>	27
Figura 4 - Fotografia da flor de <i>Vernonia polyanthes</i> no início da maturação.....	28
Figura 5 - Esquema representativo dos fatores que interferem na produção de metabólitos secundários.....	30
Figura 6 - Imagem ilustrativa dos principais fatores que podem influenciar no acúmulo de metabólitos secundários em plantas.....	31
Figura 7 - Esquema ilustrativo da rota das principais classes de substâncias provenientes dos metabolismos primário e secundário de plantas.....	32
Figura 8 - Representação da estrutura química básica dos flavonoides.....	34
Figura 9 - Imagem ilustrativa da estrutura química das subclasses dos flavonoides.....	34
Figura 10 - Imagem ilustrativa da biogênese das lactonas sesquiterpênicas.....	36
Figura 11 - Imagem ilustrativa da estrutura química dos esqueletos carbônicos e das relações biogênicas das subclasses de lactonas sesquiterpênicas.....	36
Figura 12 - Imagem ilustrativa da estrutura química do grupo α -metileno- γ -lactona.....	37
Figura 13 - Lista prioritária global de bactérias resistentes a antibióticos para guiar a pesquisa, descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos publicada pela Organização Mundial da Saúde em 2017.....	38
Figura 14 - Fotografia da (a) arvoreta, (b) flores maduras, e (c) folhas recém-colhidas de <i>Vernonia polyanthes</i> cultivada no Horto Medicinal da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora em agosto de 2015 (período de floração).....	42
Figura 15 - Esquema ilustrativo do procedimento de obtenção dos extratos de lavagem foliar (EL-Vp) e floral (EF-Vp) de <i>Vernonia polyanthes</i>	44
Figura 16 - Fotografia da Cromatografia em Camada Delgada realizada com luteolina (1), extrato VP (2), apigenina (3), extrato de lavagem foliar de <i>Vernonia polyanthes</i> (EL-Vp) (4), glaucolídeo A (5), extrato de lavagem floral de <i>Vernonia polyanthes</i> (EF-Vp) (6) e Vp5-7 (fração obtida por Santana, 2015) (7), revelada a 254 nm, 356 nm e com vanilina sulfúrica..	45
Figura 17 - Fotografia da coluna do extrato de lavagem floral de <i>Vernonia polyanthes</i> submetido à Cromatografia Líquida à Vácuo.....	46
Figura 18 - Fotografia da coluna do extrato de lavagem foliar de <i>Vernonia polyanthes</i> submetido à Cromatografia Líquida à Vácuo.....	47
Figura 19 - Imagem ilustrativa do preparo da microplaca utilizada para determinação da Concentração Inibitória Mínima pelo método de microdiluição em caldo dos extratos de lavagem foliar (EL-Vp) e floral (EF-Vp) de <i>Vernonia polyanthes</i> e do glaucolídeo A.....	59
Figura 20 - Imagem ilustrativa do preparo da microplaca utilizada para determinação da Concentração Inibitória Mínima pelo método de diluição em caldo de ampicilina (AMP) e cloranfenicol (CHL) e controles positivo e negativo.....	59
Figura 21 - Esquema ilustrativo do procedimento de diluição seriada realizada em microplaca para determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	60
Figura 22 - Imagem ilustrativa dos procedimentos para determinação da Concentração Bactericida Mínima e para classificação do efeito antibacteriano como bactericida ou bacteriostático.....	62
Figura 23 - Imagem ilustrativa do preparo da microplaca para realização do método de <i>checkerboard</i>	64

Figura 24 - Imagem gráfica da curva de calibração do ácido gálico	69
Figura 25 - Imagem gráfica da curva de calibração da rutina	70
Figura 26 - Perfil cromatográfico do (A) extrato de lavagem foliar de <i>Vernonia polyanthes</i> , (B) extrato de lavagem floral de <i>Vernonia polyanthes</i> , e (C) glaucolídeo A, obtido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Detecção por Arranjo de Diodo a 230 nm e respectivos espectros de absorção dos principais picos detectados	72
Figura 27 - Relação entre a porcentagem de morte de <i>Artemia salina</i> e a concentração do extrato de lavagem foliar de <i>Vernonia polyanthes</i>	74
Figura 28 - Relação entre a porcentagem de morte de <i>Artemia salina</i> e a concentração do extrato de lavagem floral de <i>Vernonia polyanthes</i>	74
Figura 29 - Relação entre a porcentagem de morte de <i>Artemia salina</i> e a concentração do glaucolídeo A.....	75
Figura 30 - Avaliação da citotoxicidade do extrato de lavagem foliar de <i>Vernonia polyanthes</i> (EL-Vp) por meio do ensaio de viabilidade celular utilizando linhagem de célula não tumoral RAW 264.7.....	76
Figura 31 - Avaliação da citotoxicidade do glaucolídeo A por meio do ensaio de viabilidade celular utilizando linhagem de célula não tumoral RAW 264.7.....	76
Figura 32 - Curva da cinética bacteriana de <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC [®] 25923) frente ao extrato de lavagem foliar de <i>Vernonia polyanthes</i> (EL-Vp), ampicilina (AMP) e cloranfenicol (CHL)	87
Figura 33 - Curva da cinética bacteriana de <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC [®] 25923) frente ao extrato de lavagem floral de <i>Vernonia polyanthes</i> (EF-Vp), ampicilina (AMP) e cloranfenicol (CHL)	88
Figura 34 - Curva da cinética bacteriana de <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC [®] 29213) frente ao extrato de lavagem foliar de <i>Vernonia polyanthes</i> (EL-Vp), ampicilina (AMP) e cloranfenicol (CHL)	88
Figura 35 - Curva da cinética bacteriana de <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC [®] 29213) frente ao extrato de lavagem floral de <i>Vernonia polyanthes</i> (EF-Vp), ampicilina (AMP) e cloranfenicol (CHL)	89
Figura 36 - Curva da cinética bacteriana de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilicina (MRSA) 1485279 frente ao extrato de lavagem foliar de <i>Vernonia polyanthes</i> (EL-Vp), ampicilina (AMP) e cloranfenicol (CHL).....	89
Figura 37 - Curva da cinética bacteriana de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilicina (MRSA) 1485279 frente ao extrato de lavagem floral de <i>Vernonia polyanthes</i> (EF-Vp), ampicilina (AMP) e cloranfenicol (CHL).....	90
Figura 38 - Resultado da viabilidade de <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC [®] 25923) após exposição aos extratos de lavagem foliar (EL-Vp) e floral (EF-Vp) de <i>Vernonia polyanthes</i> , ampicilina (AMP) e cloranfenicol (CHL).....	91
Figura 39 - Resultado da viabilidade de <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC [®] 29213) após exposição aos extratos de lavagem foliar (EL-Vp) e floral (EF-Vp) de <i>Vernonia polyanthes</i> , ampicilina (AMP) e cloranfenicol (CHL).....	91
Figura 40 - Resultado da viabilidade de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilicina (MRSA) 1485279 após exposição aos extratos de lavagem foliar (EL-Vp) e floral (EF-Vp) de <i>Vernonia polyanthes</i> , ampicilina (AMP) e cloranfenicol (CHL)	92
Figura 41 - Resultado do extravasamento de substâncias absorvidas a 280 nm de <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC [®] 25923) frente aos extratos de lavagem foliar (EL-Vp) e floral (EF-Vp) de <i>Vernonia polyanthes</i> , ampicilina (AMP) e cloranfenicol (CHL).....	93
Figura 42 - Resultado do extravasamento de substâncias absorvidas a 280 nm de <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC [®] 29213) frente aos extratos de lavagem foliar (EL-Vp) e floral (EF-Vp) de <i>Vernonia polyanthes</i> , ampicilina (AMP) e cloranfenicol (CHL).....	93

Figura 43 - Resultado do extravasamento de substâncias absorvidas a 280 nm de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) 1485279 frente aos extratos de lavagem foliar (EL-Vp) e floral (EF-Vp) de *Vernonia polyanthes*, ampicilina (AMP) e cloranfenicol (CHL) 93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Organização dos tubos de ensaio e volumes das amostras e reagentes utilizados no preparo de diluições empregadas para a determinação do teor de flavonoides totais por meio de método colorimétrico utilizando cloreto de alumínio (AlCl ₃)	50
Tabela 2 - Valores dos pontos de corte de Concentração Inibitória Mínima para controle de qualidade do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos de organismos não fastidiosos....	56
Tabela 3 - Descrição dos solventes e diluentes utilizados no preparo das soluções-estoque empregadas no método de microdiluição em caldo usado para determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	58
Tabela 4 - Resultados da massa (g) e do rendimento (%) dos extratos de lavagem foliar (EL-Vp) e floral (EF-Vp) de <i>Vernonia polyanthes</i> obtidos em agosto de 2015	67
Tabela 5 - Resultados da massa (g) e rendimento (%) das frações obtidas do extrato de lavagem floral (EF-Vp) e respectivas fases móveis utilizadas	68
Tabela 6 - Resultados da massa (g) e rendimento (%) das frações obtidas do extrato de lavagem foliar (EL-Vp) e respectivas fases móveis utilizadas.....	68
Tabela 7 - Valores dos teores de fenóis e flavonoides totais dos extratos de lavagem foliar e floral de <i>Vernonia polyanthes</i>	70
Tabela 8 - Tempo de retenção e área sob a curva dos picos detectados nos cromatogramas obtidos por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Detecção por Arranjo de Diodo no comprimento de onda de 230 nm para os extratos de lavagem foliar e floral de <i>Vernonia polyanthes</i> e glaucolídeo A	73
Tabela 9 - Valores da Concentração Inibitória Mínima e da Concentração Bactericida Mínima dos extratos de lavagem foliar e floral de <i>Vernonia polyanthes</i> , do glaucolídeo A, da ampicilina e do cloranfenicol frente às cepas de referência ATCC [®]	78
Tabela 10 - Valores da Concentração Inibitória Mínima e da Concentração Bactericida Mínima dos extratos de lavagem foliar e floral de <i>Vernonia polyanthes</i> , do glaucolídeo A, da ampicilina e do cloranfenicol frente às cepas de rotina	80
Tabela 11 - Valores da Concentração Inibitória Mínima e da Concentração Bactericida Mínima do extrato de lavagem floral de <i>Vernonia polyanthes</i> , das frações F ₄ , F ₅ e F ₆ desse extrato, do glaucolídeo A, da ampicilina e do cloranfenicol frente às cepas de referência ATCC [®] e de rotina.....	82
Tabela 12 - Valores da Concentração Inibitória Mínima e da Concentração Bactericida Mínima do extrato de lavagem foliar de <i>Vernonia polyanthes</i> e das frações F ₁ a F ₇ desse extrato, da ampicilina e do cloranfenicol frente às cepas de referência ATCC [®] e de rotina....	84
Tabela 13 - Valores das Concentrações Inibitórias Mínimas individuais e combinadas dos extratos de lavagem foliar e floral de <i>Vernonia polyanthes</i> , glaucolídeo A e cloranfenicol frente à <i>S. aureus</i> (ATCC [®] 25923), <i>S. aureus</i> (ATCC [®] 29213) e <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA) 1485279	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorção
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AMH	Ágar Müeller-Hinton
AMP	Ampicilina
ATCC	do inglês <i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CESJ	Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Detecção por Arranjo de Diodos
CLV	Cromatografia Líquida à Vácuo
CLSI	do inglês <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMH	Caldo Müeller-Hinton
CPM	Controle positivo dos meios utilizados
CNA	Controle negativo dos antibióticos
CNE	Controle negativo dos extratos
CNM	Controle negativo dos meios
CTT	Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
DAD	Detector de arranjo
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	do inglês <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FDA	do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FICI	do inglês <i>Fractional Inhibitory Concentration Index</i>
FRAP	do inglês <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
HPLC	do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ICB	Instituto de Ciências Biológicas

INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
ISC	Interferência do sistema solvente/diluente sobre o crescimento bacteriano
ISM	Interferência do sistema solvente/diluente sobre o meio de cultura
LSTs	Lactonas sesquiterpênicas
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-ila)-2,5-difeniltetrazólio
MRSA	do inglês <i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
NCBI	do inglês <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NIPPAN	Núcleo de Identificação e Pesquisa em Princípios Ativos Naturais
OMS	Organização Mundial da Saúde
PANCs	Plantas Alimentícias Não Convencionais
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde
S	do inglês <i>South</i>
SE	Solução-estoque
TSB	do inglês <i>Trypticase Soy Broth</i>
Tween 80	Monopalmitato de polioxietileno sorbitano a 80%
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UV	Ultravioleta
Vp	<i>Vernonia polyanthes</i>
EF-Vp	Extrato de lavagem floral de <i>Vernonia polyanthes</i>
EL-Vp	Extrato de lavagem foliar de <i>Vernonia polyanthes</i>
VRSA	do inglês <i>Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
W	do inglês <i>West</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

A_{ar}	Absorbância após a reação
AA%	Porcentagem de Atividade Antioxidante
NaCl	Cloreto de sódio
Na_2CO_3	Carbonato de sódio
t_R	Tempo de retenção
% I	Porcentagem de inibição

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	24
2.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DA ESPÉCIE VEGETAL ESTUDADA.....	24
2.1.1 A Família Asteraceae Bercht. & Presl.....	24
2.1.2 O gênero <i>Vernonia</i> Schreb.	25
2.1.3 A espécie <i>Vernonia polyanthes</i> Less.	26
2.2 A METABOLÔMICA E SUA RELAÇÃO COM A EXPRESSÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	29
2.3 METABOLISMO VEGETAL	31
2.3.1 Substâncias fenólicas provenientes do metabolismo secundário.....	33
2.3.2 Flavonoides.....	33
2.3.3 Lactonas sesquiterpênicas (LSTs)	35
2.4 RESISTÊNCIA BACTERIANA E A URGÊNCIA DO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS AGENTES ANTIBACTERIANOS.....	37
2.5 TOXICIDADE DE ESPÉCIES VEGETAIS.....	38
3 OBJETIVOS	40
3.1 OBJETIVO GERAL.....	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 MATERIAL VEGETAL	42
4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE LAVAGEM FOLIAR (EL-Vp) E FLORAL (EF-Vp) de <i>Vernonia polyanthes</i>	43
4.3 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS DE LAVAGEM FOLIAR (EL-Vp) E FLORAL (EF-Vp) de <i>Vernonia polyanthes</i>	45
4.3.1 Preparo da coluna do extrato de lavagem floral de <i>Vernonia polyanthes</i> (EF-Vp).....	46
4.3.2 Preparo da coluna do extrato de lavagem foliar de <i>Vernonia polyanthes</i> (EL-Vp).....	46
4.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS.....	47
4.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS.....	48
4.6 ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS DE LAVAGEM FOLIAR (EL-Vp) E FLORAL (EF-Vp) DE <i>Vernonia polyanthes</i> E DO GLAUCOLÍDEO A POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODO (CLAE-DAD).....	51
4.7 TRIAGEM DE TOXICIDADE	52
4.7.1 Triagem de citotoxicidade através da determinação da toxicidade aguda por meio do bioensaio com <i>Artemia salina</i>	52
4.7.2 Triagem de citotoxicidade através do ensaio de viabilidade celular pelo método do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT).....	53

4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA <i>in vitro</i> DOS EXTRATOS DE LAVAGEM FOLIAR (EL-Vp) E FLORAL (EF-Vp) DE <i>Vernonia polyanthes</i> , DAS FRAÇÕES OBTIDAS DESSES EXTRATOS E DO GLAUCOLÍDEO A.....	54
4.8.1 Cepas bacterianas	55
4.8.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	57
4.8.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e classificação do efeito antibacteriano como bactericida ou bacteriostático.....	61
4.8.4 Método de <i>Time Kill</i>.....	62
4.9 EFEITO COMBINATÓRIO DOS EXTRATOS DE LAVAGEM FOLIAR (EL-Vp) E FLORAL (EF-Vp) DE <i>Vernonia polyanthes</i> E GLAUCOLÍDEO A COM CLORANFENICOL (CHL)	63
4.9.1 Método de <i>Checkerboard</i>	63
4.10 MODO DE AÇÃO DOS EXTRATOS DE LAVAGEM FOLIAR (EL-Vp) E FLORAL (EF-Vp) DE <i>Vernonia polyanthes</i>	65
4.10.1 Ensaio de viabilidade celular bacteriana.....	65
4.10.2 Teste de extravasamento de substâncias absorvidas a 280 nm	65
5 RESULTADOS	67
5.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS DE LAVAGEM FOLIAR (EL-Vp) E FLORAL (EF-Vp) DE <i>Vernonia polyanthes</i>	67
5.2 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS DE LAVAGEM FOLIAR (EL-Vp) E FLORAL (EF-Vp) DE <i>Vernonia polyanthes</i>	67
5.3 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE FENÓIS E FLAVONOIDES TOTAIS	69
5.4 ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS DE LAVAGEM FOLIAR (EL-Vp) E FLORAL (EF-Vp) DE <i>Vernonia polyanthes</i> E DO GLAUCOLÍDEO A POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODO (CLAE-DAD).....	71
5.5 TRIAGEM DE TOXICIDADE	73
5.5.1 Triagem de citotoxicidade através da determinação da toxicidade aguda por meio do bioensaio com <i>Artemia salina</i>	73
5.5.2 Triagem de citotoxicidade através do ensaio de viabilidade celular pelo método do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT).....	75
5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA <i>in vitro</i> DOS EXTRATOS DE LAVAGEM FOLIAR (EL-Vp) E FLORAL (EF-Vp) DE <i>Vernonia polyanthes</i> , DAS FRAÇÕES OBTIDAS DESSES EXTRATOS E DO GLAUCOLÍDEO A.....	77
5.7 MÉTODO DE <i>CHECKERBOARD</i>	85
5.8 MÉTODO DE <i>TIME KILL</i>	87
5.9 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR BACTERIANA	90
5.10 TESTE DE EXTRAVASAMENTO DE SUBSTÂNCIAS ABSORVIDAS A 280 nm	92
6 DISCUSSÃO	94
7 CONCLUSÕES.....	101

REFERÊNCIAS	102
APÊNDICE A - <i>Conference paper</i> intitulada " <i>In vitro</i> antibacterial activity of <i>Vernonia polyanthes</i> Less. leaf rinse extract (Asteraceae): prospecting new therapeutic options against <i>Staphylococcus aureus</i> infections!", publicada na <i>Planta Medica</i> , v. 82, p. s1-s381, 2016. doi: 10.1055/s-0036-1596481	119
APÊNDICE B - Resumo intitulado " <i>In vitro</i> antibacterial activity of <i>Vernonia polyanthes</i> Less. flower rinse extract", apresentado e publicado nos anais do VIII Simpósio Ibero-Americano de Plantas Mediciniais e III Simpósio Ibero-Americano de Investigação em Câncer, 24 a 27 de outubro de 2016, Itajaí, Santa Catarina.....	120
APÊNDICE C - Resumo intitulado " <i>Vernonia polyanthes</i> Less. (Asteraceae Bercht. & Presl): a potential natural source of antimicrobial agents" apresentado e publicado nos anais do 5 th International Phytocosmetics and Phytotherapy Congress, 15 a 17 de maio de 2017, Patras, Grécia.....	121

1 INTRODUÇÃO

A frequência da resistência microbiana e a associação desse evento com doenças infecciosas graves têm aumentado de forma progressiva e dramática, ameaçando a sustentabilidade das futuras gerações à resposta terapêutica a esses processos (BUICK et al., 2015; WHO, 2017). Aliás, de acordo com publicação da Organização Mundial da Saúde (OMS), futuras estratégias de inovação e desenvolvimento devem se concentrar principalmente na descoberta de novos antibióticos especificamente ativos contra bactérias Gram-negativas multirresistentes e extensivamente resistentes a múltiplos agentes antibacterianos (WHO, 2017).

Os micro-organismos têm desenvolvido resistência tanto contra os já bem estabelecidos antibióticos de uso convencional quanto contra aqueles de última geração, causando graves problemas de saúde pública e prejuízos econômicos, bem como contribuído para a constante busca de substâncias eficazes, seletivas e com mínimos efeitos adversos para tratar esses patógenos multirresistentes (SPELLBERG; BARTLETT; GILBERT, 2013). Este contexto tem corroborado para o aumento do interesse, por parte dos grupos de pesquisa e indústrias farmacêuticas, sobre as propriedades antibacterianas de substâncias obtidas de produtos naturais oriundos de espécies vegetais (BRAGA, 2011; DUARTE, 2006). De fato, de todas as substâncias atualmente aprovadas como novas entidades químicas antibacterianas, uma significativa porcentagem delas equivale aos próprios produtos naturais ou é derivada de protótipos com base nessas substâncias (BROWN; LISTER; MAY-DRACKA, 2014).

Sob esta ótica, as plantas produzem uma variedade de metabólitos secundários que ganham importância devido às suas aplicações terapêuticas, biotecnológicas e nutracêuticas. Essa produção é influenciada por fatores ambientais e genéticos e está relacionada, por exemplo, à defesa das espécies vegetais contra patógenos (bactérias, fungos ou vírus) e herbívoros, ou à competição com espécies vizinhas, inibindo seu crescimento (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Quanto ao uso tradicional, o relato do emprego de plantas medicinais é milenar, encontrando-se difundido por todo o mundo. Durante séculos, essas espécies vegetais representaram a única fonte de agentes terapêuticos para o homem, sendo utilizadas desde a pré-história até os dias atuais no tratamento de doenças e disfunções do organismo humano e de animais, devido às suas propriedades farmacológicas (CHIKEZIE; OJIAKO, 2015).

Dentre os fatores envolvidos com o aumento do consumo de produtos naturais destacam-se a situação socioeconômica da população principalmente dos países de terceiro mundo (HERSCH-MARTÍNEZ,1995) e o pensamento de que "o que é natural não faz mal", acreditando, porém, não causar efeitos colaterais ou tóxicos (CALIXTO, 2000). Assim, sabe-se que todo medicamento, natural ou sintético, deve passar por estudos que comprovem sua eficácia e segurança (ALVES et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2013). Essa afirmação encontra-se respaldada pela legislação brasileira, onde fitoterápico é definido como

"aquele medicamento obtido exclusivamente de matérias-primas de origem vegetal, com qualidade constante e reprodutível e que tanto o risco quanto à eficácia seja caracterizado por levantamentos etnofarmacológicos, documentações técnico-científicas em publicações ou ensaios clínicos, assegurando seu uso (BRASIL, 2004)."

O Brasil é detentor de uma biodiversidade promissora, a maior do mundo (DUTRA et al., 2016), como fonte de produtos naturais bioativos, cujo potencial terapêutico é pobremente explorado ou regulamentado, contrastando com o que ocorre em países desenvolvidos (RICARDO et al., 2017; VEIGA JÚNIOR, 2008). Muitas dessas espécies vegetais, portanto, são empregadas como medicamentos naturais sem qualquer respaldo científico quanto à sua eficácia e segurança, o que demonstra a enorme lacuna entre a oferta de plantas e as pesquisas que validem o seu uso popular (FOGLIO et al., 2006).

Inserida nesta biodiversidade encontra-se a *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae Bercht. & Presl), espécie vegetal nativa do Brasil e popularmente conhecida como assa-peixe, assa-peixe braço, estanca-sangue, tramanhém, mata-pasto, cambará-guassu, cambará-do-branco, erva-preá e enxuga. *V. polyanthes* é uma planta silvestre, nectarífera e polinífera (DUTRA, 2011), comum nos cerrados de Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso e Goiás (ALVES; NEVES, 2003). Esta planta medicinal é tradicionalmente utilizada no tratamento de infecções, feridas, afecções da pele, distúrbios do aparelho respiratório, disordens renais, torções, fraturas, contusões, luxações, dores musculares, processos inflamatórios e como antimicrobiana, cicatrizante, diurética, emenagoga, hipotensiva e tônica (ALVES; NEVES, 2003; KIPLIMO, 2016; OLIVEIRA et al., 2007), ocupando a 70ª posição na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) (BRASIL, 2009). Ainda, como descrito acima, a assa-peixe é uma fonte de néctar e pólen para produção de mel de excelente qualidade (DUTRA, 2011), que pode ser aplicado topicamente no tratamento de queimaduras, uma das opções terapêuticas disponíveis nas práticas da medicina tradicional e complementar (SUBRAHMANYAM, 2007).

Sob a ótica química, a triagem e/ou caracterização fitoquímica do gênero *Vernonia* demonstra a diversidade de metabólitos, principalmente secundários, provavelmente também observados na espécie vegetal objeto do presente estudo, tais como alcaloides (AUDU et al., 2012), carotenoides (BARBOSA-FILHO et al., 2008), flavonoides (TOYANG; VERPOORTE, 2013), polissacarídeos (NERGARD et al., 2004), saponinas (IGILE; OLESZEK; JURZYSTA, 1995), taninos (ALIYU et al., 2011), terpenoides denominados lactonas sesquiterpênicas (LSTs) (LOPES, 1991) e triterpenos (KIPLIMO; KOORBANALLY; CHENIA, 2011). De acordo com esses dados, a variedade significativa de compostos químicos induz à pesquisa do potencial farmacológico das várias espécies de *Vernonia*, incluindo *V. polyanthes*, e estes estudos devem ser desenhados de modo a fornecer subsídio científico para seu uso seguro e eficaz e para que novos medicamentos e abordagens terapêuticas alternativas possam ser propostos.

Desde 2010, nosso grupo de pesquisa vem realizando estudos visando contribuir para este propósito por meio do aprofundamento das investigações sobre *V. polyanthes* baseadas em discussões sobre importantes tópicos com foco nessa espécie vegetal, tais como período de coleta, método de extração, composição química, atividades biológicas e farmacológicas e pesquisa e desenvolvimento de formulações e formas farmacêuticas. Os resultados derivados de projetos de Iniciação Científica e, principalmente, de Dissertações, conferiram maturidade e embasamento científicos ao nosso grupo de pesquisa para que continuássemos avançando nas estratégias e construção de novas abordagens, e já geraram dados frutíferos entre pôsteres apresentados e resumos publicados em eventos locais, regionais, nacionais e internacionais, Dissertações, *conference papers*, artigos científicos e depósito de patente.

Em relação à caracterização química, os resultados da prospecção fitoquímica do extrato etanólico e frações hexânica, diclorometânica, em acetato de etila e butanólica das folhas de *V. polyanthes* obtidos por maceração estática seguida de partição sugeriram a presença de flavonoides, taninos, cumarinas, terpenoides e esteroides, saponinas e alcaloides (TEMPONI et al., 2012). Esses mesmos resultados foram obtidos com extrato etanólico e frações dos ramos desta espécie vegetal por Minateli e colaboradores (2017). A análise do perfil químico por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Detecção por Arranjo de Diodos (CLAE-DAD) e de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) dos extratos hexânico, em acetato de etila e etanólico das folhas de *V. polyanthes* obtidos por maceração estática direta utilizando solventes de polaridade crescente, revelaram a presença dos flavonoides luteolina, rutina e apigenina (RODRIGUES et al.,

2016), e de β -amirina e dois triterpenos derivados do ácido ursólico (RODRIGUES, 2013), respectivamente. Finalmente, a avaliação química também por CLAE-DAD do extrato de lavagem foliar com diclorometano desta planta medicinal, método que favorece a extração de compostos armazenados nos tricomas glandulares tais como LSTs (APPEZZATO-DA-GLÓRIA et al., 2012), permitiu a detecção de LSTs e flavonoides, tendo como substância majoritária glaucolídeo A, uma LST (SANTANA, 2015).

Estes achados químicos puderam ser correlacionados às atividades antioxidante e anti-inflamatória sistêmica e tópica (MINATELI et al., 2017; RODRIGUES, 2013; RODRIGUES, 2016; TEMPONI et al., 2012) e à triagem do potencial antibacteriano (RODRIGUES, 2013; SANTANA, 2015; TEMPONI, 2012). Adicionalmente, os resultados microbiológicos obtidos por Santana (2015) demonstraram o potencial antibiótico do extrato de lavagem foliar de *V. polyanthes* para o tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus*, e a necessidade da realização de estudos adicionais com cepas de rotina de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina [do inglês *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)] para corroborar essa possibilidade. Ainda, ensaios de toxicidade também se fazem necessários visando subsidiar a utilização de forma eficaz e segura dessa planta nas atuais e futuras abordagens terapêuticas. Esta autora também demonstrou que o potencial do glaucolídeo A como possível protótipo de um fármaco antibacteriano se basearia na perspectiva de utilização de ferramentas químicas para obtenção de derivados dessa substância, e que sua atividade antibacteriana poderia ser explorada sob o ponto de vista do efeito combinatório com antibióticos sintéticos (SANTANA, 2015).

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo analisar o perfil químico e investigar o potencial antibacteriano e a toxidez *in vitro* dos extratos de lavagem foliar e floral de *V. polyanthes*, agregando subsídio científico para o uso eficaz e seguro dessa planta na medicina tradicional e complementar e prospectando a pesquisa e o desenvolvimento de novos medicamentos fitoterápicos ou de produtos tradicionais fitoterápicos acessíveis à população. Adicionalmente, os dados antibacterianos e toxicológicos envolvendo o glaucolídeo A foram aprofundados.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DA ESPÉCIE VEGETAL ESTUDADA

2.1.1 A Família Asteraceae Bercht. & Presl

Asteraceae Bercht. & Presl (Compositae Giseke) é uma das principais famílias entre as Angiospermas (plantas floridas, do inglês *flowering plants*), abrangendo 1.911 gêneros e 32.913 nomes de espécies vegetais aceitos (<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Compositae/>, acesso em 07 jul. 2017). Essas espécies estão mundialmente distribuídas, com exceção da Antártida; e assumindo que existem entre 250.000 a 350.000 espécies de Angiospermas, uma em cada oito delas implica em uma Asterácea, o que representa cerca de 10% (FUNK et al., 2009).

As Asteráceas são constituídas por ervas perenes, subarbustos e arbustos, mas ocorrem também ervas anuais, lianas e árvores (CANCELLI; EVALDT; BAUERMANN, 2007; MONDIN, 2006). Seus representantes ocupam com sucesso os mais diversos ambientes; entretanto, são mais abundantes nas regiões dos trópicos e subtropicais. São mais observadas em fisionomias campestres de alta altitude e menos frequentes naqueles florestais de baixa altitude, assim como em florestas tropicais úmidas (NAKAJIMA; SEMIR, 2001).

Um importante fator para o sucesso biológico desta família deve-se à capacidade de dispersão das sementes de seus frutos, que apresentam pápus plumosos, apêndices, estruturas de aderência e metabólitos secundários (HEIDEN et al., 2007; VENABLE; LEVIN, 1983). Sua evolução é marcada por uma série contínua de especializações e modificações de suas estruturas florais. Assim, a característica mais marcante da Asteraceae é a presença de flores diminutas agrupadas em inflorescências compactas denominadas capítulos (LOB, 2007).

Do ponto de vista econômico, cerca de 40 espécies têm importância direta na alimentação humana, como alface e chicória, e indireta na obtenção de produtos, como girassol, camomila e carqueja. Inclusive, no Brasil, um novo olhar vem sendo depositado especificamente sob o ponto de vista nutricional das espécies vegetais com a discussão sobre as chamadas Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANCs) (<http://www.brasil.gov.br/saude/2013/08/pesquisadores-recomendam-plantas-alimenticias-nao-convencionais>, acesso em 09 jul. 2017). De acordo com Slavin e Lloyd (2012), frutas e vegetais mantiveram, historicamente, um lugar na orientação alimentar por causa de suas

concentrações de vitaminas, especialmente C e A; minerais, de modo especial os eletrólitos; e mais recentemente fitoquímicos, especialmente antioxidantes. Espécies silvestres têm potencial nutricional, sendo que muitas são de interesse tecnológico ou ornamental, e centenas produzem metabólitos secundários de uso farmacêutico ou industrial ou fornecem néctar e pólen para a apicultura e também forragem para a produção pecuária (VITTO; PETENATTI, 2009).

2.1.2 O gênero *Vernonia* Schreb.

Vernonia Schreb. (<http://www.tropicos.org/Name/40023887>, acesso em 09 jul. 2017) recebeu essa denominação em homenagem ao botânico britânico Will Vernon e equivale a um dos maiores e mais importantes gêneros da família Asteraceae, sendo representado por cerca de 1.000 espécies e estando mundialmente distribuído em áreas tropicais e em regiões temperadas das Américas do Norte e do Sul e da Austrália (<http://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?taxonid=299917&isprofile=0&pt=8>, acesso em 09 jul. 2017).

