



**UNEBA**

UNIVERSIDADE DO  
ESTADO DA BAHIA



**PPGMSB**

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MODELAGEM E SIMULAÇÃO DE  
BIOSSISTEMAS**

**ERICLICIA DORALICE AMANCIO BISPO DEIRÓ**

**ESTUDO BIOLÓGICO E FITOQUÍMICO DAS FOLHAS DE *Verbesina macrophylla*  
(CASS.) BLAKE (ASTERACEAE)**

Alagoinhas - BA  
2023

**ERICLICIA DORALICE AMANCIO BISPO DEIRÓ**

**ESTUDO BIOLÓGICO E FITOQUÍMICO DAS FOLHAS DE *Verbesina macrophylla*  
(CASS.) BLAKE (ASTERACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Modelagem e Simulação de Biossistemas da Universidade do Estado da Bahia como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Modelagem e Simulação de Biossistemas, M.Sc.

Área de conhecimento: Interdisciplinar  
Linha de Pesquisa: Análises de Biossistemas

Orientador: Prof. Dr. Edson de Jesus Marques.

Alagoinhas - BA  
2023

Sistema de Bibliotecas da UNEB  
Biblioteca Carlos Drummond de Andrade – Campus II Manoela  
Ribeiro Vieira  
Bibliotecária – CRB 5/1768

D324e Deiró, Ericilia Doralice Amancio Bispo  
Estudo biológico e fitoquímico das folhas de *Verbesina macrophylla*  
(CASS.) Blake (Asteraceae)/ Ericilia Doralice Amancio Bispo – Alagoinhas,  
2023.  
106 f. : il

Orientador: Profº. Drº. Edson de Jesus Marques.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado da Bahia, Departamento  
de Ciências Exatas e da Terra. Mestrado em Modelagem e Simulação de  
Biossistemas. Alagoinhas, 2023.

1. *Verbesina macrophylla* - Atividade Biológica 2. Infecções bacterianas 3.  
Planta Medicinal I. Marques, Edson de Jesus. II. Universidade do Estado da  
Bahia – Departamento de Ciências Exatas e da Terra III. Título.

CDD – 581.634

ERICLICIA DORALICE AMANCIO BISPO DEIRÓ

ESTUDO BIOLÓGICO E FITOQUÍMICO DAS FOLHAS DE *Verbesina macrophylla*  
(CASS.) BLAKE (ASTERACEAE)

Dissertação de Mestrado apresentada a Universidade do Estado da Bahia, Curso de Pós-Graduação em Modelagem e Simulação de Biossistemas, como requisito para obtenção de título de Mestre em Modelagem e Simulação de Biossistemas, M.Sc.

BANCA EXAMINADORA:

*Edson de Jesus Marques*

---

Prof. Dr. Edson de Jesus Marques - Orientador  
Universidade Estadual da Bahia - PPGMSB

*Vera Lucia Costa Vale*

---

Profa. Dra. Vera Lucia Costa Vale  
Universidade Estadual da Bahia - PPGMSB

*José Tadeu Raynal Rocha Filho*

---

Prof. Dr. José Tadeu Raynal Rocha Filho  
Universidade Federal da Bahia - UFBA

À minha filha Júlia e aos meus pais  
Edvaldo e Cristina, com todo amor.  
Dedico!

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por me dar vida e saúde para conseguir realizar mais um sonho.

À Universidade do Estado da Bahia (UNEB), por fornecer as estruturas físicas para a realização dos meus experimentos, o Laboratório Experimental da UNEB – *Campus II*, e o Herbário (HUNEB).

A Universidade Federal da Bahia (UFBA), por disponibilizar o Laboratório para realização dos estudos de caracterização química.

Ao meu querido orientador Dr. Edson de Jesus Marques, um ser humano incrível, dedicado, atencioso e principalmente paciente. Muito obrigada por tudo e por tanto nessa caminhada.

A todos os colaboradores do Laboratório Experimental da UNEB, a professora Dra. Vera Lucia Costa Vale, Thais Rocha, Camila Machado e principalmente aos meus novos amigos Vitória Monise, Alexandra Correia e Felipe Cerqueira, obrigada por cada momento de descontração, vocês tornaram meus dias cansativos muito mais leves, vou levar vocês para toda a vida ...

A minha amiga Cíntia Porto por toda ajuda e companheirismo durante o curso.

À querida colega representante da turma Jéssica Freitas pelas conversas proveitosas, e por toda atenção com a organização das demandas do curso.

Agradeço com todo o meu coração a minha mãe Cristina, sem dúvida alguma eu não teria conseguido sem ela que é o motor que move a minha vida. Obrigada por me ensinar a nunca desistir e por suas orações. Gratidão ao meu pai Edvaldo, por acreditar sempre em mim e ser um dos meus portos seguros.

Aos meus irmãos Écristio e Rafael, por me fazerem sorrir, até com as coisas sérias nos momentos mais difíceis, e pelo apoio e incentivo de sempre. Ao meu esposo Fabio pela compreensão nos momentos em que estive ausente e por me auxiliar em tudo que foi possível durante o mestrado.

Enfim a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

*“Não importa onde você parou... em que momento da vida você cansou...  
O que importa é que sempre é possível e necessário recomeçar.  
Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo...  
É renovar as esperanças na vida e, o mais importante...  
Acreditar em você de novo. Se desejarmos fortemente o melhor e...  
Principalmente, lutarmos pelo melhor...  
O melhor vai se instalar em nossa vida.  
Porque sou do tamanho daquilo que vejo.  
E não do tamanho da minha altura.”*

***Carlos Drummond de Andrade***

## RESUMO

As plantas são consideradas recursos promissores no tratamento de muitas doenças que assolam a humanidade, principalmente no caso de infecções bacterianas e fúngicas que tem sido motivo de preocupação mundial, devido ao aumento da resistência microbiana aos antibióticos disponíveis no mercado. Essa perspectiva é particularmente interessante para o Brasil, em razão da riqueza de sua biodiversidade e ao uso tradicional de plantas medicinais pela população. Dentre essas espécies medicinais está inserida a *Verbesina macrophylla* (Cass.) Blake (Asteraceae) utilizada na medicina popular para o tratamento de infecções bacterianas, fúngicas, do trato urinário, respiratório, bronquite, problemas renais, inflamações e febre. Neste trabalho a espécie foi submetida a ensaios de atividade biológica e estudos fitoquímicos. A atividade antimicrobiana dos extratos bruto em hexano, acetato de etila e etanol das folhas de *V. macrophylla*, através do método de microdiluição, revelou atividade contra bactérias Gram positivas (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus*), com Concentração Inibitória Mínima (CIM) entre 500 µg/mL e 7,81 µg/mL. Os mesmos extratos apresentaram-se inativos contra fungos em concentrações até 500 µg/mL. O fracionamento do extrato em acetato de etila utilizando Cromatografia em Coluna (CC) resultou em 51 frações, analisadas através de Cromatografia em Coluna Delgada Analítica (CCDA), as quais a ação antimicrobiana pode ser observada em baixa polaridade contra bactérias Gram positivas com concentração de 1000 µg/mL e frente as cepas fúngicas filamentosa (*Aspergilus niger*) e leveduriforme (*Candida albicans*). O estudo fitoquímico revelou dois compostos (6-O-b-E-p-coumaroyl-4a-hydroxyeudesmane e 6-O-b-Z-p-coumaroyl-4a-hydroxyeudesmane). Essas substâncias foram ativas contra bactérias Gram-positivas com CIM entre 2,5 e 3,9 µg/mL e ação bactericida para *S. aureus* e *B. cereus*. O ensaio de citotoxicidade em hemárias dos extratos bruto em hexano e acetato de etila apontou ligeira hemólise apenas para o extrato hexânico, demonstrando a segurança toxicológica dos extratos. O estudo de cinética do crescimento microbiano da fração VMF19-20 utilizando o método time-kill revelou efeito bacteriostático dependente da concentração, para a cepa *Bacillus subtilis*.

**Palavras-chave:** *Verbesina macrophylla*; atividade biológica; planta medicinal; sesquiterpenos.

## ABSTRACT

Plants are considered promising resources in the treatment of many diseases that plague humanity, especially in the case of bacterial and fungal infections that have been a matter of worldwide concern, due to the increase in microbial resistance to antibiotics available on the market. This perspective is particularly interesting for Brazil, due to the richness of its biodiversity and the traditional use of medicinal plants by the population. Among these medicinal species is *Verbesina macrophylla* (Cass.) Blake (Asteraceae) used in folk medicine for the treatment of bacterial and fungal infections of the urinary tract, respiratory tract, bronchitis, kidney problems, inflammation and fever. In this study, the species was submitted to biological activity assays and phytochemical studies. The antimicrobial activity of crude extracts in hexane, ethyl acetate and ethanol from leaves of *V. macrophylla*, through the microdilution method, revealed activity against Gram positive bacteria (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Micrococcus luteus*), with inhibitory concentration minimum (MIC) between 500 µg/mL and 7.81 µg/mL. The same extracts were inactive against fungi at concentrations up to 500 µg/mL. The fractionation of the extract in ethyl acetate using Column Chromatography (CC) resulted in 51 fractions, analyzed by Analytical Thin Column Chromatography (ADCC), which antimicrobial action can be observed in low polarity against Gram positive bacteria with concentration of 1000 µg/mL and against filamentous (*Aspergilus niger*) and yeast (*Candida albicans*) fungal strains. The phytochemical study revealed two compounds (6-O-b-E-p-coumaroyl-4a-hydroxyeudesmane and 6-O-b-Z-p-coumaroyl-4a-hydroxyeudesmane). These substances were active against Gram-positive bacteria with MIC between 2.5 and 3.9 µg/mL and bactericidal action against *S. aureus* and *B. cereus*. The cytotoxicity assay in red blood cells of the crude extracts in hexane and ethyl acetate indicated slight hemolysis only for the hexane extract, demonstrating the toxicological safety of the extracts. The study of microbial growth kinetics of the VM-F19-20 fraction using the time-kill method revealed a concentration-dependent bacteriostatic effect for the *Bacillus subtilis* strain.

**Key Words:** *Verbesina macrophylla*; biological activity; medicinal plants; sesquiterpenos.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - DETALHES DA ESPÉCIE <i>Verbesina macrophylla</i> – A. RAMO FÉRTIL; B. RAMO ALADO; C. FACE ADAXIAL; D. FACE ABAXIAL; E. CAPÍTULO; F. BRÁCTEAS INVOLUCRAIS; G. FLOR DO RAIO; H. FLOR DO DISCO; I. CIPSELA .....	36
<b>Figura 2</b> - SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE <i>Verbesina macrophylla</i> POR BOHLMANN E COLABORADORES EM.....	37
<b>Figura 3</b> - SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE <i>Verbesina macrophylla</i> POR MAIA E COLABORADORES EM 2011, MONOTERPENOS: BORNIL P-TRANS-CUMARATO (Vm-1) E BORNIL-P-C/S-CUMARATO (Vm-2) .....	38
<b>Figura 4</b> - ESQUEMA DA OBTENÇÃO DOS EXTRATOS HEXÂNICO, ACETATO DE ETILA E ETANÓLICO DE <i>Verbesina macrophylla</i> (Vm) .....	40
<b>Figura 5</b> - PROCESSO DE ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE <i>Verbesina macrophylla</i> (Vm). CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM); CROMATOGRAFIA EM COLUNA FILTRANTE; CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA ANALÍTICA (CCDA) FRAÇÃO (F) .....	41
<b>Figura 6</b> - ESQUEMA DA PLACA DE 96 POÇOS PARA A DETERMINAÇÃO DA CIM .....	45
<b>Figura 7</b> - PROCEDIMENTO PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA. SANGUE DE CARNEIRO DESFIBRILADO (SDC); ROTAÇÕES POR MINUTO (RPM).....	47
<b>Figura 8</b> - ROTA PARA A OBTENÇÃO DO EFEITO DA FRAÇÃO Vm-F19-20 SOBRE A CINÉTICA DO CRESCIMENTO MICROBIANO (TIME-KILL).....	48
<b>Figura 9</b> - ESPECTRO DE RMN DE H <sup>1</sup> DA FRAÇÃO Vm-F1 DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DE <i>Verbesina macrophylla</i> (Vm) .....	74
<b>Figura 10</b> - ESPECTRO DE RMN DE H <sup>1</sup> DA FRAÇÃO Vm-F2 DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DE <i>Verbesina macrophylla</i> (Vm).....	74
<b>Figura 11</b> - ESPECTRO DE RMN DE H <sup>1</sup> DA FRAÇÃO Vm-F10 DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DE <i>Verbesina macrophylla</i> (Vm).....	74
<b>Figura 12</b> - ESPECTRO DE RMN DE H <sup>1</sup> DA FRAÇÃO Vm-F11-12 DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DE <i>Verbesina macrophylla</i> (Vm) .....	75
<b>Figura 13</b> - ESPECTRO DE RMN DE H <sup>1</sup> DA FRAÇÃO Vm-F13-14 DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DE <i>Verbesina macrophylla</i> (Vm) .....	75

<b>Figura 14 - ESPECTRO DE RMN DE H<sup>1</sup> DA FRAÇÃO Vm-F15-16 DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DE <i>Verbesina macrophylla</i> (Vm) .....</b>	75
<b>Figura 15 - ESPECTRO DE RMN DE H<sup>1</sup> DA FRAÇÃO Vm-F17-18 DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DE <i>Verbesina macrophylla</i> (Vm) .....</b>	76
<b>Figura 16 - ESPECTRO DE RMN DE H<sup>1</sup> DA FRAÇÃO Vm-F19-20 DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DE <i>Verbesina macrophylla</i> (Vm) .....</b>	76
<b>Figura 17 - ESPECTRO DE RMN DE H<sup>1</sup> DA FRAÇÃO Vm-F21-22 DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DE <i>Verbesina macrophylla</i> (Vm) .....</b>	76
<b>Figura 18 - ESPECTRO DE RMN DE H<sup>1</sup> DA FRAÇÃO Vm-F23-24 DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DE <i>Verbesina macrophylla</i> (Vm) .....</b>	77
<b>Figura 19 - ESPECTRO DE RMN DE H<sup>1</sup> DA FRAÇÃO Vm-F19-20 DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DE <i>Verbesina macrophylla</i> (Vm) Os DADOS ESPECTRAIS FORAM ADQUIRIDOS EM ESPECTRÔMETRO VARIAM INOVA 500, OPERANDO A 500 MHZ PARA O H<sup>1</sup> E A 125 MHZ PARA O C<sup>13</sup> .....</b>	78
<b>Figura 19.1 - AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE H<sup>1</sup> DA FRAÇÃO Vm-F19-20 DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DE <i>Verbesina macrophylla</i> (Vm). Os DADOS ESPECTRAIS FORAM ADQUIRIDOS EM ESPECTRÔMETRO VARIAM INOVA 500, OPERANDO A 500 MHZ PARA O H<sup>1</sup> E A 125 MHZ PARA O C<sup>1</sup> .....</b>	78
<b>Figura 19.2 - AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE H<sup>1</sup> DA FRAÇÃO Vm-F19-20 DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DE <i>Verbesina macrophylla</i> (Vm). Os DADOS ESPECTRAIS FORAM ADQUIRIDOS EM ESPECTRÔMETRO VARIAM INOVA 500, OPERANDO A 500 MHZ PARA O H<sup>1</sup> E A 125 MHZ PARA O C<sup>13</sup> .....</b>	79
<b>Figura 19.3 - AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE H<sup>1</sup> DA FRAÇÃO Vm-F19-20 (FIGURAS 19 – 19.2) DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DE <i>Verbesina macrophylla</i> (Vm). OS DADOS ESPECTRAIS FORAM ADQUIRIDOS EM ESPECTRÔMETRO VARIAN INOVA 500 OPERANDO A 125 MHZ .....</b>	79
<b>Figura 20 - ESPECTRO DE RMN DE C<sup>13</sup> DA FRAÇÃO Vm-F19-20 DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DE <i>Verbesina macrophylla</i> (Vm). OS DADOS ESPECTRAIS FORAM ADQUIRIDOS EM ESPECTRÔMETRO VARIAN INOVA 500. OPERANDO A 125 MHZ.....</b>	80
<b>Figura 21 - ESPECTRO DE RMN DE DEPT DA FRAÇÃO Vm-F19-2 DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DE <i>Verbesina macrophylla</i> (Vm). OS DADOS ESPECTRAIS FORAM ADQUIRIDOS EM ESPECTRÔMETRO VARIAN INOVA 500. OPERANDO A 125 MHZ.....</b>	80

<b>Figura 22 - ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO Vm-F19-20 DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DE <i>Verbesina macrophylla</i> (Vm). OS DADOS ESPECTRAIS FORAM ADQUIRIDOS EM ESPECTRÔMETRO VARIAN INOVA 500. OPERANDO A 125 MHZ.....</b>	<b>81</b>
<b>Figura 23 - ESPECTRO DE RMN DE HMBC DA FRAÇÃO Vm-F19-20 DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DE <i>Verbesina macrophylla</i> (Vm). OS DADOS ESPECTRAIS FORAM ADQUIRIDOS EM ESPECTRÔMETRO VARIAN INOVA 500. OPERANDO A 125 MHZ.....</b>	<b>81</b>
<b>Figura 23.1 - AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE HMBC DA FRAÇÃO Vm-F19-20 DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DE <i>Verbesina macrophylla</i> (Vm) OS DADOS ESPECTRAIS FORAM ADQUIRIDOS EM ESPECTRÔMETRO VARIAN INOVA 500 OPERANDO A 125 MH.....</b>	<b>82</b>
<b>Figura 24 - COMPONENTES MAJORITÁRIOS DA FRAÇÃO Vm-F19-20 DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DE <i>Verbesina macrophylla</i> (Vm)</b>	<b>83</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS DE <i>Verbesina macrophylla</i> (Vm). HEXANO (HEX); ACETATO DE ETILA (ACOET) .....	43
<b>Tabela 2</b> - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS EM HEXANO, ACETATO DE ETILA E ETANOL DAS FOLHAS DE <i>Verbesina macrophylla</i> (Vm). MICROGRAMAS ( $\mu\text{g}$ ); MILILITROS (mL); MAIOR QUE (>); ACETATO DE ETILA (ETOAC).....	51
<b>Tabela 3</b> - ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS EM HEXANO, ACETATO DE ETILA E ETANOL DAS FOLHAS DE <i>Verbesina macrophylla</i> (Vm). MICROGRAMAS ( $\mu\text{g}$ ); MILILITROS (mL); MAIOR QUE (>); ACETATO DE ETILA (ETOAC); CICLOPIROX OLAMINA (C. OLA) .....	55
<b>Tabela 4</b> - DADOS DO FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO ACETATO DE ETILA OBTIDO DE <i>Verbesina macrophylla</i> (Vm), COM MASSA DADA EM MILIGRAMAS. FRAÇÃO (F); MILIGRAMA (mg); ACETATO DE ETILA (ETOAC) .....	57
<b>Tabela 5</b> - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA EM 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAS FRAÇÕES OBTIDAS DO EXTRATO ACETATO DE ETILA, ORIUNDO DE <i>Verbesina macrophylla</i> (Vm). MICROGRAMAS ( $\mu\text{g}$ ); MILILITROS (mL); FRAÇÃO (F); PRESENÇA DE ATIVIDADE (+); AUSÊNCIA DE ATIVIDADE (-) ...	58
<b>Tabela 6</b> - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) EM $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAS FRAÇÕES ATIVAS Vm-F17-18 E Vm-F19-20, OBTIDAS DO EXTRATO ACETATO DE ETILA, ORIUNDO DE <i>Verbesina macrophylla</i> (Vm) FRENTE A BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS. MICROGRAMAS ( $\mu\text{g}$ ); MILILITROS (mL); MAIOR QUE (>) CLORANFENICOL (CLR) .....	61
<b>Tabela 7</b> - CLASSIFICAÇÃO QUANTO A AÇÃO ANTIMICROBIANA (BACTERICIDA OU BACTERIOSTÁTICA) DAS FRAÇÕES ATIVAS Vm-F17-18 E Vm-F19-20. FRAÇÃO (F).....	64
<b>Tabela 8</b> - ATIVIDADE ANTIFÚNGICA EM 1000 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) DAS FRAÇÕES OBTIDAS DO EXTRATO ACETATO DE ETILA, ORIUNDO DE <i>Verbesina macrophylla</i> (Vm). MICROGRAMAS ( $\mu\text{g}$ ); MILILITROS (mL); FRAÇÃO (F); PRESENÇA DE ATIVIDADE (+); AUSÊNCIA DE ATIVIDADE (-) .....	66
<b>Tabela 9</b> - ATIVIDADE CITOTÓXICA EM 10, 100 E 1000 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) DOS EXTRATOS HEXÂNICO E ACETATO DE ETILA DE <i>Verbesina macrophylla</i> (Vm). MICROGRAMAS ( $\mu\text{g}$ ); MILILITROS (mL); NÃO HOUVE HEMÓLISE (-); LIGEIRA HEMÓLISE (+); SIGNIFICATIVA HEMÓLISE (++) ; HEMÓLISE INTENSA (+++) .....	69

**Tabela 10** - DADOS DA CONTAGEM DE *Bacillus subtilis* PARA AS TRÊS CONCENTRAÇÕES (10; 100; 1000 µg/mL) DA FRAÇÃO Vm-F19-20 MICROGRAMAS (µg); MILILITROS (mL); FRAÇÃO (F).....71

**Tabela 11** - DADOS ESPECTRAIS DE RMN DE H<sup>1</sup>, C<sup>13</sup> E HMBC DOS COMPONENTES DA FRAÇÃO Vm-F19-20 DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DE *Verbesina macrophylla* (Vm) EM COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA.....83

## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1 - CURVA DE MORTE MICROBIANA (Log10 UFC/mL) DA CEPA *Bacillus subtilis*, SOB AÇÃO DA FRAÇÃO VM-F19-20 EM TRÊS CONCENTRAÇÕES ..... 72**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de Etila
ATCC	American Type Culture Collection
BaSO <sub>4</sub>	Sulfato de Bário.
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CTC	Coleção de Culturas Tropical
d	Duplo
dd	Duplo duplo
t	Tripleto
DMSO	Dimetilsulfóxido deuterado
EHexFV	Extrato Hexânico das folhas de <i>V. macrophylla</i> )
EAcOEtFVM	Extrato Acetato de Etila das folhas de <i>V. macrophylla</i> )
EEtnFVM	Extrato Etanólico das folhas de <i>V. macrophylla</i> )
F	Fração
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
LABEXP	Laboratório de Biologia Experimental
<i>m</i>	Multipleto
MHz	Megahertz
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)
ml:	Mililitros.
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
OMS	Organização Mundial de Saúde
ppm	Partes por milhão
RPM	Rotações por minuto
RMN C <sup>13</sup>	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN H <sup>1</sup>	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
Rf:	Fator de Retenção.
SDC	Sangue de carneiro desfibrilado

s	Simpleto
sl	Simpleto largo
δ	Deslocamento químico em ppm
UFC	Unidades Formadoras de Colônia.
UNEB	Universidade do Estado da Bahia
UFBA	Universidade Federal da Bahia
μg	Microgramas.
μl	Microlitros.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
1.1 Objetivos .....	21
1.1.1 Objetivo geral.....	21
1.1.2 Objetivos específicos.....	21
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>23</b>
2.1 Os antibióticos e a resistência microbiana .....	23
2.2 Metabólitos secundários e o potencial de bioprospecção .....	27
2.3 Considerações botânicas.....	31
2.3.1 Família Asteraceae.....	31
2.3.2 Gênero <i>Verbesina</i> .....	33
2.3.3 Espécie <i>Verbesina macrophylla</i> (Cass.) Blake .....	34
<b>3 METODOLOGIA DE PESQUISA .....</b>	<b>39</b>
3.1 Coleta e identificação do material botânico .....	39
3.2 Processamento do material botânico .....	39
3.3 Obtenção dos extratos .....	39
3.4 Isolamento e purificação dos constituintes químicos .....	40
3.4.1 Análises cromatográficas .....	42
3.4.2 Fracionamento cromatográfico do extrato bruto Acetato de Etila oriundo das folhas de <i>Verbesina macrophylla</i> .....	42
3.4.3 Caracterização estrutural dos constituintes químicos isolados .....	43
3.5 Ensaio biológico <i>in vitro</i> .....	43
3.5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana .....	43
3.5.1.2 Preparação da solução estoque da amostra .....	44
3.5.1.3 Preparação da suspensão do microrganismo .....	44
3.5.1.4 Microdiluições.....	44
3.5.1.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) .....	46
3.5.1.6 Determinação da atividade antimicrobiana das frações obtidas do extrato bruto Acetato de Etila .....	46
3.5.2 Teste de citotoxicidade com hemárias .....	46
3.5.3 Efeito da fração Vm-F19-20 sobre a cinética do crescimento microbiano (time-kill).....	47

3.5.3.1 Determinação das unidades formadoras de colônia (UFC) da suspenção inicial .....	49
3.5.3.2 Ensaio em microdiluição .....	49
3.5.3.3 Determinação das unidades formadoras de colônia após microdiluição .....	49
3.5.3.4 Análise estatística .....	50
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
4.1 Testes preliminares dos extratos brutos de <i>Verbesina macrophylla</i> (Cass). Blake (Asteraceae) .....	51
4.1.2 Atividade antibacteriana .....	51
4.1.3 Atividade Antifúngica .....	54
4.2 Fracionamento cromatográfico do extrato acetato de etila proveniente de <i>Verbesina macrophylla</i> .....	56
4.3 Atividade biológica das frações obtidas do extrato acetato de etila proveniente de <i>Verbesina macrophylla</i> .....	58
4.3.1 Atividade antibacteriana das frações .....	58
4.3.2 Concentração inibitória mínima (CIM) das frações ativas Vm-F17-18 e Vm-F19-20 .....	61
4.3.3 Classificação da ação antimicrobiana das frações Vm-F17-18 e Vm-F19-20 .....	63
4.3.4 Atividade antifúngica das frações.....	64
4.4 Citotoxicidade em hemácias dos extratos em Hexano e Acetato de Etila.....	68
4.5 Efeito da fração Vm-F19-20 sobre a cinética do crescimento microbiano (time-kill).....	70
4.6 Caracterização dos constituintes químicos de <i>Verbesina macrophylla</i> .....	73
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>87</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas para fins medicinais é umas das práticas mais antigas da humanidade, muitas espécies eram utilizadas para auxiliar na cura de doenças, sendo esse conhecimento transmitido de geração em geração. Assim, elas representam os primeiros recursos farmacológicos a serem utilizados em sociedade. As propriedades curativas dos constituintes das plantas advêm do sistema de defesa dos vegetais, o qual gera compostos com variadas estruturas moleculares, muito superiores daqueles derivados de produtos sintéticos (PRADDEPA et al., 2014). De forma que o reino vegetal é uma inspiração para o desenvolvimento de novas drogas (NEWMAN; CRAGG, 2012), sendo foco da pesquisa moderna, devido a sua grande diversidade química, que pode fornecer substâncias com variados efeitos farmacológicos (WANG et al., 2011; YANG et al., 2017).

Grande parte da população faz uso de plantas medicinais por ser considerado um tratamento menos agressivo ao organismo, e em consequência do elevado custo dos medicamentos sintéticos, o que os torna menos acessíveis (NÓBREGA et al., 2017). Em comunidades mais isoladas e em regiões mais pobres, as plantas medicinais se destacam por ser o único recurso terapêutico, ainda que seus constituintes químicos não sejam totalmente conhecidos (MACIEL, 2002; BERTINI, 2005). Sabendo disso, o uso popular constitui-se como uma importante estratégia para a descoberta de novos fármacos (BARNES et al., 2012).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 80% da população utiliza a medicina tradicional ou a fitoterapia para tratar suas enfermidades (KHAN; AHMAD, 2019). No Brasil, em 2006, o Ministério da Saúde lançou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), que oferecia aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS), serviços que contemplassem a Fitoterapia, principalmente no âmbito da Atenção Primária à Saúde (APS) (BRASIL, 2006; MATTOS et al., 2018). Atualmente, na rede pública, o Ministério da Saúde (MS) promove a utilização de 13 medicamentos fitoterápicos (BRASIL, 2020).

As principais vantagens dos fitoterápicos são o baixo custo, a acessibilidade e geralmente menos efeitos colaterais. As pesquisas realizadas com as plantas medicinais são muito importantes para confirmar sua segurança e eficácia (BHATTACHARYA, 2017). A avaliação da atividade biológica de uma planta deve abranger aspectos associados à atividade farmacológica e toxicológica das

substâncias isoladas, de frações obtidas ou de extratos totais do vegetal, essas informações são fundamentais para a transformação da planta medicinal em um produto fitoterápico (TOLEDO et al., 2003). Em países com flora diversificada já existem vários estudos sobre as atividades antimicrobianas de extratos e óleos essenciais de plantas nativas (HOLETZ et al., 2002; ARAÚJO, 2010).

A diversidade de espécies vegetais presentes no Brasil constitui uma de suas maiores riquezas, o país abriga aproximadamente 20% do número total de espécies do planeta (CALIXTO, 2003). O que possibilita o estudo de muitas dessas plantas para que seja comprovada a ação terapêutica e posteriormente o desenvolvimento de fitoterápicos que auxiliem na prevenção ou cura de doenças (GIULIETTI et al., 2005; KLEIN et al., 2009). No entanto, mesmo o território brasileiro possuindo esta rica flora com ampla utilização de plantas medicinais pela população, permanece a necessidade de estimular pesquisas relacionadas a potencialidade terapêutica dos metabólitos de plantas (FAGUNDES et al., 2017). Embora seja considerado o detentor da maior diversidade vegetal do mundo, o Brasil possui lacunas a serem preenchidas em relação a pesquisas com ênfase nos produtos naturais, uma vez que apenas 8% do total de espécies no país foi estudado (GONÇALVES, 2015).

Com o surgimento de bactérias altamente resistentes, os estudos por extratos de plantas que exerçam alguma ação antimicrobiana oportunizam a elaboração de novos agentes contra infecções de difícil tratamento (ELOFF, 1998). As doenças infecciosas continuam sendo a principal causa de morbidade e mortalidade no mundo todo. Uma explicação para este fato é que os microrganismos possuem grande capacidade para a aquisição de resistência aos antimicrobianos, fato que se deve principalmente ao uso indiscriminado, sem orientação médica ou farmacêutica, de antibióticos pela população (MADDILA; HEMALATHA, 2017).

Sabendo disso é importante relatar que substâncias obtidas de espécies nativas do Brasil, que apresentem atividade antimicrobiana e baixa toxicidade, podem se tornar uma alternativa viável para a obtenção de antibióticos naturais, com baixo custo e acessível para população carente das localidades onde estas espécies são encontradas (COSTA et al., 2005). Antibióticos oriundos de produtos naturais geralmente apresentam estruturas químicas complexas importantes para as interações específicas e reconhecimento por alvos macromoleculares em bactérias patogênicas (WALSH, 2003)

Dentre a grande variedade de plantas com propriedades medicinais encontram-se as espécies pertencentes à família Asteraceae, que apresentam grande valor para a indústria farmacêutica, e em virtude disso, tem sido objeto de estudo de muitas pesquisas, a fim de servir como subsídio para novos fármacos com ação antimicrobiana, anti-inflamatória, antiprotozoário e analgésico (LORENZI; MATOS, 2021; MARTINEZ et al., 2020).

O gênero *Verbesina* um dos maiores da família Asteraceae com cerca de 300 espécies (KARIS; RYDING, 1994), tem sido amplamente utilizado na medicina tradicional para o tratamento de diversas enfermidades (MORA et al., 2013). A espécie *Verbesina macrophylla* por exemplo possui indicação popular no tratamento de infecções, problemas renais e febre. Dessa espécie já foram isolados terpenos, monoterpenos e sesquiterpenos (BOHLMANN et al., 1980, MAIA et al., 2011, BEZERRA et al., 2018, DE VERAS et al., 2021). Segundo Lorenzi e Matos (2021), os terpenos são os principais responsáveis pelos efeitos antisséptico, anti-inflamatório, antipirético.

Diante do exposto, pode-se afirmar que a investigação de compostos terapêuticos alternativos oriundos de plantas medicinais é uma necessidade. Sendo de grande relevância o aprofundamento das informações acerca de espécies com potencial para o desenvolvimento de novos fármacos. Dessa forma, o presente estudo é muito pertinente, ao contribuir para o conhecimento químico e biológico da família Asteraceae.

## 1.1 Objetivos

### 1.1.1 Objetivo geral

Contribuir para o conhecimento do perfil quimiotaxonômico da família Asteraceae através do estudo biológico e fitoquímico da espécie *Verbesina macrophylla* (Cass.) Blake (Asteraceae).

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos brutos em hexano, acetato de etila e etanol oriundos das folhas de *Verbesina macrophylla*

frente a cepas bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas, e a fungos filamentosos e leveduriformes;

- Realizar fracionamento cromatográfico do extrato de melhor atividade biológica;
- Avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica das frações;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) das frações de melhor atividade;
- Determinar a classificação da ação antimicrobiana das frações de melhor atividade;
- Avaliar a citotoxicidade em hemácias dos extratos brutos;
- Avaliar a cinética de morte microbiana da fração de melhor atividade frente a bactéria Gram-postiva *Bacillus subtilis*;
- Realizar o estudo fitoquímico das frações ativas;
- Caracterizar os componentes ativos da amostra mais pura;

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Os antibióticos e a resistência microbiana

Antibióticos podem ser definidos como compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de bactérias. Conforme o mecanismo de ação podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte celular, ou bacteriostáticos, quando provocam a inibição do crescimento microbiano (WALSH, 2003).

Os primeiros antimicrobianos foram produzidos sinteticamente. Em 1910 o biólogo bacteriologista alemão Paul Ehrlich fez uma enorme contribuição para o tratamento da sífilis através da descoberta da arsfenamina, composto que apresenta em sua estrutura o arsênico, sendo comercializado como salvarsan (PATRICK, 2005).

No entanto, o marco na terapia das infecções bacterianas ocorreu com a descoberta da Penicilina pelo médico inglês Alexander Fleming, em 1928 (NICOLAOU, 2008). Anos depois, em 1934 houve a introdução daproflavina, agente amplamente utilizado na Segunda Guerra Mundial, especialmente contra infecções de feridas profundas. Este composto apresentava alta toxicidade para ser usado em infecções bacterianas sistêmicas, fato que evidenciava a necessidade da busca por novos agentes (PATRICK, 2005).

Em 1935, Gerhard Domagk constata que o corante vermelho prontosil apresentava atividade *in vivo* contra infecções causadas por espécies de *Streptococcus*, este fato foi um marco na quimioterapia antibacteriana. O prontosil originou uma nova classe de antibióticos de origem sintética, as sulfas ou sulfonamidas. Introduzida no início dos anos 1940 se estabeleceram como a primeira classe de drogas efetivas contra infecções sistêmicas (PATRICK, 2005).

A resposta terapêutica da penicilina era superior à das sulfas e a comprovação de que fungos produziam substâncias capazes de inibir a proliferação das bactérias motivou uma nova frente de pesquisas na busca por novos agentes antimicrobianos: a prospecção em culturas de microrganismos, principalmente fungos e actinobactérias. Apenas em 1940 a penicilina G, ou Benzilpenicilina foi introduzida como agente terapêutico e só então a penicilina começa a ser produzida em escala industrial, especialmente em consequência da Segunda Guerra Mundial (PROJAN, 2004).

A descoberta realizada por Alexander Fleming deu início a era da antibioticoterapia, contribuindo com o aumento da expectativa de vida das pessoas que sofriam com doenças infecciosas, antes de difícil tratamento e de alta mortalidade (SCHAECHTER et al., 2002)

O período entre 1940 e 1970 é marcado pelo surgimento de novos antibióticos, considerado a “era do ouro”. Desde então, muitos outros têm sido desenvolvidos a partir de diferentes fontes, com variados alvos e mecanismos de ação sendo mais eficientes e acarretando menos efeitos colaterais (KONG et al., 2010)

De acordo Walsh (2003), a literatura registra inúmeros antibióticos, dos quais muitos foram originados de microrganismos, e muito embora essa grande parcela, seja produzida por meio desses microrganismos, outra parte significativa resultou da modificação química dos antimicrobianos conhecidos, ou de metabólitos microbianos, as penicilinas e cefalosporinas semissintéticas, tetraciclínas e rifamicinas modificadas, clindamicina e troleandomicina são apenas alguns exemplos. O autor ainda relata que existem também antibióticos obtidos inteiramente por síntese, como é o caso do cloranfenicol.

As plantas também produzem um vasto número de substâncias naturais com potencial antimicrobiano e imunomodulador na tentativa de adaptação às agressões do meio ambiente (WILLIAMS, 2001). A busca pelo conhecimento da presença de substâncias antimicrobianas nos vegetais superiores teve grande impulso após a descoberta da penicilina (LIMA, 2001).

Os antibióticos têm papel fundamental no tratamento de doenças, são a segunda classe de droga mais utilizada no mundo, sendo responsável por 20 a 50% das despesas hospitalares, correspondendo a uma parcela expressiva das prescrições em atendimentos ambulatoriais (SÁEZ-LLORENS, 2000).

As drogas antimicrobianas possuem forma farmacêutica e posologia de tratamento diferentes de acordo com a patologia, em caso de ser utilizado por conta própria, consumido em dosagem diferente da prescrição ou interrompido o tratamento sem a orientação médica, algumas consequências negativas podem ocorrer (DEL FIOL et al., 2010). A consequência desse cenário é que o uso desordenado de antibióticos pode levar a graves problemas de saúde pública, a exemplo do crescimento da mortalidade, devido ao surgimento de superbactérias resistentes aos antibióticos disponíveis atualmente no mercado (MONTEIRO et al., 2020). Essa resistência aumenta progressivamente desde a utilização dos primeiros antibióticos,

constituindo-se uma ameaça a todo um século de avanços na medicina (LOUREIRO et al., 2016). Sobretudo, pelo uso indiscriminado que contribuiu de modo decisivo para a seleção dos microrganismos e consequentemente do problema que enfrentamos: a resistência aos antimicrobianos.

Antes da chegada do século XXI a resistência bacteriana predominava em ambientes hospitalares. Nos dias atuais essa resistência está associada a diversos ambientes e pode afetar inclusive os indivíduos saudáveis (WOODFORD, 2005). Uma possibilidade a ser adotada na tentativa de contornar essa problemática que aumenta ano após ano é o uso de terapias associadas (FERNANDES, 2006). No entanto, o uso extensivo e muitas vezes irracional dos antibióticos, condições precárias de higiene, fluxo contínuo de viajantes, o aumento de pacientes imunocomprometidos e a lentidão no diagnóstico das infecções bacterianas têm levado ao aumento da resistência (VON NUSSBAUM, 2006).

A compreensão dos mecanismos bioquímicos e genéticos envolvidos na resistência bacteriana é de suma importância para o entendimento do processo que leva a bactéria a desenvolver resistência. Embora esses mecanismos sofram variação de patógeno para patógeno, a resistência é promovida por alguns fatores fundamentais: inativação do antimicrobiano diretamente na molécula bioativa por alterações químicas, comumente causadas por enzimas bacterianas (WRIGHT, 2005); modificação do alvo, o que leva a uma diminuição de sensibilidade ao antibiótico (LAMBERT, 2005); alterações na bomba de efluxo e permeabilidade externa da membrana, que causa a redução da concentração do antibiótico sem sua modificação química (ALLINGTON, 2001); transferência do alvo: o que significa que determinadas bactérias tornam-se insensíveis a alguns antibióticos devido a sua capacidade de transmitir a inativação de uma determinada enzima, isto é, os antibióticos que apresentam mecanismos de ação que requerem inibição enzimática tornam-se inativos por não possuir o alvo para atuar (HAPPI et al., 2005).

É importante destacar que embora já seja do conhecimento da população as dificuldades com a descoberta de antibacterianos, os problemas para a criação de drogas antifúngicas são ainda mais agudos (NEWMAN; CRAGG, 2020). Todos os novos agentes são efetivamente baseados no azol, enquanto novos fungos infecciosos estão sendo descobertos em pacientes. Dados de 2019 do Centro de Controle de Doença demonstram que as infecções por *Candida auris* vem aumentando com resistência ao fluconazol, as equinocandinas (com resistência sendo

estabelecida durante o tratamento), essa realidade é observada até mesmo com anfotericina B em cerca de 30% dos isolados clínicos (NEWMAN; CRAGG, 2020). O fato de alguns antifúngicos apresentarem ação fungistática e não fungicida (azóis), pode contribuir para o surgimento de microrganismos resistentes (RANG et al., 1997; ZACCHINO et al., 2003).

O Plano de Ação Global, aprovado na Assembleia Mundial de Saúde em 2015 estabelece estratégias que podem ser adotadas para retardar o surgimento e amenizar a propagação de microrganismos resistentes a esses agentes terapêuticos reduzindo a carga da doença e a propagação da infecção: prevenção de doenças infecciosas com o uso de vacinas; uso racional de antibióticos; controle e prevenção da propagação de microrganismos resistentes; descoberta e desenvolvimento de novas drogas; conscientização da população; ação de medidas higiênico sanitárias; diminuição do uso de terapias empíricas por parte dos profissionais de saúde; além disso, a identificação dos genes causadores da resistência, bem como sua localização e diversidade são importantes para a compreensão dos fatores envolvidos na resistência (WHO, 2015).

O monitoramento da AMR (resistência antimicrobiana) foi realizado através de diferentes métodos em cada país que participou do Plano de Ação Global de 2015, e as adequações foram realizadas de acordo as condições tecnológicas e financeiras locais. O Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única (PAN-BR), publicado pelo Ministério da Saúde em 2018, descreve que o monitoramento da resistência antimicrobiana no Brasil se dará a partir da implementação de uma rede nacional de informação integrada para a vigilância e monitoramento da AMR na esfera da saúde humana, através de metodologias e modelos de segurança laboratorial, orientando protocolos clínicos para tratamento e analisando as tendências epidemiológicas (BRASIL, 2018).

Embora, diversas iniciativas tenham sido elaboradas e estejam em vigor para o enfrentamento da Resistência Bacteriana, as soluções ainda são insuficientes para mensurar a gravidade e impacto das infecções (ESTRELA, 2018). Nesse sentido Souza, (2008) acrescenta que diante do crescimento de drogarias e farmácias a fiscalização ganha mais complexidade nesses estabelecimentos, demonstrando em pesquisas que a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n.º 20 de 25 de julho de 2011 que controla a venda de antibióticos, não demonstram ser tão eficazes, visto que o controle de prescrições não é igualmente fiscalizado em todos os locais de venda.

Não existem dúvidas de que os antibióticos reduziram acentuadamente a taxa de mortalidade humana em consequência das infecções, como também evitou a ocorrência de outras tantas patologias, de maneira a contribuir para a saúde e bem-estar da população durante a última metade do século XX (RIPOLL-COZZANO, 2002). Entretanto a resistência bacteriana resultante da utilização indiscriminada dos antimicrobianos sempre será uma questão grave de saúde pública, porém para que se possa manter o mínimo controle em face a essa problemática mundial, é preciso que os profissionais estejam cada vez mais cientes deste mal e responsáveis em suas atribuições no dia a dia de seu ofício para com os pacientes. Ainda assim, não será a solução completa (OLIVEIRA, 2020).

Diante desse cenário é possível afirmar que a importância de pesquisar a aplicação de novas substâncias obtidas a partir da extração de princípios ativos das diversas espécies vegetais está na possibilidade de encontrar meios para combater patógenos, que constantemente adquirem resistência aos antibióticos industrializados. (GONÇALVES et al., 2011). Nesse contexto Newman e Cragg, (2020) relatam que os produtos naturais ainda oferecem as melhores opções para se encontrar novos compostos ativos, ou modelos que possam ajudar na cura de uma variedade de doenças que afetam a humanidade. Em consonância a essa afirmação os autores ainda descrevem que dos 162 agentes antibacterianos aprovados entre primeiro de janeiro de 2015 a 30 de setembro de 2019, pouco mais de 48% desse total se enquadrava nas categorias de Produto Natural Inalterado (N) ou Derivado de Produto Natural (ND), enquanto 22,2% desses agentes eram totalmente sintéticos.

Com relação a agentes antifúngicos, existem dois compostos à base de produtos naturais em testes de fase III, que podem aumentar as estatísticas de produtos naturais em um futuro relativamente próximo, um deles é enfumafungina, um triterpeno que levou ao semissintético ibrexafungerp, que está em quatro ensaios atuais de fase III. É necessário enfatizar que os estudos de fase III em agentes anti-infecciosos são estudos comparativos randomizados em pacientes doentes confrontando com o melhor tratamento atual (NEWMAN; CRAGG, 2020).

## **2.2 Metabólitos secundários e o potencial de bioprospecção**

O conjunto de reações químicas que ocorre em cada célula é denominado metabolismo. Os compostos químicos que são sintetizados, degradados ou

modificados são chamados de metabólitos (SIMÕES et al., 2010), que por sua vez podem ser divididos em metabólitos primários e metabólitos secundários (WAKSMUNDZKA-HAJNOS et al., 2008).

O metabolismo primário promove um conjunto de reações que exercem funções essenciais para a sobrevivência dos vegetais. Entre os compostos que estão envolvidos nesse processo encontram-se as proteínas, carboidratos, aminoácidos e ácidos nucleicos. Essas moléculas irão desempenhar um importante papel de regulação da atividade biológica, respiração, fotossíntese e o transporte de solutos (CUNHA et al., 2016; DE ARAÚJO et al., 2018).