Quanto à sua diversidade de espécies e as distintas opções terapêuticas baseadas no seu uso, temos alguns exemplos, tais como a utilização do extrato alcoólico das folhas de *Vernonia scorpioides* no tratamento de lesões cutâneas, inclusive feridas crônicas e úlceras de membros inferiores de pacientes diabéticos (DALAZEN et al., 2005); o uso do macerado de folhas de *Vernonia condensata* como analgésico, anti-ulcerogênico e na prevenção de distúrbios do estômago e do fígado (FRUTUOSO et al., 1994; SILVA et al., 2011; SILVA et al., 2017); e o emprego das raízes de *Vernonia kotschyana* na medicina tradicional maliana para o tratamento de gastrite, úlceras gastroduodenais, no auxílio da digestão e na cicatrização de feridas (NERGARD et al., 2004). Ainda, *Vernonia cinerea*, que apresentou ações analgésica, antipirética, anti-inflamatória e citotóxica (IWALEWA; IWALEWA; ADEBOYE, 2003), *Vernonia colorata*, que demonstrou atividades anti-inflamatória e antibacteriana (RABE; MULHOLLAND; VAN STADEN, 2002), e *Vernonia arborea*, que revelou potencial antifúngico (KRISHNA-KUMARI et al., 2003). Finalmente, o chá preparado das partes aéreas de *V. polyanthes* é usado no Brasil como remédio natural para o tratamento da malária e da febre (IGUAL et al., 2013). Além disso, seu extrato hidroalcoólico revelou propriedades hipotensoras (SILVEIRA; FOGGIO; GONTIJO, 2003).

2.1.3 A espécie *Vernonia polyanthes* Less.

Vernonia polyanthes Less., popularmente conhecida como assa-peixe, assa-peixe branco, estanca-sangue, tramanhém, mata-pasto, cambará-guassu ou enxuga, é uma planta silvestre comum nos cerrados de São Paulo, Mato Grosso, Minas Gerais e Goiás, ocorrendo, em termos de distribuição geográfica mundial, também em outros países da América do Sul, tais como Argentina, Bolívia, Equador e Venezuela (<http://www.tropicos.org/NamePage.aspx?nameid=2708839&tab=specimens>, acesso em 09 jul. 2017) (Figura 1).

Figura 1 - Mapa da distribuição geográfica mundial de *Vernonia polyanthes*



As áreas sinalizadas pela cor verde 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/NamePage.aspx?nameid=2708839&tab=specimens>, acesso em 02 set. 2016)

Esta planta medicinal é caracterizada por ser um arbusto com ramos angulosos e densamente pilosos. Atinge até 2,5 metros de altura, tendo folhas com disposição alternada com cerca de 10 cm de comprimento e 3 cm de largura, sendo ásperas na face ventral e pilosas na dorsal, curtamente pecioladas, de margem serrilhada, base atenuada e ápice agudo (LORENZI; MATOS, 2002) (Figura 2).

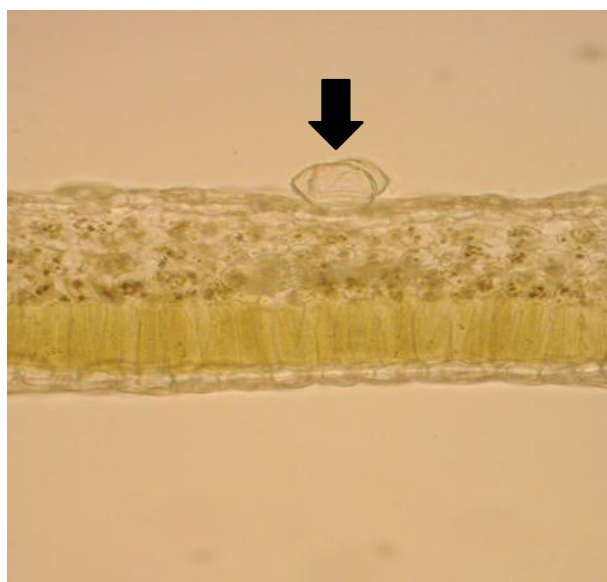
Figura 2 - Fotografia (A) das inflorescências e (B) das partes aéreas de *Vernonia polyanthes* coletadas no Horto Medicinal da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora em agosto de 2015



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2015

A presença de lâmina foliar com características anatômicas dorsiventrais com tricomas glandulares em ambas as faces implica no principal marcador morfológico de *V. polyanthes*. Na face adaxial (parte superior da folha), observa-se a epiderme uniestratificada com a presença de tricomas simples, pluricelulares, com número variável de células situadas, em geral, sobre as nervuras (LORENZI; MATOS, 2002) (Figura 3).

Figura 3 - Fotografia do tricoma glandular, sinalizado pela seta de cor preta, presente na face adaxial da folha de *Vernonia polyanthes*



Corte transversal da folha de *Vernonia polyanthes* fotografado em microscópio de luz modelo BX41 com câmera digital acoplada modelo *Power Shot A640*, aumento de 100 vezes. Procedimento realizado pela Técnica Administrativa em Educação Flavia Bonizol Ferrari no Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Fonte: SANTANA, 2015

Suas inflorescências brancas ou rosadas estão dispostas nos ápices dos ramos compondo capítulos pequenos, com 10 a 15 flores reunidas em panículas escorpioides (ALVES; NEVES, 2003). Suas floradas duram aproximadamente dois meses, sendo exploradas para produção de mel que tem alto valor comercial devido às suas propriedades medicinais. Além disso, é de grande importância para a apicultura, pois oferece grandes quantidades de recursos alimentares para as abelhas (ALVES, 2010).

Figura 4 - Fotografia da flor de *Vernonia polyanthes* no início da maturação



Fonte: ALVES, 2010

Entre os relatos científicos sobre as atividades farmacológicas de *V. polyanthes*, destacam-se as propriedades diurética e hipotensora da infusão das folhas (SILVEIRA; RÚBIO; ALVES, 2000), a capacidade do extrato hidroalcoólico das folhas de reduzir a pressão arterial sem alterar os mecanismos renais de autorregulação (SILVEIRA; FOGLIO; GONTIJO, 2003), o efeito gastroprotetor dos extratos metanólico e clorofórmico das partes aéreas (BARBASTEFANO et al., 2007), as ações antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato etanólico das folhas (TEMPONI et al., 2012), a propriedade anti-inflamatória tópica dos extratos hexânico e em acetato de etila das folhas (RODRIGUES et al., 2016) e, finalmente, as atividades antioxidante do extrato etanólico e das frações hexânica, diclorometânica, em acetato de etila e butanólica e anti-inflamatória tópica do extrato etanólico dos ramos (MINATELI et al., 2017).

Considerando-se especificamente a propriedade antimicrobiana, até o presente momento foram encontradas quatro publicações científicas ao se efetuar uma atualização da literatura em um dos principais bancos de dados da área de Saúde, o NCBI (do inglês *National Center for Biotechnology Information*), por meio de uma de suas ferramentas

(*Pubmed*), utilizando-se como palavras-chave *antimicrobial activity* e *Vernonia polyanthes* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=antimicrobial+activity+and+Vernonia+polyanthes>, acesso em 09 jul. 2017) (BRAGA et al., 2007; MOREIRA et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2015; SILVA et al., 2012).

Sob a ótica química, prospecções fitoquímicas realizadas a partir de extratos das partes aéreas de *V. polyanthes* detectaram a presença de alcaloides, flavonoides, taninos hidrolisáveis, fenóis, chalconas, auronas, ácidos graxos, saponinas e quinonas, aminogrupos, ácidos fixos, cumarinas, esteroides, triterpenos, glicosídeos flavônicos, saponínicos e antraquinônicos (BRAGA et al., 2007; CARVALHO et al., 2013; MINATELI et al., 2017; SILVA et al., 2012; SOUZA et al., 2008; TEMPONI et al., 2012; WALTRICH; HOSCHEID; PROCHNAU, 2015). A análise do perfil químico obtido por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) realizada por Barbastefano e colaboradores (2007) apontou a presença de triterpenos e LSTs e de flavonoides como substâncias majoritárias nos extratos clorofórmico e metanólico das partes aéreas desta planta, nessa ordem.

Adicionalmente, a aplicação de métodos espectroscópicos como CG-EM e Ressonância Magnética Nuclear ^1H e ^{13}C (RMN ^1H e ^{13}C) permitiram a identificação de tridecapentaineno, germacreno D, biciclogermacreno, α -humuleno, acetato de lupeil e seu isômero, estigmasterol, um hirsutinólídeo e dois sesquiterpenos, vernopoliântono e vernopoliântofurano (BOHLMANN et al., 1981); de dois hirsutinólídeos epiméricos e um dehidroderivado do vernopoliântofurano (BOHLMANN et al., 1983); dos germacrenos B e D e do ϵ -cariofileno (SILVA et al., 2012); e dos flavonoides apigenina, isoramnetina, luteolina, quercetina, quercetina-3-O- β -glicosídeo, 3',4'-dimetoxiluteolina, 3,7-dimetoxi-5,3',4'-trihidroxi-flavona, das LSTs piptocarpina A e glaucolídeo A, dos ácidos clorogênicos 3,5-di-O-(E)-cafeoilquínico e 4,5-di-O-(E)-cafeoiquínico e do ácido fenólico protocatecuico (IGUAL et al., 2013).

2.2 A METABOLÔMICA E SUA RELAÇÃO COM A EXPRESSÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

O termo "metaboloma" é utilizado para denominar - identificar e quantificar - o conjunto de metabólitos primários e secundários de uma célula ou organismo em uma determinada situação biológica (BINO et al., 2004; FIEHN, 2002). Por meio da análise metabolômica é possível descrever quais são os metabólitos presentes em uma espécie vegetal e suas concentrações de acordo com o ambiente, ou seja, a interferência dos fatores bióticos (ocasionados pela presença de seres vivos e suas relações intra e interespecíficas) e abióticos

(ambientais como luz, temperatura, solo, pH, água e nutrientes) na biossíntese dessas substâncias. Conseqüentemente, é possível obter informações sobre os processos metabólicos ativos, e assim regular o seu metabolismo viabilizando, ou não, os componentes desejados, bem como sua concentração (CAPRINI, 2007). A produção dos metabólitos secundários, por sua vez, pode sofrer interferência de vários fatores, os quais são mostrados na Figura 5.

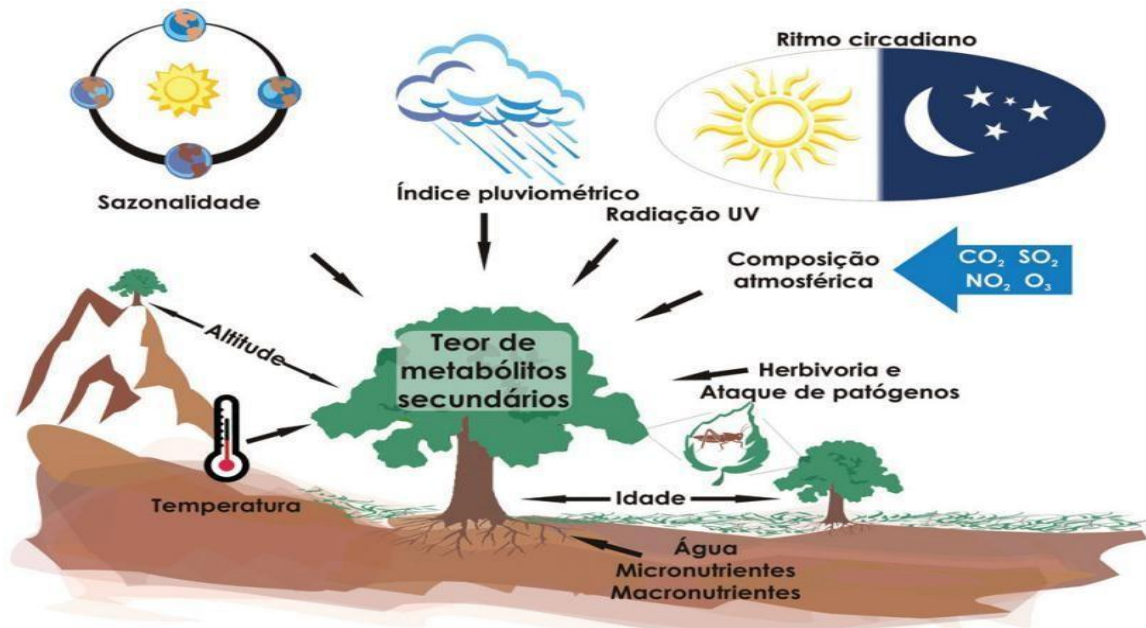
Figura 5 - Esquema representativo dos fatores que interferem na produção de metabólitos secundários



Fonte: ADAPTADO DE GOBBO-NETO; LOPES, 2007

Conforme mostram as Figuras 5 e 6, um dos fatores que influencia no conteúdo de metabólitos secundários é a época em que a espécie vegetal é coletada (sazonalidade), visto que a quantidade e/ou a origem dos constituintes ativos não é constante durante todo o ano (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Assim, existem relatos de concentrações sazonais de ácidos fenólicos (GRACE; LOGAN; ADAMS III, 1998), alcaloides (ELGORASHI; DREWES; VAN STADEN, 2002), cumarinas (WILT; MILLER, 1992), glicosídeos cianogênicos (KAPLAN; FIGUEIREDO; GOTTLIEB, 1983), glicosinolatos (AGEBIRK; OLSEN; NIELSEN, 2001), graxas epicuticulares (FAINI; LABBÉ; COLLI, 1999), iridoides (HØGEDAL; MØLGAARD, 2002), óleos essenciais (SCHWOB et al., 2004), saponinas (NDAMBA; LEMMICH; MØLGAARD, 1994), taninos (SALMINEN et al., 2001), inclusive de flavonoides (BROOKS; FEENY, 2004) e de LSTs (ZIDORN; STUPPNER, 2001).

Figura 6 - Imagem ilustrativa dos principais fatores que podem influenciar no acúmulo de metabólitos secundários em plantas

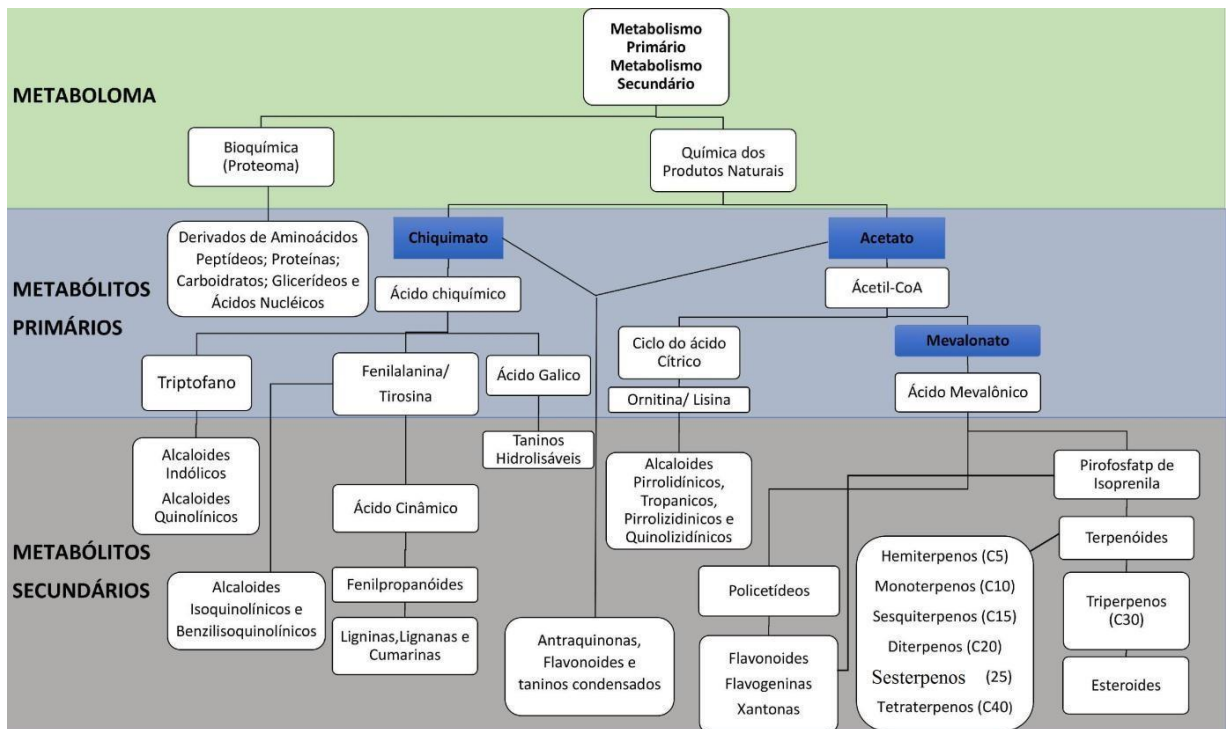


Fonte: GOBBO-NETO; LOPES, 2007

2.3 METABOLISMO VEGETAL

Um dos principais aspectos dos seres vivos é a realização da atividade metabólica, caracterizada por um conjunto de reações químicas que ocorrem no interior das células. No caso das células vegetais, ocorrem dois tipos de metabolismo, o primário e o secundário. Os metabólitos primários compreendem as vias de modificação e síntese de diversas substâncias essenciais como proteínas, gorduras, carboidratos e ácidos nucleicos e são de ocorrência universal (COSTA, 1978; LANA et al., 2012). Os metabólitos secundários, por sua vez, são originados a partir de intermediários biossintéticos do metabolismo primário (Figura 7). A distribuição diferencial dessas substâncias possui valor taxonômico, tendo em vista que certos grupos de metabólitos secundários predominam dentro de determinados gêneros ou famílias do reino vegetal (WINK, 2003).

Figura 7 - Esquema ilustrativo da rota das principais classes de substâncias provenientes dos metabolismos primário e secundário de plantas



Fonte: ADAPTADO DE BRAZ-FILHO, 2010

Sabe-se que os metabólitos secundários são produzidos como resultado da adaptação ao ambiente circundante, exercendo funções de defesa da planta contra predadores e de atração de polinizadores, contribuindo para sua sobrevivência (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012; HARTMANN, 2007; WINK, 2013). Esses metabólitos apresentam uma grande variedade de propriedades biológicas e/ou farmacológicas e toxicológicas (THEIS; LERDAU, 2003; WINK, 2013).

As plantas são consideradas uma importante fonte de substâncias biologicamente ativas, sendo de grande interesse como agroquímicos, corantes, polímeros, fibras, colas, óleos, ceras, aromatizantes, perfumes e medicamentos (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000; PINTO et al., 2002). O metabolismo secundário é o responsável por originar as substâncias em plantas medicinais que apresentam efeitos terapêuticos, além de servir para a descoberta de novos fármacos. No entanto, são conhecidas mais de 100 mil substâncias derivadas do metabolismo especial, sendo que a maioria delas ainda não foi estudada quanto ao aspecto farmacológico (OKSMAN-CALDENTY; INZE, 2004).

2.3.1 Substâncias fenólicas provenientes do metabolismo secundário

Os compostos fenólicos estão largamente distribuídos nos vegetais (SOARES, 2002), sendo considerados produtos do metabolismo secundário que as plantas sintetizam durante seu desenvolvimento normal e em resposta às condições de estresse como infecções, ferimentos, radiação ultravioleta (UV), dentre outros. Esses constituintes estão presentes em várias porções das plantas, podendo agir como fitoalexinas, atraentes para polinizadores, antioxidantes e protetores contra os raios UV. Nos alimentos, os compostos fenólicos podem contribuir para o gosto amargo (sabor), adstringência, cor, odor e estabilidade oxidativa dos produtos (SHAHIDI; NACZK, 2004).

Além da propriedade antioxidante como bloqueadores dos radicais na reação em cadeia, os compostos fenólicos são capazes de eliminar os radicais hidroxila, superóxido e oxigênio singlete (ARNAO, 2000). A inativação de radicais de oxigênio por esses compostos ocorre pela ação como doador de hidrogênio ou formação de espécies de menor reatividade (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002). Assim, o potencial antioxidante de um composto fenólico depende da sua estrutura, incluindo não apenas a sua polaridade, como também a natureza e a posição dos grupos constituintes na sua estrutura (SOARES, 2002).

A maioria das substâncias fenólicas é biossintetizada pela rota do chiquimato ou pela do mevalonato (SIMÕES et al., 2007), como os ácidos fenólicos, alcaloides, derivados da cumarina, flavonoides, saponinas, taninos, entre outros (NACZK; SHAHIDI, 2004). Quanto ao aspecto farmacológico, sabe-se que as propriedades antioxidante e anti-inflamatória são influenciadas principalmente pelas características estruturais dos sistemas fenólicos (ESTEVEES et al., 2008). Entre os compostos fenólicos que possuem atividade antioxidante destacam-se os flavonoides (CAO et al., 2013; SOARES, 2002; TSAO, 2010).

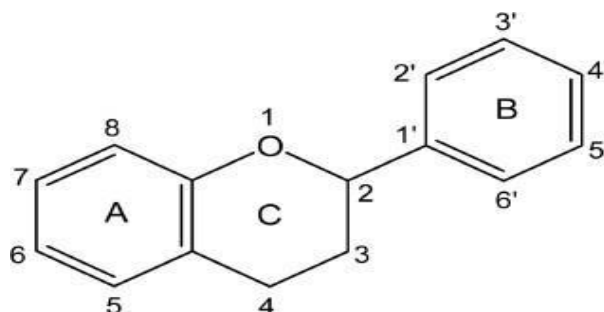
2.3.2 Flavonoides

Os flavonoides fazem parte de um grupo de compostos naturais que pertencem à família dos polifenóis, apresentam baixo peso molecular e representam uma ampla classe de constituintes encontrada no reino vegetal (ANDERSEN; MARKHAM, 2005; BUER; IMIN; DJORDJEVIC, 2010).

Do ponto de vista químico, são substâncias aromáticas que contêm 15 átomos de carbono no seu núcleo fundamental (Figura 8), sendo caracterizadas por dois anéis aromáticos (A e B) e um anel heterociclo oxigenado (C) (ANDERSEN; MARKHAM, 2005; WINKEL-

SHIRLEY, 2001). Devido aos rearranjos, metilação, metoxilação, alquilação, oxidação, glicosilação de Carbono e Oxigênio, e hidroxilação no anel C, os flavonoides podem formar mais de 9000 moléculas apresentando atividades antioxidante, antibacteriana, antiviral e anticancerígena (LEONARD et al., 2008).

Figura 8 - Representação da estrutura química básica dos flavonoides

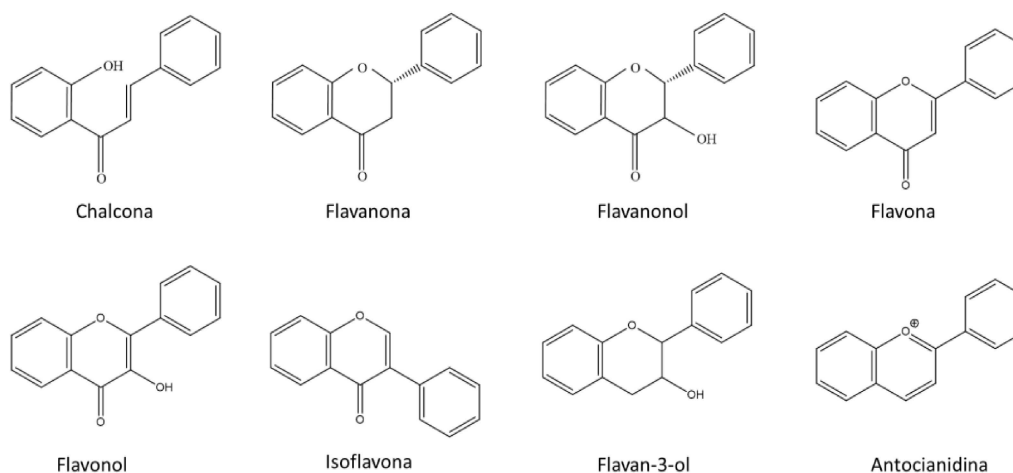


Fonte: STALIKAS, 2007

Estas substâncias são formadas através de duas rotas biogénicas, a via do ácido chiquímico, que gera substituições em posição *orto*, e a do acetato-polimalato, que utiliza a acetil-CoA e malonil-CoA, gerando substituições em posição *meta* (DEWICK, 2002; SIMÕES et al., 2007).

As substâncias que fazem parte das subclasses de flavonoides são as antocianinas, as antocianidinas, os flavonóis, as flavononas, as flavonas, as catequinas e as chalconas (ANDERSEN; MARKHAM, 2005; PIETTA, 2000; WINKEL-SHIRLEY, 2002). As estruturas dos esqueletos das principais subclasses são mostradas na Figura 9.

Figura 9 - Imagem ilustrativa da estrutura química das subclasses dos flavonoides



Fonte: ADAPTADO DE COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009

Os flavonoides apresentam propriedades biológicas e/ou farmacológicas, entre as quais atividades antioxidante, antibacteriana, anticancerígena, antidiabética, antienvelhecimento, anti-histamina, anti-inflamatória, antimutagênica, antiviral, hepatoprotetora, cicatrizante, tendo ação sobre lesões cutâneas e doenças neurodegenerativas (ABE et al., 2007; JONES et al., 2012; PERRON; BRUMAGHIM, 2009; STALIKAS, 2007).

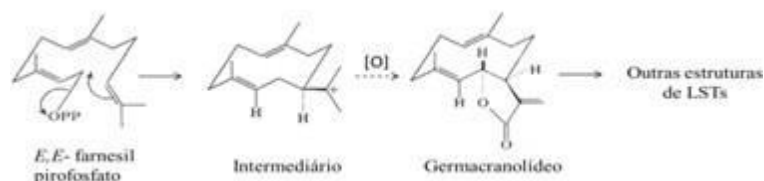
Considerando-se especificamente a atividade antimicrobiana, apigenina, luteolina, narigenina, quercetina, entre outros flavonoides, têm sido identificados como potentes agentes antibacterianos (CUSHNIE; LAMB, 2005; MARTINI; KATERERE; ELOFF, 2004; SALEEM et al., 2010). De acordo com Cushnie e Lamb (2011), essas substâncias possuem atividade antibacteriana direta, sinergismo com antibióticos e supressão de virulência bacteriana.

2.3.3 Lactonas sesquiterpênicas (LSTs)

As LSTs são metabólitos secundários encontrados nas folhas e inflorescências das plantas, sendo armazenados em grande quantidade nos tricomas glandulares da superfície foliar (AMBRÓSIO et al., 2008; APPEZZATO-DA-GLÓRIA et al.; 2012; FAVI et al., 2008; WAGNER; WANG; SHEPHERD, 2004).

As LSTs são derivadas do farnesil pirofosfato, um sesquiterpeno biossinteticamente mais simples, formado a partir de três unidades de isopreno. A ciclização do *E, E*-farnesil pirofosfato resulta na formação do *E, E*-germacradieno. A partir da oxidação de um dos carbonos da cadeia lateral deste intermediário é formado o anel lactônico, produzindo a LST (Figura 10) (FISCHER; OLIVIER; FISCHER, 1979; SEAMAN, 1982). Após a lactonização ou mesmo antes, o precursor germacrano pode sofrer uma série de alterações estruturais, como ciclizações, abertura de anéis ou migração de grupos metila, originando diferentes estruturas de LSTs. Assim, essas substâncias são classificadas em diversas subclasses de acordo com o tipo de esqueleto carbocíclico básico, sendo o germacranolídeo a subclasse precursora, conforme apresentado nas Figuras 10 e 11 (ARANTES, 2007; MAJDI et al., 2011; PICMAN, 1986).

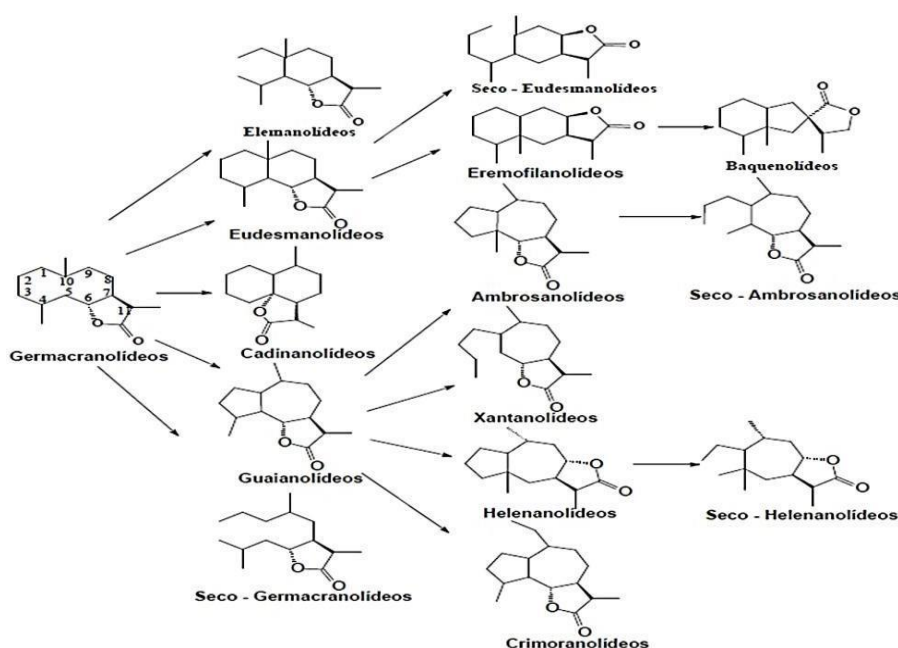
Figura 10 - Imagem ilustrativa da biogênese das lactonas sesquiterpênicas



(*E,E*): trans,trans.

Fonte: ADAPTADO DE FISCHER; OLIVIER; FISCHER, 1979

Figura 11 - Imagem ilustrativa da estrutura química dos esqueletos carbônicos e das relações biogênicas das subclasses de lactonas sesquiterpênicas

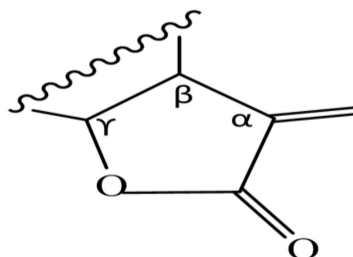


Fonte: COSTA, 2008

As LSTs constituem substâncias com elevado potencial terapêutico, destacando-se suas propriedades anti-inflamatória, antimicrobiana, antiparasitária e citotóxica (KIM et al., 2006; MATEJÍČ; ŠARAC; RANĐELOVIĆ, 2010; MERFORT, 2002; PICMAN, 1986).

Essas propriedades são atribuídas à presença de grupos carbonílicos α,β -insaturados, mas principalmente do grupo α -metileno- γ -lactona (Figura 12). Estes grupos são considerados potentes agentes alquilantes e reagem com nucleófilos, especialmente grupos sulfidrila de cisteína presentes nas proteínas, através de reações de adição tipo *Michael*. Entretanto, em algumas estruturas, centros eletrofílicos adicionais também atuam como sítios para estas reações de alquilação (ALVES, 2011; DIRSCH et al., 2000; FABIAN et al., 2013; SCOTTI et al., 2007).

Figura 12 - Imagem ilustrativa da estrutura química do grupo α -metileno- γ -lactona



Fonte: RODRIGUEZ; TOWERS; MITCHELL, 1976

2.4 RESISTÊNCIA BACTERIANA E A URGÊNCIA DO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS AGENTES ANTIBACTERIANOS

Sob o ponto de vista microbiológico, o inegável sucesso resultante das primeiras classes de antibióticos descobertas, especialmente utilizadas no tratamento e prevenção de infecções durante a Segunda Guerra Mundial, espalhou na população a ideia de que essas substâncias seriam "drogas milagrosas" ou "balas mágicas", e que as infecções bacterianas seriam eliminadas (PENESYAN; GILLINGS; PAULSEN, 2015). No entanto, esquecemos que as bactérias são campeãs da evolução e que esses micro-organismos se adaptaram a um ponto em que apresentam sérios desafios clínicos para os seres humanos (ARIAS; MURRAY, 2009). A diminuição da eficácia dos antibióticos no tratamento de infecções bacterianas é um fenômeno mundial, sendo a resistência destes agentes patogênicos um dos principais problemas de saúde pública do século XXI (WHO, 2015; LAXMINARAYAN et al., 2016).

O evento de resistência microbiana, portanto, ocorre devido ao surgimento de cepas que não respondem aos antibióticos disponíveis, apresentando a capacidade de se multiplicarem mesmo quando expostas às altas concentrações desses agentes antimicrobianos (O'NEILL, 2016). Como visto anteriormente, esta resistência decorre da própria evolução dos micro-organismos, mas tem sido intensificada pelo uso irracional e abusivo desses medicamentos nas práticas médicas, agrárias e veterinárias (SILVA et al., 2012; WANNMACHER; FERREIRA, 2004). Adicionalmente, existem os problemas relacionados à tolerância/toxicidade destes fármacos, o fato de serem bacteriostáticos ou bactericidas lentos e o custo para o indivíduo e para as instituições de saúde (BARROS; MACHADO; SPRINZ, 2013; QUEIROZ et al., 2012).