Em contrapartida os metabólitos secundários são substâncias produzidas em menor proporção, quando comparado com os primários, e que, nem sempre estão envolvidos em funções vitais da planta ou até mesmo presente em todas elas. Além disso, são conhecidos por serem produzidos em tipos específicos de células e em distintos estágios de desenvolvimento do vegetal, o que torna o seu isolamento e purificação extenuante (UNDERHILL et al., 1980).

Os compostos do metabolismo secundário podem estar armazenados em diferentes partes de órgãos do vegetal. Essas moléculas são extremamente diversas. Cada família, gênero, e espécie produzem uma categoria química característica ou uma mistura delas, que por sua vez, podem ser utilizadas como caracteres taxonômicos na classificação das plantas (WAKSMUNDZKA-HAJNOS et al., 2008). Esses constituintes químicos favorecem a dispersão de sementes, atuam como antibióticos, antifúngicos e antivirais protegendo a espécie de patógenos. Há ainda compostos que tem grande relevância na absorção da luz ultravioleta impedindo que as folhas sejam danificadas (VIZZOTO et al., 2010; FUMAGALI et al., 2008).

Deve-se ainda destacar que os metabólitos secundários atuam nas interações que acontecem entre plantas, na competição por recursos (alelopatia), inclusive quando esta competição ocorre entre indivíduos de uma mesma espécie (autopagia), de forma que a associação de metabólitos específicos pode ser tóxica para a planta que é atingida (POSER; MENTZ, 2010).

Sabendo disso pode-se dizer que a produção dos metabólitos secundários é fortemente influenciada pelo ambiente, e conforme as condições ambientais é desviado para rotas distintas resultando em produtos de múltiplas formas e variações durante essa influência. As modificações acontecem como uma resposta das plantas a diversos fatores tais como: sazonalidade, ritmo circadiano, desenvolvimento;

temperatura; disponibilidade hídrica; altitude e nutrientes (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Outras possíveis fontes de interferência nessa produção são: fatores ontogenéticos, o que contempla a variação da concentração e da composição segundo a idade e estágio de desenvolvimento no qual a planta se encontra; fatores genéticos, uma vez que os metabólitos secundários são biossintetizados a partir de metabólitos primários pré-existentes, e para que ocorram essas transformações são indispensáveis reações de catabolismo molecular, que é realizado por intermédio de enzimas celulares, e estas são expressas pelos genes, que são orientados, assim como os demais processos celulares, por um controle genético (LEITE, 2009).

Os metabólitos secundários são divididos em três grandes grupos distintos quimicamente: compostos fenólicos, terpenos e alcaloides (TAIZ; ZEIGER, 2009). São classificados de acordo a sua estrutura química: possuir anel aromático, podendo apresentar ou não unidades de açúcar; composição, ou seja, se contém ou não nitrogênio; e a via pela qual são biossintetizados, que seria a origem da planta ou sua solubilidade em diferentes solventes (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2003; WAKSMUNDZKA-HAJNOS et al., 2008).

Os terpenos são originados a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto). São quimicamente formados principalmente por hidrocarbonetos insaturados designados como "alcenos naturais", com variados graus de oxigenação (alcoólica, cetônica etc.) nos grupos substituintes ligados ao esqueleto da cadeia carbônica básica (FELIPE; BICAS, 2017; HARBORNE, 1999). São conhecidos pela vasta aplicação industrial, entre elas pode-se destacar: fixador de perfumes, solventes, matéria-prima para produção de tintas, graxas e ceras, além de fazer parte da medicina popular atuando na cura de muitas enfermidades (HARTMANN, 2007; FELIPE; BICAS, 2017).

Os compostos fenólicos são caracterizados por apresentar em sua estrutura pelo menos um anel aromático com um ou mais grupos substituintes hidroxílicos (CUNHA et al., 2016). Eles podem ser sintetizados por duas vias metabólicas, a via do ácido chiquímico e via ácido mevalônico. A classe de compostos fenólicos dos metabólitos secundários desempenha diversos efeitos biológicos, entre eles: ação antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, inibição de danos do colágeno, redução do colesterol sérico, estímulo do sistema imunológico, entre outros (CUNHA et al., 2016; FUMAGALI et al., 2008; VIZZOTTO et al., 2010).

Os alcaloides são moléculas orgânicas cíclicas que apresentam pelo menos um átomo de nitrogênio (N) em um estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos. São compostos farmacologicamente ativos e majoritariamente encontrados em angiospermas (HENRIQUES et al., 2002). Essas substâncias bioativas possuem uma gama de efeitos fisiológicos, entre eles a atividade antimicrobiana e pronunciado efeito no sistema nervoso. As substâncias bioativas correspondem a princípios ativos comuns em plantas medicinais e tóxicas podendo ser usadas como venenos e alucinógenos (FUMAGALI et al., 2008; VIZZOTTO et al., 2010; LOPEZ et al., 2012). Esses metabólitos despertam grande interesse nos pesquisadores, devido a heterogeneidade química do grupo, a distribuição restrita na natureza e ao impressionante potencial bioativo (ROBBERS et al., 1997)

As substâncias produzidas pelo metabolismo secundário se destacam devido à diversidade de estruturas químicas já relatadas bem como pela bioatividade e grande aplicabilidade das mesmas (NEWMAN; CRAGG, 2012). Tendo em vista a perspectiva farmacêutica, o principal interesse no metabolismo secundário das plantas está no número elevado de substâncias farmacologicamente importantes. Muitas técnicas podem ser empregadas para detectar e quantificar metabolitos secundários em amostras de espécies vegetais, e os estudos que envolvem métodos espectrofotométricos são os mais práticos, reproduzíveis e acessíveis do que outras metodologias, permitindo a investigação de compostos na região do ultravioleta ou visível (PEIXOTO SOBRINHO et al., 2011).

A caracterização desses metabólitos geralmente inclui métodos clássicos de fitoquímica que se constitui na purificação e posterior determinação estrutural das substâncias isoladas. Esse métodos são bastante eficientes, no entanto consomem muito tempo, porém a grande quantidade de dados disponíveis atualmente sobre os metabólitos secundários isolados de plantas em conjunto às técnicas espectroscópicas e espectrométricas é possível analisar uma grande quantidade de amostras com uma caracterização razoável das principais classes de metabólitos secundários (JANSEN et al., 2010; KIM et al., 2011; OKADA et al., 2010). O estudo do perfil metabólico de plantas é contemplado com uma diversidade de técnicas de análise, no entanto a combinação entre Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de H<sup>1</sup> e a análise de componentes principais (PCA) tem sido amplamente utilizada (FLORES-SANCHEZ et al., 2009; KIM et al., 2010; LIU et al., 2010).

O potencial terapêutico dos metabólitos secundários contribuiu para que os vegetais fossem utilizados há séculos na medicina popular como forma de prevenir, tratar e curar doenças (BRAIBANTE et al., 2014). O isolamento desses compostos bem como a determinação da atividade biológica poderá fornecer maiores informações, estimulando uma possível utilização como um método de controle de doença (SCHWAN-ESTRADA et al., 2003). Esses abrangentes efeitos biológicos dos metabólitos presentes nas plantas demonstram que é fundamental conhecê-los cada vez mais, pois a melhor compreensão de como essas moléculas atuam pode levar a inúmeras possibilidades de pesquisas que direcionem a busca pela solução de importantes problemas globais enfrentados atualmente, como por exemplo o combate a resistência microbiana às drogas sintéticas disponíveis no mercado (BEZERRA, 2008).

## **2.3 Considerações botânicas**

### **2.3.1 Família Asteraceae**

Asteraceae é considerada uma das maiores famílias das Angiospermas, abrangendo entre 24.000 e 30.000 espécies alocadas entre cerca de 1600 e 1700 gêneros. Com distribuição cosmopolita está presente em todos os continentes, podendo ser encontrada principalmente nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas, com exceção da Antártida, (FUNK et al., 2009).

No Brasil, a Família Asteraceae está representada por aproximadamente 2.000 espécies e 300 gêneros, contudo, acredita-se que esses valores estão subestimados. Essas plantas podem ser identificadas na forma de ervas, subarbustos, arbustos, pequenas árvores ou lianas Eudicotiledôneas (SOUZA; LORENZI, 2008; DONASCIMENTO, 2020). Entre as Angiospermas, a família é especialmente reconhecida pela presença de inflorescências do tipo capítulo envolvidos por brácteas, pela fusão das anteras em torno do estilete configurando um anel, e pelo fruto do tipo cipsela, frequentemente acompanhado de um conjunto de apêndices apicais denominado pápus. (FUNK et al., 2009). Possui maior ocorrência de espécies em formações campestres, sendo menos expressiva em florestas tropicais úmidas e terras baixas (JEFFREY, 2007).

Na medicina popular, muitos remédios são extraídos de espécies de *Arnica*, *Calendula* e *Echinacea*. Espécies de *Mikania* são utilizadas como remédios para picada de cobra. *Calea divaricata* (Benth), é utilizada na Venezuela para tratar febre. Espécies de *Acmella*, da América do Sul, e *Salmea scandens* (L) DC., da América Central, são utilizadas para aliviar dores de dentes (PRUSK; SANCHO, 2004). *Baccharis*, cujas espécies são popularmente conhecidas como carqueja é um gênero de grande relevância, pois apresenta elevado valor socioeconômico, sendo potencialmente indicado como fonte de óleo volátil de uso industrial (VERDI et al., 2005). *Baccharis tridentata* (Vahl) por exemplo é citada por Correia (1926), como febrífuga e diurética). A carqueja, (*B. dracunculifolia*), é utilizada para combater distúrbios gástricos, cansaço físico, inapetência, afecções febris e debilidade orgânica (MORS et al., 2000; SILVA JÚNIOR, 1997).

Entre as espécies mais conhecidas do cerrado brasileiro podemos citar *Lychonophora ericoides* (Mart) conhecida no senso comum, como arnica, utilizada na medicina popular para combater inflamações e *Vernonia ferruginea* (Less) [= *Vernonanthura ferruginea* (Less.) H. Rob.], planta melífera cujas folhas são tidas como diuréticas e cujas flores podem ser usadas em perfumarias (ALMEIDA et al., 1998).

Muitos trabalhos científicos realizados com espécies da família Asteraceae, resultaram no isolamento de uma variedade de metabólitos secundários com destaque aos flavonoides, alocados como importantes marcadores quimiotaxonômicos (EMERENCIANO et al., 2001). Porém o potencial químico-biológico de espécies desta família pode ser perdido pelo desmatamento que se agrava pelo fato de algumas de suas espécies serem endêmicas (TELES et al., 2009).

Segundo Cronquist, (1988) o sucesso evolutivo desta família pode ser parcialmente atribuído ao desenvolvimento de um sistema químico de defesa que incorpora uma produção combinada de metabólitos secundários originados dos tipos poliacetilenos, lactonas sesquiterpênicas, carboidratos como os oligossacarídeos, alcaloides, terpenoides, flavonoides, além de ácidos fenólicos, benzofuranos e cumarinas (EMERENCIANO et al., 2001).

Lactonas sesquiterpênicas são compostos marcantes de óleos essenciais e resinas de Asteraceae (SPRING, 2000), são um dos grupos de metabólitos secundários responsáveis pelas atividades anti-inflamatórias, analgésica, antimicrobiana e antitumoral de uma variedade de plantas medicinais, sendo essas ações investigadas e comprovadas através de ensaios farmacológicos (LORENZI;

MATOS, 2002; SIEDLE et al., 2003). Esse potencial fitoquímico é o principal responsável pela relevância socioeconômica das plantas da família Asteraceae na medicina tradicional, bem como justifica o fato de serem largamente estudadas quanto a sua composição química e atividade biológica, sendo que alguns dos seus compostos são utilizados para a produção de fármacos e inseticidas (VERDI et al., 2005). Além do uso medicinal, muitas espécies são utilizadas na alimentação, na produção cosmética ou, ainda, como plantas ornamentais (ROQUE, 2008).

### **2.3.2 Gênero *Verbesina***

O gênero *Verbesina* está classificado na tribo Heliantheae, (subtribo Verbesininae), possui cerca de 300 espécies distribuídas nas Américas, com a maioria ocorrendo no México, Brasil e Andes. As espécies pertencentes a esse gênero apresentam grande importância econômica devido às suas propriedades químicas (BEZERRA et al., 2018; PANERO; CROZIER, 2016).

Um estudo compreendendo 47.000 ocorrências de flavonoides, correspondendo a 800 compostos diferentes, usando um sistema computacional especialmente desenvolvido para propósitos quimiotaxonômicos registra que a expressão máxima de flavonoides em Asteraceae é encontrada em Heliantheae (EMERENCIANO et al., 2001). Nesse sentido, diversos estudos apontam que os flavonoides além de desempenhar um importante papel de sobrevivência da planta podem ser os principais responsáveis pelo potencial antimicrobiano (ROZATTO, 2012)

No Brasil podem ser encontradas nove espécies pertencentes ao gênero *Verbesina*, com ocorrências confirmadas nas regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul (MOREIRA, 2022). Podem ser caracterizadas por representantes subarbustivos a arbustivos, mais raramente arbóreos, de folhas alternas, raro opostas, sésseis ou pecioladas, com lâminas inteiras, pinatífidas ou pinatipartidas, margem serrada a denteada, com capitulescências corimboide a paniculoide (MOREIRA; CAVALCANTI, 2020).

O gênero *Verbesina* é diferenciado por apresentar substâncias tais como, os derivados de eudesmano e sesquiterpenos esterificados, frequentemente como cinamatos ou cumaratos. Os primeiros a serem isolados foram os cumaratos de α-e β-verbesinol extraídos das raízes da *Verbesina subcordata* (DC), coletadas no

Paraguai. Diversos compostos sesquiterpênicos foram isolados, dentre eles, derivados do germacradieno, e diversos cinamatos derivados de eudesmano (JAKUPOVIC et al., 1987). Agra em (2007), relatou que sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos foram isolados em espécies pertencentes a este gênero.

Espécies de *Verbesina* têm sido largamente utilizadas na medicina tradicional pelas comunidades no preparo de bebidas, chás, infusões e extratos, como forma de tratamento para diabetes, hipertensão, infecções e inflamações (MORA et al., 2013), com algumas atividades biológicas já validadas, como por exemplo a antibacteriana e anti-inflamatória de *V. turbacensis* (GUALTERI et al., 2005; LOBITZ et al., 1998), atividades antiparasitárias e antitumorais de *V. encelioides* (EZZAT et al., 2016; AL-OQAIL et al., 2016), atividade antibacteriana de *V. negrensis* (MORA et al., 2015) e atividade anti-hipertensiva de *V. caracasana* (BOTTA et al., 2003).

A espécie *Verbesina encelioides* (Cav.) Benth e Hook planta nativa da América do Norte, conhecida por apresentar atividade tóxica, causando morte em bovinos e ovinos, apresenta como princípio tóxico a guanidina galegina (3-metil-2-butenil-guanidina) (AMARO-LUIS et al., 2002). Toursarkissian, (1980) menciona que a *V. encelioides* apresenta uma atividade anti-hemorrágica e cicatrizante, Roig, (2001) acrescenta que está espécie tem propriedades oftálmicas.

### **2.3.3 Espécie *Verbesina macrophylla* (Cass.) Blake**

A primeira descrição da espécie *Verbesina macrophylla* (Figura 1) foi realizada por Cassine, depois revisada por Blake (MONDIN, 2015). É caracterizada por ser uma planta subarbustiva, com ramos alados, folha alterna, variando de 12-23 x 5-8 cm, deltóide, espatulada e dividida em segmentos horizontais; capítulos copiosos, corimbosos e em panícula; lígula pequena e lanceolada, porém larga na ponta (BAKER, 1882). É reconhecida pelas folhas pinatipartidas, pela ampla inflorescência paniculoide, ramificada, pelos capítulos radiados com flores do raio brancas e invólucro cilíndrico. Na natureza, é possível sentir o forte odor azedo disperso pelas capitulescências (MOREIRA; CAVALCANTI, 2020).

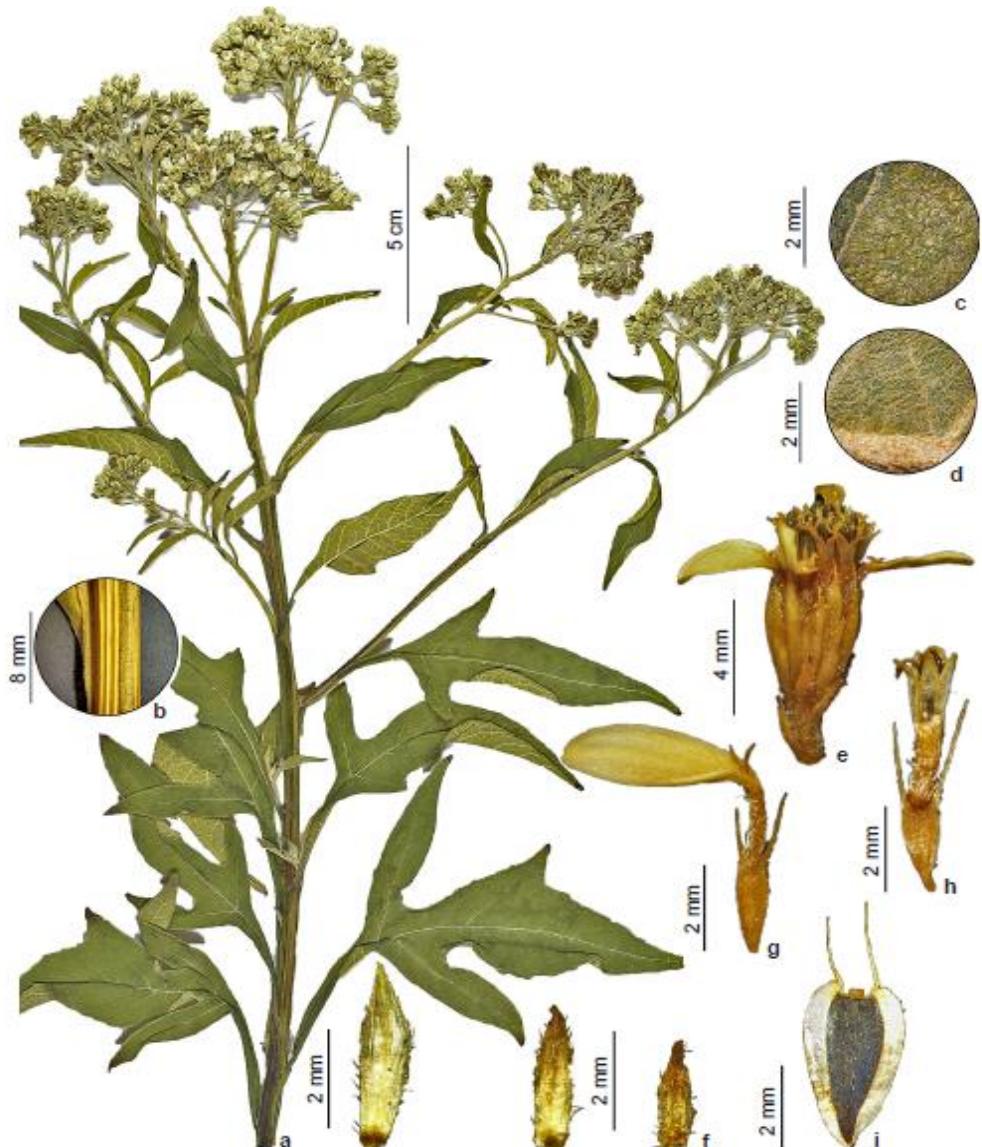
Com ampla distribuição na América do Sul, apresenta ocorrências confirmadas nas regiões Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Sergipe), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro) e Sul (Paraná) do Brasil. Ocorre do nível do mar até aproximadamente 1.500 metros de altitude, em populações

amplas, podendo facilmente ser observada em beira de estradas e em ambientes degradados. A floração e frutificação acontece mais concentradamente de junho a setembro, e outubro a fevereiro (MOREIRA; CAVALCANTI, 2020).

*V. macrophylla* é conhecida popularmente na região Nordeste do Brasil como “assa peixe”, é uma espécie com ampla distribuição em áreas de caatinga, campos rupestre e cerrado. Ocorre em solos arenos-argilosos e secos é conhecida pelas comunidades tradicionais por seus poderes curativos na forma de chás, infusões e liques, para o tratamento de infecções bacterianas e infecções fúngicas do trato urinário e respiratório, bronquite, problemas renais, inflamações e febre (BOHLMANN et al., 1980; BEZERRA et al., 2018).

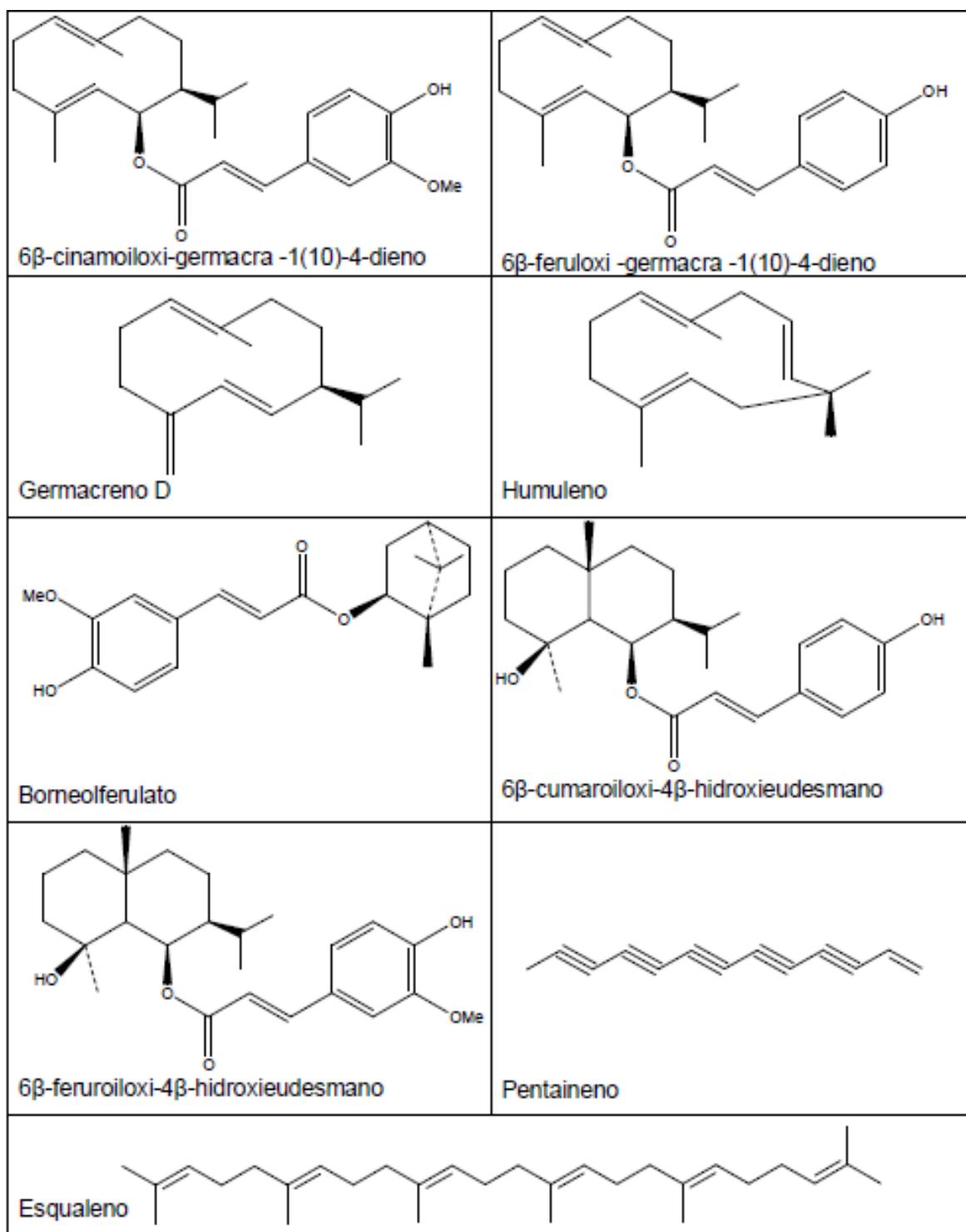
A literatura relata análises fitoquímicas que revelaram a presença de terpenos: 6 $\beta$ -coumaroiloxi- germacra-1; 4-dieno; 6 $\beta$ -feruloiloxi-germacra-1; 4-dieno; 6 $\beta$ -coumaroiloxi-4 $\beta$ -hidroxieudesmano; 6 $\beta$ -feruloiloxi-4 $\beta$ -hidroxieudesmano; germacreno D; esqualeno; epoxi-cariofileno; humuleno; pentaineno; ferulato de bornila (BOHLMANN et al., 1980) (Figura 2). monoterpenos: bornil-p-trans-cumarato e bornil-p-cis-cumarato (MAIA et al., 2011) (Figura 3). Estudos do óleo essencial da *V. macrophylla* apontaram a presença de sesquiterpenos, sendo componentes principais germacreno D, germacreno D-4-ol, (E) -cariofileno,  $\delta$ -cadineno e biciclogermacreno (BEZERRA et al., 2018, DE VERAS et al., 2021). De acordo com dados do estudo apresentado por De Veras et al. (2021), o óleo essencial desta espécie apresentou atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e efeitos antipiréticos encontrados com segurança toxicológica. Essas descobertas sugerem que novos estudos devem ser realizados para avaliar o potencial biológico de *V. macrophylla* em originar fitomedicamentos, já que as publicações relacionadas a sua atividade biológica são escassas.

Figura 1: Detalhes da espécie *Verbesina macrophylla* – a. ramo fértil; b. ramo alado; c. face adaxial; d. face abaxial; e. capítulo; f. brácteas involucrais; g. flor do raio; h. flor do disco; i. cipsela.



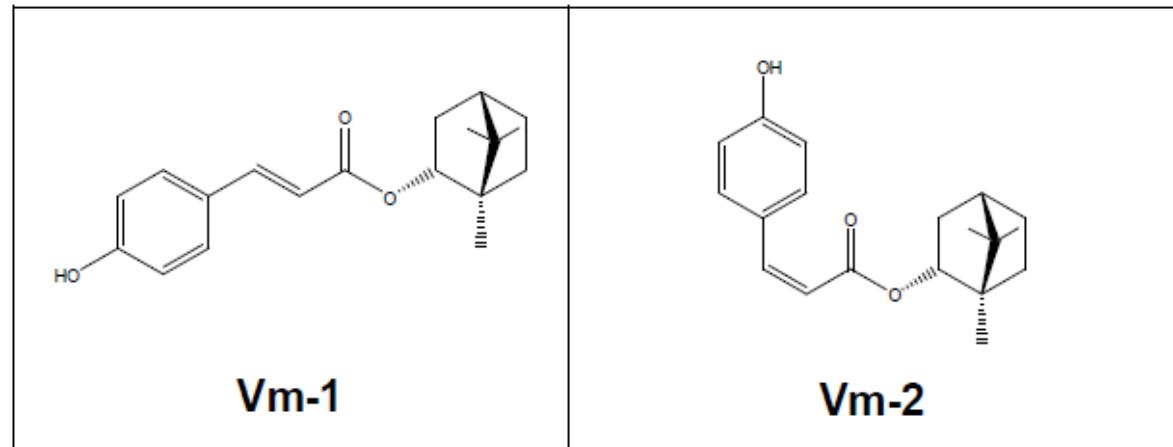
Fonte: (MOREIRA; CAVALCANTI et al., 2020)

Figura 2: Substâncias isoladas de *Verbesina macrophylla* por Bohlmann e colaboradores em 1980.



Fonte: (BOHLMANN et al., 1980)

Figura 3: Substâncias isoladas de *Verbesina macrophylla* por Maia e colaboradores em 2011, monoterpenos: bornil p-trans-cumarato (Vm-1) e bornil-p-cis-cumarato (Vm-2).



Fonte: (MAIA et al., 2011)

### 3 METODOLOGIA DE PESQUISA

#### 3.1 Coleta e identificação do material botânico

O material botânico, (folhas) de *Verbesina macrophylla* (Cass.) Blake foi coletado em agosto de 2021 no município de Alagoinhas – Bahia, em área da Universidade do Estado da Bahia (UNEB) – Campus II. O local da coleta foi georreferenciado com as seguintes coordenadas (12°10'42"S e 38°24'43"W). A identificação foi realizada pela taxonomista professora Dra. Gracineide Selma Santos de Almeida. Uma exsicata da espécie coletada fora preparada e tombada no Herbário HUNEB da Universidade do Estado da Bahia sob o número de registro Nº 14858.

#### 3.2 Processamento do material botânico

As folhas foram lavadas, em seguida, desidratadas em estufa com ar circulante a uma temperatura média de 40°C durante cinco dias, após a completa secagem foram trituradas. O material seco e pulverizado proveniente de *Verbesina macrophylla* pesou 514,52 g.

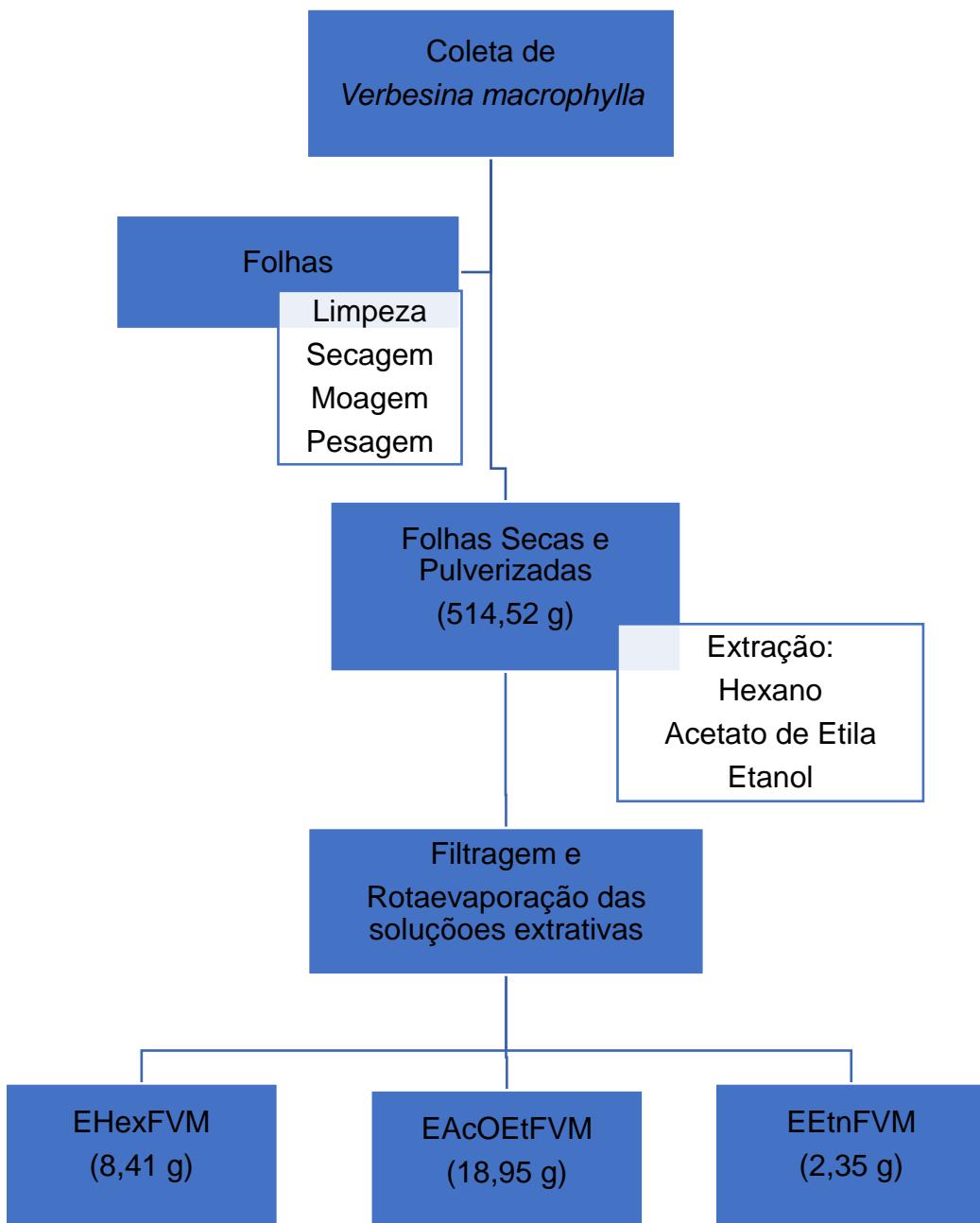
#### 3.3 Obtenção dos extratos

O material vegetal seco e pulverizado foi submetido à extração a frio usando hexano, acetato de etila e etanol em ordem crescente de polaridade. Esse procedimento consistiu na manutenção do material dentro de um recipiente de vidro imerso em solvente, sofrendo agitação em alguns momentos, e após um período de 72 horas foi filtrado. Essa etapa do processo foi repetida três vezes consecutivas para cada solvente empregado visando maximizar a extração.

As soluções extractivas obtidas foram concentradas com o auxílio do evaporador rotativo a temperatura média de 45°C. Após a completa evaporação dos solventes foram obtidos os extratos brutos hexânico, acetato de etila e etanólico. Os extratos resultantes foram pesados e codificados, sendo denominados: EHexFVM (Extrato Hexânico das folhas de *Verbesina macrophylla*) EAcOEtFVM (Extrato Acetato de Etila das folhas de *Verbesina macrophylla*) e EEtnFVM (Extrato Etanólico das folhas de

*Verbesina macrophylla*) A Figura 4 apresenta a rota seguida para obtenção destes extratos.

Figura 4: Esquema da obtenção dos extratos hexânico, acetato de etila e etanólico de *Verbesina macrophylla* (Vm).

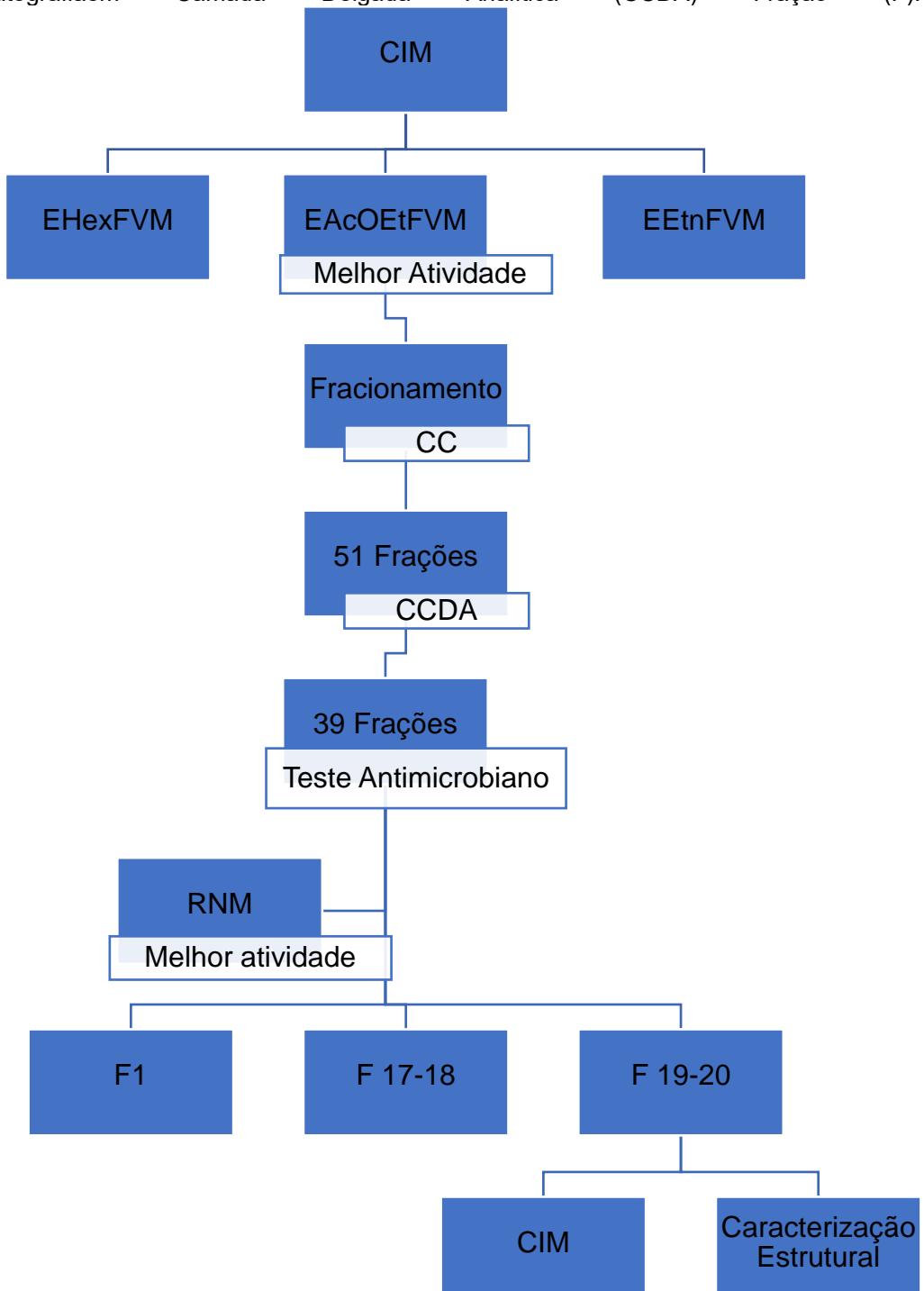


Fonte: Elaborado pela autora (2022)

### 3.4 Isolamento e purificação dos constituintes químicos

O isolamento e a purificação dos constituintes químicos das folhas de *V. macrophylla* foram guiados por bioensaios, levando também em consideração a maior disponibilidade de massa do extrato. Nessa etapa do trabalho foram realizados os procedimentos apresentados na Figura 5.

Figura 5: Processo de isolamento e purificação dos constituintes químicos de *Verbesina macrophylla* (Vm). Concentração Inibitória Mínima (CIM); Cromatografia em Coluna (CC); Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA); Fração (F).



Fonte: Elaborado pela autora (2022)

### **3.4.1 Análises cromatográficas**

A purificação e o isolamento dos constituintes químicos da *V. macrophylla* foram realizados utilizando-se métodos cromatográficos: Cromatografia em Coluna (CC) e Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA).

A cromatografia em coluna consiste em um tubo cilíndrico de vidro na posição vertical, empregando como fase estacionária Sílica Gel 60 (MACHEREY – NAGEL) (partículas com 0,063-0,2mm/ 70-230 mesh) e para a fase móvel os solventes hexano, acetato de etila e metanol de forma isolada ou em sistemas com gradiente crescente de polaridade.

A Cromatografia em Camada Delgada Analítica foi empregada para a análise das frações obtidas por CC. Essas cromatografias foram realizadas em placas de vidros. A fase fixa foi preparada com suspensão de Sílica Gel 60 (MACHEREY – NAGEL) p/TLC, UV 254 nm, em água destilada. Após o preparo as cromatoplacas secaram ao ar livre e foram ativadas em estufa a 120°C por duas horas.

As revelações das substâncias nas cromatoplacas foram realizadas através da exposição à lâmpada de radiação ultravioleta em dois comprimentos de onda (254 e 366 nm) em aparelho Mineralight, modelo UVGL – 58 e por impregnação das placas em câmaras saturadas por vapores de iodo.

### **3.4.2 Fracionamento cromatográfico do extrato bruto Acetato de Etila oriundo das folhas de *Verbesina macrophylla*.**

Para esse procedimento, retirou-se do extrato acetato de etila, uma alíquota de 14,4 g, que foi submetida a uma coluna cromatográfica e realizado o processo de partição com solventes de diferentes polaridades, iniciando com hexano, seguido de acetato de etila e metanol, de forma isolada ou em sistemas de diferentes proporções.

Foram recolhidas 51 frações de 100 ml cada, depois etiquetadas e codificadas da seguinte forma: *Verbesina macrophylla* Fração 1 (Vm-F1), Vm-F2 ... Vm-F51. As frações foram concentradas em evaporador rotativo e analisadas em CCDA. A tabela 1 demonstra a reunião de frações que foi realizada de acordo com os seus fatores de retenção (Rf's).

Tabela 1: Fracionamento cromatográfico do extrato acetato de etila das folhas de *Verbesina macrophylla* (Vm). Hexano (Hex); Acetato de Etila (AcOEt).

FRAÇÃO	ELUENTE	PROPORÇÃO	REUNIDAS
<b>1-3</b>	Hex	100	
<b>4-7</b>	Hex:AcOEt	99:1	2-6
<b>8-14</b>	Hex:AcOEt	98:2	7-9; 11-12; 13-
			14;
<b>15-17</b>	Hex:AcOEt	97:3	15-16
<b>18-20</b>	Hex:AcOEt	96:4	17-18; 19-20
<b>21-23</b>	Hex:AcOEt	95:5	21-22
<b>24-41</b>	AcOEt	100	23-24
<b>42-51</b>	Metanol	100	

Fonte: Elaborado pela autora (2022)

### 3.4.3 Caracterização estrutural dos constituintes químicos isolados

A caracterização dos constituintes químicos isolados de *V. macrophylla* foi realizada através da análise dos espectros obtidos da Ressonância Magnética Nuclear e os resultados encontrados foram comparados com os dados da literatura.

Os experimentos foram realizados no laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Para a obtenção dos espectros de RMN foram utilizados espetrômetros VARIAN-NMR-SYSTEM 500 MHz. O solvente empregado para a dissolução das amostras foi o Clorofórmio Deuterado ( $\text{CDCL}_3$ ).

Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (PPM) e as constantes de acoplamento ( $J$ ) em Hz. A diversidade dos sinais em RNM  $^1\text{H}$  foram esboçadas segundo a convenção: s (simpleto), sl (simpleto largo) d (dopleto), dd (duplo dopleto), t (triplete) e m (multiplete).

## 3.5 Ensaios biológicos *in vitro*

### 3.5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana

Os experimentos para a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos hexânico, acetato de etila e etanólico, bem como das frações obtidas das folhas

de *V. macrophylla* foram realizados no Laboratório de Biologia Experimental (LABEXP), localizado na Universidade do Estado da Bahia (UNEB). O método utilizado para a realização dos ensaios foi a técnica de microdiluição em caldo, em microplacas de 96 poços, com base no documento CLSI/NCCLS M7-A6 (NCCLS, 2012).

As cepas de bactérias inicialmente foram semeadas em placas de Petri contendo Ágar Mueller Hinton, utilizando a técnica em esgotamento de placa (HENRY, 1995). No experimento, o meio de cultivo empregado para bactérias foi o Nutriente Broth e para fungos Caldo de levedura e Malte/Caldo de Malte. Para este ensaio foram utilizados os seguintes microrganismos: Gram-positivos: *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Micrococcus luteus* (ATCC 1024), *Bacillus cereus* (CCT 0096), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Gram-negativos: *Escherichia coli* (ATCC 94863) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25619). As cepas fúngicas utilizadas foram *Aspergillus niger* (ATCC 16404), *Candida glabrata* (ATCC 00720) e *Candida albicans* (ATCC 18804).

### **3.5.1.2 Preparação da solução estoque da amostra**

A solução estoque de cada extrato, foi preparada em uma concentração de 2000 µg/mL. O diluente utilizado foi o Dimetil Sulfóxido (DMSO) a 20% v/v em água. A homogeneização foi realizada com o auxílio de um agitador de tubos.

### **3.5.1.3 Preparação da suspensão do microrganismo**

A suspensão de cada microrganismo testado foi preparada retirando uma alíquota da biomassa do mesmo recentemente cultivado, com o auxílio de uma alça de platina, e transferida para um tubo de ensaio contendo 10 mL de solução salina. Após a homogeneização foi feita a comparação desta suspensão, com a turbidez de uma solução de Sulfato de Bário ( $\text{BaSO}_4$ ), correspondente a 0,5 na escala de McFarlend. A suspensão do microrganismo foi diluída em meio de cultivo, de maneira que foi transferido 100 µL desta suspensão para uma placa de Petri contendo 10 mL do meio, para que então fossem distribuídas nos poços da microplaca.

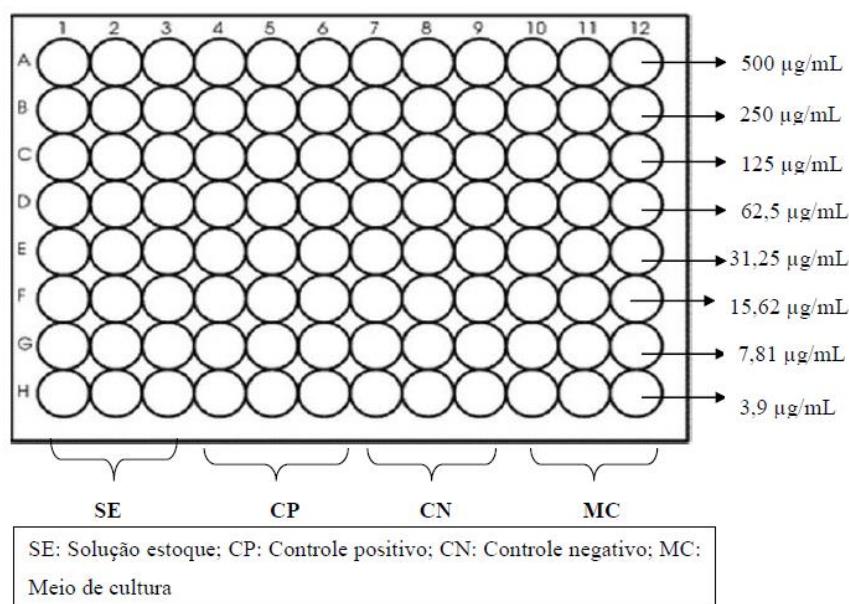
### **3.5.1.4 Microdiluições**

As microdiluições foram realizadas distribuindo com o auxílio de uma micropipeta multicanal 100 µL do meio de cultivo apropriado para os microrganismos em teste, nos poços da placa. A solução estoque da amostra foi testada em triplicata, sendo distribuídos 100 µL da mesma na concentração 1000 µg/mL nos poços A1 a A3. Como controle positivo foram utilizados 100 µL do antibiótico Cloranfenicol 500 µg/mL para o ensaio com bactérias e ciclopiroxolamina 500 µg/mL para fungos, depositados nos poços A4 a A6. Para o controle negativo foi utilizado 100 µL de DMSO a 5 % v/v em água destilada nos poços A7 a A9. Os poços A10, A11 e A12 receberam somente meio de cultura, para que fosse confirmada a esterilidade da placa.