Quanto às cepas mais preocupantes dentro do universo de possibilidades, a OMS divulgou uma lista das 20 bactérias multirresistentes a antibióticos consideradas uma ameaça global, configurando um problema de saúde pública mundial, e categorizadas em três níveis

de prioridade [crítica (1), alta (2) e média (3)], como mostrado na Figura 13 (WHO, 2017). A urgência da busca de novos agentes antimicrobianos para o tratamento de infecções bacterianas "intratáveis" torna-se, portanto, uma estratégia prioritária.

Figura 13 - Lista prioritária global de bactérias resistentes a antibióticos para guiar a pesquisa, descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos publicada pela Organização Mundial da Saúde em 2017

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

Fonte: ADAPTADO DE WHO, 2017

Neste contexto, considerando-se que uma das principais funções dos metabólitos secundários produzidos pelas espécies vegetais é conferir proteção contra os microorganismos (DEWICK, 2002), e tendo em vista o quadro alarmante da resistência adquirida por estes agentes biológicos, as pesquisas visando à obtenção de antibióticos a partir de produtos naturais ativos aumentaram significativamente (DUARTE, 2006).

2.5 TOXICIDADE DE ESPÉCIES VEGETAIS

As plantas medicinais são utilizadas há milhares de anos pela população como instrumento imprescindível no alívio e na cura de diversos males (VEIGA JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Entretanto, existe uma percepção errônea das pessoas de que o uso de plantas é natural, seguro e eficaz, porém, sabe-se que essa prática pode causar efeitos colaterais e tóxicos (CALIXTO, 2000; TOVAR; PETZEL, 2009).

Uma planta é considerada tóxica quando é capaz de acarretar um dano, como alergia, distúrbios cardiovasculares, respiratórios, metabólicos, gastrointestinais,

neurológicos, podendo levar à morte de algum organismo (DRAIZE et al., 1944; VASCONCELOS; VIEIRA; VIEIRA, 2009). No Brasil, em 1999, o número de intoxicações causadas por plantas foi de 1.759 casos, o que correspondeu a 2,49% dos episódios de intoxicação humana ocorridos, fazendo com que as plantas ocupassem o 13º lugar em número de casos de intoxicação naquele ano (SINITOX, 1999). Apesar do discreto número e do baixo percentual de casos de intoxicações por plantas, deve-se levar em consideração que muitos casos não são registrados ou são notificados como exposição à agente tóxico desconhecido, o que compromete o dado real, gerando subnotificações.

Assim, os testes de toxidez têm como objetivo avaliar ou prever os efeitos tóxicos nos sistemas biológicos e averiguar a toxicidade relativa das substâncias (FORBES; FORBES, 1994; LOOMIS et al., 1996). Ensaios para a monitorização dos extratos de plantas tais como de toxicidade com *Artemia salina* e de viabilidade celular vêm sendo incorporados nos estudos para este propósito.

A *A. salina* é um microcrustáceo marinho, pertencente ao filo Arthropoda e componente da fauna aquática salina e salobra do ecossistema marinho (BARBIERI-JÚNIOR; OSTRENSKY-NETO, 2001). Esse microcrustáceo tem sido bastante utilizado nos ensaios toxicológicos a fim de estabelecer a toxidez devido à rapidez do seu crescimento, baixo custo de criação e manutenção em condições de laboratório e sensibilidade do método. O resultado desse bioensaio é expresso a partir da estimativa da concentração de uma substância através da medida de uma resposta biológica, na qual existe apenas um parâmetro envolvido: vida ou morte (BARBOSA et al., 2003).

Para avaliação da atividade citotóxica *in vitro* pode se utilizar o teste da viabilidade celular pelo método de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), um composto de coloração amarela que ao sofrer ação das desidrogenases mitocondriais presentes nas células viáveis se transforma em outro de coloração escura chamado formazana [E,Z-1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazan]. O composto formado é um cristal insolúvel em solução aquosa, e a sua formação reflete o estado da cadeia respiratória, ou seja, quanto maior a viabilidade celular, maior será a redução do MTT e, conseqüentemente, maior a absorbância espectrofotométrica (DE DAVID, 2013; PISSINATE, 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo geral analisar o perfil químico e investigar o potencial antibacteriano e a toxidez *in vitro* dos extratos de lavagem foliar e floral de *V. polyanthes*, agregando subsídio científico para seu uso eficaz e seguro na medicina tradicional e complementar. Adicionalmente, os dados antibacterianos e toxicológicos envolvendo o glaucolídeo A foram aprofundados.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter os extratos de lavagem foliar e floral de *V. polyanthes*;
- Efetuar o fracionamento dos extratos de lavagem foliar e floral de *V. polyanthes*.

A partir dos extratos de lavagem foliar e floral de *V. polyanthes*:

- Determinar os teores de fenóis e flavonoides totais por espectrofotometria UV-Vis;
- Obter o perfil químico por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Detecção por Arranjo de Diodos (CLAE-DAD).

A partir dos extratos de lavagem foliar e floral de *V. polyanthes* e do glaucolídeo

A:

- Efetuar a triagem de toxidez por meio da determinação da toxicidade aguda através dos métodos do bioensaio com *Artemia salina* e de viabilidade celular utilizando linhagem de célula não tumoral RAW 264.7;
- Investigar o potencial antibacteriano *in vitro* através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo frente a oito cepas de referência da *American Type Culture Collection* (ATCC[®]), cinco cepas de rotina de MRSA, três cepas de rotina de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. Enteritidis e duas cepas de rotina de *Salmonella* spp., sendo uma resistente à fluoroquinolona;
- Investigar o potencial antibacteriano *in vitro* para as frações obtidas por Cromatografia Líquida à Vácuo dos extratos de lavagem foliar e floral de *V. polyanthes* através da determinação da CIM pelo método de microdiluição em caldo frente à *S. aureus* (ATCC[®] 25923TM), *S. aureus* (ATCC[®] 29213TM) e MRSA 1485279;

- Determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) e classificar o efeito antibacteriano bactericida ou bacteriostático para as cepas de referência ATCC[®] e de rotina, quando possível;
- Investigar a ação antibacteriana sobre *S. aureus* (ATCC[®] 25923TM), *S. aureus* (ATCC[®] 29213TM) e MRSA 1485279 por meio do método de *time kill*;
- Investigar o efeito combinatório com cloranfenicol frente à *S. aureus* (ATCC[®] 25923TM), *S. aureus* (ATCC[®] 29213TM) e MRSA 1485279;
- Investigar o modo de ação sobre *S. aureus* (ATCC[®] 25923TM), *S. aureus* (ATCC[®] 29213TM) e MRSA 1485279 por meio dos testes de viabilidade celular bacteriana e do extravasamento de substâncias absorvidas a 280 nm.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

Folhas e flores frescas de *V. polyanthes* foram coletadas da planta cultivada no Horto Medicinal da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, Minas Gerais, latitude 21°26'40" Sul e longitude 43°22'1" Oeste, entre 07:00 e 08:00 horas do dia 17 de agosto de 2015 (Figura 14). Uma exsicata (CESJ nº 10.329), identificada pela Dra. Fátima Regina Gonçalves Salimena, encontra-se depositada no Herbário Leopoldo Krieger (CESJ), Instituto de Ciências Biológicas, UFJF. As folhas e flores foram selecionadas pela exclusão daquelas deterioradas ou com presença de materiais estranhos. Devido ao período em que a planta se encontrava, suas folhas apresentavam formato mais fino e estavam um pouco menores do que o usual (item 2.1.3, p. 26). Em seguida, este material vegetal foi submetido à secagem em temperatura ambiente (~ 25 °C) por seis dias, e pesado para preparo dos extratos de lavagem foliar (EL-Vp) e floral (EF-Vp). O nome da planta *Vernonia polyanthes* Less. foi verificado no sítio eletrônico da *The Plant List* (<http://www.theplantlist.org/tp11.1/record/gcc-102424>, acesso em 09 jul. 2017), sendo sinônimo de *Vernonanthura phosphorica* (Vell.) H. Rob.

Figura 14 - Fotografia da (a) arvoreta, (b) flores maduras, e (c) folhas recém-colhidas de *Vernonia polyanthes* cultivada no Horto Medicinal da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora em agosto de 2015 (período de floração)



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

Conforme informações disponibilizadas pela Companhia de Saneamento Municipal (CESAMA) de Juiz de Fora, o clima no município

"apresenta duas estações bem definidas: uma, que vai de outubro a abril, com temperaturas mais elevadas e maiores precipitações pluviométricas, e outra de maio a setembro, mais fria e com menor presença de chuvas." (CESAMA, 2017)

De acordo com o sistema Köppen e Geiger, a região possui um clima classificado como tipo Cwa (subtropical), também denominado Tropical de Altitude (a cidade apresenta altitudes médias de 700 a 900 metros), ou seja, mesotérmico, com verões quentes e moderadamente chuvosos e invernos secos não rigorosos. Porém, a área de abrangência do Bairro São Pedro, onde se situa a UFJF campus Juiz de Fora bem como o Horto Medicinal, devido a sua maior altitude e afastamento da zona urbana concentrada, tem verões mais amenos e clima classificado como Cwb (subtropical de altitude). Segundo dados gerados pela Estação Climatológica Principal da UFJF/5° DISME (número 83.692), a temperatura média anual gira em torno de 18,9 °C, sendo fevereiro o mês mais quente (21,7 °C) e julho o mais frio (16,1 °C); os índices pluviométricos médios nas últimas décadas foram próximos a 1.536 mm, sendo janeiro o mês mais chuvoso (298 mm) (CESAMA, 2017).

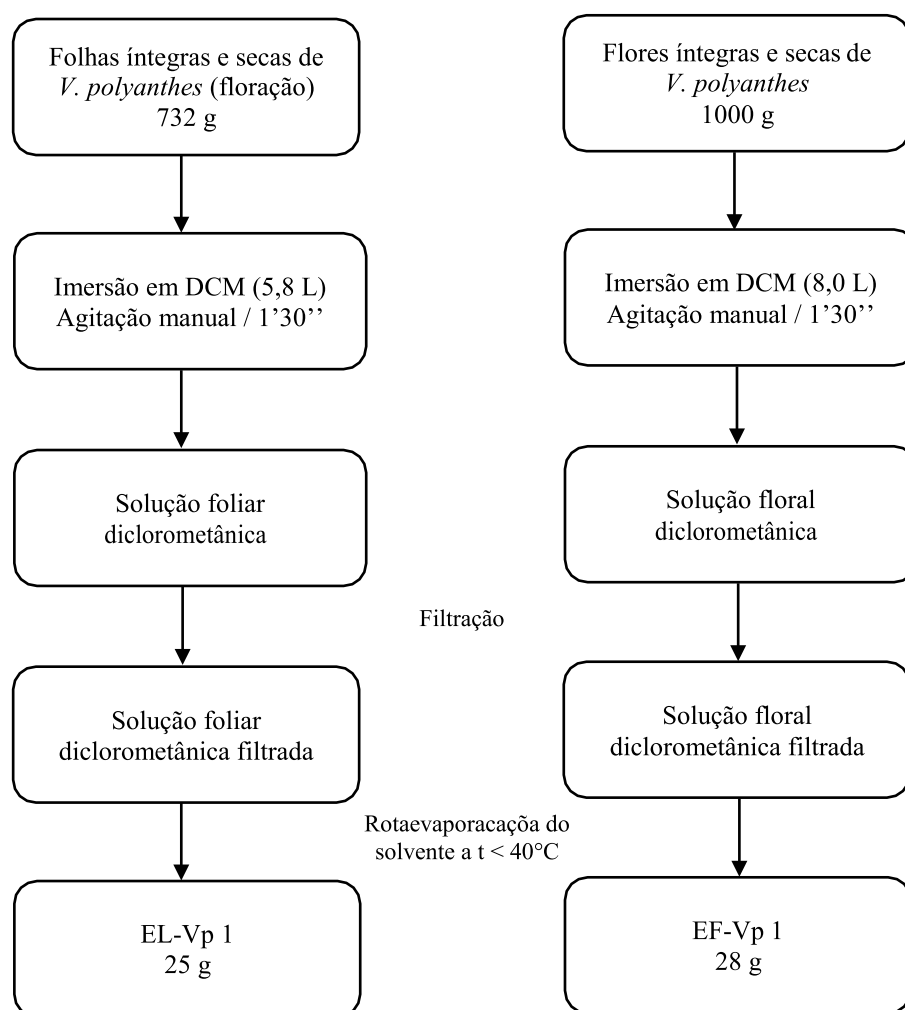
Considerando que o período ótimo de floração de *V. polyanthes* corresponde ao mês de agosto (DUTRA, 2011), e que no intervalo de maio a setembro se observa o menor índice pluviométrico (CESAMA, 2017), optou-se pela coleta em agosto de 2015.

4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE LAVAGEM FOLIAR (EL-Vp) E FLORAL (EF-Vp) de *Vernonia polyanthes*

A estratégia de obtenção de EL-Vp e EF-Vp foi definida em virtude dos resultados da prospecção fitoquímica (MINATELI et al., 2017; TEMPONI et al., 2012) e da caracterização química por CLAE-DAD (RODRIGUES et al., 2016; SANTANA, 2015) e CG-EM (RODRIGUES, 2013), que conduziram à escolha do método de extração por lavagem do material vegetal (folhas e flores) usando solvente orgânico [diclorometano (DCM)], visto que favorece a extração de compostos armazenados nos tricomas glandulares tais como LSTs (APPEZZATO-DA-GLÓRIA et al., 2012; IGUAL et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2011). Assim, para a obtenção de EL-Vp e EF-Vp, 732 g de folhas íntegras e secas e 1.000 g de flores de *V. polyanthes* foram lavadas, separadamente, por meio da imersão total do material vegetal em 5,8 e 8 L de DCM, respectivamente, seguida de agitação manual por 1 min e 30

seg, realizada no interior da cabine de segurança química. As duas soluções resultantes desses procedimentos (soluções diclorometânicas foliar e floral) foram filtradas em papel de filtro comum e concentradas com auxílio de um evaporador rotativo em temperatura inferior a 40 °C (Figura 15). Os resíduos foram transferidos para dois frascos de vidro temperado transparente de boca larga, previamente identificados, pesados e mantidos abertos para a completa evaporação do DCM e, posteriormente, protegidos com papel laminado.

Figura 15 - Esquema ilustrativo do procedimento de obtenção dos extratos de lavagem foliar (EL-Vp) e floral (EF-Vp) de *Vernonia polyanthes*



DCM: Diclorometano.

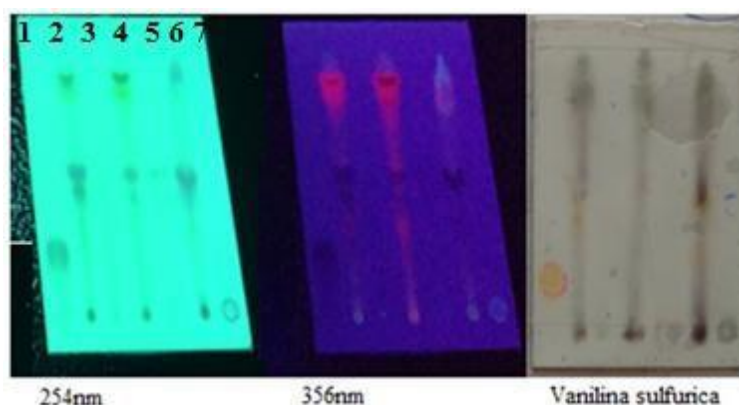
Fonte: ADAPTADO DE SANTANA, 2015

4.3 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS DE LAVAGEM FOLIAR (EL-Vp) E FLORAL (EF-Vp) de *Vernonia polyanthes*

O fracionamento de EL-Vp e EF-Vp foi realizado no Núcleo de Identificação e Pesquisa de Princípios Ativos Naturais (NIPPAN), localizado no Centro de Pesquisas Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFJF, sob responsabilidade do Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho.

Para realização desta etapa, foram pesados 5 mg do extrato VP obtido por Santana (2015), EL-Vp e EF-Vp, e 2 mg dos flavonoides apigenina e luteolina (Sigma-Aldrich Chemical Co, St. Louis, Michigan, USA) e da LST glaucolídeo A [composto majoritário detectado, isolado, purificado e caracterizado por Santana (2015)], e solubilizados em 1 mL de DCM. Posteriormente, foram submetidos à análise por CCD a fim de estabelecer qual seria a melhor fase móvel de partida para se utilizar na eluição das amostras na Cromatografia Líquida à Vácuo (CLV). As cromatoplasmas com 5 cm de comprimento e largura variando de acordo com a quantidade de amostras foram limpas com metanol P.A. e secas à temperatura ambiente (~ 25 °C). Em cada cromatoplasma foram feitos *spots* sucessivos das amostras, que foram eluídas com diferentes fases móveis acidificadas (três gotas de ácido acético) e reveladas com vanilina sulfúrica [solução reveladora vanilina 1% (p/v) em metanol e ácido sulfúrico 5% (p/v) em metanol].

Figura 16 - Fotografia da Cromatografia em Camada Delgada realizada com luteolina (1), extrato VP (2), apigenina (3), extrato de lavagem foliar de *Vernonia polyanthes* (EL-Vp) (4), glaucolídeo A (5), extrato de lavagem floral de *Vernonia polyanthes* (EF-Vp) (6), Vp5-7 (fração obtida por Santana, 2015) (7), revelada a 254 nm, 356 nm e com vanilina sulfúrica



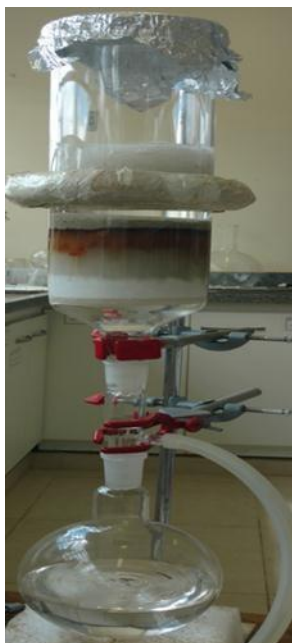
Fase móvel: hexano:acetato de etila / 55:45 (acidificado).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

4.3.1 Preparo da coluna do extrato de lavagem floral de *Vernonia polyanthes* (EF-Vp)

EF-Vp (20 g) foi solubilizado em DCM e incorporado em aproximadamente 20 g de celite (pó fino e homogêneo). O fracionamento foi feito por CLV em coluna de sílica gel 70-230 *mesh* (250 g), sílica com gesso 60 H (50 g) e sílica gel PF 230-400 *mesh* (50 g), com um gradiente crescente de eluição (hexano:DCM; DCM P.A.; DMC:metanol; metanol) (Figura 17). As frações obtidas foram analisadas por CCD e agrupadas de acordo com o perfil cromatográfico em 10.

Figura 17 - Fotografia da coluna do extrato de lavagem floral de *Vernonia polyanthes* submetido à Cromatografia Líquida à Vácuo



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

Estas frações foram concentradas à pressão reduzida utilizando evaporador rotativo, pesadas, analisadas por CCD e mantidas sob refrigeração até a realização dos ensaios biológicos.

4.3.2 Preparo da coluna do extrato de lavagem foliar de *Vernonia polyanthes* (EL-Vp)

EL-Vp (20 g) foi solubilizado em DCM e incorporado em aproximadamente 20 g de celite (pó fino e homogêneo). O fracionamento foi feito por CLV em coluna de sílica gel 70-230 *mesh* (250 g), sílica com gesso 60 H (50 g) e sílica gel PF 230-400 *mesh* (50 g), com um gradiente crescente de eluição (hexano P.A.; hexano:acetato de etila; acetato de etila P.A.)

(Figura 18). As frações obtidas foram analisadas por CCD e agrupadas de acordo com o perfil cromatográfico em sete.

Figura 18 - Fotografia da coluna do extrato de lavagem foliar de *Vernonia polyanthes* submetido à Cromatografia Líquida à Vácuo



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

Estas frações foram concentradas à pressão reduzida, utilizando evaporador rotativo, pesadas, analisadas por CCD e mantidas sob refrigeração até a realização dos ensaios biológicos.

4.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS

A determinação do teor de fenóis totais foi realizada no Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia da UFJF, sob responsabilidade do Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa, com auxílio dos seguintes equipamentos e materiais:

- Espectrofotômetro de feixe UV-1800 (Shimadzu[®], Barueri, São Paulo, Brasil);
- Água destilada (*in house*);
- Balança de precisão (Gehaka BG 2000, São Paulo, São Paulo, Brasil);
- Reagentes: Metanol (Vetec Química Farm Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil); Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich[®], Vila Almeida, São Paulo, Brasil), Carbonato de sódio 7,5% (Inlab,

Jabaquara, São Paulo, Brasil), Ácido gálico (Sigma-Aldrich Chemical Co, St. Louis, Michigan, USA) e Dimetilsulfóxido P.A. (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil).

O teor de fenóis totais foi determinado por meio do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (SOUSA et al., 2007), com pequenos ajustes. Para tanto, foram preparadas soluções-estoque (SEs) de EL-Vp e EF-Vp a 1 mg/mL em metanol. Em seguida, foram adicionados 500 µL das SEs e 2500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu em tubos de ensaio previamente identificados, em triplicata, e agitados por 1 min. Posteriormente, foram adicionados 2000 µL de uma solução de carbonato de sódio 7,5%, procedendo-se à agitação. Após 2 h de reação à temperatura ambiente (~ 25 °C), as absorvâncias das soluções foram medidas em espectrofotômetro a 788 nm. Como "auto zero" e branco foram utilizados metanol e 500 µL de metanol e todos os reagentes utilizados anteriormente com exceção dos extratos, nessa ordem. Para construção da curva de calibração foram preparadas soluções com diferentes concentrações de ácido gálico (padrão) em metanol (1 a 6 µg/mL). Para obtenção da reta de calibração e equação da reta, bem como da determinação do coeficiente de correlação (R^2) através da análise de regressão linear (*Excel for Windows*) pelo método dos mínimos quadrados, foram utilizadas as médias das absorvâncias das concentrações de ácido gálico, onde o valor de Y foi substituído pelas absorvâncias do extrato e o resultado foi expresso em g/100 g do extrato equivalente a ácido gálico (EAG).

4.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS

A determinação do teor de flavonoides totais foi realizada no Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia da UFJF, sob responsabilidade do Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa, com auxílio dos seguintes equipamentos e materiais:

- Espectrofotômetro de feixe UV-1800 (Shimadzu[®], Barueri, São Paulo, Brasil);
- Água destilada (*in house*);
- Balança Eletrônica de Precisão (Gehaka BG 2000, São Paulo, São Paulo, Brasil);
- Reagentes: Ácido acético glacial P.A. (Vetec, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil), Piridina P.A. (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil); Metanol (Vetec Química Farm Ltda, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil), Cloreto de alumínio hexa-hidratado (F. Maia S.A., Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil); Rutina (Sigma-Aldrich Chemical Co, St. Louis, Michigan, USA); e Dimetilsulfóxido P.A. (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil).

O teor de flavonoides totais foi determinado por meio de método colorimétrico utilizando cloreto de alumínio conforme descrito por Sobrinho e colaboradores (2008), com pequenas modificações, e rutina como padrão. Para construção da curva de calibração, inicialmente foi preparada SE de rutina 0,5 mg/mL em metanol. A partir dessa SE foram preparadas diluições em concentrações entre 2 a 25 µg/mL, a saber: para uma série de tubos de ensaio 13 x 100 mm devidamente identificados foram transferidas alíquotas de 20, 50, 100, 150, 200 e 250 µL da SE, em triplicata. Após, foram adicionados 400 µL de metanol, 120 µL de ácido acético P.A., 2000 µL de piridina a 20% (v/v) em metanol, 500 µL de cloreto de alumínio hexa-hidratado a 8% (m/v) em metanol, completando o volume para 5000 µL com água destilada. O preparo do branco de cada uma das concentrações foi realizado pela adição dos reagentes, com exceção da rutina. Para quantificação dos flavonoides totais de EL-Vp e EF-Vp, inicialmente foram preparados 5000 µL de SEs em metanol desses extratos (5 mg/mL). A partir dessas SEs, foi realizada uma etapa de semi-purificação adicionando 2000 µL de hexano e 3000 µL de água destilada, seguida de centrifugação a 3000 rpm durante 3 min. Após, a parte superior dessa mistura foi removida com pipeta *Pasteur* e alíquotas de 400 µL da fase hidroalcoólica inferior foram coletadas, em triplicata, e transferidas para novos tubos de ensaio devidamente identificados, nos quais se procedeu a reação. Após 30 min à temperatura ambiente (~ 25 °C), as absorvâncias das soluções de rutina, EL-Vp e EF-Vp foram registradas em espectrofotômetro a 412 nm (Tabela 1). Foram utilizadas as médias das absorvâncias das concentrações de rutina para se obter a reta de calibração e para se determinar o coeficiente de correlação (R^2) através da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados (*Excel for Windows*). O teor de flavonoides totais foi determinado em g/100 g de extrato equivalente a rutina (ER).

Tabela 1 - Organização dos tubos de ensaio e volumes das amostras e reagentes utilizados no preparo de diluições empregadas para a determinação do teor de flavonoides totais por meio de método colorimétrico utilizando cloreto de alumínio (AlCl_3)

Identificação Tubo Ensaio	Rutina (μL)	Metanol (μL)	Extrato (μL)	Ácido Acético (μL)	Piridina (μL)	AlCl_3 (μL)	Água Destilada (μL)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
A	20	400	NA	120	2000	500	1960	2
B	50	400	NA	120	2000	500	1930	5
C	100	400	NA	120	2000	500	1880	10
D	150	400	NA	120	2000	500	1830	15
E	200	400	NA	120	2000	500	1780	20
F	250	400	NA	120	2000	500	1730	25
EL-Vp	NA	NA	400	120	2000	500	1980	25
EF-Vp	NA	NA	400	120	2000	500	1980	25
Branco	NA	400	NA	120	2000	500	1980	NA

EL-Vp: extrato de lavagem foliar de *Vernonia polyanthes*; EF-Vp: extrato de lavagem floral de *Vernonia polyanthes*; NA: Não Adicionado.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

4.6 ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS DE LAVAGEM FOLIAR (EL-Vp) E FLORAL (EF-Vp) DE *Vernonia polyanthes* E DO GLAUCOLÍDEO A POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODO (CLAE-DAD)

As análises por CLAE-DAD foram realizadas na Central Analítica Multiusuária de Bioprodutos e Bioprocessos (CENTRALBIO), localizada na Faculdade de Farmácia da UFJF, sob responsabilidade do Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho, com auxílio dos seguintes equipamentos e materiais:

- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Waters[®] (Milford, EUA), composto por bomba binária 1525, detector por Arranjo de Diodos (DAD) 2998, injetor auto *sampler* 2707 e *software Empower 3* para aquisição e tratamento dos dados;
- Coluna analítica de fase reversa C₁₈ (Sunfire) (4,6 mm x 250 mm, 5 µm);
- Metanol grau HPLC (J.T. Baker), água deionizada e ácido orto-fosfórico 85% (Merck, Darmstadt, Alemanha);
- Microcentrífuga (Kasvi, São José do Pinhais, Paraná, Brasil);
- Purificador de água *Purelab Classic* (Elga, Canadá);
- Lavadora Ultrassônica Digital Aquecida (Sanders, Santa Rita do Sapucaí, Minas Gerais, Brasil);
- *Kit* filtração à vácuo.

EL-Vp e EF-Vp foram submetidos à análise por CLAE acoplada ao detector UV-Visível DAD em fase reversa visando à obtenção de seus perfis cromatográficos. Para esse propósito, aproximadamente 1 mg destes extratos foram solubilizados em metanol grau HPLC. Para aumento da solubilidade, estas soluções metanólicas foram agitadas em ultrassom aquecido a 35 °C por 5 min. Posteriormente, foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min e os sobrenadantes filtrados através de uma membrana de poro 45 µm diretamente para o *vial*. O gradiente de eluição foi de uma fase binária composta de água acidificada com 0,5% de ácido acético (CH₃COOH) e metanol (MeOH), iniciando com 50% de cada componente em um gradiente crescente de polaridade até 25 min, chegando a 10% de água acidificada e 90% de MeOH; de 30 a 50 min o gradiente foi de 100% de MeOH, limpando a coluna entre uma amostra e outra, totalizando 50 min de eluição para, posteriormente, voltar à fase móvel de partida 50% água acidificada e 50% MeOH, dando início à nova análise. Utilizou-se coluna de fase reversa C₁₈ (4,6 mm x 250 mm, 5 µm), fluxo de 0,6mL/min e

volume de injeção de 20 μL . A presença de algumas classes de metabólitos secundários foi inferida através de seus espectros de absorção no UV obtidos por CLAE-DAD e comparação com dados da literatura.

4.7 TRIAGEM DE TOXICIDADE

4.7.1 Triagem de citotoxicidade através da determinação da toxicidade aguda por meio do bioensaio com *Artemia salina*

O bioensaio com *A. salina* foi realizado 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, com auxílio dos seguintes equipamentos e materiais:

- Água destilada (*in house*);
- Reagentes: Tween 80 (Thermo Scientific[®], Waltham, Massachusetts, USA); Dimetilsulfóxido P.A. (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil) e Timol e Cafeína (Farmácia Arcanjo Miguel, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil);
- Sal marinho natural (*OceanTech Premium Reef Salt - Blue Treasure[®]*);
- Micropipetas (Thermo Scientific[®], Waltham, Massachusetts, USA);
- pHmetro (Hanna[®] instruments, Tamboré Barueri, São Paulo, Brasil).

A determinação da toxicidade aguda de EL-Vp, EF-Vp e glaucolídeo A frente ao microcrustáceo *A. 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, obedecendo a proporção recomendada pelo fabricante (6,7 kg para 190 L de água destilada, ou seja, 35,3 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 min 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 EF-Vp e EL-Vp (100, 625, 1000, 1250, 2500 e 5000 $\mu\text{g/mL}$), do glaucolídeo A (10, 50, 100, 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$) e dos controles positivo (timol/cafeína 50, 100, 250, 500 e 750 $\mu\text{g/mL}$) e negativo (água marinha artificial). Para facilitar a dissolução dos extratos foi utilizada uma mistura de dimetilsulfóxido (DMSO) e Tween 80 na proporção de 1:1 v/v (DEL-VECHIO-VIEIRA et

al., 2015). Os ovos de *A. salina* (50 mg) foram transferidos para um recipiente retangular plástico (15 cm x 10 cm x 5 cm), que foi mantido por 48 h em condições de temperatura, iluminação e pH adequadas à eclosão (MEYER et al., 1982). Para realização do bioensaio, foram utilizados tubos de ensaio 13 x 100 mm, em quadruplicata, para cada concentração testada dos extratos e dos controles positivo e negativo. Para cada um dos tubos de ensaio foram transferidas 10 larvas de *A. salina*, selecionadas macroscopicamente com auxílio de micropipeta e placa de Petri de 90 x 15 mm para contagem dos indivíduos. O volume final em cada tubo foi de 5 mL, aos quais foi adicionada uma gota de suspensão de fermento biológico seco em água marinha (0,6 mg/mL), que serviu de alimento para as larvas e que garantiu que as mortes não fossem ocasionadas por inanição (MEYER et al., 1982). Após 24 h de incubação, procedeu-se à contagem dos indivíduos sobreviventes. Os dados obtidos nessa contagem foram utilizados no cálculo de porcentagem de mortes (M%) para cada tubo de ensaio, de acordo com a fórmula de Abbott:

Os dados de M% em relação ao aumento da concentração dos extratos foram ajustados a uma equação linear simples, que foi utilizada para estimar a concentração de extrato ou glaucolídeo A responsável por matar 50% da população de larvas, ou seja, a CL₅₀ (concentração letal do extrato ou glaucolídeo A para 50% da população).

4.7.2 Triagem de citotoxicidade através do ensaio de viabilidade celular pelo método do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT)

O ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT foi realizado no Laboratório de Imunologia do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFJF, sob responsabilidade do Prof. Dr. Gilson Costa Macedo, com auxílio dos seguintes equipamentos e materiais:

- Leitor de microplacas SpectraMax 190, Molecular Devices (Thermo Scientific[®], Waltham, Massachusetts, USA);
- Meio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, New York, USA);
- Reagentes: MTT (Sigma-Aldrich Chemical Co, St. Louis, Michigan, USA); DMSO (Sigma-Aldrich Chemical Co, St. Louis, Michigan, USA).