As diluições seriadas foram realizadas com fator de diluição dois, obtendo-se as seguintes concentrações da amostra: 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 e 3,9 µg/mL (Figura 6), com o auxílio de uma micropipeta multicanal, inicialmente homogeneizando (3x) as soluções dos poços da fileira A e posteriormente transferindo-se 100 µL para a fileira B e desta para a C, assim sucessivamente até a última fileira (H), sendo descartado no final da diluição 100 µL.

Na etapa final da diluição seriada foram distribuídos 100 µL da suspensão bacteriana em todos os poços da placa, obtendo-se um volume final de 200 µL em cada poço. Logo após a microplaca é tampada e incubada em estufa por 24 horas a 37°C. Após esse período foi realizada a leitura dos resultados.

Figura 6: Esquema da placa de 96 poços para a determinação da CIM.



Fonte: Elaborado pela autora (2022)

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

A concentração inibitória mínima foi interpretada como a menor concentração do agente antimicrobiano que inibiu completamente o crescimento dos microrganismos nos poços, conforme detectado a olho nu observando a turvação dos poços quando há o crescimento de bactérias e/ou fungo (NCCLS, 2012), bem como através do teste do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol- 2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina] um dos métodos mais utilizados devido à sua sensibilidade de detectar viabilidade mitocondrial e, consequentemente, a viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

### **3.5.1.6 Determinação da atividade antimicrobiana das frações obtidas do extrato bruto Acetato de Etila**

As análises foram realizadas seguindo a norma NCCLS (2012). Inicialmente todas as frações foram testadas na concentração de 1000 µg /mL sem que fossem realizadas diluições seriadas. Após a leitura dos resultados, foram selecionadas frações com atividade antimicrobiana positiva e então submetidas a novos testes para que fosse determinada a concentração inibitória mínima no extrato.

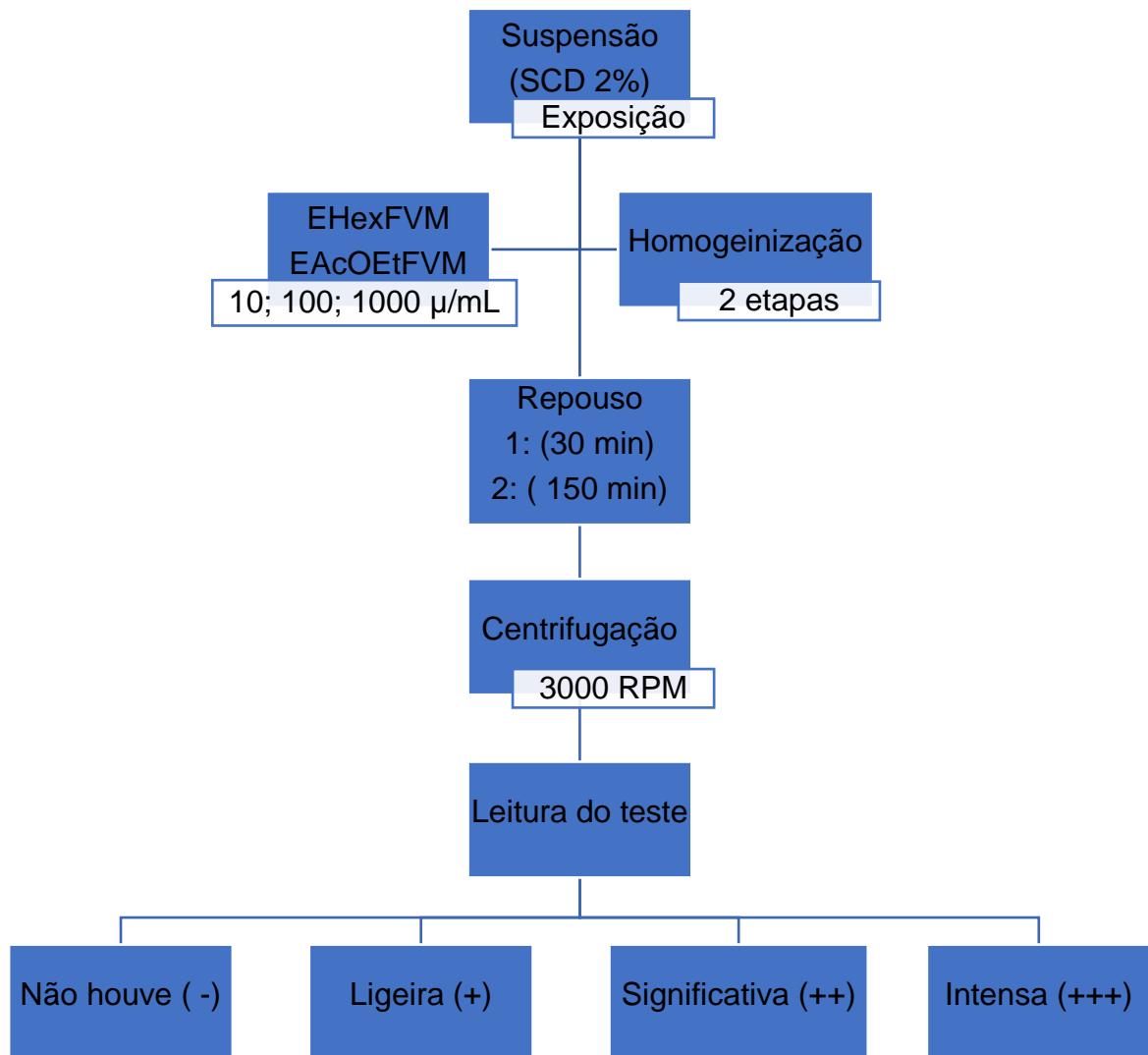
### **3.5.2 Teste de citotoxicidade com hemácias**

A determinação da atividade hemolítica foi realizada conforme a metodologia da Farmacopeia Brasileira (2010), como apresentado na Figura 7. Esse teste consiste em verificar o metabolismo da célula quando esta é exposta a uma determinada substância. No procedimento os extratos em Hexano e Acetato de Etila foram adicionados nas concentrações de: 10, 100 e 1000 µg/mL, a uma suspensão a 2% com sangue de carneiro desfibrilado (Laborclin ®). Posteriormente a suspensão foi misturada lentamente, durante um minuto, em duas etapas. Após a primeira agitação, a mistura repousou por 30 minutos, após nova homogeneização foi mantida em repouso por mais 150 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos.

O grau de hemólise foi qualitativamente avaliado pelo tom avermelhado no sobrenadante obtido após centrifugação. Foram atribuídos símbolos à intensidade de hemólise, onde uma cruz (+) indica ligeira hemólise, duas (++) significativa hemólise e três (+++) indica que houve hemólise intensa. Nesse ensaio foi utilizada água

destilada como controle positivo enquanto a solução salina e dimetilsulfóxido (DMSO) foram utilizados como controle negativo. Ambos receberam os mesmos procedimentos empregados nas amostras testes.

Figura 7: Procedimento para determinação da atividade hemolítica. Sangue de carneiro desfibrilado (SDC); Rotações por minuto (RPM).

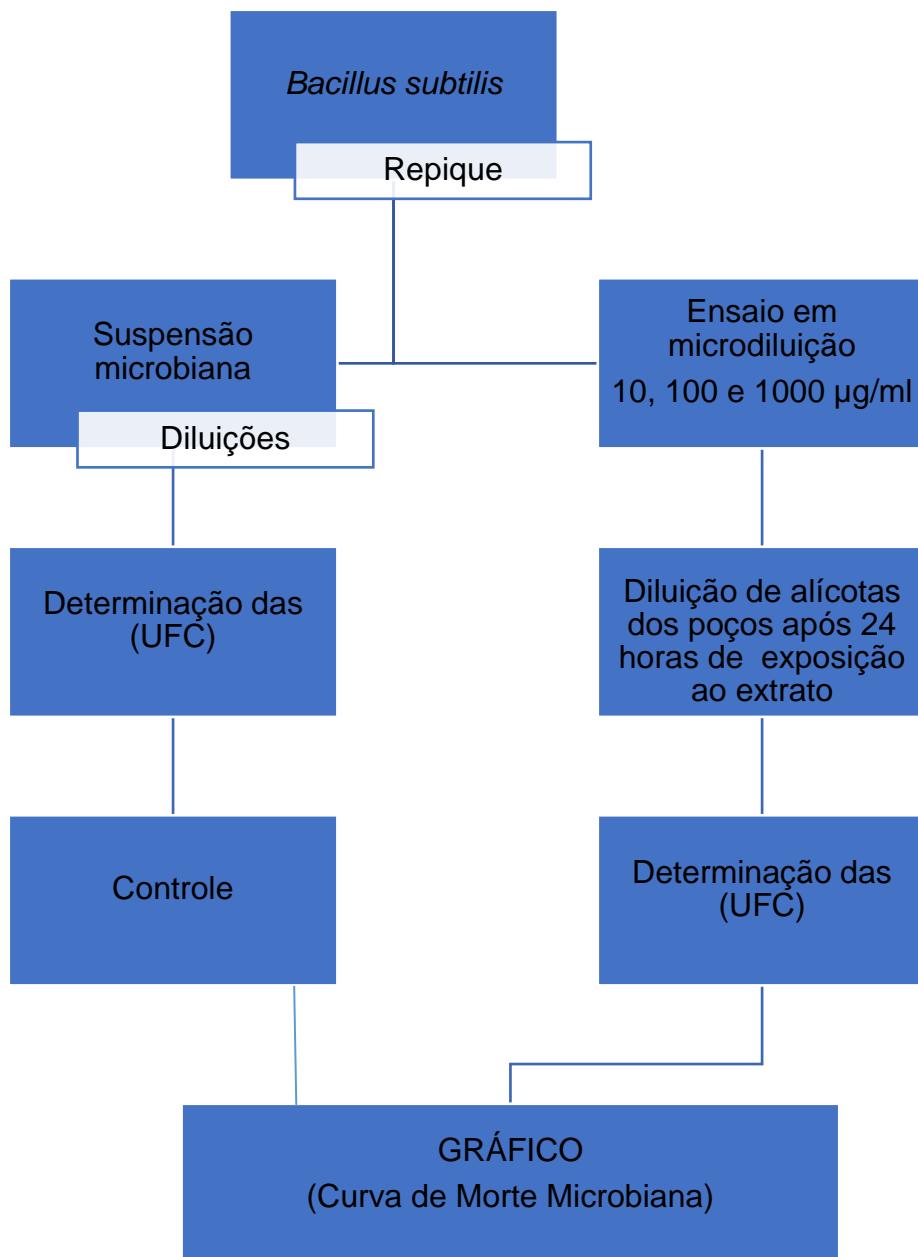


Fonte: Elaborado pela autora (2022)

### 3.5.3 Efeito da fração Vm-F19-20 sobre a cinética do crescimento microbiano (time-kill).

A Figura 8 apresenta os procedimentos realizados neste experimento, que foi realizado de acordo a metodologia descrita por Klepser et al, 1998. Para a execução do teste foram utilizadas cepas de *Bacillus subtilis* repicados de acordo a técnica de esgotamento de placa (HENRY, 1995).

Figura 8: Fluxo para a obtenção do efeito da fração VM-F19-20 sobre a cinética do crescimento microbiano (time-kill).



Fonte: Elaborado pela autora (2022)

### **3.5.3.1 Determinação das unidades formadoras de colônia (UFC) da suspensão inicial**

Inicialmente foram enumerados 4 tubos de ensaio. No tubo 1 foi colocado 9,990 ml de solução salina e nos demais 990 µL, logo após retirou-se 10 µL da suspensão microbiana preparada anteriormente para ser colocada no tubo 1 homogeneizando (3x), deste tubo foi retirado 10 µL para ser colocado no 2 e assim sucessivamente até o quarto e último.

Logo após foi realizada a semeadura em triplicata das suspensões diluídas. Para tanto foi retirando 100 µL do tubo 2 e aplicado na superfície de uma placa de Petri contendo Agar Muller Hilton, esse procedimento foi realizado com o tubo 3 e 4. A suspensão foi espalhada na superfície do meio com o auxílio de uma alça de Drigaslký. Após a semeadura as placas foram colocadas na estufa a uma temperatura de 37 °C e após 24 h efetuadas a contagem de colônias.

### **3.5.3.2 Ensaio em microdiluição**

A solução estoque foi preparada pesando 2 mg da amostra e solubilizando em 500 µL de DMSO obtendo uma concentração de (4,0mg/mL). O experimento foi realizado em microplacas de 96 poços e o meio de cultura empregado foi Nutriente Broth. Foram analisadas amostras nas seguintes concentrações do extrato:

- 1000 µg/ml, obtida adicionando em um eppendorf 200 µL do meio de cultura em 200 µL da solução estoque;
- 100 µg/ml, obtida adicionando em um eppendorf 320 µL do meio de cultura em 80 µL da solução estoque;
- 10 µg/ml, obtida adicionando em um eppendorf 392 µL do meio de cultura em 8 µL da solução estoque;

Após o preparo das amostras em diferentes concentrações, foi distribuído de cada uma delas em triplicata 100 µL nos Poços da Placa de Eliza e logo após adicionado 100 µL da suspensão microbiana. A placa foi colocada em estufa a 37 °C e retirada após 24 horas.

### **3.5.3.3 Determinação das unidades formadoras de colônia após microdiluição**

Inicialmente foram preparadas 9 placas de Petri contendo Ágar Mueller Hinton. Posteriormente foram identificadas em triplicata, com a indicação das concentrações do extrato que foram analisadas no experimento (10, 100 e 1000 $\mu$ g/ml). Após as 24 horas de incubação da placa de Eliza, em que havia sido realizado o ensaio de microdiluição (descrito no tópico 3.5.3.2) foi efetuada a leitura do teste, e depois a semeadura do conteúdo dos poços, para que então fosse avaliado o crescimento das colônias de bactérias, após a exposição da suspensão microbiana à fração VM-F19-20.

Essa etapa metodológica consistiu em distribuir previamente 990  $\mu$ L de salina em 18 tubos do tipo eppendorf, logo após foram retirados 10  $\mu$ L de cada um dos poços das triplicatas (teste) da placa de Eliza. Em seguida, essa alíquota foi diluída duas vezes da seguinte forma: em um primeiro eppendorf contendo 990  $\mu$ L de salina foi depositado os 10  $\mu$ L retirados do poço, esse conteúdo homogeneizado e então transferido 10  $\mu$ L para um segundo eppendorf. Somente após a segunda diluição foi retirado 100  $\mu$ L do conteúdo e realizada a semeadura nas placas de Petri.

Depois de semeadas, as placas foram levadas a estufa em temperatura de 37°C. Após 24 horas foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias, e então determinado o número aproximado de microrganismos, após terem sido expostos à fração VM-F19-20 em diferentes concentrações.

### **3.5.3.4 Análise estatística**

A curva de cinética de crescimento microbiana foi plotada pelo log10 UFC/mL em função de um intervalo de 24 horas e das concentrações estudadas do fitoconstituente. A ferramenta utilizada para o processamento dos dados obtidos após o procedimento experimental foi o software GraphPadPrism 5. Neste programa foi possível gerar uma função logarítmica a qual deu origem ao gráfico que ilustra o comportamento da cepa bacteriana *Bacillus subtilis* após exposição à fração VM-F19-20.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Testes preliminares dos extratos brutos hexânico, acetato de etila e etanólico de *Verbesina macrophylla* (Cass). Blake (Asteraceae)

#### 4.1.2 Atividade antibacteriana

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos brutos em hexano, acetato de etila e etanol oriundos das folhas de *V. macrophylla* frente às cepas bacterianas está apresentada na Tabela 2.

É possível observar que nenhum dos extratos apresentou atividade frente as cepas Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, em concentrações menores que 500 µg/mL. Os extratos em hexano e acetato de etila foram ativos contra as cepas padrões de bactérias Gram positivas: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus* com concentrações inibitórias mínimas que variaram entre 500 µg/mL e 31,25 µg/mL. Quanto ao extrato etanólico, este não apresentou atividade contra *S. aureus*, no entanto o seu efeito pode ser observado frente *B. cereus* e *B. subtilis* em uma concentração de 500 µg/mL, e contra a Gram-positiva *Micrococcus luteus*, com CIM de 7,81 µg/mL. Os microrganismos que apresentaram suscetibilidade a estes extratos são potencialmente patogênicos ao homem e tidos como agentes responsáveis por quadros infecciosos comuns.

Tabela 2: Atividade antibacteriana dos extratos em hexano, acetato de etila e etanol das folhas de *Verbesina macrophylla* (Vm). Microgramas (µg); mililitros (mL); maior que (>); acetato de etila (EtOAc).

Grupo	Espécies	CIM dos Extratos (µg/mL)	Controle		
		Hexano	EtOAc	Etanol	Cloranfenicol
Gram- positivas	<i>B. cereus</i>	125	62,5	500	3,9
	<i>S. aureus</i>	250	500	> 500	3,9
	<i>B. subtilis</i>	125	31,25	500	3,9
	<i>M. luteus</i>	125	31,25	7,81	3,9
Gram- negativas	<i>P. aeruginosa</i>	>500	>500	>500	125

<i>E. coli</i>	>500	>500	>500	3,9
----------------	------	------	------	-----

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Nesse contexto, sabe-se que grande parte das bactérias do gênero *Bacillus*, são consideradas patogênicas em humanos (BATT, 2014). *Bacillus cereus* é responsável por casos de intoxicações alimentares, podendo resultar em dois tipos de síndromes: A emética que é desencadeada pelas células bacterianas em crescimento no alimento contaminado, e se manifesta como náuseas e vômitos em aproximadamente uma a 5 horas após a ingestão. E a síndrome diarreica, em que a intoxicação alimentar advém da presença de enterotoxinas complexas, os indivíduos contaminados costumam apresentar diarreia aquosa profusa, dores abdominais, náuseas e vômitos cerca de 8 a 16 horas após a contaminação. *B. subtilis* é pouco reconhecido quanto aos seus aspectos de patogenicidade e não há descrito na literatura a ocorrência de surtos no Brasil (RASKO et al., 2005; MELLEGARD et al., 2011).

Cepas resistentes de *Staphylococcus aureus* têm surgido a cada novo antibiótico introduzido no tratamento das patologias a ele atribuídas (SANTOS, 2007). As infecções da pele e tecidos moles podem atingir desde regiões superficiais até os tecidos mais profundos, sendo *S.aureus* o agente mais comum, podendo acometer pacientes da comunidade ou hospitalizados (ROBERT; CHAMBERS, 2005). Esse microrganismo traz grandes riscos para pacientes imunocomprometidos causando desde infecções cutâneas crônicas benignas, até infecções sistêmicas levando o indivíduo à morte. As infecções cutâneas incluem foliculite simples, impetigo, furúnculos e carbúnculos, danosos ao tecido subcutâneo produzindo efeitos sistêmicos, como febre (CARVALHO et al., 2005; CAVALCANTI et al., 2005). Já as toxinas estafilocócicas desencadeiam a necrose epidérmica tóxica e a síndrome do choque tóxico. Além disso *S. aureus* é capaz de induzir infecções alimentares através da produção de exotoxinas durante crescimento em alimentos contaminados (CAVALCANTI et al., 2005; LOWY 1998).

*Micrococcus luteus* é uma bactéria que constitui a microbiota normal da pele, entretanto, em pacientes com a imunidade comprometida, pode produzir infecções cutâneas (SMITH et al., 1999). Raramente é classificada como patogênica em humanos, porém doenças infecciosas já foram atribuídas a essa bactéria, incluindo a

artrite séptica (WHARTON et al., 1986), meningite (FOSSE et al., 1985) e endocardite (COLEBUNDERS et al., 1985).

Os resultados encontrados neste trabalho, corroboram com os dados relatados por De Veras et al. (2021), em que o óleo essencial das folhas de *V. macrophylla* apresentou atividade antimicrobiana frente *S.aureus*, com CIM de 512 µg/mL, enquanto neste estudo os valores variaram entre 500 µg/mL para o extrato em etanol e 250 µg/mL em hexano. Em consonância a esses dados, outras espécies do gênero *Verbesina* também apresentaram atividade frente *S.aureus*: *V. negrensis* (MORA et al., 2015) e *V. encelioides* (TORIBIO, 2005; 2012).

Não existe na literatura, uma classificação consensual sobre valores de inibição aceitáveis para produtos naturais quando comparados com antibióticos padrões. No entanto Aligianis et al. (2001), propuseram uma classificação para materiais vegetais com base nos resultados de CIM, considerando como: forte inibição – CIM até 500 µg/mL; inibição moderada – CIM entre 600 e 1500 µg/mL e como fraca inibição - CIM acima de 1600 µg/mL. Segundo esta classificação os três extratos testados possuem uma forte inibição frente as bactérias que apresentaram sensibilidade aos mesmos.

É notável que a atividade inibitória dos extratos de *V. macrophylla* foi inferior àquelas promovidas pelo antibiótico padrão indicado pelo NCCLS, testado sob condições metodológicas semelhantes, provavelmente isso se deve ao fato de que os antibióticos usados como controle, são substâncias com elevado grau de pureza, em contrapartida os extratos brutos, possuem grande variedade de compostos quimicamente distintos.

O extrato etanólico, quando comparado com os demais (hexânico e acetato de etila) além de não ter apresentado atividade frente *S. aureus*, a inibição das bactérias *B. cereus* e *B. subtilis* se deu em uma concentração mais alta. De acordo Nascimento et al. (2006), e Bayoub et al. (2010), a utilização de diferentes solventes no preparo dos extratos pode ter interferido em sua atividade biológica, pois o extrato etanólico apresenta alta capacidade de inibir o crescimento bacteriano, devido a excelente extração dos princípios ativos polares das plantas, os quais irão refletir na ação antibacteriana. Os relatos de Mora et al. (2013), por exemplo demonstraram a atividade antimicrobiana do extrato etanólico de *Verbesina negrensis* frente *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

A ausência de inibição do crescimento das bactérias *P. aeruginosa* e *E. coli* quando expostas aos extratos vegetais testados, pode ser explicada segundo

Contrucci et al. (2019), pela menor susceptibilidade das bactérias Gram-negativas à ação dos antimicrobianos, o que evidencia um grande desafio para a saúde coletiva. Alguns dos aparelhos dessa resistência se deve a sua própria estrutura celular, como por exemplo a cobertura de lipopolissacarídeo que está presente na membrana externa da bactéria impedindo a difusão de princípios ativos (ALVES et al., 2022). Mecanismos bioquímicos como os propiciados pelas enzimas betalactamases que dificultam a ação de antibióticos beta-lactâmicos como no caso das penicilinas também conferem resistência a esses microrganismos (MOTA et al., 2018). Dessa forma, com base nesses autores pode-se afirmar que é esperado que os fitoconstituintes presentes nos extratos em hexano, acetato e etanol de *V. macrophylla* utilizados nesse ensaio também tenham dificuldade em inibir patógenos com essas características.