Este teste foi realizado segundo procedimento colorimétrico proposto por Riss e colaboradores (2013), que se baseia no princípio de que o MTT, sendo uma substância de coloração amarela, ao sofrer ação das desidrogenases mitocondriais presentes nas células viáveis, se transforma em um composto de cor escura chamado formazan, permitindo a determinação indireta da citotoxicidade (MOSMANN, 1983; RISS et al., 2013). Assim, para determinar a viabilidade celular, uma linhagem não tumoral tipo RAW 264.7 de macrófagos foi cultivada em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina a 37 °C em 5% de CO₂. Com confluência de 80%, essas células foram submetidas ao teste ou subcultivadas. Para prosseguimento do experimento, as células RAW 264.7 foram inoculadas a uma densidade de 2×10^5 células/poço (MOSMANN, 1983) em microplacas de 96 poços de fundo chato, e incubadas a 37 °C, em 5% de CO₂, por 24 h. Em seguida, o meio RPMI-1640 foi removido e substituído por outro contendo ou não diferentes concentrações de EL-Vp (0,5; 1; 2; 5; 10; 15 e 30 µg/mL) e glaucolídeo A (1, 2, 5, 10 e 20 µg/mL), e procedeu-se à nova incubação a 37 °C, em 5% de CO₂, por 48 h. Após, o sobrenadante foi removido, adicionou-se 100 µL de MTT (5 mg/mL) a cada poço e incubou-se a 37 °C, em 5% de CO₂, por 2 h e 30 min adicionais. Subsequentemente, o sobrenadante foi removido e adicionou-se 100 µL de DMSO a cada poço para dissolver qualquer cristal formazan depositado. A densidade ótica foi determinada em um comprimento de onda de 595 nm usando um leitor de microplacas. DMSO 5% foi utilizado como controle positivo. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata. Os resultados do teste foram dados como valores médios (\pm desvio padrão) e analisados usando o *software GraphPad Prism*[®] versão 5. As diferenças significativas foram determinadas pela análise unidirecional de variância (ANOVA) e seguindo o teste de Tukey para comparações múltiplas, sendo o nível de significância na análise $p < 0,05$.

4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *in vitro* DOS EXTRATOS DE LAVAGEM FOLIAR (EL-Vp) E FLORAL (EF-Vp) DE *Vernonia polyanthes*, DAS FRAÇÕES OBTIDAS DESSES EXTRATOS E DO GLAUCOLÍDEO A

Os ensaios de atividade antibacteriana *in vitro* 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, com auxílio dos seguintes equipamentos e materiais:

- Cabine de segurança biológica classe II B2 (Veco, Campinas, São Paulo, Brasil);

- Estufa bacteriológica (Quimis, Campanário, São Paulo, Brasil);
- Autoclave (Primatec, Itu, São Paulo, Brasil);
- Micropipetas (Thermo Scientific[®], Waltham, Massachusetts, USA);
- Microplacas de 96 poços de fundo chato (Corning, Corning, New York, USA);
- Placas de Petri 90 x 15 mm (PlastLabor, Inhauma, Rio de Janeiro, Brasil);
- Meios de cultura: Ágar e Caldo Müeller-Hinton (Difco Laboratories[®], Detroit, Michigan, USA);
- Antibacterianos: ampicilina (AMP) e cloranfenicol (CHL) (Sigma-Aldrich Chemical Co, St. Louis, Michigan, USA);
- Indicador biológico: cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (CTT) (Vetec[®], Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil);
- Solução padronizada 0,5 de McFarland (DME Diagnóstico Microbiológicos Especializados[®], Araçatuba, São Paulo, Brasil);
- Reagentes: glicerol (Synth); DMSO (Vetec[®], Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil); Tween 80 (Thermo Scientific[®], Waltham, Massachusetts, USA).

A investigação do potencial antibacteriano *in vitro* de EL-Vp, EF-Vp, das frações obtidas desses extratos e do glaucolídeo A foi realizada por meio da determinação da CIM empregando-se o método de microdiluição em caldo de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2012), seguida do estabelecimento da CBM e da classificação do efeito antibacteriano bactericida ou bacteriostático, conforme protocolo preconizado por Andrews (2001), com pequenos ajustes.

4.8.1 Cepas bacterianas

Os procedimentos microbiológicos foram realizados empregando 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 saber:

Cepa de Referência	Abreviatura Adotada no Texto
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (ATCC [®] 25923 TM)	<i>S. aureus</i> (ATCC [®] 25923)
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (ATCC [®] 29213 TM)	<i>S. aureus</i> (ATCC [®] 29213)
<i>Escherichia coli</i> (ATCC [®] 10536 TM)	<i>E. coli</i> (ATCC [®] 10536)
<i>Escherichia coli</i> (ATCC [®] 25922 TM)	<i>E. coli</i> (ATCC [®] 25922)
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Cholerasuis (ATCC [®] 10708 TM)	<i>S. Cholerasuis</i> (ATCC [®] 10708)
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium (ATCC [®] 13311 TM)	<i>S. Typhimurium</i> (ATCC [®] 13311)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC [®] 9027 TM)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC [®] 9027)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC [®] 27853 TM)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC [®] 27853)

Além de informarem sobre a atividade antibacteriana *in vitro* de EL-Vp, EF-Vp, das frações obtidas desses extratos e do glaucolídeo A, conforme preconizado pelos documentos M07-A9 e M100-S24 (CLSI, 2012, 2014), *S. aureus* (ATCC[®] 29213), *E. coli* (ATCC[®] 25922) e *P. aeruginosa* (ATCC[®] 27853) são cepas empregadas como controle de qualidade, de fonte fidedigna, recomendadas, dessa forma, para garantir e validar a qualidade dos ensaios microbiológicos. A Tabela 2 apresenta os pontos de corte de CIM estabelecidos pelo CLSI (2014) para estas cepas frente à AMP e CHL na concentração de 10 e 30 µg/mL, respectivamente, obtidos em testes de susceptibilidade aos antimicrobianos devidamente validados.

Tabela 2 - Valores dos pontos de corte de Concentração Inibitória Mínima para controle de qualidade do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos de organismos não fastidiosos

Antibiótico	<i>S. aureus</i> (ATCC [®] 29213)*	<i>E. coli</i> (ATCC [®] 25922)*	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC [®] 27853)*
AMP	0,5 - 2,0 µg/mL	2,0 - 8,0 µg/mL	Não Previsto
CHL	2,0 - 16,0 µg/mL	2,0 - 8,0 µg/mL	Não Previsto

*Estes valores classificam estas cepas como sensíveis, com exceção de *P. aeruginosa* (ATCC[®] 27853). AMP: ampicilina; CHL: cloranfenicol.

Fonte: ADAPTADO DO DOCUMENTO M100-S24 (CLSI, 2014)

Cepas de rotina de MRSA, de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. Enteritidis e de *Salmonella* spp., isoladas de infecções sanguíneas (MRSA) e sanguíneas e urinárias (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. Enteritidis e de *Salmonella* spp.) 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, também foram testadas, a saber:

Cepa de Rotina	Abreviatura Adotada no Texto
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina 1485279	MRSA 1485279
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina 1605677	MRSA 1605677
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina 1664534	MRSA 1664534
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina 1688441	MRSA 1688441
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina 1830466	MRSA 1830466
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar. Enteritidis 1406591	<i>S. Enteritidis</i> 1406591
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar. Enteritidis 1418594	<i>S. Enteritidis</i> 1418594
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar. Enteritidis 1428260	<i>S. Enteritidis</i> 1428260
<i>Salmonella</i> spp.1266695	<i>Salmonella</i> spp.1266695
<i>Salmonella</i> spp.1507708	<i>Salmonella</i> spp.1507708

O armazenamento das cepas de referência ATCC® e de rotina 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 h) diretamente em 1,0 mL de solução LDG previamente distribuída em tubos plásticos com tampa de rosca próprios para congelamento (Inlab). A seguir, estes tubos foram armazenados em uma temperatura de cerca de 20 °C negativos até a realização dos ensaios biológicos.

4.8.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para a determinação da CIM foi empregado o método de microdiluição em caldo conforme preconizado pelo CLSI (2012). Inicialmente, foram preparadas SEs de EL-Vp, EF-Vp e das frações obtidas desses extratos 10 mg/mL, e de glaucolídeo A, AMP e CHL 1 mg/mL. As SEs de EL-Vp, EF-Vp e das frações obtidas desses extratos foram preparadas em DMSO, cuja concentração final não ultrapassou 2%. Este percentual foi estabelecido de acordo com os parâmetros validados pelo nosso grupo de pesquisa para a espécie vegetal objeto de estudo, no intuito de cumprir o limite máximo de 1% de DMSO no poço da microplaca (LANGFIELD et al., 2004) e a recomendação descrita no documento M100-S24 (CLSI, 2014). Para o preparo da SE do glaucolídeo A levou-se em consideração a limitada solubilidade dessa substância em água e, por isso, foram adicionados 2% de Tween 80 ao diluente com o objetivo de se evitar sua precipitação na solução (MAZUR et al., 2015). Finalmente, as SEs de AMP e CHL foram preparadas utilizando-se os solventes e diluentes descritos no documento M100-S24 (CLSI, 2014) (Tabela 3).

Tabela 3 - Descrição dos solventes e diluentes utilizados no preparo das soluções-estoque empregadas no método de microdiluição em caldo usado para determinação da Concentração Inibitória Mínima

Solução Estoque (SE)	Solvente	Diluyente	Concentração Final SE (mg/mL)
EL-Vp	Dimetilsulfóxido	Água destilada estéril	10,0
EF-Vp	Dimetilsulfóxido	Água destilada estéril	10,0
Frações EL-Vp	Dimetilsulfóxido	Água destilada estéril	10,0
Frações EF-Vp	Dimetilsulfóxido	Água destilada estéril	10,0
Glaucolídeo A	Dimetilsulfóxido	Água destilada estéril	1,0
		+	
		Tween 80	
Ampicilina	Tampão fosfato 0,1 M pH 8,0	Tampão fosfato 0,1 M pH 6,0	1,0
Cloranfenicol	Etanol 95%	Água destilada estéril	1,0

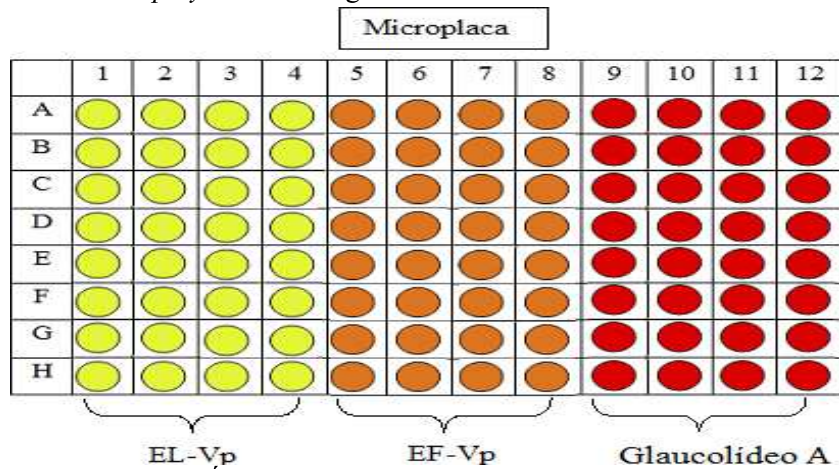
EL-Vp: extrato de lavagem foliar de *Vernonia polyanthes*; EF-Vp: extrato de lavagem floral de *Vernonia polyanthes*.

Fonte: ADAPTADO DE FERES-NETTO, 2016

Para o preparo dos inóculos bacterianos, as cepas de referência ATCC[®] e de rotina foram inicialmente ativadas em ágar Müeller-Hinton (AMH) e incubadas por 16 a 18 h em estufa bacteriológica a $35^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$, em aerobiose. Após incubação e com auxílio de alça microbiológica calibrada estéril descartável, três a cinco Unidades Formadoras de Colônia (UFC) foram transferidas para tubo de ensaio 13 x 100 mm contendo 3,5 mL de solução salina estéril (NaCl 0,9% p/v), comparadas e ajustadas visualmente à escala padrão 0,5 de McFarland (CLSI, 2012).

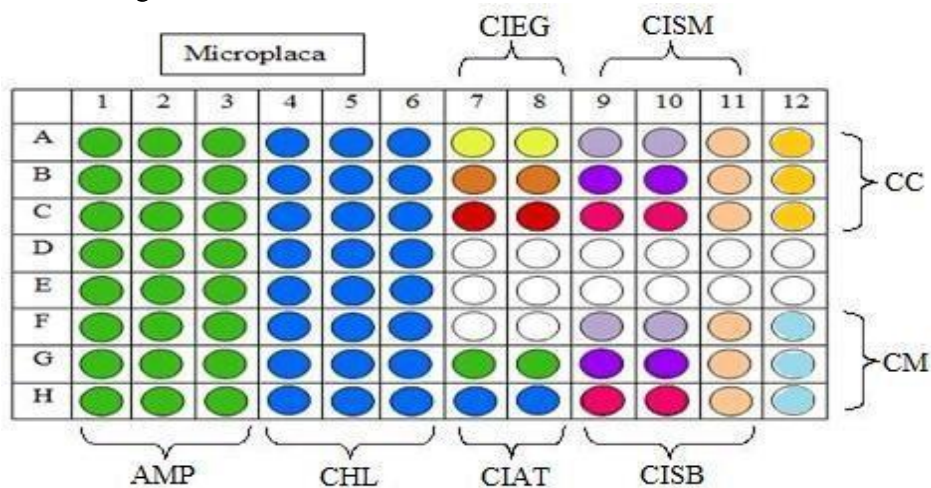
Concluídas as etapas de preparo das SEs e dos inóculos bacterianos, iniciou-se o procedimento para determinação da CIM em microplacas de 96 poços de fundo chato, utilizando-se uma microplaca para EL-Vp, EF-Vp, frações desses extratos e glaucolídeo A (Figura 19) e outra para os controles (Figura 20) para cada cepa testada.

Figura 19 - Imagem ilustrativa do preparo da microplaca utilizada para determinação da Concentração Inibitória Mínima pelo método de microdiluição em caldo dos extratos de lavagem foliar (EL-Vp) e floral (EF-Vp) de *Vernonia polyanthes* e do glaucolídeo A



Fonte: ELABORADO PELOPRÓPRIO AUTOR, 2017

Figura 20 - Imagem ilustrativa do preparo da microplaca utilizada para determinação da Concentração Inibitória Mínima pelo método de diluição em caldo de ampicilina (AMP) e cloranfenicol (CHL) e controles positivo e negativo



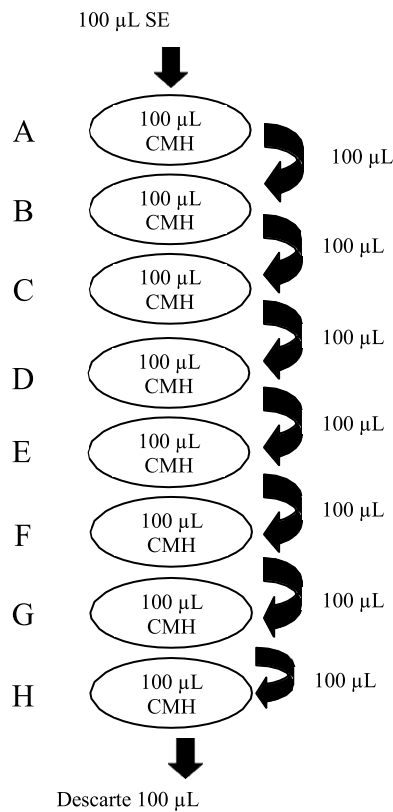
CIEG: controle da interferência de EL-Vp, EF-Vp ou glaucolídeo A sobre o caldo Müller-Hinton; CIAT: controle da interferência dos antibióticos sobre o caldo Müller-Hinton; CISM: controle da interferência dos sistemas solvente/diluyente sobre o caldo Müller-Hinton (meio de cultura); CISB: controle da interferência dos sistemas solvente/diluyente sobre o crescimento bacteriano; CC (controle de crescimento): meio de cultura + inóculo bacteriano; CM (controle do meio): meio de cultura + solução salina estéril; poço sem cor: poço vazio.

Fonte: ADAPTADO DE SILVA et al., 2012

Conforme apresenta a Figura 21, a partir das SEs foram realizadas diluições seriadas diretamente nas microplacas, obtendo-se um gradiente de concentração de 5000 a 40 e de 500 a 4 $\mu\text{g/mL}$ para EL-Vp, EF-Vp e frações desses extratos, e para glaucolídeo A, AMP e CHL, nessa ordem. Inicialmente, foram adicionados 100 μL de caldo Müller-Hinton (CMH) aos poços. Em seguida, foram acrescidos 100 μL das SEs nos poços 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 a realização das diluições seriadas das amostras e antibióticos, em quadruplicata e triplicata, respectivamente, foram adicionados 10 μL da suspensão bacteriana previamente padronizada. O gradiente de concentração dos extratos foi estabelecido em busca da atividade farmacológica, e por isso valores de CIM > 5000 $\mu\text{g/mL}$ não foram determinados com base no critério de Fabry, Okemo e Ansorg (1998). Como reportado por esses autores, plantas medicinais usadas na medicina tradicional contra infecções podem ter alguma atividade antimicrobiana quando apresentam CIM < 8000 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 21 - Esquema ilustrativo do procedimento de diluição seriada realizada em microplaca para determinação da Concentração Inibitória Mínima



SE: solução estoque dos extratos de lavagem foliar e floral de *Vernonia polyanthes* e das frações obtidas desses extratos e do glaucolídeo A; CMH: caldo Müller-Hilton.

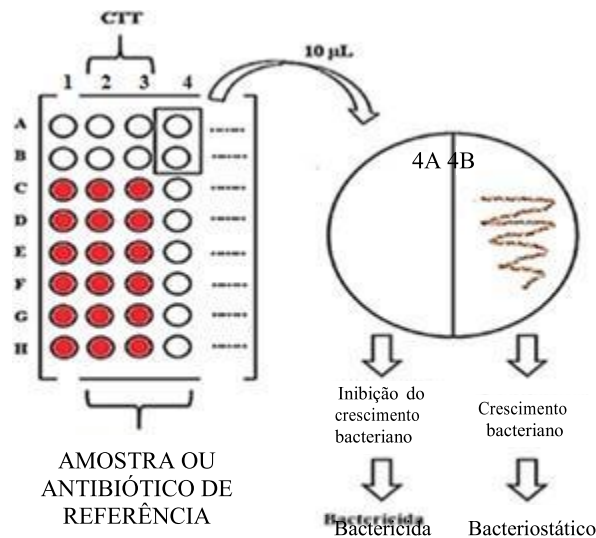
Fonte: ADAPTADO DE SILVA et. al., 2012

Após incubação à $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, em aerobiose, por 16 a 20 h, realizou-se a leitura das microplacas por meio da adição de 10 μL de solução de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (CTT) a 1 mg/mL em todos os poços, exceto naqueles da coluna 4, referentes a uma das quadruplicatas dos extratos, frações, glaucolídeo A e antibióticos testados, cujos conteúdos foram utilizados para o estabelecimento da CBM e para a classificação do efeito antibacteriano bactericida ou bacteriostático. Após a adição do CTT, as microplacas foram incubadas por 30 min nas mesmas condições anteriormente descritas. Após incubação, os poços que apresentaram coloração rosa a avermelhada indicaram crescimento bacteriano, e os que mantiveram a cor original foram compatíveis com ausência de crescimento. 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-A9 (CLSI, 2012).

4.8.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e classificação do efeito antibacteriano como bactericida ou bacteriostático

Como descrito ao final do item 4.8.2, a partir dos conteúdos dos poços das colunas das microplacas que não receberam solução de CTT e dos quais não foi observado crescimento bacteriano (colunas 4, 8 e 12 exemplificadas na Figura 19; pág. 59), foram retirados 10 μL com auxílio de alça microbiológica calibrada estéril descartável. Essas alíquotas foram estriadas em placas de Petri contendo AMH, e após incubação dessas placas em estufa a $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 18 a 20 h, em aerobiose, analisou-se a presença ou ausência de crescimento de colônias. Assim, as concentrações de EL-Vp, EF-Vp, frações desses extratos e glaucolídeo A que permitiram o desenvolvimento bacteriano no AMH foram definidas como bacteriostáticas, e as que o inibiram como bactericidas.

Figura 22 - Imagem ilustrativa dos procedimentos para determinação da Concentração Bactericida Mínima e para classificação do efeito antibacteriano como bactericida ou bacteriostático



CTT: cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio.

Fonte: ADAPTADO DE SANTANA, 2015

Com o intuito de se aprofundar as investigações microbiológicas sobre *V. polyanthus*, optou-se pela realização do efeito combinatório de EL-Vp, EF-Vp e glaucolídeo A com CHL, bem como pela avaliação da provável ação antibacteriana desses extratos e dessa substância sobre *S. aureus*. Para execução desses experimentos foram empregadas as cepas *S. aureus* (ATCC[®] 25923), *S. aureus* (ATCC[®] 29213) e MRSA 1485279. A seleção dessas três cepas ocorreu pelos seguintes motivos, a saber: 1) *S. aureus* (ATCC[®] 25923) é uma cepa sensível à meticilina (MSSA) e formadora de biofilme; 2) *S. aureus* (ATCC[®] 29213) é uma cepa MSSA isolada de ferida e não formadora de biofilme; e 3) MRSA 1485279 foi isolada de ponta de catéter de paciente com diagnóstico de infecção da corrente sanguínea, e que apresentou perfil de resistência ao maior número de agentes antibacterianos constantes do painel do sistema VITEK[®]2, sendo caracterizada como MRSA pela resistência à oxacilina (CIM \geq 4 μ g/mL) e pelo teste de triagem com cefoxitina (positivo) (CLSI, 2014).

4.8.4 Método de *Time Kill*

A atividade antibacteriana foi também investigada pelo método de *time kill* realizado segundo D'Arrigo e colaboradores (2010), com pequenos ajustes. Este método permite que se determine o intervalo de tempo em que a amostra impede o crescimento do micro-organismo testado, fornecendo a dinâmica de ação dessa amostra e sua interação com o

tempo, e classificando o efeito como bactericida ou bacteriostático (MITCHELL et al., 2012). Para tanto, suspensões das cepas bacterianas selecionadas na densidade de 5×10^5 UFC/mL foram expostas a EL-VP, EF-Vp, glaucolídeo A, AMP e CHL, nas concentrações de 0,5x, 1x e 2x CIM para EL-Vp frente à *S. aureus* (ATCC[®] 29213), *S. aureus* (ATCC[®] 25923) e MRSA 1485279; de 0,5x, 1x e 1,5x CIM para EF-Vp frente à *S. aureus* (ATCC[®] 29213), e de 0,5x, 1x e 2x CIM frente à *S. aureus* (ATCC[®] 25923) e MRSA 1485279; e de 1x CIM para AMP e CHL frente à essas três cepas. O valor máximo para EF-Vp frente à *S. aureus* (ATCC[®] 29213) foi diferente dos demais visto que a CIM determinada foi igual a 5000 µg/mL, equivalente ao limite superior do gradiente de concentração testado. Como controle de crescimento bacteriano foi utilizado CMH contendo somente inóculo bacteriano. As leituras das absorbâncias foram registradas em espectrofotômetro a 630 nm antes da incubação ($t = 0$) e nos intervalos de tempo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 24 h de incubação a $35^\circ \pm 2^\circ \text{C}$, em aerobiose. A curva de crescimento bacteriano foi construída em função da variação da absorbância pelo tempo utilizando o *software GraphPad Prism*[®] versão 5.

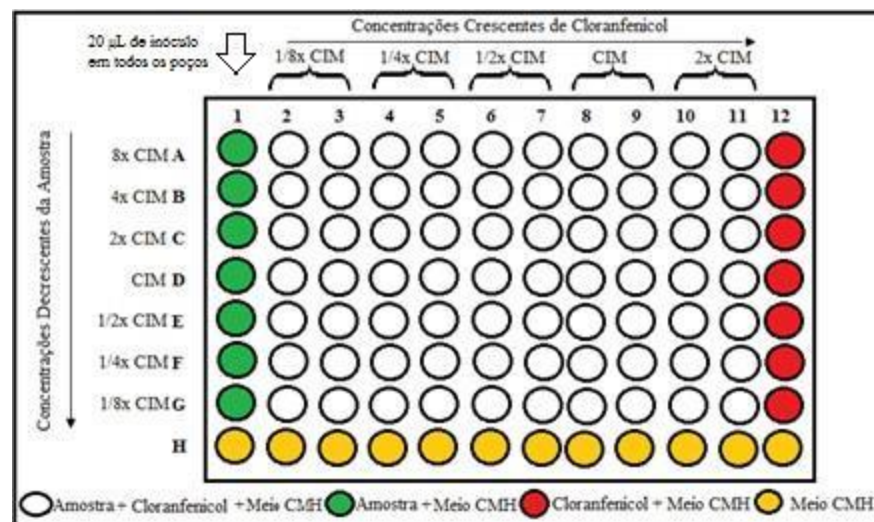
4.9 EFEITO COMBINATÓRIO DOS EXTRATOS DE LAVAGEM FOLIAR (EL-Vp) E FLORAL (EF-Vp) DE *Vernonia polyanthes* E GLAUCOLÍDEO A COM CLORANFENICOL (CHL)

4.9.1 Método de *Checkerboard*

O efeito combinatório de EL-Vp, EF-Vp e glaucolídeo A com CHL foi investigado por meio do método de *checkerboard* usando a técnica de microdiluição segundo Fadli e colaboradores (2012). Resumidamente, em microplaca de 96 poços de fundo chato foram adicionados volumes de CMH com concentrações de EL-Vp, EF-Vp ou glaucolídeo A de 1/8x a 8x CIM (orientação vertical, da coluna A até a H), que foram combinados com CHL em concentrações de 1/8x a 2x CIM (orientação horizontal, da linha 1 até a 12), configurando uma imagem semelhante a um tabuleiro de xadrez (Figura 23). As diluições seriadas de EL-Vp, EF-Vp ou glaucolídeo A e CHL foram misturadas de modo que cada linha (e coluna) continha uma concentração do primeiro agente e concentração crescente do segundo. As suspensões bacterianas foram padronizadas a partir de cultura em CMH, de 18 a 20 h, em estufa bacteriológica a $35^\circ \pm 2^\circ \text{C}$, em aerobiose, adicionando-se solução salina estéril até atingir turvação igual à suspensão do tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/mL), a qual foi utilizada no ensaio. Inicialmente, os 96 poços das microplacas

foram preenchidos com 80 μL de CMH. Em seguida, foram preparadas SEs do CHL que variaram de 1/8x a 2x CIM e, após, foram pipetados 50 μL dessas soluções para cada poço específico (coluna 2 a 11) conforme mostrado na Figura 23. Da mesma maneira, foram preparadas SEs de EL-Vp, EF-Vp e glaucolídeo A que variaram de 8x a 1/8x CIM de acordo com cada cepa testada e, em seguida, foram transferidos 50 μL dessas soluções para cada poço específico (linha A até G). Dessa forma, a coluna 1 continha a amostra (extrato ou glaucolídeo A) acrescida de CMH, e a linha H somente CMH. Em outra microplaca, foi realizado o controle de crescimento bacteriano. Adicionalmente, foram distribuídos 20 μL da suspensão bacteriana em cada poço. Finalmente, as microplacas foram incubadas por 24 h, em estufa bacteriológica a $35^\circ \pm 2^\circ\text{C}$, em aerobiose, e após esse período, realizou-se a leitura por meio da adição de 10 μL de solução de CTT a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em todos os poços. O Índice da Concentração Inibitória Fracionada (do inglês FICI, *Fractional Inhibitory Concentration Index*) foi calculado por meio da seguinte equação (FADLI et al., 2012):

Figura 23 - Imagem ilustrativa do preparo da microplaca para realização do método de *checkerboard*



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

Com base nos valores de FICI, Fadli e colaboradores (2012) propuseram a seguinte categorização:

- Sinergismo total: $\text{FICI} \leq 0,5$;
- Sinergismo parcial: $0,5 < \text{FICI} \leq 0,75$;

- Sem efeito: $0,75 < FICI \leq 2$;
- Antagonismo: $FICI > 2$.

4.10 MODO DE AÇÃO DOS EXTRATOS DE LAVAGEM FOLIAR (EL-Vp) E FLORAL (EF-Vp) DE *Vernonia polyanthes*

4.10.1 Ensaio de viabilidade celular bacteriana

O ensaio de viabilidade de células bacterianas na presença de EL-Vp e EF-Vp foi realizado segundo protocolo previamente descrito por Kim e colaboradores (2015), com discretas adaptações. Células bacterianas (1 μL) subcultivadas em AMH foram ressuspensas em solução salina estéril (NaCl 0,9% p/v) e, então, essas suspensões foram padronizadas à densidade ótica de 0,7 em 610 nm. Em seguida, 1000 μL dessas suspensões padronizadas foram adicionadas a 19 mL de tampão fosfato pH 7,1 (50mM) estéril com 0,5x, 1x e 2x CIM para EL-Vp e com 0,5x, 1,5x e 2x CIM para EF-Vp. Os valores para EF-Vp frente à *S. aureus* (ATCC[®] 29213) foram diferentes dos demais visto que a CIM determinada foi igual a 5000 $\mu\text{g/mL}$, equivalente ao limite superior do gradiente de concentração testado. Alíquotas na ordem de diluição de 10^{-5} foram incubadas em estufa bacteriológica por 1 h a $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, em aerobiose, na presença destes extratos, e posteriormente inoculadas em placas de Petri contendo TSA e novamente incubadas a $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, em aerobiose, por 18 a 20 h. O resultado foi expresso graficamente como $\text{UFC mL}^{-1} \times 10^5$ utilizando o *software GraphPad Prism*[®] versão 5. A interferência do sistema solvente-dilúente foi verificada por meio do controle das células bacterianas na presença de DMSO, e como controles positivos foram utilizados AMP e CHL na concentração de 1x CIM.

4.10.2 Teste de extravasamento de substâncias absorvidas a 280 nm

As suspensões de células bacterianas foram preparadas conforme descrito no item 4.10.1 e delas foram obtidos sobrenadantes usados para medir o extravasamento de substâncias (perda de proteínas e material genético intracelular) conforme descrito por Kim e colaboradores (2015), com pequenos ajustes. Assim, 1mL das suspensões bacterianas tratadas e não tratadas com EL-Vp e EF-Vp e controles nas concentrações descritas em 4.10.1, foi incubado em estufa bacteriológica por 1 h, a $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, em aerobiose. Após incubação, a mistura foi retirada, centrifugada (10.000 x g por 10 min), e a absorbância do sobrenadante foi então determinada a 280 nm em espectrofotômetro. O resultado foi expresso graficamente

como razão entre células tratadas e não tratadas utilizando o *software GraphPad Prism*[®] versão 5.

5 RESULTADOS

5.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS DE LAVAGEM FOLIAR (EL-Vp) E FLORAL (EF-Vp) DE *Vernonia polyanthes*

A Tabela 4 apresenta os resultados dos rendimentos de EL-Vp e EF-Vp, em porcentagem (%), obtidos a partir de 732 g e 1000 g de folhas íntegras e secas e flores de *V. polyanthes*, respectivamente. Pela análise desta Tabela, observa-se que o rendimento obtido com EF-Vp (3,4%) foi superior àquele para EL-Vp (2,8%), fornecendo biomassa também maior após o processo de extração (28 g e 25 g, nessa ordem).

Tabela 4 - Resultados da massa (g) e do rendimento (%) dos extratos de lavagem foliar (EL-Vp) e floral (EF-Vp) de *Vernonia polyanthes* obtidos em agosto de 2015

Material Vegetal	Extrato	Massa do Extrato (g)	Rendimento (%)
Folha	EL-Vp	25	2,8
Flor	EF-Vp	28	3,4

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

5.2 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS DE LAVAGEM FOLIAR (EL-Vp) E FLORAL (EF-Vp) DE *Vernonia polyanthes*

A partir do fracionamento dos extratos de *V. polyanthes*, foram obtidas dez frações de EF-Vp (EF-Vp F₁ a EF-Vp F₁₀) e sete de EL-Vp (EL-VpF₁ a EL-Vp F₇), cujos rendimentos são mostrados pelas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5 - Resultados da massa (g) e rendimento (%) das frações obtidas do extrato de lavagem floral (EF-Vp) e respectivas fases móveis utilizadas

Fração	Massa (g)	Rendimento (%)	Fase Móvel
EF-Vp F ₁	3,52	17,60	Hex:DCM (90:10)
EF-Vp F ₂	0,20	1,01	Hex:DCM (80:20)
EF-Vp F ₃	0,02	0,08	Hex:DCM (80:20)
EF-Vp F ₄	1,33	6,66	Hex:DCM (50:50)
EF-Vp F ₅	2,39	11,97	Hex:DCM (25:75)
EF-Vp F ₆	2,46	12,32	DCM
EF-Vp F ₇	2,06	10,30	DCM
EF-Vp F ₈	5,73	28,64	DCM:MeOH (75:25)
EF-Vp F ₉	1,31	6,54	DCM:MeOH (50:50)
EF-Vp F ₁₀	0,19	0,93	MeOH

Hex: hexano; DCM: diclorometano; MeOH: metanol.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

Tabela 6 - Resultados da massa (g) e rendimento (%) das frações obtidas do extrato de lavagem foliar (EL-Vp) e respectivas fases móveis utilizadas

Fração	Massa (g)	Rendimento (%)	Fase móvel
EL-Vp F ₁	2,66	13,32	Hex
EL-Vp F ₂	7,60	37,98	Hex:Acoet (90:10)
EL-Vp F ₃	1,21	6,06	Hex:Acoet(90:10)
EL-Vp F ₄	2,40	12,02	Hex:Acoet(70:30)
EL-Vp F ₅	3,82	19,09	Hex:Acoet(50:50)
EL-Vp F ₆	0,45	2,25	Hex:Acoet(30:70)
EL-Vp F ₇	0,74	3,72	Acoet

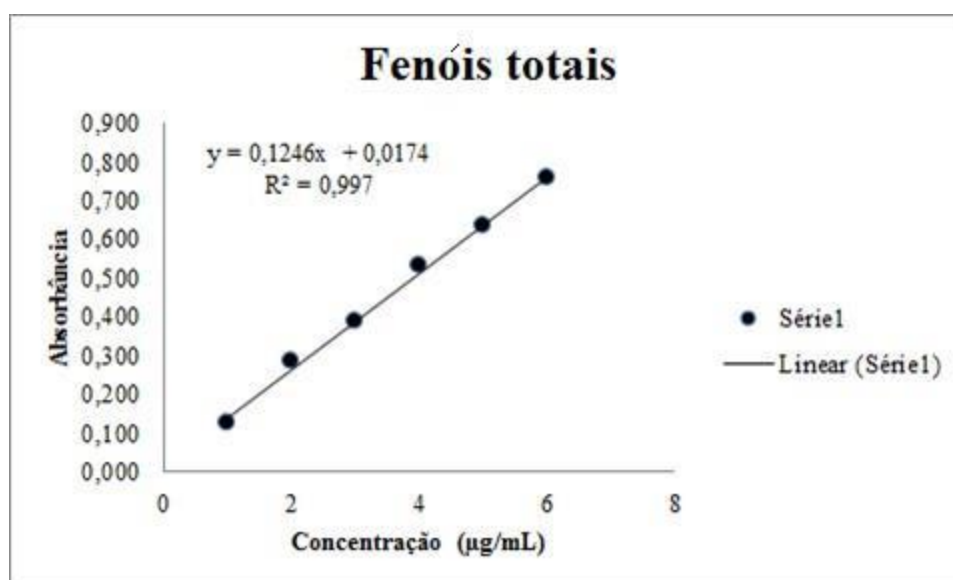
Hex: hexano; Acoet: acetato de etila.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

5.3 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE FENÓIS E FLAVONOIDES TOTAIS

Os teores de fenóis totais foram determinados por meio da equação da reta obtida a partir da análise de regressão linear da curva de calibração do ácido gálico (Figura 24). A equação da reta foi $y = 0,1246x + 0,0174$, sendo o coeficiente de determinação $R^2 = 0,997$. O valor de "y" na equação foi substituído pelas absorvâncias dos extratos e o valor de "x" resultante correspondeu ao teor de fenóis totais no extrato analisado em equivalente de ácido gálico (g/100 g), considerando os fatores de diluição empregados (Tabela 7).

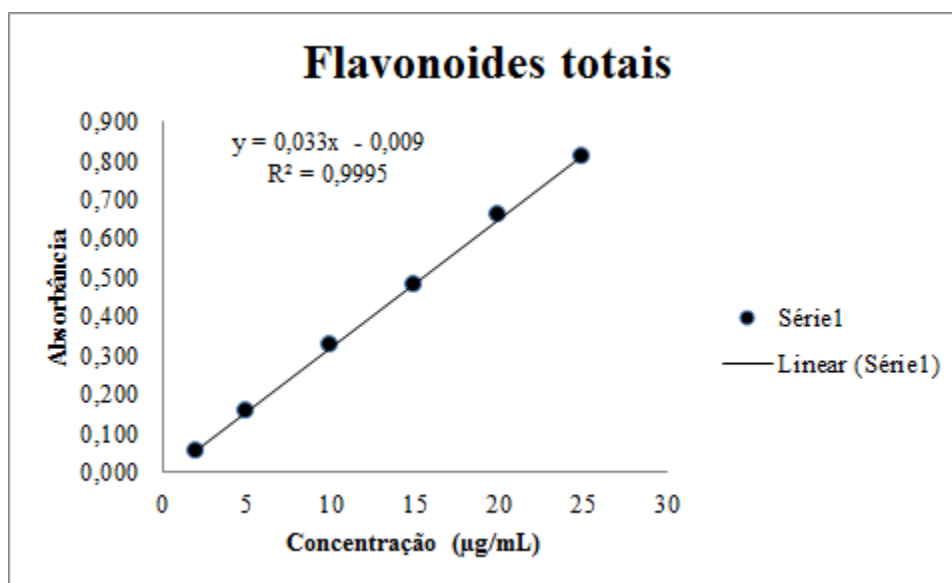
Figura 24 - Imagem gráfica da curva de calibração do ácido gálico



Fonte: ELABORADO PELO PROPRIO AUTOR, 2017

A determinação do teor de flavonoides totais foi realizada por meio da equação da reta obtida a partir da análise de regressão linear da curva de calibração da rutina (Figura 25). Assim como efetuado para o estabelecimento do teor de fenóis totais, a equação da reta foi $y = 0,033x - 0,009$, sendo o coeficiente de determinação $R^2 = 0,9995$. O valor de "y" na equação foi substituído pelas absorvâncias dos extratos e o valor de "x" resultante correspondeu ao teor de flavonoides totais no extrato analisado em equivalente de rutina (g/100 g), considerando os fatores de diluição empregados (Tabela 7).

Figura 25 - Imagem gráfica da curva de calibração da rotina



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

A Tabela 7 apresenta os resultados dos teores de fenóis e flavonoides totais de EL-Vp e EF-Vp em g/100 g EAG e ER, respectivamente. Conforme se observa pela análise desta Tabela, os valores dos teores de fenóis totais foram iguais a $1,41 \pm 0,04$ e $2,16 \pm 0,04$ g/100 g EAG para EL-Vp e EF-Vp, nessa ordem, sendo que o maior teor foi observado para EF-Vp. Em relação aos resultados dos teores de flavonoides totais, os valores foram de $16,55 \pm 0,01$ e $6,28 \pm 0,01$ g/100 g ER para EL-Vp e EF-Vp, respectivamente, sendo que o maior teor foi obtido para EL-Vp.

Tabela 7 - Valores dos teores de fenóis e flavonoides totais dos extratos de lavagem foliar e floral de *Vernonia polyanthes*

Extrato	Fenóis Totais (g/100 gEAG)	Flavonoides Totais (g/100 g ER)
EL-Vp	$1,41 \pm 0,04$	$16,55 \pm 0,01$
EF-Vp	$2,16 \pm 0,04$	$6,28 \pm 0,01$

EL-Vp: extrato de lavagem foliar de *Vernonia polyanthes*; EF-Vp: extrato de lavagem floral de *Vernonia polyanthes*.

Os valores correspondem à média \pm desvio padrão. As médias diferiram entre si após análise de variância seguida do teste de Tukey (ANOVA) para $p < 0,05$.

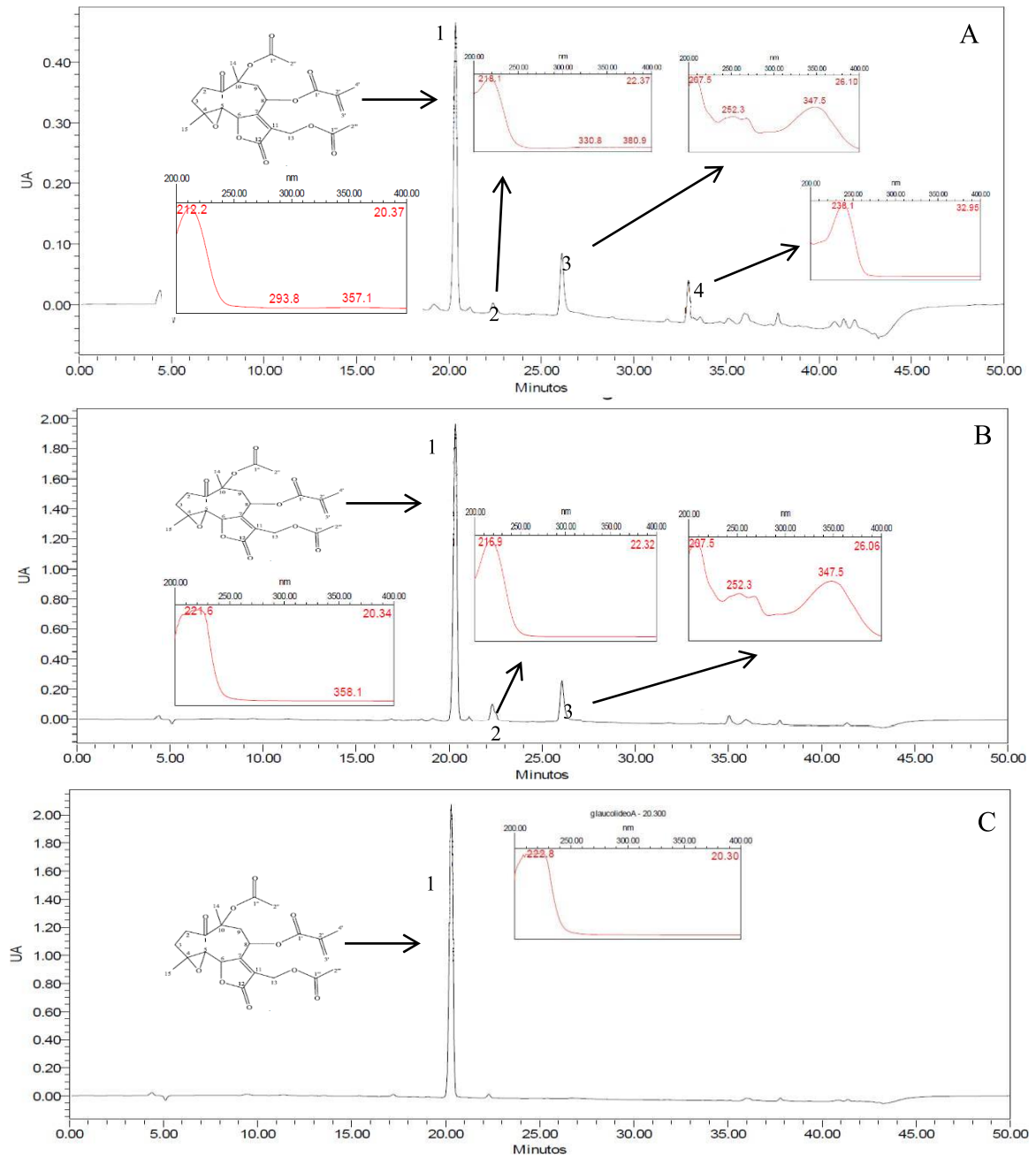
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

5.4 ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS DE LAVAGEM FOLIAR (EL-Vp) E FLORAL (EF-Vp) DE *Vernonia polyanthes* E DO GLAUCOLÍDEO A POR CROMATOGRRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODO (CLAE-DAD)

No presente estudo, EL-Vp, EF-Vp e glaucolídeo A foram submetidos à análise por CLAE-DAD nos comprimentos de onda de 230, 254 e 330 nm para investigação de suas composições químicas.

A Figura 26 apresenta os perfis cromatográficos de EL-Vp, EF-Vp e glaucolídeo A obtidos no comprimento de onda de 230 nm. Pela análise desses perfis, pode-se observar a presença de quatro picos majoritários para EL-Vp e três para EF-Vp, com a presença do pico principal do glaucolídeo A, com tempo de retenção (t_R) de 20,367 e 20,338 para EL-Vp e EF-Vp, respectivamente. Essa observação foi confirmada por meio do cromatograma do glaucolídeo A, com t_R de 20,3 min [Figura 26-(C)].

Figura 26 - Perfil cromatográfico do (A) extrato de lavagem foliar de *Vernonia polyanthes*, (B) extrato de lavagem floral de *Vernonia polyanthes*, e (C) glaucolídeo A, obtido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Detecção por Arranjo de Diodo a 230 nm e respectivos espectros de absorção dos principais picos detectados



EL-Vp: extrato de lavagem foliar de *Vernonia polyanthes*; EF-Vp: extrato de lavagem floral de *Vernonia polyanthes*.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

Tabela 8 - Tempo de retenção e área sob a curva dos picos detectados nos cromatogramas obtidos por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Detecção por Arranjo de Diodo no comprimento de onda de 230 nm para os extratos de lavagem foliar e floral de *Vernonia polyanthes* e glaucolídeo A

Amostra	Tempo de retenção (t_R) em minutos				Área sob a curva dos picos			
	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4
EL-Vp	20,367	22,374	26,101	32,955	6617815	319495	1589848	827659
EF-Vp	20,338	22,332	26,063	ND	27714346	2045767	4112583	ND
GA	20,300	ND	ND	ND	28977824	ND	ND	ND

EL-Vp: extrato de lavagem foliar de *Vernonia polyanthes*; EF-Vp: extrato de lavagem floral de *Vernonia polyanthes*; GA: glaucolídeo A; ND: não determinado.

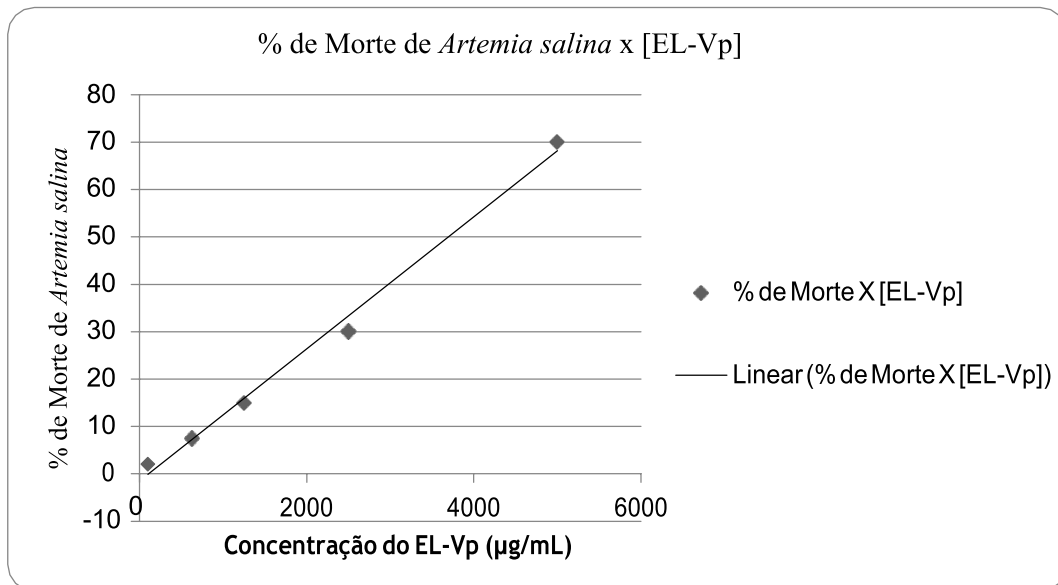
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

5.5 TRIAGEM DE TOXICIDADE

5.5.1 Triagem de citotoxicidade através da determinação da toxicidade aguda por meio do bioensaio com *Artemia salina*

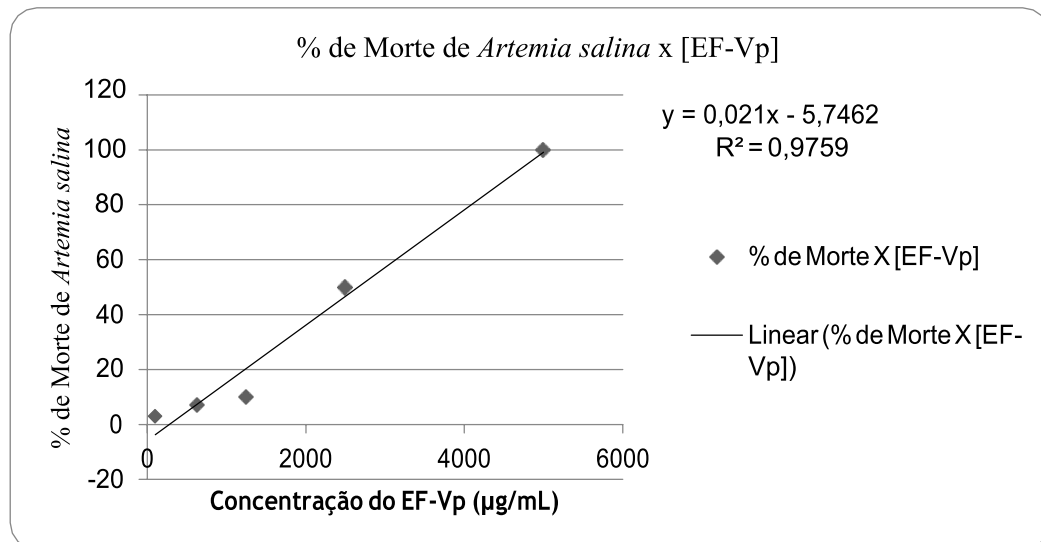
Conforme mostram as Figuras 27, 28 e 29, foram elaboradas retas a partir das porcentagens de morte (%M) de *A. salina* (eixo y) versus as concentrações dos extratos (eixo x). Como parâmetro de avaliação da toxicidade aguda, foram estimados os prováveis valores de CL_{50} para cada extrato investigado com base nesta análise gráfica. EL-Vp, EF-Vp e glaucolídeo A apresentaram valores de CL_{50} iguais a 3706 $\mu\text{g/mL}$, 2655 $\mu\text{g/mL}$ e 2653 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O timol (controle positivo) revelou CL_{50} de 38 $\mu\text{g/mL}$, sendo considerado altamente tóxico, e os controles negativos apresentaram %M < 20%. Segundo Meyer e colaboradores (1982), valores de CL_{50} > 1000 $\mu\text{g/mL}$ para extratos vegetais são considerados atóxicos frente ao microcrustáceo *A. salina*.

Figura 27 - Relação entre a porcentagem de morte de *Artemia salina* e a concentração do extrato de lavagem foliar de *Vernonia polyanthes*



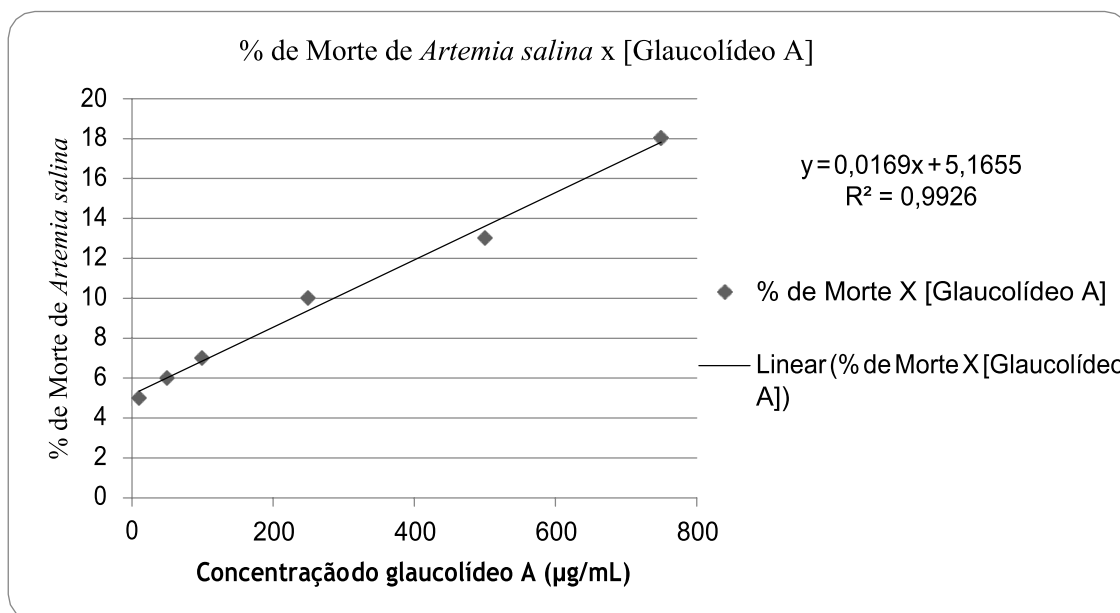
EL-Vp: extrato de lavagem foliar de *Vernonia polyanthes*.
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

Figura 28 - Relação entre a porcentagem de morte de *Artemia salina* e a concentração do extrato de lavagem floral de *Vernonia polyanthes*



EF-Vp: extrato de lavagem floral de *Vernonia polyanthes*.
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

Figura 29 - Relação entre a porcentagem de morte de *Artemia salina* e a concentração do glaucolídeo A



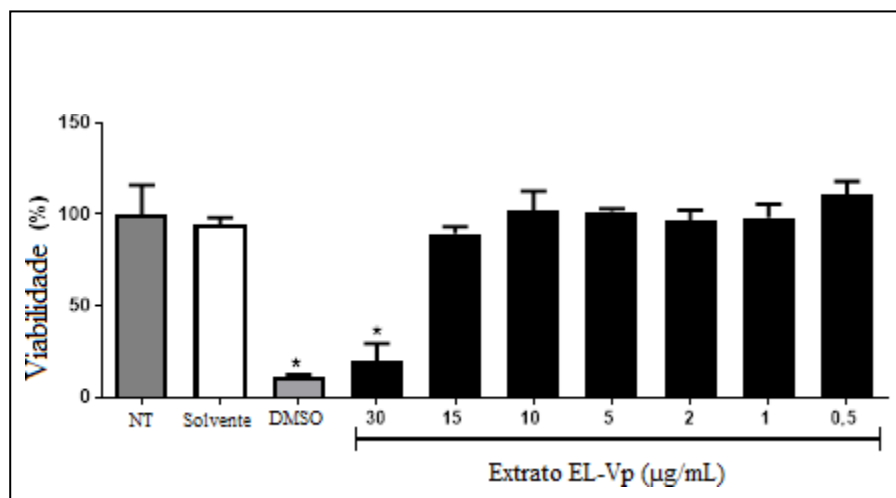
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

5.5.2 Triagem de citotoxicidade através do ensaio de viabilidade celular pelo método do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT)

A citotoxicidade *in vitro* do EL-Vp e do glaucolídeo A foi também avaliada através do ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT, utilizando células RAW 264.7.

Como apresenta a Figura 30, EL-Vp (30 µg/mL) reduziu a viabilidade dos macrófagos RAW 264.7, mostrando-se menos tóxico que DMSO 5% (controle positivo). Não foi possível obter o resultado de citotoxicidade para EF-Vp a tempo de ser inserido no presente estudo, em virtude de não se ter atingido a confluência de 80%, necessária para a realização deste ensaio.

Figura 30 - Avaliação da citotoxicidade do extrato de lavagem foliar (EL-Vp) de *Vernonia polyanthes* por meio do ensaio de viabilidade celular utilizando linhagem de célula não tumoral RAW 264.7

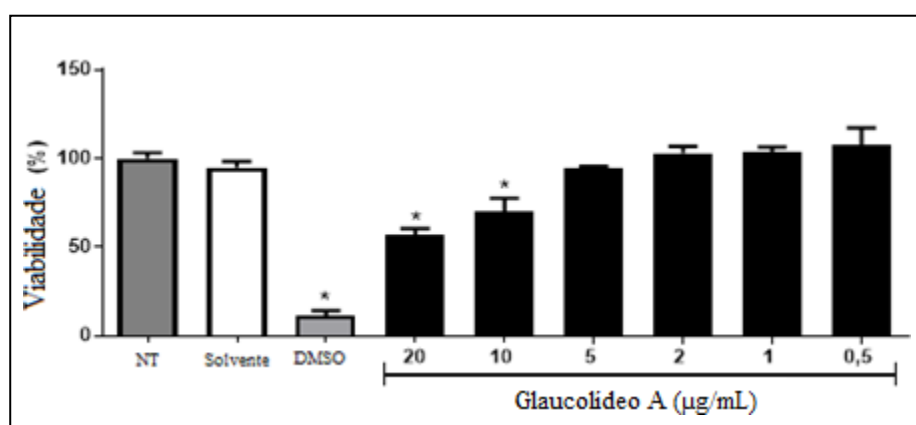


Efeito do EL-Vp na viabilidade celular pelo ensaio MTT. As células RAW 264.7 foram incubadas na presença ou ausência de EL-Vp (0,5 a 30 µg/mL) durante 48 h. DMSO 5% e DMSO 0,5% foram usados como controles positivo e do sistema solvente/diluyente, nessa ordem. Os dados são apresentados como médias ± desvio padrão. * $p < 0,05$ versus nenhuma célula tratada (NT).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

A Figura 31 apresenta os resultados da citotoxicidade obtidos com o glaucolídeo A. Pela análise desta Figura, foi observada $CL_{50} > 50\%$ para glaucolídeo A na concentração de 20 µg/mL, sendo essa substância considerada atóxica quando comparada ao controle positivo (DMSO 5%).

Figura 31 - Avaliação da citotoxicidade do glaucolídeo A por meio do ensaio de viabilidade celular utilizando linhagem de célula não tumoral RAW 264.7



Efeito do glaucolídeo A na viabilidade celular pelo ensaio MTT. As células RAW 264.7 foram incubadas na presença ou ausência de glaucolídeo A (0,5 a 20 µg/mL) durante 48 h. DMSO 5% e DMSO 0,5% foram usados como controles positivo e do sistema solvente/diluyente, nessa ordem. Os dados são apresentados como médias ± desvio padrão. * $p < 0,05$ versus nenhuma célula tratada (NT).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *in vitro* DOS EXTRATOS DE LAVAGEM FOLIAR (EL-Vp) E FLORAL (EF-Vp) DE *Vernonia polyanthes*, DAS FRAÇÕES OBTIDAS DESSES EXTRATOS E DO GLAUCOLÍDEO A

A Tabela 9 apresenta os valores de CIM e CBM para EL-Vp, EF-Vp e glaucolídeo A. Conforme mostra esta Tabela, EL-Vp inibiu o crescimento de quatro das oito cepas bacterianas testadas, sendo mais eficiente frente à *S. aureus* (ATCC[®] 25923) e *S. aureus* (ATCC[®] 29213), com valores de CIM iguais a 625 e 1250 µg/mL, respectivamente. EF-Vp, por sua vez, foi ativo frente à três destas oito cepas avaliadas [*S. aureus* (ATCC[®] 25923) (CIM = 1250 µg/mL), *S. aureus* (ATCC[®] 29213) (CIM = 5000 µg/mL) e *P. aeruginosa* (ATCC[®]27853) (CIM = 5000 µg/mL)]. Ainda segundo esta Tabela, não foi observada atividade antibacteriana do glaucolídeo A no gradiente de concentração testado (até 500 µg/mL). Porém, visto que o presente estudo também visou à investigação do efeito combinatório dessa substância com cloranfenicol por meio do método de *checkerboard*, elevou-se o gradiente testado e glaucolídeo A mostrou-se ativo na concentração de 750 µg/mL frente à *S. aureus* (ATCC[®] 25923) e *S. aureus* (ATCC[®] 29213). Em relação à CBM, foi possível estabelecer os valores obtidos para EL-Vp e EF-Vp frente à *S. aureus* (ATCC[®] 25923) (CBM = 2500 µg/mL), *S. aureus* (ATCC[®] 29213) (CBM = 2500 µg/mL) e *P. aeruginosa* (ATCC[®] 9027) (CBM = 5000 µg/mL), e frente à *S. aureus* (ATCC[®] 25923) (CBM = 5000 µg/mL) e *P. aeruginosa* (ATTC[®] 27853) (CBM = 5000 µg/mL), nessa ordem. Para as demais cepas, os valores de CBM foram reportados como > 5000 µg/mL (Tabela 9). O efeito antibacteriano de EL-Vp frente à *S. aureus* (ATCC[®] 25923) e *S. aureus* (ATCC[®] 29213) foi classificado como bacteriostático, e mostrou-se distinto entre as cepas de *P. aeruginosa*, sendo bactericida para a (ATTC[®] 9027) e bacteriostático para a (ATTC[®] 27853). Ainda, EF-Vp apresentou efeito bacteriostático frente à *S. aureus* (ATCC[®] 25923) e bactericida frente à *P. aeruginosa* (ATTC[®] 27853).

Tabela 9 - Valores da Concentração Inibitória Mínima e da Concentração Bactericida Mínima dos extratos de lavagem foliar e floral de *Vernonia polyanthes*, do glaucolídeo A, da ampicilina e do cloranfenicol frente às cepas de referência ATCC®

Cepa de Referência ATCC®	Concentração Inibitória Mínima (CIM) (µg/mL)					Concentração Bactericida Mínima (CBM) (µg/mL)		
	Extrato / Substância Pura / Antibiótico**					Extrato / Substância Pura		
	EL-Vp	EF-Vp	GA	AMP**	CHL**	EL-Vp	EF-Vp	GA
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC® 25923™)	625	1250	750*	< 4	8	2500	5000	> 500
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC® 29213™)	1250	5000	750*	< 4 ^a	8 ^b	2500	> 5000	> 500
<i>Escherichia coli</i> (ATCC® 10536™)	> 5000	> 5000	> 500	< 4	< 4	> 5000	> 5000	> 500
<i>Escherichia coli</i> (ATCC® 25922™)	> 5000	> 5000	> 500	< 4 ^d	< 4 ^d	> 5000	> 5000	> 500
<i>Salmonella Choleraesuis</i> (ATCC® 10708™)	> 5000	> 5000	> 500	< 4	< 4	> 5000	> 5000	> 500
<i>Salmonella Typhimurium</i> (ATCC® 13311™)	> 5000	> 5000	> 500	< 4	< 4	> 5000	> 5000	> 500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC® 9027™)	5000	> 5000	> 500	> 500	64	5000	> 5000	> 500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC® 27853™)	5000	5000	> 500	> 500 ^c	64 ^c	> 5000	5000	> 500

EL-Vp: extrato de lavagem foliar de *Vernonia polyanthes*; EF-Vp: extrato de lavagem floral de *Vernonia polyanthes*; GA: glaucolídeo A; AMP: ampicilina; e CHL: cloranfenicol.

*Ajuste do gradiente de concentração para o glaucolídeo A frente à *S. aureus* (ATCC® 25923) e *S. aureus* (ATCC® 29213) para determinar a CIM visando à realização do método de *checkerboard*. **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 a 2 µg/mL; (b) 2 a 16 µg/mL; (c) não reportado; (d) 2 a 8 µg/mL. Esses valores classificam essas bactérias como sensíveis, com exceção de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853™).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

A Tabela 10 mostra os resultados de CIM e CBM de EL-Vp, EF-Vp e glaucolídeo A frente às cepas bacterianas clinicamente relevantes testadas. Pela análise desta Tabela, observa-se que EL-Vp e EF-Vp foram ativos frente às cinco cepas MRSA (MRSA 1485279, 1605677, 1664534, 1688441 e 1830466), com valores de CIM entre 78 e 5000 $\mu\text{g/mL}$, e incapazes de inibir o crescimento das três cepas de *Salmonella* Enteritidis e das duas *Salmonella* spp. no gradiente de concentração investigado. Com exceção da MRSA 1485279, com valor de CIM igual a 375 $\mu\text{g/mL}$, o glaucolídeo A foi inativo para as demais cepas de rotina testadas no gradiente de concentração proposto. Conforme também apresentado pela Tabela 10, foi possível estabelecer os valores de CBM para MRSA 1605677, MRSA 1664534 e MRSA 1830466 frente a ambos os extratos investigados. O efeito antibacteriano foi classificado como bacteriostático para as cepas MRSA testadas cujas CIM puderam ser determinadas (Tabela 10). Em relação ao glaucolídeo A, também foi observado efeito bacteriostático quando essa substância foi testada frente à MRSA 1485279.