Ainda é possível observar na Tabela 2 que o controle positivo para a cepa bacteriana *Pseudomonas aeruginosa* apresentou um valor de CIM igual a 125 µg/mL sendo esta, a maior concentração encontrada quando comparada com os valores de controle obtidos para todas as outras bactérias testadas, que correspondeu a 3,9 µg/mL. Em relação a esses dados, pode-se refletir sobre os achados da literatura, que relatam sobre a grande problemática da endemidade e multirresistência de isolados clínicos da bactéria *P. aeruginosa*, em conjunto aos elevados índices de mortalidade e morbidade (HEIMESAAT et al., 2019).

Atualmente, as opções terapêuticas para a intervenção das infecções ocasionadas por *P. aeruginosa* são limitadas, frequentemente restringindo-se ao uso de carbapenêmicos (BUEHRLE et al., 2017). Uma outra opção terapêutica seria as polimixinas, no entanto, o mecanismo que confere a ação bactericida desse fármaco permanece desconhecido (HORCAJADA et al., 2019). Isso demonstra a complexidade em combater agentes patogênicos resistentes como a bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa*.

Nos casos em que não houve atividade inibitória dos extratos obtidos da folha de *V. macrophylla* nas concentrações estabelecidas para esse ensaio biológico, é importante destacar que a presença de substâncias antimicrobianas no órgão vegetal em questão não pode ser descartada. Para Fennel et al. (2004), este resultado pode ser atribuído ao fato de que as variações referentes a determinação da Concentração Inibitória Mínima são influenciadas por muitos fatores, dentre eles é possível citar a técnica aplicada, a cepa utilizada no teste, a origem da planta e o período em que foi

coletada, se na preparação dos extratos foram utilizadas plantas frescas ou secas, bem como a quantidade de extrato estabelecida para o teste.

#### 4.1.3 Atividade Antifúngica

A tabela 3 expõe a CIM dos extratos brutos em hexano, acetato de etila e etanol de *V. macrophylla* contra fungos oportunistas de importância clínica. É possível notar que nenhum dos extratos apresentaram potencial antifúngico em concentrações até 500 ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Tabela 3: Atividade antifúngica dos extratos em hexano, acetato de etila e etanol das folhas de *Verbesina macrophylla* (Vm). Microgramas ( $\mu\text{g}$ ); mililitros (mL); maior que (>); acetato de etila (EtOAc). CiclopiroxOlamina (C. Ola).

<b>Grupo</b>	<b>Espécies</b>	<b>CIM dos Extratos (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>			<b>Controle</b>
		Hexânico	EtOAc	Etanólico	
<b>Leveduriforme</b>	<i>C. albicans</i>	>500	>500	>500	15,62
	<i>C. glabrata</i>	>500	>500	>500	15,62
<b>Filamentoso</b>	<i>A. niger</i>	> 500	> 500	> 500	62,5

Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Não foram encontrados na literatura registros da atividade antifúngica de extratos brutos de *Verbesina macrophylla*, para que fossem comparados com o presente estudo. No entanto, De Veras et al. (2021), descrevem que o óleo essencial de *V. macrophylla* possui atividade antifúngica frente *Candida albicans*. Possivelmente, essa atividade está ligada aos compostos majoritários encontrados no óleo essencial da espécie, e a maior suscetibilidade do fungo a essas substâncias. Nesse contexto o trabalho realizado por De Veras et al. (2021), ainda evidenciou a presença de substâncias tais como germacreno D, biciclogermacreno e cariofileno constituindo o óleo essencial de *V. macrophylla*, sendo esses compostos também descritos em outras espécies da mesma família, e que apresentaram atividade antifúngica sobre *C. albicans*.

Dados da literatura revelam uma variedade de extratos vegetais com ação anti-*Candida*, de plantas pertencentes à família Asteraceae (NETO; MORAIS, 2003). No entanto, poucos são os relatos a respeito de atividade antifúngica com espécies pertencentes ao gênero *Verbesina* dentre eles, o trabalho de Toribio (2005), que

analisou a atividade antimicrobiana do extrato metanólico seco da *V. encelioides* (Cav.) e em contraste ao presente estudo obteve a inibição da levedura *C. albicans*.

Diante desse cenário cabe a reflexão sobre a dificuldade em se obter novos agentes antifúngicos e da importância de estudos com essa finalidade. Nesse sentido Garcia (1999), comenta que os fungos desenvolveram múltiplos mecanismos para dificultar a ação de agentes antifúngicos tais como, alteração do sítio de permeabilidade, e do mecanismo de ação.

Atualmente grande parte dos fármacos disponíveis no mercado apresentam efeitos colaterais, eficácia questionável contra fungos reemergentes, ou rapidamente desenvolvem resistência, sendo imprescindível uma nova geração de medicamentos antifúngicos. Dessa forma os estudos estão orientados na investigação de agentes, que atuem seletivamente na célula fúngica sem interferir em nenhum sistema bioquímico do hospedeiro (ZACCHINO, 2001).

É importante destacar que a ausência da atividade antimicrobiana dos extratos de *V. macrophylla* para os fungos testados neste estudo, não se pode descartar a presença de substâncias antimicrobianas nos extratos, de modo que tal fato pode ter relação a diversos fatores tais como: o modo de extração a quantidade de componentes presentes, bem como a fatores que influenciam o metabolismo secundário do vegetal em questão. Sugere-se novos testes em condições metodológicas diferentes.

#### **4.2 Fracionamento cromatográfico do extrato acetato de etila proveniente de *Verbesina macrophylla*.**

O extrato acetato de etila (EtOAc) demonstrou consistente atividade antibacteriana no ensaio biológico preliminar, conforme pode ser ilustrado na Tabela 2, também apresentou o maior rendimento quando comparado aos demais extratos produzidos, rendeu 18,95 gramas, enquanto o hexânico pesou 8,41g e o etanólico 2,35 g. Esses dados fundamentaram a escolha do extrato EtOAc para que fosse realizado o fracionamento cromatográfico e assim realizado o estudo fitoquímico e biológico de suas frações.

A Cromatografia em Camada Delgada (CCD) é um método muito eficiente para separar e quantificar compostos antimicrobianos em um cromatograma de um extrato bruto ou semipuro, possibilitando o isolamento do composto ativo guiando-se por

bioensaio. A CCD configura-se como um método físico de separação, na qual as substâncias a serem separadas são distribuídas entre uma fase fixa (sílica gel), de grande área superficial denominada fase estacionária, e outra na qual um fluído elui através dela, chamada fase móvel. Na fase móvel são utilizados solventes com polaridades crescentes (CECHINEL FILHO et al., 2000).

Na Tabela 4 estão apresentados os dados obtidos após o extrato EtOAc ter sido submetido à Cromatografia em Coluna, utilizando solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, acetato de etila e metanol). Pode-se observar que o fracionamento resultou em 51 amostras, que foram analisadas através da técnica de cromatografia em camada delgada. As frações que apresentaram o mesmo deslocamento químico (RF) em CCD foram agrupadas (Tabela 4). Após a completa evaporação do solvente as amostras foram pesadas, etiquetadas e refrigeradas para que posteriormente fossem realizados ensaios de atividade biológica, e estudos fitoquímicos.

Tabela 4: Dados do fracionamento cromatográfico do extrato acetato de etila obtido de *Verbesina macrophylla* (Vm) com massa dada em miligramas. Fração (F); miligrana (mg); Acetato de Etila (EtOAc).

<b>Fracionamento Cromatográfico do extrato EtOAc</b>			
<b>Fração (Vm)</b>	<b>mg</b>	<b>Fração</b>	<b>Mg</b>
<b>F1</b>	72,7	<b>F33</b>	16,3
<b>F2 - 6</b>	196	<b>F34</b>	10,2
<b>F7 - 9</b>	2034	<b>F35</b>	8,5
<b>F10</b>	230	<b>F36</b>	9
<b>F11 - 12</b>	1328	<b>F37</b>	8,9
<b>F13 - 14</b>	453,2	<b>F38</b>	8,4
<b>F15 - 16</b>	376	<b>F39</b>	11
<b>F17 - 18</b>	1744,1	<b>F40</b>	10,6
<b>F19 - 20</b>	1841	<b>F41</b>	12,2
<b>F21 - 22</b>	736,4	<b>F42</b>	10,8
<b>F23 - 24</b>	698,6	<b>F43</b>	127,2
<b>F25</b>	356,4	<b>F44</b>	1914,8
<b>F26</b>	1325,7	<b>F45</b>	237,8
<b>F27</b>	534	<b>F46</b>	24,9

<b>F28</b>	137,1	<b>F47</b>	8
<b>F29</b>	36,4	<b>F48</b>	3,9
<b>F30</b>	21,4	<b>F49</b>	3,5
<b>F31</b>	21,3	<b>F50</b>	2,3
<b>F32</b>	14,8	<b>F51</b>	1,6

Fonte: Elaborado pela autora (2022)

#### **4.3 Atividade biológica das frações obtidas do extrato bruto acetato de etila proveniente de *Verbesina macrophylla*.**

##### **4.3.1 Atividade antibacteriana das frações**

Na Tabela 5 são apresentados os dados da atividade antibacteriana das frações do extrato bruto acetato de etila contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Nota-se a ação antimicrobiana somente contra as bactérias Gram-positivas, sendo *M. luteus* a bactéria mais suscetível, pois 17 frações inibiram seu crescimento. Os microrganismos *B. cereus* e *B. subtilis* foram sensíveis à 11 frações, enquanto *S. aureus* apenas a três. A concentração das frações do extrato utilizada no teste foi de 1000 µg/mL, seguindo o critério de classificação de CIM proposto por Webster et al. (2008), esse valor é considerado satisfatório.

Tabela 5: Atividade antibacteriana em 1000 µg/mL das frações obtidas do extrato acetato de etila, oriundo de *Verbesina macrophylla* (Vm). Microgramas (µg); mililitros (mL); fração (F); presença de atividade (+); ausência de atividade (-).

##### **Atividade Antibacteriana das Frações do Extrato EtOAc (1000 µg/mL)**

<b>Fração (Vm)</b>	<b>Gram-positivas</b>				<b>Gram-negativas</b>	
	<i>B.cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<b>F1</b>	-	-	-	+	-	-
<b>F2 - 6</b>	+	+	+	+	-	-
<b>F7 – 9</b>	-	-	-	+	-	-
<b>F10</b>	+	-	+	+	-	-
<b>F11 - 12</b>	+	-	+	+	-	-

<b>F13 - 14</b>	+	-	+	+	-	-
<b>F15 - 16</b>	+	-	+	+	-	-
<b>F17 - 18</b>	+	+	+	+	-	-
<b>F19 - 20</b>	+	+	+	+	-	-
<b>F21 - 22</b>	+	-	+	+	-	-
<b>F23 - 24</b>	+	-	+	+	-	-
<b>F25</b>	+	-	+	+	-	-
<b>F26</b>	+	-	-	+	-	-
<b>F27</b>	-	-	-	+	-	-
<b>F28</b>	-	-	-	-	-	-
<b>F29</b>	-	-	-	+	-	-
<b>F30</b>	-	-	-	-	-	-
<b>F31</b>	-	-	-	+	-	-
<b>F32</b>	-	-	+	-	-	-
<b>F33</b>	-	-	-	+	-	-
<b>F34</b>	-	-	-	-	-	-
<b>F35</b>	-	-	-	-	-	-
<b>F36</b>	-	-	-	-	-	-
<b>F37</b>	-	-	-	-	-	-
<b>F38</b>	-	-	-	-	-	-
<b>F39</b>	-	-	-	-	-	-
<b>F40</b>	-	-	-	-	-	-
<b>F41</b>	-	-	-	-	-	-
<b>F42</b>	-	-	-	-	-	-
<b>F43</b>	-	-	-	-	-	-
<b>F44</b>	-	-	-	-	-	-
<b>F45</b>	-	-	-	-	-	-

<b>F46</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>F47</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>F48</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>F49</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>F50</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>F51</b>	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Como mostra a Tabela 5, as primeiras frações foram as mais ativas, esse fato indica que os componentes responsáveis pela ação antimicrobiana podem ser extraídos em baixa polaridade, já que essas frações foram retiradas durante o método CCD utilizando hexano puro e sistemas hexano/ acetato de etila. Com relação as frações obtidas com solventes polares (acetato de etila e metanol), estas praticamente não apresentaram atividade, apenas Vm-F32 e Vm-F33 foram capazes de inibir *B. subtilis* e *M. luteus* respectivamente.

De acordo Bresciania et al. (2004), e Carvalho et al. (2001), solventes apolares como o hexano possibilitam a extração de grupos esteróides (estimagmasterol, sistosterol), cumarínicos, ésteres do ácido oleanóico, lactonas sesquiterpênicas e terpenóides (ácidos caurânicos). Nesse sentido vale ressaltar que alguns desses grupos já foram relatados em estudos fitoquímicos da espécie *Verbesina macrophylla*. Além disso, a literatura científica menciona, que diversos microrganismos são inibidos pela atuação de terpenos, cujo mecanismo de ação dessa atividade não está completamente elucidado, no entanto acredita-se que a ruptura da membrana celular por compostos lipofílicos pode estar envolvida nesse processo (COWAN, 1999; DORMAN; DEANS, 2000; WILKENS, 2002).

Os resultados encontrados indicam que as bactérias Gram-positivas são mais suscetíveis aos componentes presentes em *V. macrophylla* quando comparadas com as Gram-negativas. Esse perfil químico de seletividade contra Gram positivos não é restrinido aos compostos encontrados nos vegetais, mas sim um fenômeno habitual observado entre muitos antimicrobianos (BASILE et al., 2000). Outros estudos com frações de plantas pertencentes a família Asteraceae já relataram a atividade antimicrobiana frente a cepas Gram-positivas, por exemplo: *Acmella brasiliensis* Spreng (SARTORI, 2005), *Verbesina negrensis* Steyermark (MORA et al, 2013) *Baccharis dracunculifolia* D. C. (DE ABREU; ONOFRE, 2010).

Não foi observada ação antimicrobiana contra as bactérias *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Esse fato pode ser justificado em virtude de a membrana externa das bactérias Gram-negativas apresentarem uma barreira à penetração de muitas moléculas de antibióticos, e o espaço periplasmático englobar enzimas, que tem capacidade de lisar moléculas estranhas inseridas neste espaço (DUFFY; POWER, 2001; SARTORI et al., 2003).

#### **4.3.2 Concentração inibitória mínima (CIM) das frações ativas Vm-F17-18 e Vm-F19-20**

A Tabela 6 demonstra os resultados da Concentração Inibitória Mínima encontrada para as frações Vm-F17-18 e Vm-F19-20 de *Verbesina macrophylla*, frente cepas bacterianas Gram-positivas.

O motivo pelo qual essas frações foram selecionadas para a determinação da CIM está no fato de que o crescimento de todas as bactérias Gram-positivas testadas preliminarmente em uma concentração de 1000 µg/mL foi inibido, bem como, porque o espectro da Ressonância Magnética Nuclear, demonstrou haver alto grau de pureza, inclusive apontando uma grande similaridade na composição das amostras.

Nota-se na Tabela 6 uma pronunciada atividade antibacteriana das frações, sendo capazes de inibir o crescimento dos microrganismos em baixas concentrações, com CIM variando entre 2,5 e 3,9 µg/mL. Vale ressaltar, que o resultado obtido para *S. aureus* e *B. cereus* superou o antibiótico padrão utilizado no teste.

Tabela 6: Concentração inibitória mínima (CIM) em µg/mL das frações ativas Vm-F17-18 e Vm-F19-20, obtidas do extrato acetato de etila, oriundo de *Verbesina macrophylla* (Vm) frente a bactérias Gram-positivas. Microgramas (µg); mililitros (mL); maior que (>) Cloranfenicol (Clr).

<b>CIM das Frações Ativas (µg/mL)</b>				
<b>Grupo</b>	<b>Espécies</b>	<b>F17-18</b>	<b>F19-20</b>	<b>Controle Clr</b>
<b>Gram- positivas</b>	<i>B. cereus</i>	2,5	2,5	3,9
	<i>S. aureus</i>	2,5	2,5	3,9
	<i>B. subtilis</i>	3,9	3,9	3,9
	<i>M. luteus</i>	3,9	3,9	3,9

Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Estes resultados corroboram com dados de estudos realizados anteriormente com espécies da família Asteraceae (a qual pertence *V. macrophylla*), onde as frações mais apolares mostraram atividade contra bactérias Gram positivas (DE ABREU; ONOFRE, 2010; DE MATOS, 2001; DA SILVA et al., 2002).

Através da análise dos dados de RMN das frações Vm-F17-18 e Vm-F19-20 (Tabela 11) foi possível sugerir que 70% das amostras são compostas pelo terpeno 6-O-b-E-p-coumaroyl-4a-hydroxyeudesmane (Vm A), anteriormente relatado por Bohlmann et al. (1980), e depois por Maia (2011), e 25 % pelo composto 6-O-b-Z-p-coumaroyl-4a-hydroxyeudesmane (Vm B) (Figura 24), descrito antes apenas por Maia (2011), de forma que esse é o segundo relato dessa substância na espécie *Verbesina macrophylla* e o terceiro de seu isolamento na literatura. Anteriormente o composto havia sido isolado apenas da espécie *Verbesina virginica* (XU et al., 2010).

Sendo assim pode-se afirmar que esses metabólitos secundários são os responsáveis pela acentuada atividade antibacteriana observada. Esse estudo corrobora com os dados da literatura, que expõem outras substâncias já isoladas de espécies da família Asteraceae que apresentaram atividade biológica. Al-Dabbas et al., (2005) estudando o extrato acetato de etila das partes aéreas inteiras de *Varthemia iphionoides* (Compositae), relatou o isolamento de um sesquiterpeno eudesmano (ácido selina-4,11(13)-dien-3-on-12-óico) que exibiu uma potente atividade antibacteriana contra (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Salmonella enteritidis*); dez lactonas sesquiterpênicas foram isoladas das partes aéreas de *Centaurea spinosa*, sendo observado a atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (SAROGLOU et al., 2005); substâncias isoladas de *Epaltes mexicana* Less. inibiram o crescimento de bactérias Gram-positivas e negativas (KATO, 1996).

Cerca de 1.000 eudesmanóides naturais foram descritos em espécies da família Asteraceae, com padrões distintos de oxigenação e clivagem. A atividade biológica de sesquiterpenóides do tipo eudesmano em Asteraceae têm sido o foco de muitos estudos fitoquímicos, farmacológicos e sintéticos. Esses compostos exibem uma ampla gama de atividades biológicas que incluem ação reguladora do crescimento de plantas, antialimentares de insetos, antifúngicos, antitumorais e antibacterianos, de modo que o interesse em relacionar a estrutura e os padrões de oxigenação com a função tem aumentado (WU et al., 2006).

Nesse contexto Flores (2010), menciona que essa variada atividade biológica permitiu que muitos sesquiterpenos fossem isolados e caracterizados. A autora ainda afirma que poucos compostos isolados de espécies do gênero *Verbesina* foram estudados quanto a sua atividade biológica. Dessa forma é importante ressaltar que o presente estudo é o primeiro registro do efeito antibacteriano de substâncias isoladas de *Verbesina macrophylla*.

#### **4.3.3 Classificação da ação antimicrobiana das frações Vm-F17-18 e Vm-F19-20**

Um número considerável de pesquisas em todo o mundo tem comprovado as propriedades microbiostáticas e microbicidas a partir de produtos vegetais. Usualmente, são realizados ensaios biológicos *in vitro* em testes de susceptibilidade ou sensibilidade para estudar, avaliar e confirmar o tipo de ação da amostra (SOUZA et al., 2003). Assim como realizado nesse trabalho.

A classificação da ação antimicrobiana foi determinada, retirando uma alíquota do poço de inibição, CIM das frações, para cada microrganismo e consecutivamente inoculando em meio estéril. As concentrações das frações que em 24 horas não demonstraram nenhum crescimento microbiano foram classificadas como bactericidas e as concentrações que neste mesmo tempo apresentavam crescimento na CIM foram classificadas como bacteriostáticas (WALSH, 2003).

Na Tabela 7 estão apresentados os resultados da classificação quanto a ação bactericida ou bacteriostática das Frações Vm-F17-18 e Vm-F19-20. Nota-se que para as cepas *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* a ação foi bactericida, de forma que ao final de 24 horas de experimentação, não houve crescimento de colônias caracterizando assim esse efeito, enquanto para *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus* as frações demonstraram ser bacteriostáticas.

A ação bacteriostática de extratos vegetais não destrói as bactérias, no entanto impede a multiplicação das mesmas e como consequência diminui a possibilidade de que ocorram mutações (PHILLIPSONS, 2001). Dessa forma a realização de estudos como este é de suma importância para motivar outros trabalhos que tenham como perspectiva a identificação da propriedade específica do extrato vegetal quanto a sua ação.

Tabela 7: Classificação quanto a ação antimicrobiana (bactericida ou bacteriostática) das frações ativas Vm-F17-18 e Vm-F19-20. Fração (F).

<b>Classificação da Ação do Extrato</b>		
<b>Espécies</b>	<b>Frações (Vm)</b>	
	<b>F-17-18</b>	<b>F19-20</b>
<i>Bacillus cereus</i>	bactericida	Bactericida
<i>Bacillus subtilis</i>	bacteriostático	bacteriostático
<i>Staphylococcus aureus</i>	bactericida	Bactericida
<i>Micrococcus luteus</i>	bacteriostático	bacteriostático

Fonte: Elaborado pela autora (2022)

#### 4.3.4 Atividade antifúngica das frações

Os fungos são extremamente interessantes, por serem capazes de se desenvolver em diversas superfícies e colonizar ambientes, animais, vegetais e o ser humano (SELINTRENNIKOFF, 2001). Nos últimos 30 anos, a ocorrência de infecções fúngicas está se tornando cada vez mais comum, especialmente em pacientes imunocomprometidos e com isso, se tornam um importante problema de saúde pública, que se agrava quando surgem casos de resistência microbiana (ANDRADE et al., 2017). De acordo Lazzarini et al. (2018), existem estimativas de que mais de 300 milhões de indivíduos recebem diagnóstico de infecções fúngicas graves em todo mundo, dos quais os patógenos causadores das infecções são principalmente dos gêneros *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus* e *Pneumocystis*.