Tabela 10 - Valores da Concentração Inibitória Mínima e da Concentração Bactericida Mínima dos extratos de lavagem foliar e floral de *Vernonia polyanthes*, do glaucolídeo A, da ampicilina e do cloranfenicol frente às cepas de rotina

Cepa de Rotina	Concentração Inibitória Mínima (CIM) ($\mu\text{g/mL}$)					Concentração Bactericida Mínima (CBM) ($\mu\text{g/mL}$)		
	Extrato / Substância Pura / Antibiótico					Extrato / Substância Pura		
	EL-Vp	EF-Vp	GA	AMP*	CHL**	EL-Vp	EF-Vp	GA
MRSA 1485279	1250	625	375	500	125	> 5000	> 5000	> 500
MRSA 1605677	156	78	> 500	125	8	1250	1250	> 500
MRSA 1664534	1250	2500	> 500	16	< 4	2500	5000	> 500
MRSA 1688441	5000	5000	> 500	250	< 4	> 5000	> 5000	> 500
MRSA 1830466	1250	2500	> 500	64	4	2500	5000	> 500
<i>Salmonella</i> Enteritidis 1406591	> 5000	> 5000	> 500	< 4	< 4	> 5000	> 5000	> 500
<i>Salmonella</i> Enteritidis 1418594	> 5000	> 5000	> 500	< 4	< 4	> 5000	> 5000	> 500
<i>Salmonella</i> Enteritidis 1428260	> 5000	> 5000	> 500	< 4	< 4	> 5000	> 5000	> 500
<i>Salmonella</i> spp. 1266695	> 5000	> 5000	> 500	< 4	< 4	> 5000	> 5000	> 500
<i>Salmonella</i> spp. 1507708	> 5000	> 5000	> 500	> 500	< 4	> 5000	> 5000	> 500

EL-Vp: extrato de lavagem foliar de *Vernonia polyanthes*; EF-Vp: extrato de lavagem floral de *Vernonia polyanthes*; GA: glaucolídeo A; AMP: ampicilina; e CHL: cloranfenicol.

*Por definição, cepas MRSA são resistentes aos antibióticos beta-lactâmicos tais como AMP. Em relação à *Salmonella*, valores de CIM ≤ 8 e ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$ foram interpretados conforme documento M100-S24, e classificaram as cepas testadas como sensíveis e resistentes, respectivamente. **Para cepas de *Staphylococcus* spp., os valores de CIM obtidos com CHL também foram interpretados segundo este documento, a saber: CIM ≤ 8 $\mu\text{g/mL}$ = sensível, CIM = 16 $\mu\text{g/mL}$ = intermediário, e CIM ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$ = resistente. Para as *Salmonella* testadas, por sua vez, CIM ≤ 8 $\mu\text{g/mL}$ classificaram essas cepas como sensíveis a este antibiótico (CLSI, 2014).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

Os resultados de CIM e CBM de EF-Vp, das frações EF-Vp F₄, EF-Vp F₅ e EF-Vp F₆ e do glaucolídeo A são mostrados pela Tabela 11. Pela análise desta Tabela observa-se que, das 10 frações obtidas de EF-Vp, três foram avaliadas. Essa seleção se baseou na solubilidade destas frações no sistema solvente/diluyente utilizado (DMSO/Tween 80), pois foi necessário considerar a dificuldade de se estabelecer esse parâmetro nas condições exigidas pelos ensaios, e o curto espaço de tempo para fazê-lo (duração do Curso de Mestrado Acadêmico). EF-Vp, EF-Vp F₄, EF-Vp F₅ e glaucolídeo A foram ativos frente às duas cepas de referência ATCC[®] e uma de rotina testadas, com valores de CIM variando de 375 a 5000 µg/mL. Conforme também apresentado pela Tabela 11, os valores de CBM foram reportados como > 5000 e > 500 µg/mL, para EF-Vp, EF-Vp F₄, EF-Vp F₅, EF-Vp F₆ e para glaucolídeo A, nessa ordem, visto que essa foi a maior concentração estabelecida para extrato e frações e para substância pura, respectivamente. O efeito antibacteriano foi classificado como bacteriostático para todas as amostras frente às cepas testadas.

Tabela 11 - Valores da Concentração Inibitória Mínima e da Concentração Bactericida Mínima do extrato de lavagem floral de *Vernonia polyanthes*, das frações F₄, F₅ e F₆ desse extrato, do glaucolídeo A, da ampicilina e do cloranfenicol frente às cepas de referência ATCC® e de rotina

Cepa Bacteriana	Concentração Inibitória Mínima (CIM) (µg/mL)							Concentração Bactericida Mínima (CBM) (µg/mL)				
	Extrato / Fração / Substância Pura / Antibiótico							Extrato / Fração / Substância Pura				
	EF-Vp	EF-Vp F ₄	EF-Vp F ₅	EF-Vp F ₆	GA	AMP	CHL	EF-Vp	EF-Vp F ₄	EF-Vp F ₅	EF-Vp F ₆	GA
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC® 25923™)	1250	2500	5000	> 5000	750	< 4	8	5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 500
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC® 29213™)	5000	2500	2500	> 5000	750	< 4	8	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 500
MRSA 1485279	625	2500	5000	> 5000	375	500	125	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 500

EL-Vp: extrato de lavagem foliar de *Vernonia polyanthes*; EF-Vp F₄: fração número 4 do extrato de lavagem floral *Vernonia polyanthes*; EF-Vp F₅: fração número 5 do extrato de lavagem floral *Vernonia polyanthes*; EF-Vp F₆: fração número 6 do extrato de lavagem floral *Vernonia polyanthes*; GA: glaucolídeo A; AMP: ampicilina; e CHL: cloranfenicol.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

Os valores de CIM e CBM de EL-Vp e das frações EL-Vp F₁ a EL-Vp F₇ estão apresentados na Tabela 12. Pela análise desta Tabela, observa-se que as frações de EL-Vp foram ativas frente às duas cepas de referência ATCC[®] e uma de rotina testadas, com valores de CIM variando de 312,5 a 2500 µg/mL, sendo que EL-Vp F₃ se mostrou a mais eficiente entre as investigadas. Conforme também mostrado pela Tabela 12, com exceção da CBM de F₄ [*S. aureus* (ATCC[®] 25923) (CBM = 5000 µg/mL), *S. aureus* (ATCC[®] 29213) (CBM = 2500 µg/mL) e MRSA 1485279 (CBM = 1250 µg/mL)], F₃ [MRSA 1485279 (CBM = 2500 µg/mL)], F₅ [*S. aureus* (ATCC[®] 25923) (CBM = 5000 µg/mL)] e F₆ [*S. aureus* (ATCC[®] 29213) (CBM = 5000 µg/mL)], as demais frações revelaram valores > 5000 µg/mL. O efeito antibacteriano foi classificado como bacteriostático para todas as frações frente às cepas testadas.

Tabela 12 - Valores da Concentração Inibitória Mínima e da Concentração Bactericida Mínima do extrato de lavagem foliar de *Vernonia polyanthes* e das frações F₁ a F₇ desse extrato, da ampicilina e do cloranfenicol frente às cepas de referência ATCC[®] e de rotina

Cepa Bacteriana	Concentração Inibitória Mínima (CIM) (µg/mL)/ Concentração Bactericida Mínima (CBM) (µg/mL)																	
	Frações de EL-Vp																Antibiótico	
	EL-Vp		EL-Vp F ₁		EL-Vp F ₂		EL-Vp F ₃		EL-Vp F ₄		EL-Vp F ₅		EL-Vp F ₆		EL-Vp F ₇		AMP	CHL
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC [®] 25923 [™])	625	2500	625	> 5000	625	> 5000	312,5	> 5000	312,5	5000	625	5000	625	> 5000	1250	> 5000	< 4	8
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC [®] 29213 [™])	1250	2500	1250	> 5000	625	> 5000	312,5	> 5000	1250	2500	2500	> 5000	1250	5000	2500	> 5000	< 4	8
MRSA 1485279	1250	> 5000	1250	> 5000	1250	> 5000	625	2500	625	1250	1250	> 5000	625	> 5000	1250	> 5000	500	125

EL-Vp: extrato de lavagem foliar de *Vernonia polyanthes*; EL-Vp F₁ a F₇: frações de EL-Vp; AMP: ampicilina; e CHL: cloranfenicol.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

5.7 MÉTODO DE *CHECKERBOARD*

Os valores das CIMs individuais de EL-Vp, EF-Vp, glaucolídeo A e CHL frente à *S. aureus* (ATCC[®] 25923), *S. aureus* (ATCC[®] 29213) e MRSA 1485279, assim como as CIMs de suas combinações, estão apresentados na Tabela 13. Conforme mostra esta Tabela, EF-Vp quando combinado com CHL demonstrou sinergismo parcial frente à *S. aureus* (ATCC[®] 29213) e sem efeito frente às duas outras cepas bacterianas testadas. Ao serem investigados, EL-Vp e glaucolídeo A combinados com CHL revelaram antagonismo.

Tabela 13 - Valores das Concentrações Inibitórias Mínimas individuais e combinadas dos extratos de lavagem foliar e floral de *Vernonia polyanthes*, glaucolídeo A e cloranfenicol frente à *S. aureus* (ATCC® 25923), *S. aureus* (ATCC® 29213) e *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) 1485279

Cepa Bacteriana	Extrato / Substância Pura / Antibiótico	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)		FICI	Efeito Combinatório
		Sozinho	Combinado		
<i>S. aureus</i> (ATCC® 29213)	EF-Vp	5000	1250	0,75	Sinergismo Parcial
	Cloranfenicol	75	37,5		
	EL-Vp	1250	5000	> 4	Antagonismo
	Cloranfenicol	75	18,75		
	Glaucolídeo A	750	3000	> 4	Antagonismo
	Cloranfenicol	75	37,5		
<i>S. aureus</i> (ATCC® 25923)	EF-Vp	1250	2500	2,25	Sem Efeito
	Cloranfenicol	75	18,75		
	EL-Vp	625	2500	> 4	Antagonismo
	Cloranfenicol	75	37,5		
	Glaucolídeo A	750	3000	> 4	Antagonismo
	Cloranfenicol	75	18,75		
MRSA 1485279	EF-Vp	625	78,125	2,13	Sem Efeito
	Cloranfenicol	125	250		
	EL-Vp	1250	5000	> 4	Antagonismo
	Cloranfenicol	125	125		
	Glaucolídeo A	ND*	ND*	ND*	ND*
	Cloranfenicol	ND	ND	ND	ND

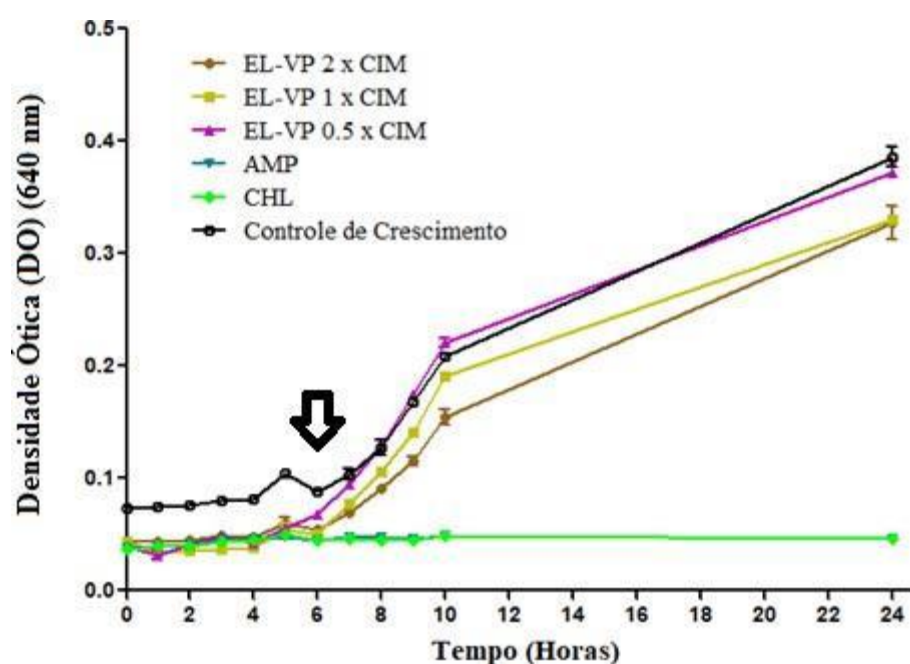
EF-Vp: extrato de lavagem floral de *Vernonia polyanthes*; EL-Vp: extrato de lavagem foliar de *Vernonia polyanthes*; FICI: do inglês, *Fraction inhibitory concentration index*; ND*: não determinado (Não foi possível estabelecer o efeito combinatório do glaucolídeo A sozinho ou combinado com o cloranfenicol frente à MRSA 1485279 pelo consumo de todo o material purificado pelo nosso grupo de pesquisa e a impossibilidade de adquiri-lo comercialmente).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

5.8 MÉTODO DE *TIME KILL*

As Figuras 32, 33, 34, 35, 36 e 37 mostram os resultados de EL-Vp e EF-Vp frente à *S. aureus* (ATCC[®] 25923), *S. aureus* (ATCC[®] 29213) e MRSA 1485279, nessa ordem, obtidos pelo método de *time kill* durante um período de incubação de 24 h. Pela análise destas Figuras observa-se que, apesar das oscilações das curvas (esse ensaio investiga a cinética bacteriana), o efeito antibiótico foi notado a partir de 6, 2 e 7 h para *S. aureus* (ATCC[®] 25923), *S. aureus* (ATCC[®] 29213) e MRSA 1485279, respectivamente. Os perfis de ação de EL-Vp e EF-Vp foram mantidos durante todo o período de observação (24 h), demonstrando visível redução da taxa de multiplicação bacteriana na dependência da concentração do extrato utilizada e da cepa bacteriana testada. Ainda, EF-Vp foi mais eficiente, demonstrando efeito bactericida dependendo da concentração utilizada e da cepa testada.

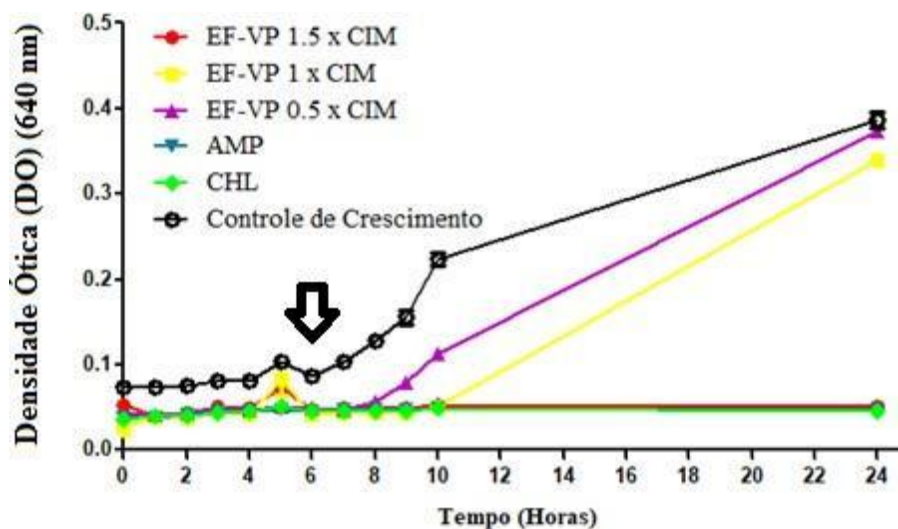
Figura 32 - Curva da cinética bacteriana de *Staphylococcus aureus* (ATCC[®] 25923) frente ao extrato de lavagem foliar de *Vernonia polyanthes* (EL-Vp), ampicilina (AMP) e cloranfenicol (CHL)



A seta indica o início da ação do extrato de lavagem foliar de *Vernonia polyanthes* (EL-Vp) sobre a cepa bacteriana testada tendo como base a comparação com a curva de crescimento dessa cepa a partir da fase exponencial (controle de crescimento).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

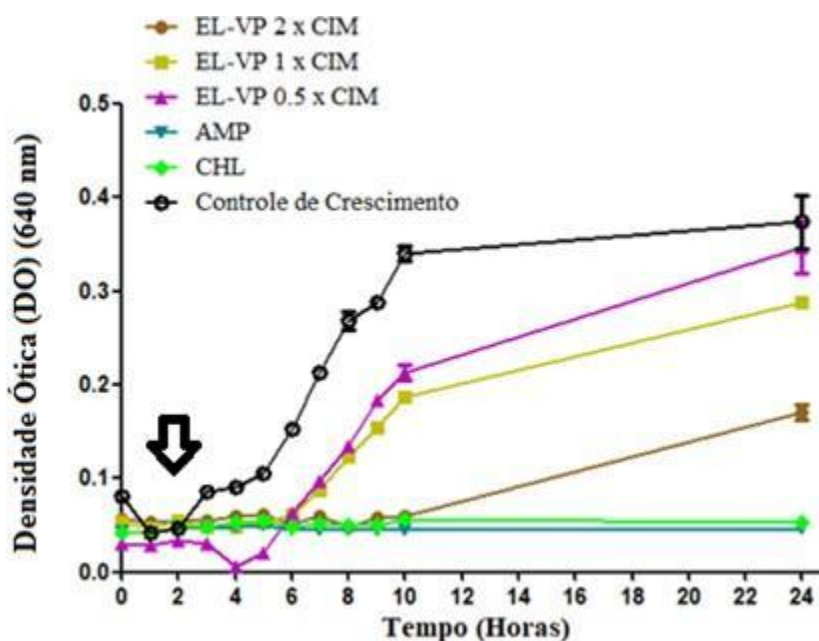
Figura 33 - Curva da cinética bacteriana de *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923) frente ao extrato de lavagem floral de *Vernonia polyanthes* (EF-Vp), ampicilina (AMP) e cloranfenicol (CHL)



A seta indica o início da ação do extrato de lavagem floral de *Vernonia polyanthes* (EF-Vp) sobre a cepa bacteriana testada tendo como base a comparação com a curva de crescimento dessa cepa a partir da fase exponencial (controle de crescimento).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

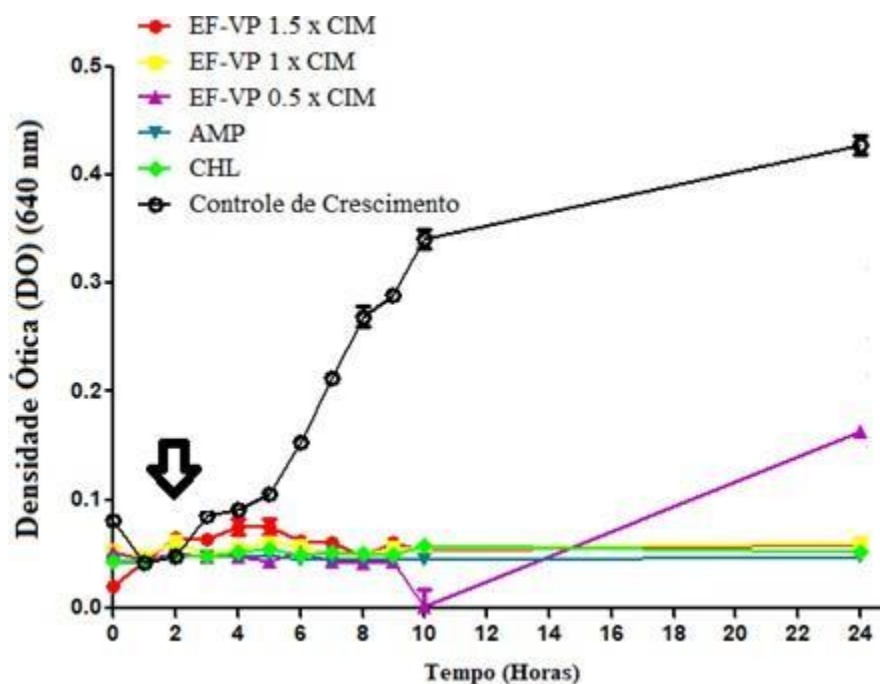
Figura 34 - Curva da cinética bacteriana de *Staphylococcus aureus* (ATCC® 29213) frente ao extrato de lavagem foliar de *Vernonia polyanthes* (EL-Vp), ampicilina (AMP) e cloranfenicol (CHL)



A seta indica o início da ação do extrato de lavagem foliar de *Vernonia polyanthes* (EL-Vp) sobre a cepa bacteriana testada tendo como base a comparação com a curva de crescimento dessa cepa a partir da fase exponencial (controle de crescimento).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

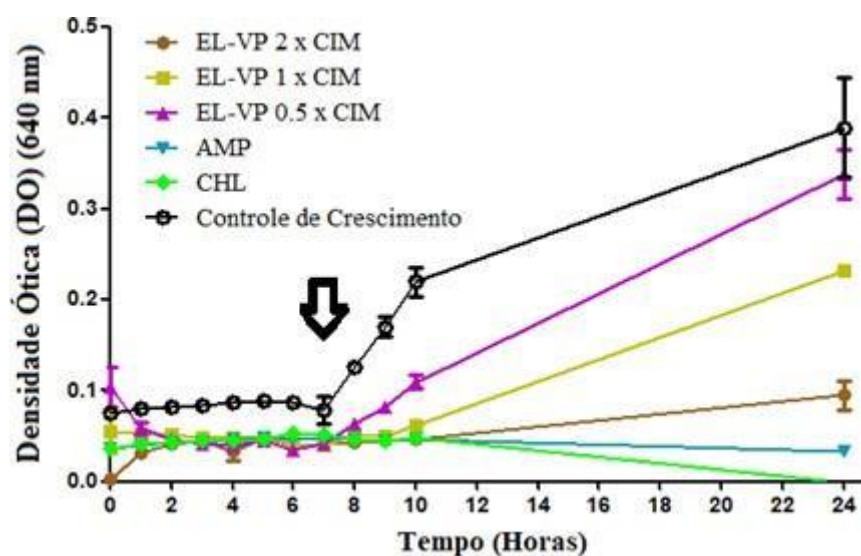
Figura 35 - Curva da cinética bacteriana de *Staphylococcus aureus* (ATCC® 29213) frente ao extrato de lavagem floral de *Vernonia polyanthes* (EF-Vp), ampicilina (AMP) e cloranfenicol (CHL)



A seta indica o início da ação do extrato de lavagem floral de *Vernonia polyanthes* (EF-Vp) sobre a cepa bacteriana testada tendo como base a comparação com a curva de crescimento dessa cepa a partir da fase exponencial (controle de crescimento).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

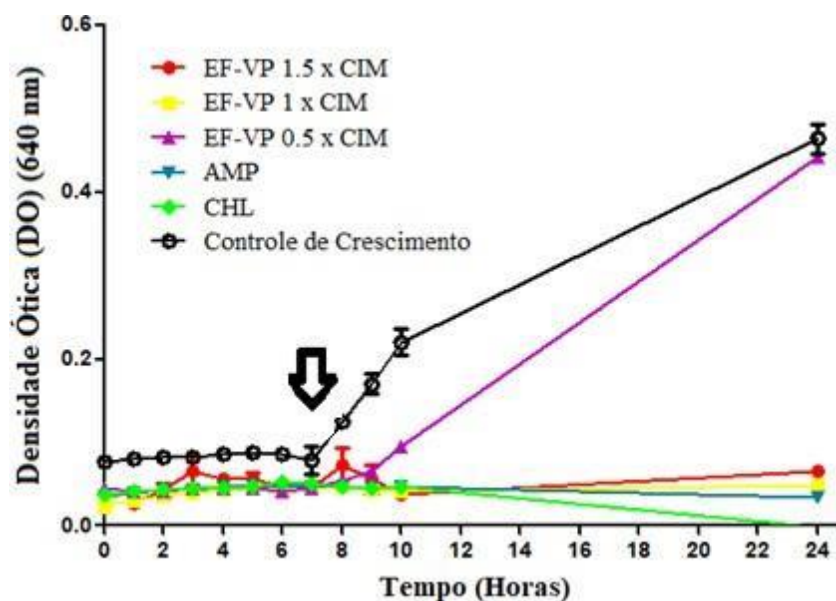
Figura 36 - Curva da cinética bacteriana de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) 1485279 frente ao extrato de lavagem foliar de *Vernonia polyanthes* (EL-Vp), ampicilina (AMP) e cloranfenicol (CHL)



A seta indica o início da ação do extrato de lavagem foliar de *Vernonia polyanthes* (EL-Vp) sobre a cepa bacteriana testada tendo como base a comparação com a curva de crescimento dessa cepa a partir da fase exponencial (controle de crescimento).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

Figura 37 - Curva da cinética bacteriana de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) 1485279 frente ao extrato de lavagem floral de *Vernonia polyanthes* (EF-Vp), ampicilina (AMP) e cloranfenicol (CHL)



A seta indica o início da ação do extrato de lavagem floral de *Vernonia polyanthes* (EF-Vp) sobre a cepa bacteriana testada tendo como base a comparação com a curva de crescimento dessa cepa a partir da fase exponencial (controle de crescimento).

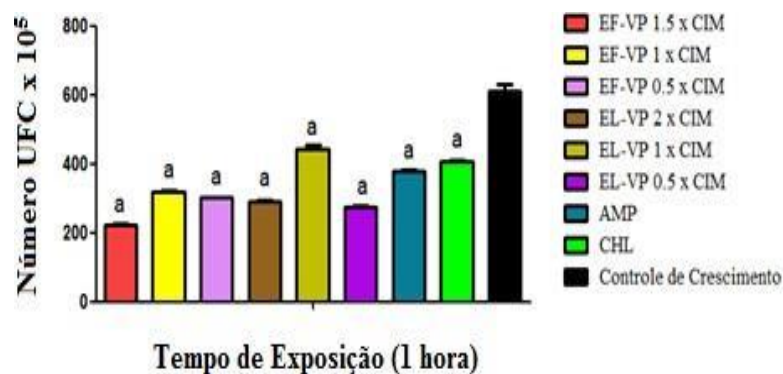
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

59 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR BACTERIANA

Em Microbiologia, utiliza-se a palavra crescimento em referência a um aumento no número de células em consequência da divisão celular (MADIGAN et al., 2016). Assim, o ensaio de viabilidade de células bacterianas foi realizado para avaliar a ação de EL-Vp, EF-Vp, AMP ou CHL sobre a determinação do número de Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC/mL) [número de UFC capaz de sobreviver à exposição a essas amostras após 1 h (fase lag, onde se observa pouca ou nenhuma divisão celular)].

De acordo com as Figuras 38, 39 e 40, percebe-se que a exposição à EL-Vp (0,5x CIM, 1x CIM e 2x CIM) e EF-Vp (0,5x CIM, 1x CIM e 1,5x CIM) induziu à morte celular bacteriana, demonstrando que as células tratadas de *S. aureus* foram incapazes de sobreviver na presença dessas amostras, sofrendo redução do número de UFC/mL. Ainda, EF-Vp mostrou-se mais eficiente que EL-Vp.

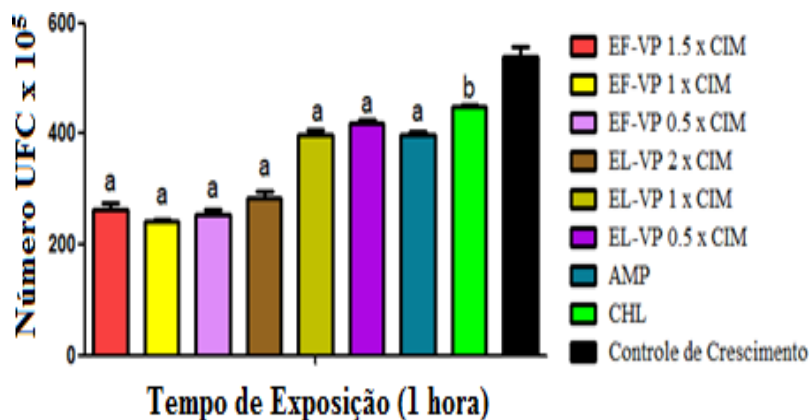
Figura 38 - Resultado da viabilidade de *Staphylococcus aureus* (ATCC[®] 25923) após exposição aos extratos de lavagem foliar (EL-Vp) e floral (EF-Vp) de *Vernonia polyanthes*, ampicilina (AMP) e cloranfenicol (CHL)



UFC: Unidade Formadora de Colônia. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão; os experimentos foram realizados em triplicata; mesma letra indica que não há diferença significativa após análise de variância seguida do teste de Comparação Múltiplo de Dunnett para $p < 0,001$.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

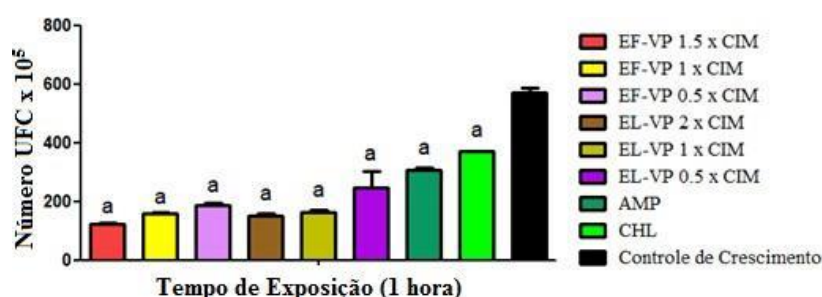
Figura 39 - Resultado da viabilidade de *Staphylococcus aureus* (ATCC[®] 29213) após exposição aos extratos de lavagem foliar (EL-Vp) e floral (EF-Vp) de *Vernonia polyanthes*, ampicilina (AMP) e cloranfenicol (CHL)



UFC: Unidade Formadora de Colônia. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão; os experimentos foram realizados em triplicata; mesma letra indica que não há diferença significativa após análise de variância seguida do teste de Comparação Múltiplo de Dunnett para $p < 0,001$.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

Figura 40 - Resultado da viabilidade de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) 1485279 após exposição aos extratos de lavagem foliar (EL-Vp) e floral (EF-Vp) de *Vernonia polyanthes*, ampicilina (AMP) e cloranfenicol (CHL)



UFC: Unidade Formadora de Colônia. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão; os experimentos foram realizados em triplicata; mesma letra indica que não há diferença significativa após análise de variância seguida do teste de Comparação Múltiplo de Dunnett para $p < 0,001$.

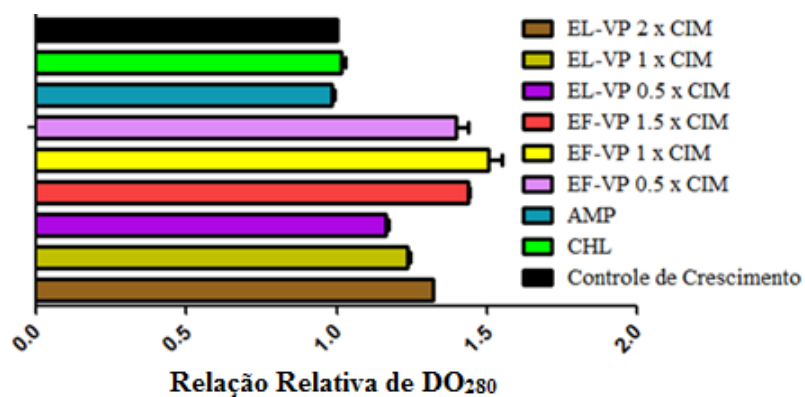
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

5.10 TESTE DE EXTRAVASAMENTO DE SUBSTÂNCIAS ABSORVIDAS A 280 nm

O potencial dano da membrana celular bacteriana causado por EL-Vp (0,5x CIM, 1x CIM e 2x CIM), EF-Vp (0,5x CIM, 1x CIM e 1,5x CIM), AMP ou CHL foi investigado por meio do teste de extravasamento de substâncias absorvidas a 280 nm.

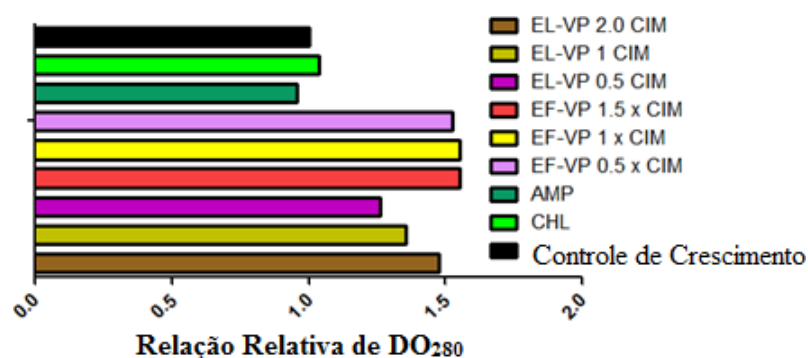
As Figuras 41, 42 e 43 apresentam a relação relativa entre o material absorvido a 280 nm extravasado e células bacterianas tratadas e não tratadas (controle de crescimento). Como mostrado nestas Figuras, os resultados demonstram que houve uma expressiva liberação dos conteúdos absorvidos a 280 nm de *S. aureus* (ATCC[®] 25923), *S. aureus* (ATCC[®] 29213) e MRSA 1485279 quando essas cepas foram tratadas com EL-Vp (0,5x CIM, 1x CIM e 2x CIM) e EF-Vp (0,5x CIM, 1x CIM e 1,5x CIM), sendo que EF-Vp foi mais eficiente que EL-Vp, atuando independente da concentração usada.

Figura 41 - Resultado do extravasamento de substâncias absorvidas a 280 nm de *Staphylococcus aureus* (ATCC[®] 25923) frente aos extratos de lavagem foliar (EL-Vp) e floral (EF-Vp) de *Vernonia polyanthes*, ampicilina (AMP) e cloranfenicol (CHL)



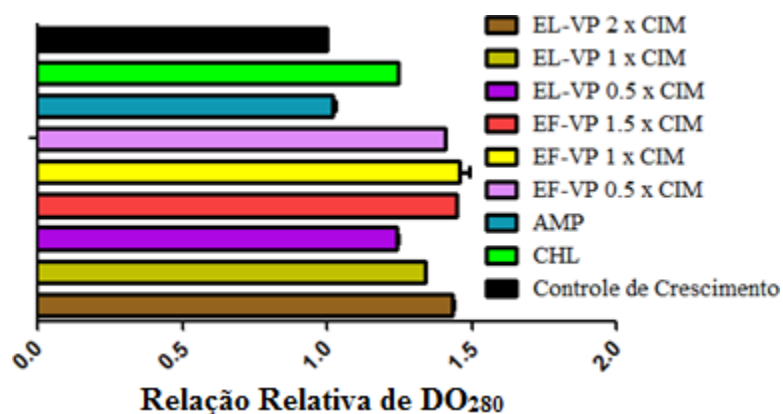
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

Figura 42 - Resultado do extravasamento de substâncias absorvidas a 280 nm de *Staphylococcus aureus* (ATCC[®] 29213) frente aos extratos de lavagem foliar (EL-Vp) e floral (EF-Vp) de *Vernonia polyanthes*, ampicilina (AMP) e cloranfenicol (CHL)



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

Figura 43 - Resultado do extravasamento de substâncias absorvidas a 280 nm de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) 1485279 frente aos extratos de lavagem foliar (EL-Vp) e floral (EF-Vp) de *Vernonia polyanthes*, ampicilina (AMP) e cloranfenicol (CHL)



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

6 DISCUSSÃO

A extração é um importante passo em qualquer estudo sobre plantas medicinais e desempenha um papel significativo e crucial no seu resultado final e desfecho (AZMIR et al., 2013). Assim, o método de extração a ser utilizado pode influenciar fortemente a composição química do extrato obtido e, portanto, sua atividade biológica (ATANASOV et al., 2015).

Neste contexto, entre os vários métodos convencionais e não convencionais disponíveis, a extração de metabólitos secundários por lavagem de tricomas glandulares com solventes orgânicos reduz a complexidade do extrato obtido (TISSIER, 2012), sendo essa técnica considerada uma opção que favorece a extração de flavonoides, terpenos e LSTs (APPEZZATO-DA-GLÓRIA et al., 2012; IGUAL et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2011).

Conforme descrito no item 4.2 [Obtenção dos extratos de lavagem foliar (EL-Vp) e floral (EF-Vp) de *Vernonia polyanthes*] à pág. 43, estudos realizados por nosso grupo de pesquisa que precederam a presente investigação, demonstraram que a prospecção fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *V. polyanthes* bem como do extrato etanólico e das frações hexânica, diclorometânica, em acetato de etila e butanólica dos caules dessa espécie vegetal, indicou a presença de taninos, flavonoides, cumarinas, terpenoides, esteroides, saponinas e alcaloides (MINATELI et al., 2017; TEMPONI et al., 2012). Ainda, a caracterização química por CLAE-DAD dos extratos hexânico e em acetato de etila das folhas de *V. polyanthes* (HEVP e EAEVP, respectivamente) revelou a presença de flavonoides, permitindo a identificação de luteolina ou 2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-4-cromen-ona e apigenina ou 5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4H-1-benzopirran-4-ona, e rutina ou 2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-3-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosiloxi]-4H-cromen-ona, em HEVP e EAEVP, nessa ordem (RODRIGUES, et al., 2016). Finalmente, Santana (2015) reportou a detecção de três flavonoides e três LSTs no extrato de lavagem foliar de *V. polyanthes*, com a presença majoritária de glaucolídeo A. Este arcabouço químico, somado ao fato de que entre os extratos e frações de folhas e caules de *V. polyanthes* previamente investigados a fração diclorometânica revelou o efeito antibiótico mais eficiente e promissor, fez com que o presente estudo fosse desenvolvido aplicando-se o método utilizado por Santana (2015), tendo como principal objetivo o aprofundamento das pesquisas microbiológicas.

Em 2005, Goli, Barzegar e Sahari (2005) descreveram que o rendimento do extrato depende do solvente e do método de extração empregados. Em 2007, Hayouni e colaboradores corroboraram esta descrição ao relatarem a variação do rendimento do extrato

bem como de suas atividades biológicas em função dos diferentes métodos de extração usados. Assim, pela análise dos resultados das massas e dos rendimentos de EL-Vp e EF-Vp [folhas e flores coletadas em agosto de 2015 (inverno)], nota-se uma discreta diferença numérica entre eles, obtendo-se valores de 25 e 28 g e 2,8% e 3,4%, respectivamente. Santana (2015), ao realizar a coleta das folhas de *V. polyanthes* em janeiro de 2014 (verão) e empregar o mesmo método extrativo, obteve um rendimento de 2,2%. Este menor percentual pode ter ocorrido em virtude de janeiro ser o mês mais chuvoso no município de Juiz de Fora (CESAMA, 2017), com os maiores índices pluviométricos, o que pode ter comprometido a extração e, conseqüentemente, o rendimento, ainda que todos os cuidados quanto à coleta do material vegetal tenham sido tomados. Adicionalmente, Igual e colaboradores (2013), ao empregarem o mesmo método extrativo usando metanol e folhas coletadas em fevereiro de 2011 (verão), obtiveram um rendimento cerca de 5x inferior (0,56%) em relação ao obtido no presente estudo (2,8%), que pode estar associado ao solvente usado, bem como, sem aprofundarmos essa discussão, ao período e local de coleta.

Quanto à quantificação de fenóis totais, observou-se maior teor dessas substâncias em EF-Vp ($2,16 \pm 0,04$ g ER/100 g) do que em EL-Vp ($1,41 \pm 0,04$ g ER/100 g), sendo que o oposto foi obtido para flavonoides totais, ou seja, o teor em EF-Vp ($6,28 \pm 0,01$ g EAG/100 g) foi cerca de 3x menor do que em EL-Vp ($16,55 \pm 0,01$ g EAG/100 g). Não localizamos publicações científicas nas buscas realizadas com este foco nos bancos de dados disponíveis para que pudéssemos comparar e discutir nossos resultados com outros obtidos com *V. polyanthes*. Porém, Temponi (2012) reportou que os teores de fenóis e flavonoides totais variaram de $0,76 \pm 0,01$ (fração hexânica) a $18,63 \pm 0,32$ (fração butanólica) g/100 g e de $0,26 \pm 0,02$ (fração hexânica) a $7,73 \pm 0,14$ (fração em acetato de etila), respectivamente. Rodrigues (2013) descreveu que os teores de fenóis e flavonoides totais variaram de $0,53 \pm 0,02$ (extrato hexânico) a $22,93 \pm 0,04$ (extrato etanólico) e de $0,18 \pm 0,01$ (extrato hexânico) a $8,23 \pm 0,01$ g/100 g (extrato etanólico), nessa ordem. Excluídos os aspectos relacionados aos métodos de extração e à fenologia, denota-se a efetiva influência da capacidade extratora dos solventes utilizados sobre os teores de fenóis e flavonoides totais obtidos. De acordo com Michiels e colaboradores (2012), as propriedades de extração dos solventes afetam significativamente os teores de fenóis totais, com variação de $\pm 25\%$. Adicionalmente, Ku e colaboradores (2002), ao investigarem as concentrações de apigenina, apigenina-7-O-glicosídeo, luteolina e luteolina-7-O-glicosídeo em folhas, flores, caules e raízes de *Vernonia paltula* demonstraram que, com exceção da apigenina-7-O-glicosídeo, os maiores percentuais

dessas substâncias estavam nas folhas, o que corrobora nossos achados (maior teor de flavonoides em EL-Vp).

Com relação à análise de EL-Vp, EF-Vp e glaucolídeo A [obtido por Santana (2015)] por CLAE-DAD, os resultados obtidos sugerem a presença de flavonoides e LSTs, de acordo com as características e similaridade dos espectros de absorção UV para cada pico analisado (FISCHER; OLIVIER; FISCHER, 1979; TSIMOGIANNIS et al., 2007; XU; YE; ZHAO, 2011). Conforme previamente descrito no item 2.1.3 A espécie *Vernonia polyanthes* Less., à pág. 26, estes compostos são detectados nessa espécie vegetal. Vale ressaltar que a presença do glaucolídeo A, anteriormente descrita por Igual e colaboradores (2013) e por Santana (2015), foi confirmada por meio da comparação entre os t_R do pico majoritário detectado nos extratos e aquele observado com a substância pura e as características e similaridade dos espectros de absorção UV. Dessa forma, com base nos perfis cromatográficos de EF-Vp e EL-Vp, procedeu-se ao fracionamento a fim de se isolar e purificar o glaucolídeo A, ou outras substâncias ainda não identificadas. Ferramentas analíticas mais robustas tais como Cromatografia Líquida de Ultra Performance acoplada a Espectrometria de Massas com Analisador Híbrido Quadrupolo-Tempo de Voo (do inglês *Ultra-Performance Liquid Chromatography coupled Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry - UPLC -QTOF/MS*) poderão se fazer necessárias para elucidar esta questão. O fracionamento de EF-Vp e EL-Vp por CLV resultou em dez e sete frações, nessa ordem. Essas frações foram submetidas à estudo bioguiado utilizando o potencial antibacteriano *in vitro* como atividade biológica marcadora com o intuito de se verificar qual (is) apresentaria (m) melhores resultados microbiológicos. Com isso, em um futuro próximo, pretende-se analisar o perfil químico destas frações a fim de isolar, purificar e caracterizar novas substâncias associadas a esta propriedade, ou a outras que venham a ser investigadas.

Em relação à toxidez, a investigação foi realizada por meio da triagem de citotoxicidade através da toxicidade aguda pelo bioensaio com *A. salina* e pela viabilidade celular pelo método do MTT. O bioensaio com *A. salina* seguiu o protocolo proposto por Meyer e colaboradores (1982), com pequenos ajustes. De acordo com o critério de toxidez preconizado por esses autores, valores de $CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ para EL-Vp, EF-VP e glaucolídeo A (3.706, 2.655 e 2.653 $\mu\text{g/mL}$, nessa ordem), permitem relacioná-los à ausência de toxicidade aguda. O ensaio de viabilidade celular pela técnica de MTT baseou-se no método de Riss e colaboradores (2013), e os resultados obtidos demonstram que, ainda que EL-Vp apresente CL_{50} compatível com toxidez na concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 30, pág. 76), esse valor se mostra menos tóxico que DMSO 5% (controle positivo), sugerindo um

perfil de baixa citotoxicidade. Quanto ao glaucolídeo A, obteve-se $CL_{50} > 50\%$ na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ dessa substância, sendo atóxico quando comparado ao controle positivo (Figura 31, pág. 76). Entretanto, Williams e colaboradores (2005), ao estudarem a citotoxicidade do extrato de folhas de *Vernonia pachyclada* e dos glaucolídeos K, L e M sobre linhagens celulares de câncer ovariano humano A2780, descreveram o moderado efeito tóxico desse extrato e dessas substâncias, sendo glaucolídeo M o mais ativo entre elas. Porém, para o melhor entendimento da toxidez de *V. polyanthes* se faz necessário o aprofundamento dos estudos toxicológicos com a aplicação de ferramentas de análise mais resolutivas e sensíveis.

No que diz respeito aos dados microbiológicos, alguns resultados conflitantes podem ser encontrados na literatura revisada e atribuídos aos diferentes procedimentos de extração e métodos de atividade antimicrobiana realizados para avaliar essa relevante propriedade biológica. Excluída a discussão sobre as interferências destas questões e direcionando o foco para as cepas e a atividade antibacteriana, Oliveira e colaboradores (2007) relataram o efeito antimicobacteriano significativo do extrato hidroalcoólico da raiz de *V. polyanthes* usado como bebida ("beberagem") pela comunidade indígena Vanuíre no tratamento de doenças respiratórias. Jorgetto e colaboradores (2011) reportaram o efeito bacteriostático do extrato hidroalcoólico das folhas desta espécie vegetal sobre *Bacillus cereus* (ATCC[®] 11778TM), *Escherichia coli* (ATCC[®] 8739TM) e *Proteus mirabilis* (ATCC[®] 25933TM), com CIM de $1,8 \times 10^3$, $7,2 \times 10^3$ e $1,4 \times 10^3$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Silva e colaboradores (2012) demonstraram a atividade antibacteriana do extrato metanólico e do óleo essencial desta planta medicinal frente cepas de rotina de *S. aureus* (CIM_{90%} de $3,3 \times 10^3$ e $2,8 \times 10^3$ $\mu\text{g/mL}$, nessa ordem) e *E. coli* (CIM_{90%} de $26,9 \times 10^3$ e $24,1 \times 10^3$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). Waltrich e colaboradores (2015) avaliaram esta propriedade 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 25922), *S. aureus* (ATCC 25923) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853) usando o método de difusão em disco de papel. Neste estudo, as frações em acetato de etila a partir dos extratos aquoso e metanólico foram ativas frente à *S. aureus*, inibindo o crescimento bacteriano nas concentrações de 6×10^3 e 12×10^3 $\mu\text{g/disco}$, nessa ordem.

Os resultados microbiológicos obtidos na presente investigação são corroborados pelos estudos anteriores e demonstram a atividade antibacteriana *in vitro* de EL-Vp, EF-Vp, frações obtidas desses extratos e glaucolídeo A frente principalmente as cepas de *S. aureus* testadas, sendo que EL-Vp e EF-Vp foram os mais ativos frente às duas cepas de referência de

S. aureus e cinco MRSA de rotina testadas, com valores de CIM variando de 78 a 5000 µg/mL. De acordo com a classificação de Kuete (2010), esta atividade antibacteriana variou de significativa (CIM < 100 µg/mL) à fraca (CIM > 625 µg/mL), na dependência da cepa testada. Vale ressaltar que, conforme descrito por Costa e colaboradores (2016), as cepas MRSA testadas no presente estudo foram re-investigadas pelo método de microdiluição em caldo como possíveis *S. aureus* com heterorresistência (do inglês *heterogeneous vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus* - hVISA) ou resistência intermediária a vancomicina (do inglês *vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus* - VISA), apesar da classificação como sensíveis pelo sistema automatizado VITEK[®]2, o que potencializa a relevância do efeito antibiótico de EL-Vp e EF-Vp observado.

Estes resultados conduziram ao estudo do efeito combinatório de EL-Vp, EF-Vp e glaucolídeo A com CHL, visto que pode haver uma interação farmacodinâmica entre extrato e antibiótico, aferida por parâmetros qualitativos, tais como sinergia, indiferença [ausência de interação (ODDS, 2003); sem efeito (FADLI et al., 2012)] e antagonismo (D'ARRIGO et al., 2010). Adicionalmente, sob a ótica etnofarmacológica vislumbrando novas abordagens terapêuticas de feridas e infecções com o uso de *V. polyanthes*, as interações *in vitro* podem melhorar a eficácia do antibiótico e contribuir para o desenvolvimento de novos agentes tópicos para o tratamento de lesões cutâneas, incluindo conjuntiva e infecções respiratórias por inalação (D'ARRIGO et al., 2010).

Segundo Sanhueza e colaboradores (2017), estudos *in vitro* têm sido publicados mostrando o efeito sinérgico entre extratos de plantas com antibióticos de diferentes classes contra cepas patogênicas sensíveis e multirresistentes. Neste contexto, Silva e colaboradores (2013), ao investigarem o sinergismo de extratos brutos e óleos essenciais de plantas medicinais com agentes antimicrobianos, entre eles do extrato metanólico e do óleo essencial de folhas de *V. polyanthes* com CHL, relataram indiferença frente às cepas *S. aureus* (ATCC 33591) e *E. coli* (ATCC 25922) e quinze de rotina de ambas, com exceção do óleo essencial frente a *S. aureus*, onde se observou sinergismo por meio do teste de disco-difusão. No presente estudo, semelhante aos achados anteriores, a análise dos resultados obtidos pelo método de *checkerboard* realizado com EL-Vp, EF-Vp e glaucolídeo A isolados e combinados com CHL, demonstraram efeito sinérgico parcial de EF-Vp com CHL frente a *S. aureus* (ATCC[®] 29213) (FICI = 0,75), sendo observado sem efeito ou antagonismo para as demais combinações (Tabela 13, pág. 86).

O método de *time kill* demonstrou que EL-Vp e EF-Vp foram capazes de reduzir a velocidade de multiplicação bacteriana na dependência da concentração do extrato e da cepa

testada, corroborando os dados anteriormente obtidos. Essa redução pode ser observada ao se comparar a inclinação da curva de controle de crescimento das bactérias não tratadas com aquelas tratadas com o extrato ou com o antibiótico, de modo especial para EF-Vp. Assim, EF-Vp frente a *S. aureus* (ATCC[®] 25923) na concentração de 1,5x CIM, *S. aureus* (ATCC[®] 29213) com 1x e 1,5x CIM e MRSA 1485279 com 1x e 1,5x CIM, apresentaram resultados mais significativos, semelhantes à AMP e CHL, inclusive com manutenção do efeito bactericida durante 24 h de incubação e consequente diminuição da densidade populacional. Esta inibição permanente do crescimento bacteriano (efeito bactericida) é desejável para prevenir a adesão bacteriana inicial à diferentes superfícies, como dispositivos médicos, onde a capacidade de inviabilizar o micro-organismo se faz necessária (PERIASAMY et al., 2012). Resultados semelhantes foram observados por Babii e colaboradores (2016) para *S. aureus* (ATCC[®] 25923). Esses autores relataram que uma nova classe de flavonoides tricíclicos sintéticos foi capaz de inibir o crescimento bacteriano e também matar esta cepa com 1x CIM e 2x CIM dessas substâncias. A deficiência da integridade da membrana e lise celular, especialmente nos primeiros momentos após a exposição à estes flavonoides, foram os principais mecanismos de ação envolvidos.

Com o intuito de investigar o provável modo de ação de EL-Vp (0,5x, 1x e 2x CIM) e EF-Vp (0,5x, 1x e 1,5x CIM), foi inicialmente realizado o teste de viabilidade celular bacteriana, conduzido para medir a densidade de células bacterianas capazes de sobreviver à exposição a esses extratos. Assim, este método permite ilustrar como a toxicidade dos compostos ativos afeta a viabilidade bacteriana e a fisiologia relacionada à membrana (REDDY et al., 2010). A exposição à EL-Vp e EF-Vp induziu a morte celular bacteriana, revelando que as células tratadas de *S. aureus* foram incapazes de sobreviver na presença desses extratos. Ainda, EF-Vp se mostrou mais efetivo quando comparado à EL-Vp. Esta indução da morte celular bacteriana observada se deu provavelmente em função de defeito na permeabilidade da membrana.

Este potencial dano na membrana foi investigado por meio do método de extravasamento de substâncias absorvidas a 280 nm. Como observado nas Figuras 41, 42 e 43, à pág. 93, EL-Vp e EF-Vp revelaram um provável efeito de rompimento da membrana celular por meio da análise do extravasamento de substâncias intracelulares. Vale ressaltar que a diminuição da viabilidade celular bacteriana foi acompanhada pelo aumento da permeabilidade da membrana celular. Assim, os resultados do extravasamento de substâncias absorvidas a 280 nm sugerem que EL-Vp e EF-Vp atuam por meio da permeabilização da membrana microbiana (KIM et al., 2015). Essa maior permeabilidade leva à desestabilização

da membrana celular, com extravasamento do conteúdo intracelular e morte (LEE et al., 2014). 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 que absorvem a 260 nm, é uma indicação de danos à membrana.

Este efeito antibacteriano determinado pelo nosso grupo de pesquisa provavelmente seja devido à presença dos compostos fenólicos presentes em EL-Vp e EF-Vp, especialmente em virtude da detecção dos flavonoides, visto que os valores de CIM obtidos com glaucolídeo A não o tornam responsável por essa ação, bem como o efeito antagônico observado quando combinado com CHL. De acordo com Cushnie e Lamb (2011), isto ocorre em função de três mecanismos, a saber: 1) dano na membrana citoplasmática (causado pela perfuração e/ou redução na fluidez); 2) inibição da síntese de ácidos nucleicos (causada pela inibição da topoisomerase, por exemplo); e 3) inibição do metabolismo da energia (NADH-causada pela inibição do citocromo c redutase). Neste caso, o provável mecanismo de ação envolvido seria o dano na membrana citoplasmática, causado pela perfuração e/ou redução na fluidez, em virtude dos resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular bacteriana e de extravasamento de substâncias absorvidas a 280 nm.

7 CONCLUSÕES

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

- O método de extração por lavagem foliar e floral utilizando diclorometano mostrou-se adequado, favorecendo LSTs;
- A determinação dos teores de fenóis e flavonoides totais contribuiu para a caracterização química quantitativa de *V. polyanthes*, visto que não existe publicação com esses dados na literatura;
- A caracterização química dos extratos por CLAE-DAD sugeriu a presença de flavonoides e LSTs e confirmou a presença de glaucolídeo A como majoritário;
- A avaliação de citotoxicidade demonstrou que EL-Vp, EF-Vp e glaucolídeo A foram atóxicos ou apresentaram baixo perfil de toxidez nos ensaios realizados;
- Os resultados microbiológicos revelaram o potencial antibacteriano de *V. polyanthes*, principalmente frente às cepas de *S. aureus*, incluindo MRSA, corroborando seu uso tradicional no tratamento de infecções e feridas;
- O glaucolídeo A parece não ser o principal responsável pela atividade antibacteriana de EL-Vp e EF-Vp em virtude dos valores de CIM obtidos e do efeito combinatório antagônico com CHL observado;
- O glaucolídeo A pode apresentar outras atividades biológicas de forma mais eficiente, podendo ser testado em sua habilidade anti-inflamatória, esquistossomicida, entre outras;
- Deverão ser realizadas investigações químicas utilizando ferramentas analíticas mais robustas visando o isolamento, purificação e caracterização de outras substâncias que possam estar associadas ao potencial antibacteriano promissor de *V. polyanthes*.

REFERÊNCIAS

- ABE, L. T.; MOTA, R. V.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 287, p.394-400, 2007.
- AGEBIRK, N.; OLSEN, C. E.; NIELSEN, J. K. Seasonal variation in leaf glucosinolates and insect resistance in two types of *Barbarea vulgaris* spp. *Arcuate*. **Phytochemistry**, v. 58, p.91-100, 2001.
- ALIYU, A. B.; MUSA, A. M.; ABDULLAHI, M. S.; IBRAHIM, H.; OYEWALE, A. O. Phytochemical screening and antibacterial activities of *Vernonia ambigua*, *Vernonia blumeoides* and *Vernonia ocephala* (Asteraceae). **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 68, p. 67-73, 2011.
- ALVES, J. C. F. A review on the chemistry of eremanthine: a sesquiterpene lactone with relevant biological activity. **Organic Chemistry International**, v. 2011, p. 1-35, 2011.
- ALVES, L. H. S. Abelhas, visitantes florais de *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae), em Valença - RJ. Dissertação (Mestrado em Ciências - Entomologia) -Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2010.
- ALVES, N. D. C.; SANTOS, T. C.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C.; LIRA, L. M.; DORNELAS, C. B.; CABRAL, L. M. Avaliação da adequação técnica de indústrias de medicamentos fitoterápicos e oficinais do Estado do Rio de Janeiro. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, p. 745-753, 2008.
- 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.
- AMBRÓSIO, S. R.; OKI, Y.; HELENO, V. C. G.; CHAVES, J. S.; NASCIMENTO, P. G. B. D.; LICHSTON, J. E.; CONSTANTINO, M. G.; VARANDA, E. M.; DA COSTA, F. B. Constituents of glandular trichomes of *Tithonia diversifolia*: relationships to herbivory and antifeedant activity. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2052-2060, 2008.
- ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 5-16, 2001.
- ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications**. 1ª ed., New York: CRC Press, p. 143-218, 2005.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; DA COSTA, F. B.; SILVA, V. C.; GOBBO-NETO, L.; REHDER, V. L. G.; HAYASHI, A. H. Glandular trichomes on aerial and underground organs in *Chrysolaena* species (*Vernonieae* - Asteraceae): structure, ultrastructure and chemical composition. **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 207, p. 878-887, 2012.
- ARANTES, F. F. P. **Síntese e avaliação da fitotoxicidade de novas lactonas sesquiterpênicas**. 2007. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. Antibiotic-resistant bugs in the 21st century - a clinical superchallenge. **New England Journal of Medicine**, v. 360, p. 439-443, 2009.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science and Technology**, v. 11, p. 419-421, 2000.

ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E.-M., LINDER, T.; WAWROSCHEK, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E. H.; ROLLINGER, J. M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J. M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M. D.; KOPP, B.; BAUER, R. DIRSCH, V. M.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 1582-1614, 2015.

AUDU, A. S.; TAIWO, A. E.; OJUOLAPE, A. R.; SANI, A. S.; BUKOLA, A. R.; MOHAMMED, I. A study review of documented phytochemistry of *Vernonia amygdalina* (Family Asteraceae) as the basis for pharmacologic activity of plant extract. **Journal of Natural Sciences Research**, v. 2, p. 1-9, 2012.

AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFUOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, p. 426-436, 2013.

BABII, C.; BAHRIN, L. G. NEAGU, A. N.; GOSTIN, I.; MIHASAN, M.; BIRSA, L. M.; STEFAN, M. Antibacterial activity and proposed action mechanism of a new class of synthetic tricyclic flavonoids. **Journal of Applied Microbiology**, v. 20, p. 630-637, 2016.

BARBASTEFANO, V.; COLA, M.; LUIZ-FERREIRA, A.; FARIAS-SILVA, E.; HIRUMALIMA, C.; 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.

BARBIERI-JÚNIOR, R. C.; OSTRENSKY-NETO, A. **Camarões marinhos: reprodução, maturação e larvicultura**. Viçosa: Editora Aprenda Fácil, v.1, p. 242-243, 2001.

BARBOSA, J.; FERREIRA, A.; FONSECA, B. SOUSA, I. Teste de toxicidade do íon cobre para *Artemia salina*. Manual de Biologia Marinha e Pescas da Faculdade de Ciências do Mar e de Ambiente. Rio de Janeiro, p. 17, 2003.

BARBOSA-FILHO, J. M.; ALENCAR, A. A.; NUNES, X. P.; TOMAZ, A. C. A.; SENA-FILHO, J. G.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; SILVA, M. S.; SOUZA, M. F. V.; DA-CUNHA, E. V. L. Sources of alpha-, beta-, gamma-, delta- and epsilon-carotenes: a twentieth century review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 135-154, 2008.

BARROS, E.; MACHADO, A.; SPRINZ, E. **Antimicrobianos**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, p.551-556, 2013.

BINO, R. J.; HALL, R. D.; FIEHN, O.; KOPKA, J.; SAITO, K.; DRAPER, J.; NIKOLAU, B. J.; MENDES, P.; ROESSNER-TUNALI, U.; BEALE, M. H.; TRETHERWEY, H. N.; LANGE, B. M.; WURTELE, E. S.; SUMNER, L. W. Potential of metabolomics as a functional genomics tool. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 418-425, 2004.

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. 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.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. **RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. Espécies vegetais**. 2009. DAF/SCTIE/MS - RENISUS - fev/2009. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso em: 05 jul 2017.

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, p. 229-239, 2010.

BROOKS, J. S.; FEENY, P. Seasonal variation in *Daucus carota* leaf-surface and leaf-tissue chemical profiles. **Biochemistry System Ecology**, v. 32, p. 769-782, 2004.

BROWN, D. G.; LISTER, T.; MAY-DRACKA, T. New natural products as new leads for antibacterial drug discovery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 413-418, 2014.

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.

BUICK, S.; MARK JOFFE, A.; TAYLOR, G.; CONLY, J. A consensus development conference model for establishing health policy for surveillance and screening of antimicrobial-resistant organisms. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, p. 1095-1101, 2015.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CANCELLI, R. R.; EVALDT, A. C. P.; BAUERMANN, S. G. Contribuição à morfologia polínica da família Asteraceae Martinov. no Rio Grande do Sul - Parte I. **Pesquisas, Botânica**, v. 58, p. 347-374, 2007.

CAO, J.; XIA, X.; CHEN, X.; XIAO, J.; WANG, Q. Characterization of flavonoids from *Dryopteris erythrosora* and evaluation of their antioxidant, anticancer and acetylcholinesterase inhibition activities. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 242-250, 2013.

CAPRINI, G. P. **Metabolômica de plantas**: análise fitoquímica de *Pentas lanceolata*, estudos com culturas celulares e experimentos iniciais de biossíntese com precursores marcados utilizando uma espécie de *Mentha* como sistema modelo. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia com ênfase em Biologia Molecular e Biotecnologia) -Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2007.

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

CESAMA, Companhia de Saneamento Municipal de Juiz de Fora. **Hidrografia em Juiz de Fora**. 2017. Disponível em: <http://www.cesama.com.br/?pagina=hidrografia>. Acesso em 15 jul 2017.

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

CHIKEZIE, P. C.; OJIAKO, O. A. Herbal medicine: yesterday, today and tomorrow. **Alternative & Integrative Medicine**, v. 4, p. 1-5, 2015.

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.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**, v. II, 2ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1978.

COSTA, A. V. **Atribuição inequívoca dos sinais de RMN de ¹H e de ¹³C do glaucolídeo B, síntese de seus derivados e síntese de 2-fenil-6, 7-exo-isopropilidenodioxo-8-oxabicyclo-[3.2.1]-oct-2-eno, visando a obtenção de novos herbicidas**. 2008. Tese (Doutorado em Ciências - Química) - Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

COSTA, T. M.; MORGADO, P. G. M.; CAVALCANTE, F. S.; DAMASCO, A. P.; NOUÉR, S. A.; SANTOS, K. R. N. Clinical and microbiological characteristics of heteroresistant and vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* from bloodstream infections in a Brazilian teaching hospital. **PLOS ONE**, v. 11, p. 0160506, 2016.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, p. 241-256, 2009.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Chapter 24 - Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Eds). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, p. 1250-1318, 2000.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 343-356, 2005.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, p. 99-107, 2011.

DALAZEN, P.; MOLON, A.; BIAVATTI, M. W.; KREUGER, M. R. O. Effects of the topical application of the extract of *Vernonia scorpioides* on excisional wounds in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 82-87, 2005.

D'ARRIGO, M.; GINESTRA, G.; MANDALARI G.; FURNERI, P.M.; BISIGNANO, G. Synergism and post antibiotic effect of tobramycin and *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Phytomedicine**, v. 17, p. 317-322, 2010.

DE DAVID, L.E. Avaliação das atividades citotóxica, antifúngica e do potencial de segurança *in vivo* de *ar-turmerona* (*Curcuma longa* L.). Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2013.

DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; FERNANDES, L. S.; SANTOS, B. C. S.; PIRES, A. S.; ALVES, M. S.; SOUSA, O. V. Phenolic constituents and biological properties of *Eryngium pristis* Cham. & Schltdl (Apiaceae). **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 7, p. 151-159, 2015.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. 2^a ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2002. 507 p.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, p. 303-336, 2012.

DIRSCH, V. M.; STUPPNER, H.; ELLMERER-MÜLLER, E. P.; VOLLMAR, A. M. Structural requirements of sesquiterpene lactones to inhibit LPS-induced nitric oxide synthesis in RAW 264.7 macrophages. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 2747-2753, 2000.

DRAIZE, J. H.; WOODARD, G.; CALVERY, H. O. Method for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 82, p. 337-390, 1944.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **MultiCiência: Construindo a História dos Produtos Naturais**, v. 7, p. 1-16, 2006.

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**. Ribeirão Preto, Dissertação. Programa de Pós-graduação em Entomologia, Departamento de Biologia, Universidade de São Paulo, Brasil, 2011.

ELGORASHI, E. E.; DREWES, S. E.; VAN STADEN, J. Organ-to-organ and seasonal variation in alkaloids from *Crinum macowanii*. **Fitoterapia**, v. 73, p. 490-495, 2002.

ESTEVES, M.; SIQUET, C.; GASPAR, A.; RIO, V.; SOUSA, B. J.; REIS, S.; MARQUES, M. P. M.; BORGES, F. A. Antioxidant versus cytotoxic properties of hydroxycinnamic acid derivatives. A new paradigm in phenolic research. **Archiv der Pharmazie**, v. 3, p. 164-173, 2008.