Diante deste cenário, as frações obtidas do extrato bruto acetato de etila foram analisadas frente cepas fúngicas leveduriformes (*Candida albicans* e *Candida glabrata*) e filamentosa (*Aspergillus niger*), de importância clínica e difícil tratamento devido o surgimento da multirresistência. Dentre as 38 frações, os microrganismos foram expostos a 34, em decorrência da insuficiência de massa dos extratos para realização do ensaio. Assim, as frações Vm-F48, Vm-F49, Vm-F50 e Vm-F51 não foram testadas.

Os fungos leveduriformes, são muito comuns em infecções hospitalares, dentre eles, o gênero *Candida*, é reconhecido por ser a causa de infecções como candidíase ou candidose, os danos causados podem ser brandos, agudos ou crônicos,

manifestando-se de forma superficial ou profunda. Sua apresentação clínica varia de acordo a imunidade do paciente (FREIRE et al., 2016).

Dentre as espécies pertencentes a este gênero destaca-se a *C. albicans* devido à elevada incidência nos casos de candidíase, cuja frequente exposição desta espécie aos antifúngicos favoreceu o surgimento de cepas multirresistentes, no entanto infecções causadas por espécies de *Candida* não *albicans* tem aumentado dramaticamente (LÓPEZ-MARTÍNEZ, 2010). Nesse sentido a literatura relata que aproximadamente metade das ocorrências de candidose são provocados por espécies não *albicans*, de forma que *C. glabrata* já representa o segundo fungo mais isolado em amostras de sangue (GÓMEZ et al., 2010; OREN; PAUL, 2014; SAMPAIO; PAIS, 2014).

A infecção por *C. glabrata* é principalmente endógena, uma vez que esta espécie pode colonizar a pele e as mucosas, ocorrendo transmissão também através de material infectado, profissionais de saúde ou até mesmo de outros pacientes. A redução da flora bacteriana comensal do trato gastrointestinal após administração de antibacterianos de amplo espectro, também facilita a proliferação de leveduras no tubo digestivo aumentando o risco da passagem desta por translocação para a corrente sanguínea, através do epitélio intestinal (PEMÁN; SALAVERT, 2013).

*Aspergillus* são fungos oportunistas filamentosos, capazes de causar síndromes alérgicas, a exemplo da aspergilose broncopulmonar alérgica; podem colonizar cavidades originando bolas fúngicas no pulmão ou seios nasais; provocam infecções invasivas, como a aspergilose pulmonar disseminada e a AI. Dependendo das condições do hospedeiro, as infecções podem ser localizadas ou disseminadas (DENNING, 1998; MARR et al., 2002). *Aspergillus niger* comumente é isolado em casos de otite externa (COLLEE et al., 1993). É também um agente etiológico secundário em otites bacterianas, podendo causar doenças pulmonares em pacientes com o sistema imunológico comprometido. A presença de cristais de oxalato de cálcio em amostras microscópicas é uma característica útil para o diagnóstico de infecção por *Aspergillus niger*, mesmo na ausência de conídios (PERSON et al, 2010).

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados obtidos para a atividade antifúngica das frações de *V. macrophylla*. É notável que o fungo leveduriforme *Candida glabrata* foi a única cepa fúngica não suscetível a nenhuma das frações testadas. Vm-F1 e Vm-F2-6 apresentaram atividade frente *C.albicans* e *A. niger*, enquanto Vm-F7-9 e Vm-F10 foram ativas apenas para *C. albicans*. A inibição das

frações é considerada satisfatória (WEBSTER et al., 2008). As demais (Vm-F11 ... Vm-F47) não inibiram o crescimento dos fungos em uma concentração de 1000 µg/mL.

Tabela 8: Atividade antifúngica em 1000 µg/mL das frações obtidas do extrato acetato de etila oriundo de *Verbesina macrophylla* (Vm). Microgramas (µg); mililitros (mL); fração (F); presença de atividade (+); ausência de atividade (-).

<b>Fração</b>	<b>Atividade Antifúngica das Frações (Vm) do Extrato EtOAc (1000 µg/mL)</b>		
	<b>Leveduriforme</b>	<b>Filamentoso</b>	
	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<b>F1</b>	+	-	+
<b>F2 - 6</b>	+	-	+
<b>F7 – 9</b>	+	-	-
<b>F10</b>	+	-	-

Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Quando comparados, os resultados da atividade antifúngica das frações com os obtidos nos ensaios em que foram testados os extratos brutos contra as mesmas cepas fúngicas, observa-se que apenas as frações foram ativas. Esse resultado está em consonância com o raciocínio de Cechinel Filho et al. (2001), e Malheiros et al. (2001), quando afirmam que a análise de compostos ativos é muito mais complexa e prolongada, visto que comumente as substâncias ativas presentes em menor proporção na espécie são as que apresentam os melhores efeitos biológicos.

Outra importante observação a ser feita é que dentre todas as frações testadas, apenas quatro frações apresentaram atividade antifúngica, enquanto 12, demonstraram ação antibacteriana. Ao comparar esses resultados, constata-se que o número de frações ativas para as bactérias é três vezes maior que para os fungos. Essa discrepância pode ser observada também no caso de drogas antimicrobianas já disponíveis no mercado.

Considerando esses fatos, Silva (2016), expõe que atualmente, existe uma variedade de medicamentos antimicrobianos que podem ser utilizados para tratar infecções fúngicas, entretanto, essa “diversidade” torna-se relativamente pequena, se

comparado a disponibilidade de drogas utilizadas na terapia de infecções bacterianas. Góes (2009), afirma que este fato pode ser atribuído natureza eucariótica das células fúngicas, bem como pelo impasse em encontrar alvos únicos não compartilhados com hospedeiros humanos. Inclusive esses fatores têm aumentado a pressão para buscar dentre os produtos naturais novos agentes antifúngicos, que além de eficazes, sejam menos tóxicos do que aqueles que estão em uso (KHAN; AHMAD; CAMEOTRA, 2013). A enorme diversidade química, permeabilidade celular intrínseca e especificidade bioativa das substâncias antimicrobianas naturais configura-se como uma promissora fonte de novos fármacos para tratar de doenças infeciosas (JIANG et al., 2008).

Observando a Tabela 8 nota-se a falta de atividade biológica frente *Candida glabrata*. Em relação a essa cepa Gołaś et al. (2014), relata que esse é um fungo emergente entre as espécies não *albicans* sendo capaz de desenvolver resistência aos Azóis e se difundir como resultado da utilização de fluconazol e itraconazol como tratamento profilático preferencial e empírico, muitas vezes indiscriminadamente. Tscherner et al. (2011), chama atenção para a necessidade de desenvolver estudos genéticos de *C. glabrata*, além de investigar os mecanismos de patogenicidade, para compreender o que levou esta espécie a transitar de comensal a patógeno, de modo a aperfeiçoar as terapias instituídas.

A Tabela 8 também evidencia a ação antifúngica de quatro frações frente *C. albicans*, e duas para *A. niger*. É importante comentar que diante da emergência desses patógenos, e dos relatos do surgimento de resistência ao antifúngicos tradicionais, o isolamento de compostos que contribuam para combater esses microrganismos é de suma importância. Diante desse cenário Heard et al., (2021) reflete que os produtos naturais com propriedades antifúngicas surgem como opções terapêuticas. Podendo ser uma alternativa e/ou ser combinado com outros agentes farmacológicos (ALVES et al., 2019). Principalmente buscando controlar fungos resistentes e infecciosos (HELAL et al., 2019).

De acordo as análises da Ressonância Magnética Nuclear, pode-se atribuir a atividade antifúngica observada no teste à componentes do tipo ácidos graxos. Diversos ácidos graxos são conhecidos por apresentar propriedades antibacterianas e antifúngicas (RUSSEL, 1991). No entanto, esse estudo relata pela primeira vez a atividade antifúngica de ácidos graxos presentes em *Verbesina macrophylla*.

Os resultados obtidos nesse trabalho estão em acordo com dados encontrados na literatura. Cantuária (2018), identificou em *Eremanthus erythropappus* (DC) MacLeish (Asteraceae) especificamente na fração hexânica, compostos que pertencem à classe dos ácidos e dos ésteres de ácidos graxos, responsáveis por uma proeminente atividade antifúngica; Moreno et al. (2013), avaliou o ácido palmítico, frente à cepa *Candida albicans*, e obteve uma CIM de 500 µg/mL para esta molécula. Outros trabalhos também já associaram ácidos graxos a atividades antifúngicas (DA CUNHA 2006; SINGH et al., 2002; KIM et al., 2003; SACCHETTI et al., 2005).

Reda e Carneiro (2007), afirmam que a família Asteraceae ainda é pouco estudada no que diz respeito ao teor de óleo e à composição desses componentes, no entanto sabe-se que apresentam uma predominância do ácido linoléico, conforme já observado em oleaginosas tradicionais como *Carthamus tinctorius* (75,9%) (GRIECO; PIEPOLI, 1967) e *Helianthus annuus* (68,4%) (ERBA; BAYDAR, 2007). Asteraceae possui uma variedade de ácidos graxos incomuns, como os insaturados *cis* ou *trans* com duplas ligações nas posições 3 ou 5, ou conjugados, acetilênicos, epoxilados ou hidroxilados (TSEVEGSUREN et al., 1999, 2000). A existência de ácidos graxos incomuns nessas espécies confere importância econômica, pois alguns deles possuem efeito terapêutico e são comercializados como fitoterápicos ( $\gamma$ -linolênico) (TSEVEGSIREN; AITZETMÜLLER, 1996).

Dessa forma, tendo este trabalho demonstrado que a ação antifúngica das frações foi proveniente de componentes ácidos graxos, é extremamente necessário que sejam realizados estudos mais detalhados com as frações ativas de *V. macrophylla* que apresentaram essa atividade, a fim de realizar e o isolamento e a caracterização química das amostras.

#### **4.4 Citotoxicidade em hemácias dos extratos em Hexano e Acetato de Etila**

Os vegetais possuem uma diversidade de propriedades biológicas intrínsecas, celebradas por suas aplicações na medicina tradicional desde tempos remotos. No entanto, apesar deste costume, é necessário ponderar esse uso, plantas medicinais não é um sinônimo de inocuidade. Ao oposto da crença de que, se o medicamento natural não fizer bem, mal não pode fazer, é preciso compreender que a planta medicinal é um xenobiótico, isto é, é um produto quimicamente desconhecido, e que detém propriedades terapêuticas ou intoxicantes, e que ao ser introduzido no

organismo humano, pode sofrer biotransformações, e desta maneira, pode originar produtos tóxicos ao organismo (KHWAI RAKPAMA et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2014).

Nesse contexto, o ensaio de atividade hemolítica tem sido largamente utilizado para determinar a toxicidade de extratos vegetais, justamente pela necessidade de investigar os riscos e a eficácia em células humanas (ZOHRA; FAWZIA, 2014).

A hemólise ocorre quando os eritrócitos se rompem através da desestabilização da membrana celular ocasionando a liberação de hemoglobina, afetando o funcionamento de órgãos vitais tais como rins, fígado e coração (REZENDE et al., 2017). Assim, a utilização das iminentes atividades biológicas dos compostos naturais deve levar em consideração seus efeitos toxicológicos, no entanto, esse princípio tem impossibilitado a aplicação de diversos fármacos (GHOSH et al., 2018; SILVA et al., 2017).

Diante dessa preocupação o presente trabalho investigou a atividade citotóxica de extratos brutos em hexano e acetato de etila das folhas de *Verbesina macrophylla*. As amostras foram selecionadas para o teste levando em consideração a proeminente atividade biológica apresentada em testes preliminares. Na Tabela 9, encontram-se os resultados do efeito tóxico dos extratos sobre as hemácias, de forma que foi verificado ligeira hemólise (+) apenas para o extrato hexânico em sua maior concentração (1000µg/mL).

Tabela 9: Atividade citotóxica em 10, 100 e 1000 µg/mL dos extratos hexânico e acetato de etila de *Verbesina macrophylla* (Vm). Microgramas (µg); mililitros (mL); não houve hemólise (-); ligeira hemólise (+); significativa hemólise (++) ; hemólise intensa (+++).

Citotoxicidade em Hemácias			
Extrato	10 µg/mL	100 µg/mL	1000 µg/mL
<b>Hexano</b>	-	-	+
<b>Acetato de Etila</b>	-	-	-

Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Não foram encontrados na literatura, dados sobre a atividade citotóxica em extratos vegetais de *Verbesina macrophylla*, no entanto, o estudo do óleo essencial desta espécie realizado por De Veras et al. (2021), demonstrou que em todas as concentrações testadas houve segurança para seu uso como droga, sendo a hemólise

inferior a 5%. Outros achados em relação a extratos de espécies com propriedades terapêuticas pertencentes à família Asteraceae demonstraram não ser tóxicos nos modelos utilizados: *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) (PAULA, 2014); *Praxelis clematidea* (PEREIRA, 2022); *Eupatorium ballotifolium* (SOBRINHO et al., 2016); *Baccharis dracunculifolia* (DA SILVA FILHO et al., 2009) *Arctiumlappa*, *Mikaniagglomerata* (DE HARO MORENO, 2018).

Por outro lado, existem estudos de espécies que demonstram a inviabilidade de compostos químicos devido a sua toxicidade, como por exemplo os tricotecenos macrocíclicos presentes em *Baccharis coridifolia* que apresentaram propriedade antiviral (GARCIA, 2002). Ensaios de toxicidade *in vivo* em coelhos e ratos mostraram que a ingestão de *B. coridifolia* e/ou tricotecenos purificados desenvolveu sintomas tóxicos que, na maioria das vezes, resultaram na morte dos animais, sendo a diarreia o sintoma mais comum (HABERMEHL et al., 1985; DOBEREINER et al., 1976). O estudo de Faria (2019), demonstrou certa toxicidade do extrato e das fases de *Ageratum fastigiatum* utilizada como anti-inflamatório, analgésico e cicatrizante quando usada topicalmente em preparações alcoólicas ou hidroalcoólicas. O óleo essencial de *Eupatoriumba ilotifolium* possui atividades anticancerígenas e antifúngicas em baixas concentrações, contudo, nessas concentrações também apresentam um potencial hemolítico de 12,5% (SOBRINHO et al., 2016)

Todos esses trabalhos demonstram que a segurança toxicológica é imprescindível e deve superar o potencial biológico e/ou farmacológico, dos extratos ou compostos obtidos dos vegetais, sendo a atividade hemolítica um importante indicador da impossibilidade de sua aplicação. Assim os extratos em hexano e acetato de etila de *Verbesina macrophylla* apresentaram segurança toxicológica, tendo expressado ligeira hemólise, apenas na maior concentração testada para o extrato hexânico.

#### **4.5 Efeito da fração Vm-F19-20 sobre a cinética do crescimento microbiano (time-kill)**

Os estudos de tempo de morte de agentes antimicrobianos são capazes de fornecer uma avaliação mais dinâmica da relação entre um agente antimicrobiano e um determinado organismo, podendo apresentar maior aplicabilidade clínica do que as determinações estáticas de Concentração Letal Mínima (MLC). Por esse motivo, investigações voltadas ao tempo de morte têm sido largamente utilizadas como

avaliação da taxa relativa e da extensão do potencial bactericida de muitos agentes, além das características farmacodinâmicas e o possível antagonismo ou sinergia entre agentes administrados simultaneamente (PFALLER et al., 2004). Esse tipo de avaliação é extenuante, entretanto, além de confirmar as determinações da CIM, pode fornecer o tempo exato de ação em que os antimicrobianos causam a morte das bactérias avaliadas (TEETHAISONG et al., 2014).

Através do método time-kill é possível determinar a morte de um isolado bacteriano ao longo do tempo testando um ou mais agentes antimicrobianos sob condições metodicamente controladas. Caso o objetivo seja avaliar a sinergia ou antagonismo entre dois ou mais antimicrobianos, as curvas de morte irão apresentar uma concentração fixa de cada agente sozinho e em conjunto, sendo confrontadas com as do controle sem drogas e nos intervalos de tempo estabelecidos. Quando o método for utilizado para analisar apenas um agente antimicrobiano, (como no caso deste trabalho), as curvas de morte são plotadas testando múltiplos da Concentração Inibitória Mínima (CIM) (NCCLS, 1998).

A cinética de morte microbiana foi analisada, com o objetivo de determinar a viabilidade das bactérias da cepa *Bacillus subtilis* após exposição à fração Vm-F19-20 em diferentes concentrações ao longo de 24 horas, identificando se a atividade dessa fração possui ação bactericida ou bacteriostática, bem como se esta atividade é concentração ou tempo-dependente.

Na Tabela 10, estão apresentados os dados da contagem microbiana, os quais foram utilizados para a obtenção do Gráfico 1, que expressa a cinética de morte da bactéria *Bacillus subtilis* e ilustra a relação entre as três concentrações (10; 100; 1000 µg/mL) da fração ativa Vm-F19-20 e o número de bactérias resultantes após um período de 24 horas de exposição ao fitoconstituínte.

Tabela 10: Dados da contagem de *Bacillus subtilis* para as três concentrações (10; 100; 1000 µg/mL) da fração (Vm-F19-20). Microgramas (µg); mililitros (mL); fração (F).

#### Dados do Experimento

Concentração (µg/mL)	Nº Bactérias	Log. Concentração (x)	Nº Bactérias (y)
0	16,3. 10 <sup>8</sup>	0	1630. 10 <sup>5</sup>
10	52.10 <sup>5</sup>	1	52. 10 <sup>5</sup>
100	12.10 <sup>5</sup>	2	12. 10 <sup>5</sup>

1000	$6 \cdot 10^5$	3	$6 \cdot 10^5$
------	----------------	---	----------------

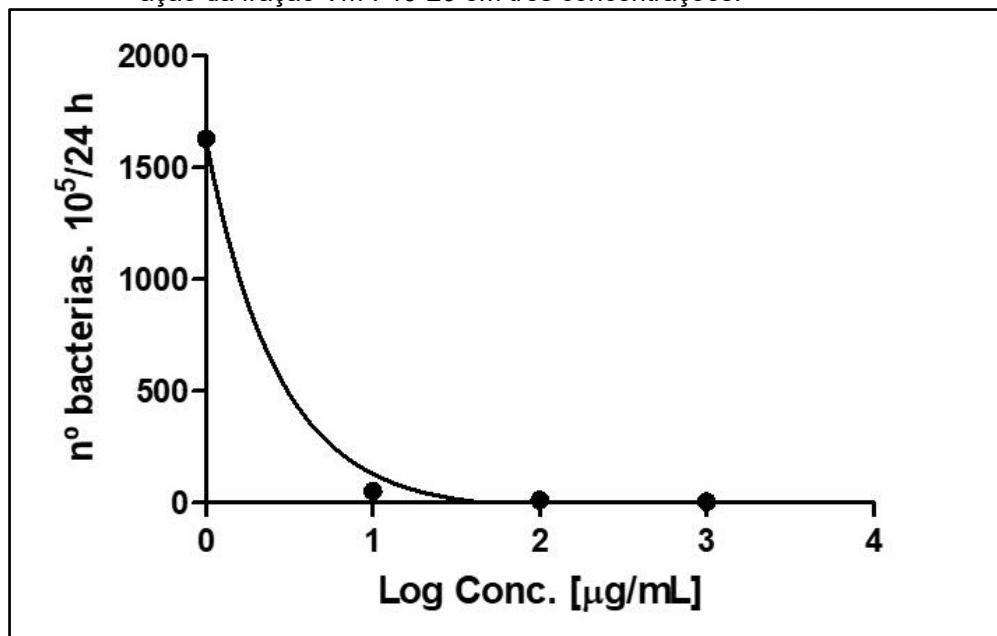
Fonte: Elaborado pela autora (2022)

O padrão de comportamento da população de bactérias da espécie *Bacillus subtilis* pode ser representado segundo a função logarítmica abaixo:

$$Y = Bottom + (Top - Bottom)/(1 + 10^{(X - Log|C50)}).$$

Em que X é o logaritmo da concentração da fração, e Y representa o número de bactérias após um período de 24 horas de exposição ao extrato.

Gráfico 1: Curva de morte microbiana ( $\log_{10}$ UFC/mL) da cepa *Bacillus subtilis*, sob ação da fração Vm-F19-20 em três concentrações.



Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Observando o Gráfico 1, nota-se que a fração Vm-F19-20 apresentou um efeito bacteriostático para a cepa *Bacillus subtilis*, pois não houve redução maior ou igual a  $3 \log_{10}$ UFC/mL (99,9 %) a partir do inóculo inicial na CIM em todas as concentrações testadas, em um período de 24 horas. Conforme a concentração da fração aumenta, menor é o número de bactérias resultantes após a contagem de UFC, de modo que quando submetidas a uma concentração de 1000 μg/mL foram encontradas aproximadamente  $6 \cdot 10^5$  bactérias, em 100 μg/mL  $12 \cdot 10^5$  e em 10 μg/mL  $52 \cdot 10^5$ . Então percebe-se uma grande influência da fração Vm-F19-20 sobre o crescimento das

bactérias quando observado o controle (0 µg/mL) que apresenta um número aproximado de  $1630 \cdot 10^5$  bactérias.

Desse modo, a análise do Gráfico 1 sugere que pela cinética de morte, tanto em concentrações inferiores como na maior concentração da fração existe atividade bacteriostática dependente da concentração, já que o aumento desta potencializa a atividade antibacteriana. É importante salientar que estudos de citotoxicidade da fração devem ser realizados para avaliar o impacto desse fitoconstituente em altas concentrações.

Não foram encontrados na literatura estudos que avaliaram parâmetros de crescimento microbiano relacionado à eficiência antimicrobiana de um extrato bruto ou fração extraída de *Verbesina macrophylla*. Apesar da escassez de dados para a esse tipo de estudo, o resultado do teste mostra-se promissor, uma vez que existe a possibilidade de em associação com um antibiótico padrão a atividade antibacteriana ser potencializada. Nesse contexto, é relatado por Stefanovic et al. (2012), que substâncias diferentes combinadas aumentam as chances de conter uma infecção, e que a utilização de extratos de espécies vegetais bioativas, derivados semissintéticos e substâncias puras isoladas ampliam a eficácia *in vitro* de antimicrobianos empregados contra uma diversidade de microrganismos.

Dutra (2016), demonstrou em seus estudos que combinações dos extratos metanólicos de *P. granatum*, *P. guajava* e *A. occidentale* associados a antibióticos padronizados apresentaram uma potencialização do efeito antimicrobiano contra a bactérias Gram-positivas, sugerindo uma ação sinérgica entre os mesmos; Morais - Braga et al. (2012), descrevem que *Lygodium venustum* possui metabólitos secundários que podem ser usados em associação com antibióticos, tendo sido observado esse efeito sinérgico entre a fração obtida do extrato em acetato de etila e o antibiótico amicacina frente *E. coli* e *S. aureus*.