FABIAN, L.; SULSEN, V.; FRANK, F.; CAZORLA, S.; MALCHIODI, E.; MARTINO, V.; LIZARRAGA, E.; CATALÁN, C.; MOGLIONI, A.; MUSCHIETTI, L.; FINKIELSZTEIN, L. *In silico* study of structural and geometrical requirements of natural sesquiterpene lactones with trypanocidal activity. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 1407-1414, 2013.

FABRY, W.; OKEMO, P. O.; ANSORG, R. Antibacterial activity of East African medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, p. 79-84, 1998.

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.

FAINI, F.; LABBÉ, C.; COLLI, J. Seasonal changes in chemical composition of epicuticula waxes from the leaves of *Baccharis linearis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, p. 673-679, 1999.

FAVI, F.; CANTRELL, C. L.; MEBRAHTU, T.; KRAEMER, M. E. Leaf peltate glandular trichomes of *Vernonia galamensis* ssp. *galamensis* var. *ethiopica* Gilbert: development, ultrastructure, and chemical composition. **International Journal of Plant Sciences**, v. 169, p. 605-614, 2008.

FERES-NETTO, C. **Caracterização química e investigação *in vitro* das atividades antioxidante e antibacteriana de *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae).** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica, 2016. 176 p

FIEHN, O. Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v. 48, p.155-171, 2002.

FISCHER, N. H.; OLIVIER, E. J.; FISCHER, H. D. The biogenesis and chemistry of sesquiterpene lactones. In: **Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products.**Vienna: Springer, p. 47-320, 1979.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **MultiCiência**, v. 7, p. 1-8, 2006.

FORBES, V. E.; FORBES, T. L. **Ecotoxicology in theory and practice.** 1st ed. Londres: Chapman & Hall, p. 240-247, 1994.

FRUTUOSO, V. S.; GURJÃO, M. R. R.; CORDEIRO, R. S. B.; MARTINS, M. A. Analgesic and anti-ulcerogenic effects of a polar extract from leaves of *Vernonia condensata*. **Planta Medica**, v. 60, p. 21-25, 1994.

FUNK, V. A.; SUSANNA, A.; STUESSY, T. F.; ROBINSON, H. Classification of Compositae. In: FUNK, V. A.; SUSANNA, A.; STUESSY, T. F.; BAYER, R. J. (Eds.) **Systematics, evolution, and biogeography of Compositae.** Michigan: International Association for Plant Taxonomy, p. 171-189, 2009.

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.

GOLI, A. H.; BARZEGAR, M.; SAHARI, M. A. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachiavera*) hull extracts. **Food Chemistry**, v. 92, p. 521-525, 2005.

GRACE, S. C.; LOGAN, B. A.; ADAMS III, W. W. Seasonal differences in foliar content of chlorogenic acid, a phenylpropanoid antioxidant, in *Mahonia repens*. **Plant Cell and Environment**, v. 21, p. 513-522, 1998.

HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2831-2846, 2007.

HAYOUNI, E. A.; ABEDRABBA, M.; BOUIX, M., HAMDI, M. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercuscoccifera* L. and *Juniperusphoenicea* L. fruit extracts. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1126-1134, 2007.

HEIDEN, G.; BARBIERI, R. L.; WASUM, R. A.; SCUR, L.; SARTORI, M. A família Asteraceae em São Mateus do Sul, Paraná. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 249-251, 2007.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 572-584, 2002.

HERSCH-MARTÍNEZ, P. Commercialization of wild medicinal plants from southwest Puebla. **Economic Botany**, v. 49, p. 197-206, 1995.

HØGEDAL, B. D.; MØLGAARD, P. HPLC analysis of the seasonal and diurnal variation of iridoids in cultivars of *Antirrhinum majus*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, p. 949-962, 2002.

IGILE, G.; OLESZEK, W.; JURZYSTA, M. Vernoniosides D and E, two novel saponins from *Vernonia amygdalina*. **Journal of Natural Products**, v.58, p. 1438-1443, 1995.

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.

IWALEWA, E. O.; IWALEWA, O. J.; ADEBOYE, J. O. Analgesic, antipyretic, anti-inflammatory effects of methanol, chloroform and ether extracts of *Vernonia cinerea* less leaf. **Journal of Ethnopharmacology**, v.86, p.229-234, 2003.

JONES, Q. R. D.; WARFORD, J.; RUPASINGHE, H. P. V.; ROBERTSON, G. S. Target-based selection of flavonoids for neurodegenerative disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 33, p. 1-9, 2012.

JORGETTO, G. V.; BORIOLO, M. F. G.; SILVA, L. M.; NOGUEIRA, D.; JOSE, T. D. S., RIBEIRO, G. E., OLIVEIRA, N. M. S.; FIORINI, J. E. Analysis on the *in vitro* antimicrobial activity and *in vivo* mutagenicity by using extract from *Vernonia polyanthes* Less (Assapeixe). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, p. 53-61, 2011.

KAPLAN, M. A. C.; FIGUEIREDO, M. R.; GOTTLIEB, O. R. Variation in cyanogenesis in plants with season and insect pressure. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 11, p.367-370, 1983.

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.

KIM, S. H.; SONG, J. H.; CHOI, B. G.; KIM, H. J.; KIM, T. S. Chemical modification of santonin into a diacetoxy acetal form confers the ability to induce differentiation of human promyelocytic leukemia cells via the down-regulation of NF- κ B DNA binding activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 13117-13125, 2006.

KIPLIMO, J. J.; KOORBANALLY, N. A.; CHENIA, H. Triterpenoids from *Vernonia auriculifera* Hiern exhibit antimicrobial activity. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, p. 1150-1156, 2011.

KIPLIMO, J. J. A review on the biological activity and the triterpenoids from the genus *Vernonia* (Asteraceae family). **International Research Journal of Pure & Applied Chemistry**, v. 11, p. 1-14, 2016.

KRISHNA-KUMARI, G. N.; MASILAMANI, S.; GANESH, M. R.; ARAVIND, S.; SRIDHAR, S. R. Zaluzanin D: a fungistatic sesquiterpene from *Vernonia arborea*. **Fitoterapia**, v. 74, p. 479-482, 2003.

KU, Y.-R.; CHEN, C.-Y.; HO, L.-K.; LIN, J.-H.; CHANG, Y.-S. Analysis of flavonoids in *Vernonia paltula* by High Performance Liquid Chromatography. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, p. 139-142, 2002.

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

LANA, D. F. D.; NECCHI, R. M. M.; CASOTI, R.; MANFRON, M. P. Uma revisão sobre as propriedades farmacológicas, morfoanatomia e toxicidade de *Xanthium cavanillesii* Schouw (Asteraceae). **Saúde (Santa Maria)**, v.38, p. 57-70, 2012.

LANGFIELD, R. D.; SCARANO, F. J.; HEITZMAN, M. E.; KONDO M.; HAMMOND, G. B.; NETO, C. C. Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galioides*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 279-281, 2004.

LAXMINARAYAN, R.; MATSOSO, P.; PANT, S.; BROWER, C.; RØTTINGEN, J. A.; KLUGMAN, K.; DAVIES, S. Access to effective antimicrobials: a worldwide challenge. **Lancet**, v. 387, p. 168-175, 2016.

LEE, D. S.; EOM, S. H.; KIM, Y. M.; KIM, H. S.; YIM, M. J.; LEE, S. H.; KIM, D. H.; JE, J. Y. Antibacterial and synergic effects of gallic acid-grafted-chitosan with β -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 60, p. 629-638, 2014.

LEONARD, E.; YAN, Y.; FOWLER, Z.L.; LI, Z., LIM, C.G.; LIM, K.H.; KOFFAS, M. A. Strain improvement of recombinant *Escherichia coli* for efficient production of plant flavonoides. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, p. 257-265, 2008.

LOB, A. **Seleção sexual e evolução de capítulos em Asteraceae**. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Programa de Pós-Graduação em Biologia, Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Minas Gerais, 2007. 69 p.

LOOMIS, M. D.; HAYES, A. W. **Loomis's essentials of Toxicology**. California: Academic Press, p. 280-282, 1996.

LOPES, J. L. C. Sesquiterpene lactones from *Vernonia*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 227-230, 1991.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 3^a ed. São Paulo: Instituto Plantarum, p. 380-390, 2002.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. L.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MAJDI, M.; LIU, Q.; KARIMZADEH, G.; MALBOOBI, M. A.; BEEKWILDER, J.; CANKAR, K.; VOS, R.; TODOROVIC, S.; SIMONOVIC, A.; BOUWMEESTER, H. Biosynthesis and localization of parthenolide in glandular trichomes of feverfew (*Tanacetum parthenium* L. Schulz Bip.). **Phytochemistry**, v. 72, p. 1739-1750, 2011.

MARTINI, N. D.; KATERERE, D. R. P.; ELOFF, J. N. Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 207-212, 2004.

MATEJIC, J.; ŠARAC, Z.; RANDELOVIC, V. Pharmacological activity of sesquiterpene lactones. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 24, p. 95-100, 2010.

MAZUR, M.; SKROBISZEWSKI, A. GŁADKOWSKI, W.; PODKOWIK, M.; BANIA, J.; NAWROT, J.; KLEJDYSZ, T.; WAWRZEŃCZYK, C. Lactones 46. Synthesis, antifeedant and antibacterial activity of γ -lactones with *p*-methoxyphenyl substituent. **Pest Management Science**, 2015. Disponível em: <<http://onlinelibrary-wiley-com.ez25.periodicos.capes.gov.br/doi/10.1002/ps.4012/epdf>>. Acesso em 23 julho 2016.

MERFORT, I. Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpene lactones. **Journal of Chromatography A**, v. 967, p. 115-130, 2002.

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.

MICHIELS, J. A.; KEVERS, C.; PINCEMAIL, J.; DEFRAIGNE, J. O.; DOMMES, J. Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. **Food Chemistry**, v. 130, p. 986-993, 2012.

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.

MITCHELL, G.; LAFRANCE, M.; BOULANGER, S.; SÉGUIN, D. L.; GUAY, I.; GATTUSO, M.; MARSAULT, E.; BOUARAB, K.; MALOUIN, F. Tomatidine acts in synergy with aminoglycoside antibiotics against multiresistant *Staphylococcus aureus* and prevents virulence gene expression. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 559-568, 2012.

MONDIN, C. A. **Riqueza genérica e dados biogeográficos das asteráceas brasileiras. Os avanços da Botânica no início do século XXI: morfologia, fisiologia, taxonomia, ecologia e genética**. 1^a ed. Conferências Plenárias e Simpósios do 57^o Congresso Nacional de Botânica. Porto Alegre: Pallotti, 2006.

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.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal Chromatography A**, v. 1054, p. 95-111, 2004.

NAKAJIMA, J. M.; SEMIR, J. Asteraceae no Parque da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, p. 471-478, 2001.

NASCIMENTO, A. M.; SOARES, M. G.; TORCHELSEN, F. K. S.; ARAÚJO, J. A.; LAGE, P. S.; DUARTE, M. C.; ANDRADE, P. H.; RIBEIRO, T. G.; COELHO, E. A.; 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. 1793-1800, 2015.

NERGARD, C. S.; DIALLO, D.; MICHAELSEN, T. E.; MALTERUD, K. E.; KIYOHARA, H.; MATSUMOTO, T.; YAMADA, H.; PAULSEN, B. S. Isolation, partial characterisation and immunomodulating activities of polysaccharides from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. ex Walp. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 141-152, 2004.

NDAMBA, J.; LEMMICH, E.; MØLGAARD, P. Investigation of the diurnal, ontogenetic and seasonal variation in the molluscicidal saponin content of *Phytolacca dodecandra* aqueous berry extracts. **Phytochemistry**, v. 35, p. 95-99, 1994.

ODDS, F. C. Synergy, antagonismo and white the chequerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 1, 2003.

OKSMAN-CALDENTY, K.; INZE, D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to products designer secondary metabolites. **Trend in Plant Science**, v. 9, p. 433-440, 2004.

OLIVEIRA, A. C. B.; OLIVEIRA, A. P.; GUIMARÃES, A. L.; OLIVEIRA, R. A.; SILVA, F. S.; REIS, S. A. G. B.; RIBEIRO, L. A. A.; ALMEIDA, J. R. G. S. Avaliação toxicológica pré-clínica do chá das folhas de *Morus nigra* L. (Moraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, p. 244-249, 2013.

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 Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, p. 165-169, 2007.

OLIVEIRA, R. B., PAULA, D. A.C., ROCHA, B. A., FRANCO, J. J., GOBBO-NETO, L., UYEMURA, S. A., SANTOS, W. F., COSTA, F. B. Renal toxicity caused by oral use of medicinal plants: the yacon example. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 434-441, 2011.

O'NEILL, J. **Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations: the review on antimicrobial resistance.** HM Government: wellcome^{trust}, p. 84-89, 2016.

PENESYAN, A.; GILLINGS, M.; PAULSEN, I. T. Antibiotic discovery: combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. **Molecules**, v. 20, p. 5286-5298, 2015.

PERIASAMY, S.; JOO, H.-S.; DUONG, A. C.; BACH, T.-H. L.; TAN, V. Y.; CHATTERJEE, S. S.; CHEUNG, G. Y. C.; OTTO, M. How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristics structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, p. 1281-1286, 2012.

PERRON, N. R.; BRUMAGHIM, J. L. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochemistry and Biophysics*, v. 53, p. 75-100, 2009.

PETERSEN, P. J.; LABTHAVILKUL, P.; JONES, C. H.; BRADFORD, P. A. *In vitro* antibacterial activities of tigecycline in combination with other antimicrobial agents determined by checkerboard and time-kill kinetic analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, p. 573-576, 2006.

PICMAN, A. K. Biological activities of sesquiterpene lactones. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 14, p. 255-281, 1986.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

PISSINATE, K. **Atividade citotóxica de *Piper nigrum* e *Struthanthus marginatus*. Estudo preliminar da correlação entre a citotoxicidade e hidrofobicidade da piperina e derivados sintéticos.** Dissertação (mestrado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Exatas Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica, 2006.

QUEIROZ, G. M.; SILVA, L. M.; PIETRO, R. C. L. R.; SALGADO, H. R. N. Multirresistência microbiana e opções terapêuticas disponíveis. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 10, p. 132-138, 2012.

RABE, T.; MULHOLLAND, D.; VAN STADEN, J. Isolation and identification of antibacterial compounds from *Vernonia colorata* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 80, p. 91-94, 2002.

REDDY, M. V.; THOTA, N.; SANGWAN, P. L.; MALHOTRA, P.; ALI, F.; KHAN, I. A.; CHIMNI, S. S.; KOUL, S. Novel bisstyryl derivatives of bakuchiol: targeting oral cavity pathogens. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 3125-3134, 2010.

RICARDO, L. M.; PAULA-SOUZA, J.; ANDRADE, A.; BRANDÃO, M. G. L. Plants from the Brazilian Traditional Medicine: species from the books of the Polish physician Piotr Czerniewicz (Pedro Luiz Napoleão Chernoviz, 1812-1881). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, p. 388-400, 2017.

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H. A.; WORZELLA, T. J.; MINOR, L. Cell viability assays. In: SITTAMPALAM, G. S.; COUSSENS, N. P.; BRIMACOMBE, K., et al., editors. **Assay Guidance Manual [Internet]**. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>. Acesso em: 12 ago 2015.

RODRIGUES, K. C. M. **Caracterização química e investigação das atividades antibacteriana e anti-inflamatória tópica de *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae)**. 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.

RODRIGUEZ, E.; TOWERS, G. H. N.; MITCHELL, J. C. Biological activities of sesquiterpene lactones. **Phytochemistry**, v. 15, p. 1573-1580, 1976.

SALEEM, M.; NAZIR, M.; ALI, M. S.; HUSSAIN, H.; LEE, Y. S.; RIAZ, N.; JABBAR, A. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. **Natural Product Reports**, v. 27, p. 238-254, 2010.

SALMINEN, J. P.; OSSIPOV, V.; HAUKIOJA, E.; PIHLAJA, K. Seasonal variation in the content of hydrolysable tannins in leaves of *Betula pubescens*. **Phytochemistry**, v. 57, p.15-22, 2001.

SANHUEZA, L.; MELO, R.; MONTERO, R.; MAISEY, K.; MENDOZA, L.; WILKENS, M. Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **PLOS ONE**, v. 12, p. e0172273, 2017.

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

SCHWOB, I.; BESSIERE, J. M.; MASOTTI, V.; VIANO, J. Changes in essential oil composition in Saint John's wort (*Hypericum perforatum* L.) aerial parts during its phenological cycle. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.32, p. 735-774, 2004.

SCOTTI, M. T.; FERNANDES, M. B.; FERREIRA, M. J.; EMERENCIANO, V. P. Quantitative structure-activity relationship of sesquiterpene lactones with cytotoxic activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 2927-2934, 2007.

SEAMAN, F. C. Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae. **The Botanical Review**, v. 48, p. 121-594, 1982.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Nutritional and pharmacological effects of food phenolics. **Phenolics in Food and Nutraceuticals**. New York: CRC Press, p. 331-402, 2004.

SILVA, J. B.; MENDES, R. F.; TOMASCO, V.; PINTO, N. C. C.; OLIVEIRA, L. G.; RODRIGUES, M. N.; ARAGÃO, D. M. O.; AGUIAR, J. A. K.; ALVES, M. S.; CASTAÑON, M. C. N. M.; RIBEIRO, A.; SCIO, E. New aspects on the hepatoprotective potential associated with the antioxidant, hypocholesterolemic and anti-inflammatory activities of *Vernonia condensata* Baker. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 198, p. 399-406, 2017.

SILVA, J. B.; TEMPONI, V. S.; FERNANDES, F. V.; ALVES, G. A. D.; MATOS, D. M.; GASPARETTO, C. M.; RIBEIRO, A.; PINHO, J. J. R. G.; ALVES, M. S.; SOUSA, O. V. New approaches to clarify antinociceptive and anti-inflammatory effects of the ethanol extract from *Vernonia condensata* leaves. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 8993-9008, 2011.

SILVA, N. C. C.; BARBOSA, L. N.; ANDRADE, B. F. M. T.; PROBST, I. S.; DOYAMA, J. T.; FERNANDES JUNIOR, A. Synergism of crude extracts and essential oils from medicinal plants with antimicrobial drugs. **Journal of Antimicrobials Photon**, v. 128, p. 189-197, 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**, v. 26, p. 1510-1514, 2012.

SILVEIRA, R. R.; FOGGIO, 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.

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.

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^a ed. Porto Alegre: Editora da UFSC e UFRGS Editora, 2007.

SINITOX (Sistema Nacional de Informações Toxicológicas) [online]. Registros de Intoxicações/ dados nacionais/ 1999 Disponível em:< https://sinitox.icict.fiocruz.br/sites/sinitox.icict.fiocruz.br/files//tab06_brasil_1999.pdf>. Acesso em 17/07/2017

SLAVIN, J. L.; LLOYD, B. Health benefits of fruits and vegetables. **Advances Nutrition**, v. 3, p. 506-516, 2012.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, p. 71-81, 2002.

SOBRINHO, T. J. S. P.; SILVA, C. H.T. P.; NASCIMENTO, J. E.; MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, p. 683-689, 2008.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.

SOUZA, F. A.; SENA, J.; MARANHO, L. T.; OLIVEIRA, C. M. R.; GUIMARÃES, A. T. B. Caracterização fitoquímica preliminar de infusões populares obtidas das partes aéreas das espécies *Apium leptophyllum* (pers.) F. muell. ex Benth. (Apiaceae), *Elvira biflora* L. (DC.) e *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, p. 24-27, 2008.

SPELLBERG, B.; BARTLETT, J. G; GILBERT D. N. The future of antibiotics and resistance. **The New England Journal of Medicine**, v. 4, p. 299-302, 2013.

STALIKAS, C. D. Review: extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 3268-3295, 2007.

SUBRAHMANYAM, M. Topical application of honey for burn wound treatment - an overview. **Annals of Burns and Fire Disasters**, v. xx, p. 137-139, 2007.

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

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.

THEIS, N.; LERDAU, M. The evolution of function in plant secondary metabolites. **International Journal of Plant Sciences**, v. 164, p. 93-102, 2003.

TISSIER, A. Glandular trichomes: what comes after expressed sequence tags? **The Plant Journal**, v. 70, p. 51-68, 2012.

TOVAR, R. T.; PETZEL, R. M. Herbal toxicity. **Disease-a-Month**, v. 55, p. 592-641, 2009.

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.

TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**, v. 2, p. 1231-1246, 2010.

TSIMOGLIANNIS, D.; SAMIOTAKI, M.; PANAYOTOU, G.; OREOPOULOU, V. Characterization of flavonoid subgroups and hydroxyl substitution by HPLC-MS/MS. **Molecules**, v. 12, p. 593-606, 2007.

VASCONCELOS, J.; VIEIRA, J.G.P.; VIEIRA, E.P.P. Plantas tóxicas: conhecer para prevenir. **Revista Científica da UFPA**, v.7, p.1-10, 2009.

VEIGA JÚNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 308-313, 2008.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, p. 519-528, 2005. VEIGA JR., V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. GRYNBERG, N.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

VEIGA JR., V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. GRYNBERG, N.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

VENABLE, D. L.; LEVIN, D. A. Morphological dispersal structures in relation to growth habit in the Compositae. **Plant Systematic Evolution**, v. 143, p. 1-16, 1983.

VITTO, L. A.; PETENATTI, E. M. Asteráceas de importancia económica y ambiental. Primera parte. Sinopsis morfológica y taxonómica, importancia ecológica y plantas de interés industrial. **Multequina**, v. 18, p. 87-115, 2009.

WAGNER, G. J.; WANG, E.; SHEPHERD, R. W. New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. **Annals of Botany**, v. 93, p. 3-11, 2004.

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.

WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. Princípios gerais no tratamento da dor. **Farmacologia clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara- Koogan, p. 153-156, 2004.

WILLIAMS, R. B.; NORRIS, A.; SLEBODNICK, C.; MEROLA, J.; MILLER, J. S.; ANDRIANTSIFERANA, R.; RASAMISON, V. E.; KINGSTON, D. G. I. Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Vernonia pachyclada* from the Madagascar rainforest. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1371-1374, 2005.

WILT, F. M.; MILLER, G. C. Seasonal variation of coumarin and flavonoid concentrations in persistent leaves of wyoming big sagebrush (*Artemisia tridentata* ssp. *wyomingensis*: Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 20, p.53-67, 1992.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v. 64, p. 3-19, 2003.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). **South African Journal of Botany**, v. 89, p. 164-175, 2013.

WINKEL-SHIRLEY, B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 218-223, 2002.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid Biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. **Plant Physiology**, v. 126, p. 485-493, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global action plan on antimicrobial resistance**. Geneva: World Health Organization, 2015. 19 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis**. Geneva: World Health Organization, 2017. 87 p.

XU, R.; YE, Y.; ZHAO, W. **Introduction to natural products chemistry**. 1^a ed. Boca Raton: CRC Press, p. 339-381, 2011.

ZIDORN, C.; STUPPNER, H. Evaluation of chemosystematic characters in the genus *Leontodon*. **Taxon**, v. 50, p. 115-133, 2001.

APÊNDICE A - *Conference paper* intitulada "*In vitro* antibacterial activity of *Vernonia polyanthes* Less. leaf rinse extract (Asteraceae): prospecting new therapeutic options against *Staphylococcus aureus* infections!", publicada na **Planta Medica**, v. 82, p. s1-s381, 2016. doi: 10.1055/s-0036-1596481

Planta Med 2016; 82(S 01): S1-S381
DOI: 10.1055/s-0036-1596481

Abstracts

Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York

In vitro antibacterial activity of *Vernonia polyanthes* Less. leaf rinse extract (Asteraceae): prospecting new therapeutic options against *Staphylococcus aureus* infections!

JDG de Santana, JR Florêncio, LMS de Almeida, LS Fernandes, AA da Silva Filho, MJ Salvador, OV Sousa, MS Alves

[> Author Affiliations](#)
Further Information

- [Congress Abstract](#)

Vernonia polyanthes Less. (Asteraceae), popularly known as "assa-peixe", is a native vegetal species of South America, especially in Brazil [1]. This medicinal plant is traditionally used in cases of cold, flu, cough, fever, bronchitis and pneumonia [2]. Anatomically, *V. polyanthes* presents glandular trichomes, which are modified epidermal hairs that contain specialized cells involved in the biosynthesis, storage and secretion of a number of natural molecules, including secondary metabolites [1,3]. Flavonoids and sesquiterpene lactones are considered chemical markers of the *Vernonia* genus [4]. The current study investigated the *in vitro* antibacterial activity of *V. polyanthes* leaf rinse extract (Vp-LRE) in order to corroborate with the traditional use of this plant species and its potential as a source of new antibacterial agents. *In vitro* antibacterial activity was established by the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) using the microdilution method according to the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines [5] followed by the Minimal Bactericidal Concentration (MBC), which allows classification of the antibacterial effect as bacteriostatic or bactericidal [6]. *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538™ and ATCC® 29213™, *Escherichia coli* ATCC® 10536™ and ATCC® 25922™, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Choleraesuis* ATCC® 10708™, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* ATCC® 13311™ and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 9027™ and ATCC® 27853™ were used as reference strains. Vp-LRE revealed antibacterial activity against 5 of 8 tested strains, being more active against *S. aureus* ATCC® 6538™ and ATCC® 29213™ with MIC values of 625 µg/mL for both, demonstrating bacteriostatic effect and MBC of 2500 µg/mL and 1250 µg/mL, respectively. These results suggest the potential of *V. polyanthes* as a promising source of bioactive molecules with antibacterial action, prospecting new therapeutic approaches against *S. aureus* infections.

Acknowledgements: This investigation was financially supported by UFJF, FAPEMIG, CNPq and CAPES.

Keywords: *Vernonia polyanthes*, Asteraceae, glandular trichomes, antibacterial agents, *Staphylococcus aureus*.

References:

- [1] Alves VFG, Neves LJ. Anatomia foliar de *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae). Rev Univ Rural, Sér Ciênc da Vida 2003; 22: 1 – 8
- [2] Rodrigues VEG, Carvalho, DA. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. Ciênc Agrotec 2001; 25: 102 – 123
- [3] Lange BM, Turner, GW. Terpenoid biosynthesis in trichomes – current status and future opportunities. Plant Biotech J 2013; 11: 2 – 22
- [4] Costa FJ, Bandeira PN, Albuquerque MRJR, Pessoa ODL, Silveira ER, Braz-filho R. Constituintes químicos de *Vernonia chalybaea* Mart. Quim Nova 2008; 31: 1691 – 1695.
- [5] Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. J Antimicrob Chemother 2001; 48: 5 – 16
- [6] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Ninth Edition (M07-A9). Wayne: CLSI, 2012

APÊNDICE B - Resumo intitulado "*In vitro* antibacterial activity of *Vernonia polyanthes* Less. flower rinse extract", apresentado e publicado nos anais do VIII Simpósio Ibero-Americano de Plantas Medicinais e III Simpósio Ibero-Americano de Investigação em Câncer, 24 a 27 de outubro de 2016, Itajaí, Santa Catarina



IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *VERNONIA POLYANTHES* LESS. FLOWER RINSE EXTRACT

*Florencio JR*¹, *Santana JDG*², *Mayorga OAS*³, *Alves MS*⁴

Introduction: *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae), popularly known in Brazil as "assa-peixe", is a native vegetal species of South America, especially in this country. This medicinal plant is traditionally used in cases of cold, influenza, cough, fever, bronchitis and pneumonia. **Objective:** The current study explored the *in vitro* antibacterial activity of the *V. polyanthes* flower rinse extract (Vp-FRE) in order to corroborate with the traditional use of this plant and its potential as a source of new antibacterial agents. **Material and methods:** *In vitro* antibacterial activity was established by the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) using the microdilution method according to the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines followed by the Minimal Bactericidal Concentration (MBC), which allows the classification of the antibacterial effect as bacteriostatic or bactericidal. *Staphylococcus aureus* ATCC®6538™ and ATCC®29213™, *Escherichia coli* ATCC®10536™ and ATCC®25922™, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis ATCC®10708™, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Thyphimurium ATCC®13311™ and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 9027™ and ATCC®27853™ were tested. **Results and Discussion:** Among the bacterial reference strains tested, Vp-FRE showed antibacterial activity against *S. aureus* ATCC®6538™ and *P. aeruginosa* ATCC®27853™, with MIC values of 2.5 mg/mL and 5 mg/mL, respectively, demonstrating bacteriostatic and bactericidal effects, in this order, and MBC values of 5 mg/mL for both strains. **Conclusion:** Vp-FRE was active against *S. aureus* ATCC®6538™ and *P. aeruginosa* ATCC®27853™, indicating that *V. polyanthes* can be an interesting source of bioactive molecules with antibacterial effect, contributing with the prospection of new therapeutic approaches against infections. Moreover, these are unpublished results for this part of *V. polyanthes*, a nectariferous and polliniferous plant species.

Acknowledgements: UFJF, FAPEMIG, CNPq and CAPES.

¹ Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil, jonatasrflorencio@hotmail.com

² Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil, jordanagitirana@hotmail.com

³ Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil, oscarsantos_7@hotmail.com

⁴ Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil, silvana.alves@ufjf.edu.br

APÊNDICE C - Resumo intitulado "*Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae Bercht. & Presl): a potential natural source of antimicrobial agents" apresentado e publicado nos anais do 5th International Phytocosmetics and Phytotherapy Congress, 15 a 17 de maio de 2017, Patras, Grécia

***Vernonia polyanthes* LESS. (ASTERACEAE BERCHT. & PRESL): A POTENTIAL NATURAL SOURCE OF ANTIMICROBIAL AGENTS**

Jônatas Rodrigues Florencio¹, Jordana Damasceno Gitirana de Santana¹, Oscar Alejandro Santos Mayorga¹, Elita Scio², Orlando Vieira de Sousa³, Ademar Alves da Silva Filho³, Maria Silvana Alves³

¹Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Laureço Kelmer s/n, Campus Universitário, São Pedro, 36036-900, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

²Laboratory of Bioactive Natural Products, Department of Biochemistry, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Laureço Kelmer s/n, Campus Universitário, São Pedro, 36036-900, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

³Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Laureço Kelmer s/n, Campus Universitário, São Pedro, 36036-900, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

Background: *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae Bercht. & Presl) is a Brazilian native plant species, popularly known as "assa-peixe", and traditionally used to treat wounds, torsions, fractures, respiratory system disorders, and kidney problems^(1,2). The current study aimed to investigate the antibacterial activity of *V. polyanthes* flowers (Vp-FRE) and leaf (Vp-LRE) rinse extracts in order to corroborate with its traditional use and prospecting new therapeutic options against bacterial infections. **Methods:** Antibacterial activity of Vp-FRE and Vp-LRE was established by the Minimal Inhibitory Concentration (MIC)⁽³⁾ followed by the Minimal Bactericidal Concentration (MBC), which allows to classify the bacteriostatic or bactericidal effect⁽⁴⁾. *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538™/ATCC® 29213™; *Escherichia coli* ATCC® 10536™/ATCC® 25922™; *Salmonella Choleraesuis* ATCC® 10708™; *Salmonella* Thyphimurium ATCC® 13311™; and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 9027™/ATCC® 27853™ were tested. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 1485279, 1605677, 1664534, 1688441, 1830466; *Salmonella* spp. 1266695, 1507708, and *Salmonella* Enteritidis 1406591, 1418594, 1428260 clinical strains were also tested. **Results and discussion:** Vp-FRE revealed antibacterial activity against 9 of 18 strains tested, being more active against *S. aureus* ATCC® 29213™ and *S. aureus* 1605677, with MIC values of 1250 µg/mL and 156 µg/mL, respectively, and MBC of 1250 µg/mL and bacteriostatic effect for both strains. Vp-LRE was active against 6 of 18 strains tested, demonstrating more activity against *S. aureus* 1605677 and 1485279, with MIC values of 78 µg/mL and 625 µg/mL, in this order, MBC values of 1250 µg/mL and > 5000 µg/mL, respectively, and bacteriostatic effect. These values are consistent, even lower than MIC and MBC values range (500 to 8000 µg/mL) showed by other medicinal plants with antibacterial activity⁽⁵⁾. **Conclusions:** The present results suggest the potential of *V. polyanthes* as a promising source of antibacterial agents, contributing to the prospection of new therapeutic options against the increasing bacterial resistance to currently available antibiotics.

Keywords: *Vernonia polyanthes*; Asteraceae; Antibacterial activity; Antibacterial Agents; Natural Products; Medicinal Plant.

References:

- ⁽¹⁾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.
⁽²⁾RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande - Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, p. 102-123, 2001.

⁽³⁾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, 2012.

⁽⁴⁾ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 5-16, 2001.

⁽⁵⁾FABRY, W.; OKEMO, P. O.; ANSORG, R. Antibacterial activity of East African medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, p. 79-84, 1998.