Diante dessa possibilidade, e dos resultados promissores obtidos no teste pode-se sugerir que novos estudos da fração Vm-F19-20 de *Verbesina macrophylla*, devem ser realizados. Assim o Método de *Checkerboard* que é caracterizado por ser um teste de microdiluição que avalia a CIM de drogas sozinhas e combinadas pode ser realizado para investigar se a associação dessa fração com antibióticos padrão resulta em sinergismo, antagonismo ou indiferença.

#### **4.6 Caracterização dos constituintes químicos de *Verbesina macrophylla***

As figuras abaixo ilustram os espectros de Ressonância Magnética Nuclear obtidos das frações provenientes do extrato bruto em acetato de etila de *V. macrophylla*. Os dados espectrais foram adquiridos em espectrômetro Varian INOVA 500, operando a 500 MHz para o H<sup>1</sup>.

Figura 9: Espectro de RMN de H<sup>1</sup> da fração Vm-F1 do extrato em acetato de etila de *Verbesina macrophylla* (Vm).

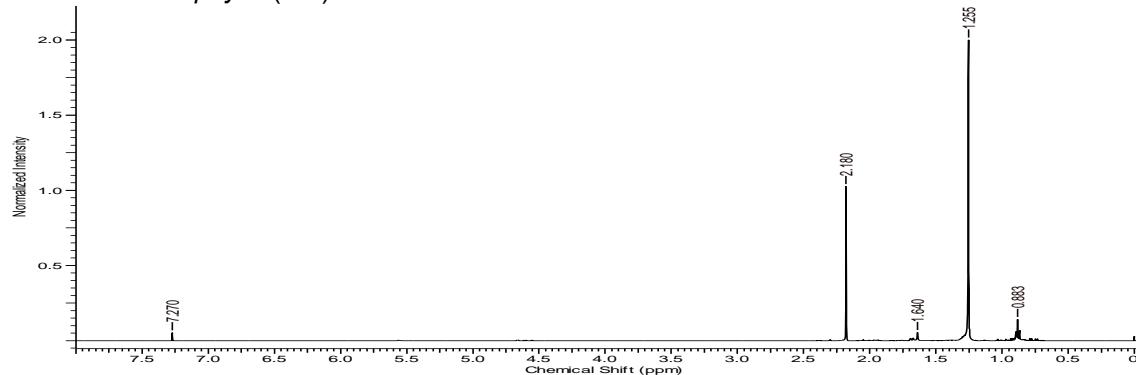


Figura 10: Espectro de RMN de H<sup>1</sup> da fração Vm-F2 do extrato em acetato de etila de *Verbesina macrophylla* (Vm).

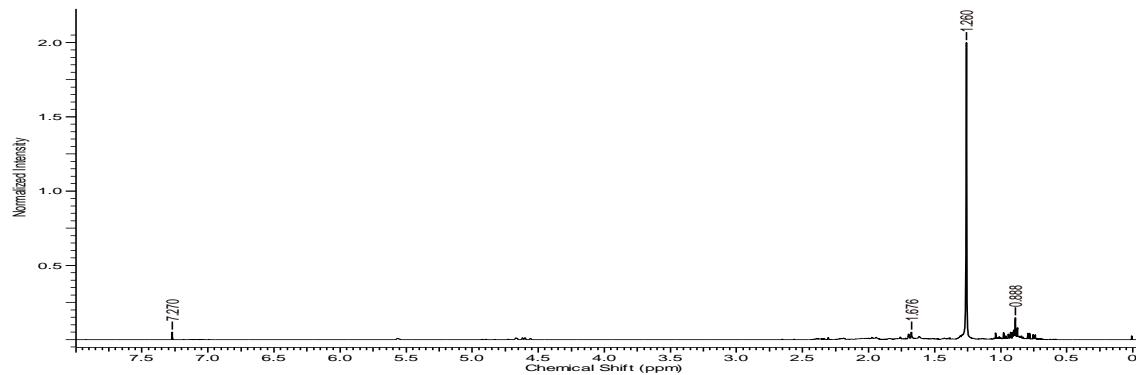


Figura 11: Espectro de RMN de H<sup>1</sup> da fração Vm-F10 do extrato em acetato de etila de *Verbesina macrophylla* (Vm).

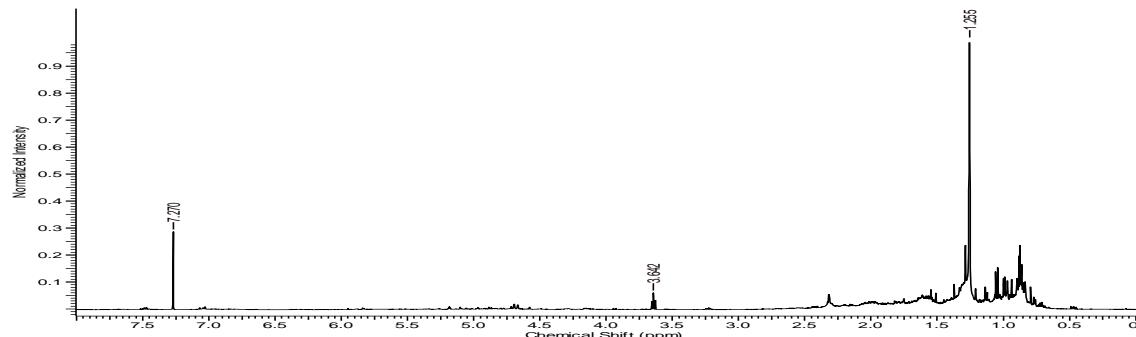


Figura 12: Espectro de RMN de H<sup>1</sup> da fração Vm-F11-12 do extrato em acetato de etila de *Verbesina macrophylla* (Vm).

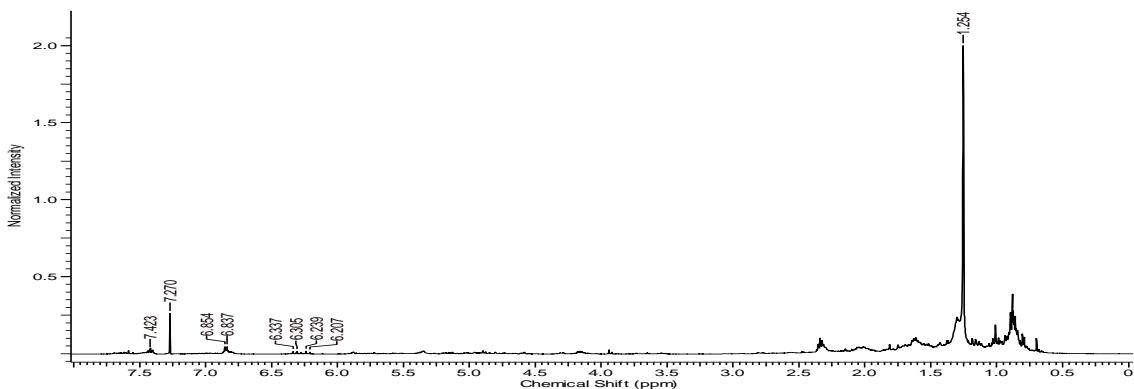


Figura 13: Espectro de RMN de H<sup>1</sup> da fração Vm-F13-14 do extrato em acetato de etila de *Verbesina macrophylla* (Vm).

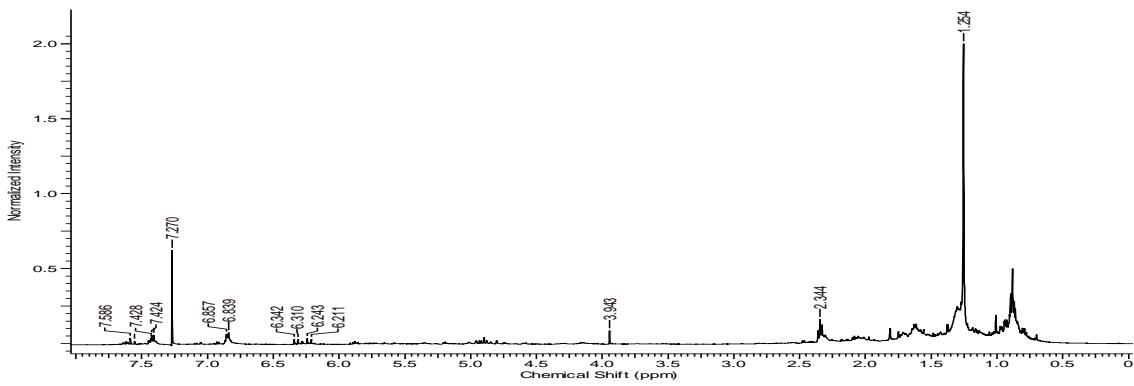


Figura 14: Espectro de RMN de H<sup>1</sup> da fração Vm-F15-16 do extrato em acetato de etila de *Verbesina macrophylla* (Vm).

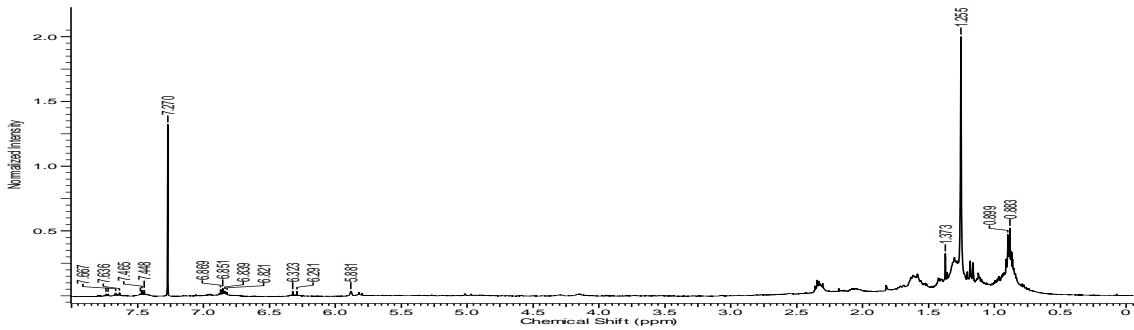


Figura 15: Espectro de RMN de H<sup>1</sup> da fração Vm-F17-18 do extrato em acetato de etila de *V. macrophylla* (Vm).

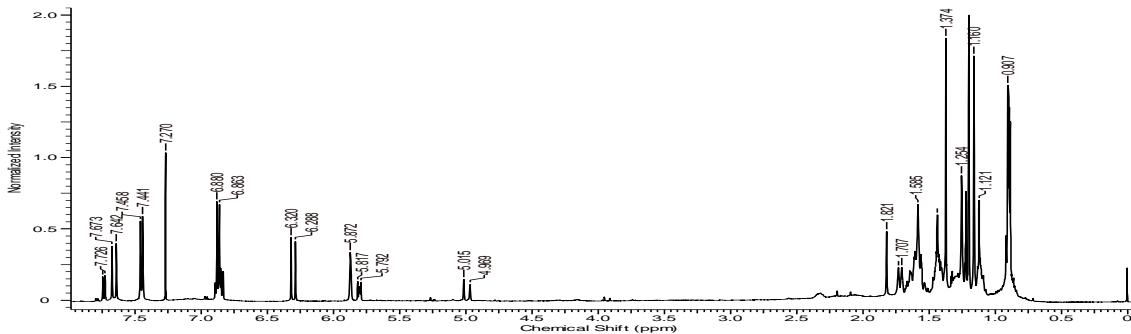


Figura 16: Espectro de RMN de H<sup>1</sup> da fração Vm-F19-20 do extrato em acetato de etila de *Verbesina macrophylla* (Vm).

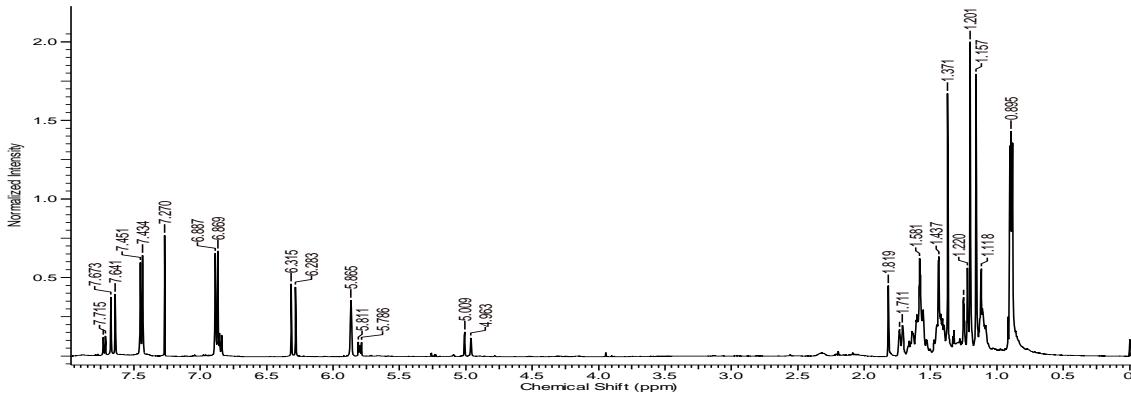


Figura 17: Espectro de RMN de H<sup>1</sup> da fração Vm-F21-22 do extrato em acetato de etila de *Verbesina macrophylla* (Vm).

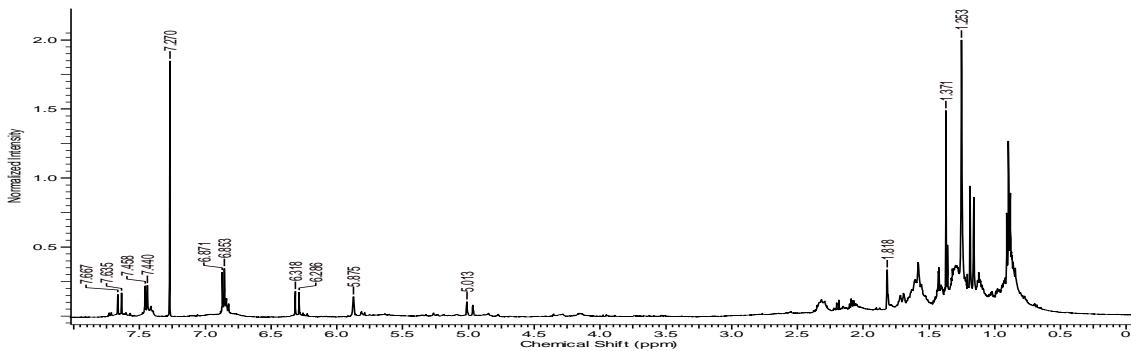
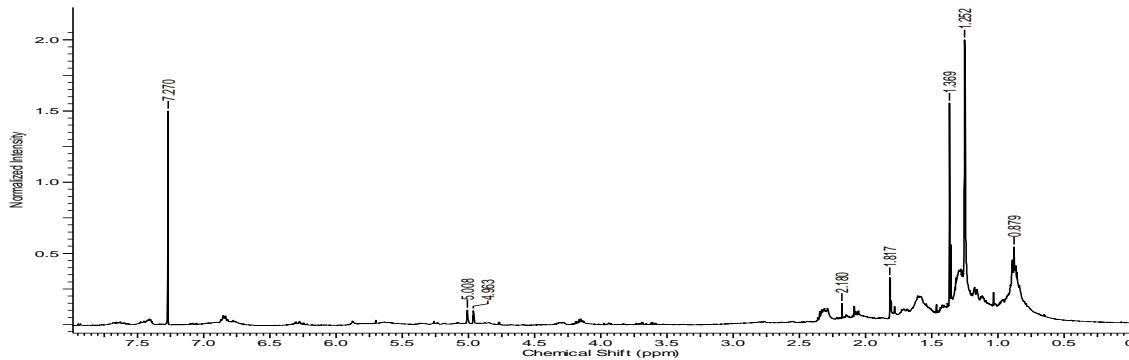


Figura 18: Espectro de RMN de H<sup>1</sup> da fração Vm-F23-24 do extrato em acetato de etila de *Verbesina macrophylla* (Vm).



Os espectros de RMN de H<sup>1</sup> (Vm-F1 - VmF10) apresentam um conjunto de sinais que sugerem a predominância de componentes do tipo ácido graxos. Vm-F1 e Vm-F2, com maior grau de pureza, se apresentaram como um sólido branco e amorfos. De Vm-F11 a Vm-F16 aparecem sinais, entre δ 6,2 e 7,4 ppm, típicos de compostos que apresentam grupamento aromático. Em menor proporção um conjunto de sinais sugestivos da presença de componentes de natureza terpênica, entre δ 2,34 e 0,82.

Entre as frações Vm-F17 a Vm-F22, há um conjunto de sinais bastante semelhantes, com predominância para sinais de componentes aromático e de terpenos, porém com maior grau de pureza na fração Vm-F19-20. Por isso, foi a amostra escolhida para realização de novos experimentos de RMN. Representados pelos espectros de RMN de H<sup>1</sup> (Figura 19), e suas ampliações (19.1 - 19.3) e pelos espectros de RMN: C<sup>13</sup>, DEPT, HSQC e HMBC (Figuras 20, 21, 22 e 23). O espectro da fração Vm-F23-24 apresentou baixo grau de pureza. Mostra sinais em δ 5,08 e 4,96 de hidrogênio ligados a carbono olefínico, presente em componente de natureza terpênica, com a possível presença de um contaminante graxo (δ 1,25).

Figura 19: Espectro de RMN de H<sup>1</sup> da fração (Vm-F19-20) do extrato em acetato de etila de *Verbesina macrophylla* (Vm). Os dados espectrais foram adquiridos em espectrômetro Varian INOVA 500, operando a 500 MHz para o H<sup>1</sup> e a 125 MHz para o C<sup>13</sup>.

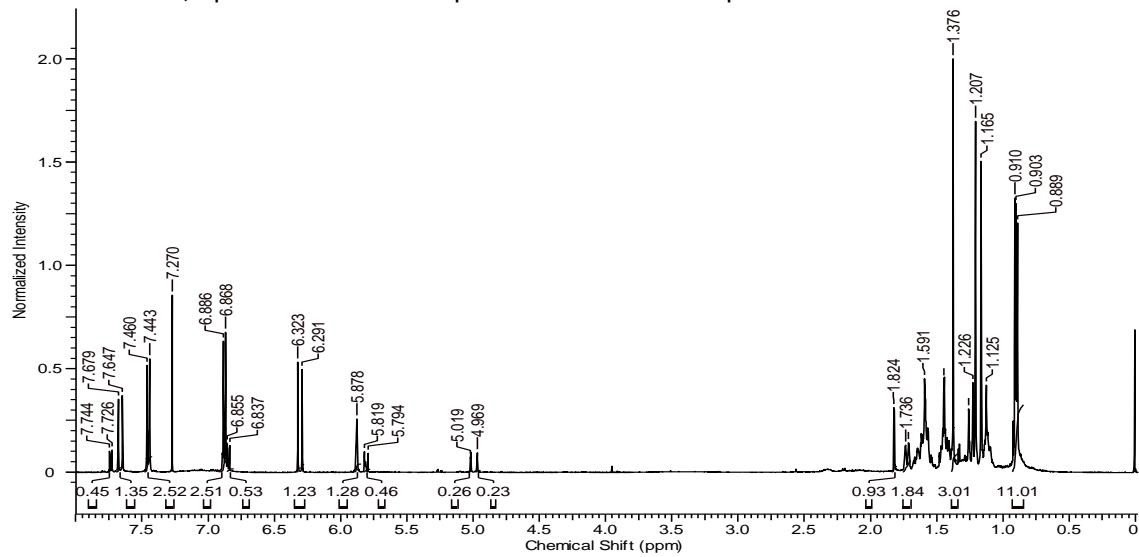


Figura 19.1: Ampliação do espectro de RMN de H<sup>1</sup> da fração (Vm-F19-20) do extrato em acetato de etila de *Verbesina macrophylla* (Vm). Os dados espectrais foram adquiridos em espectrômetro Varian INOVA 500, operando a 500 MHz para o H<sup>1</sup> e a 125 MHz para o C<sup>13</sup>.

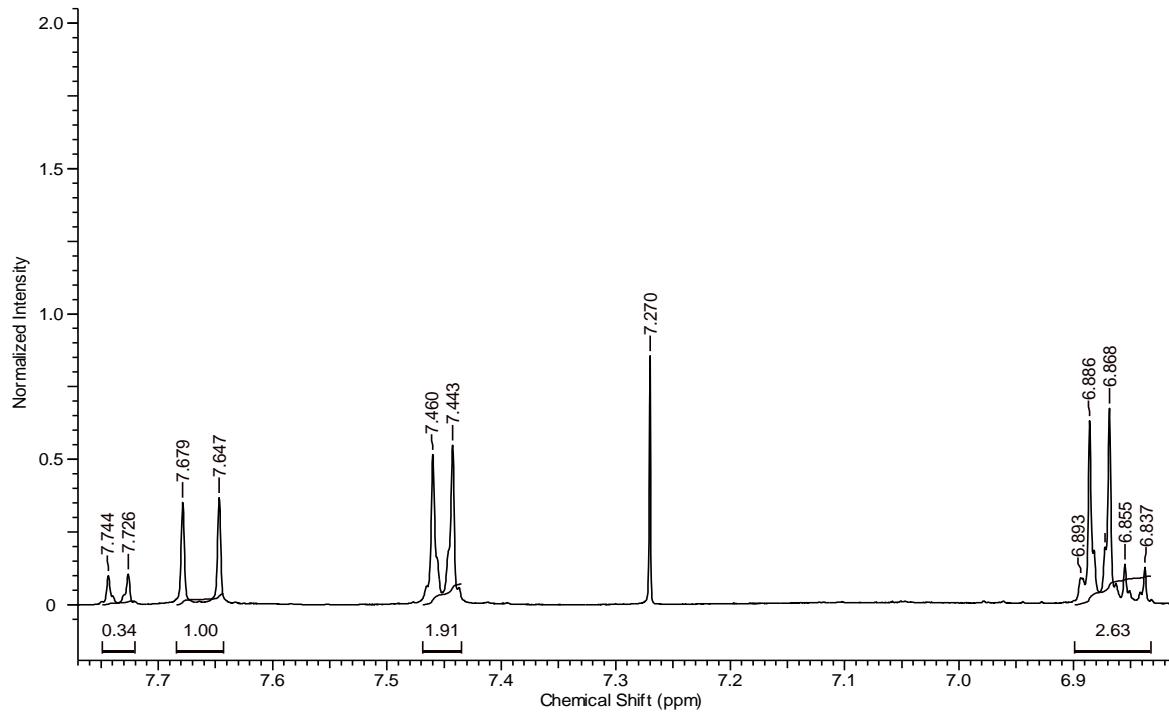


Figura 19.2: Ampliação do espectro de RMN de H<sup>1</sup> da fração (Vm-F19-20) do extrato em acetato de etila de *Verbesina macrophylla* (Vm). Os dados espectrais foram adquiridos em espetrômetro Varian INOVA 500, operando a 500 MHz para o H<sup>1</sup> e a 125 MHz para o C<sup>13</sup>.

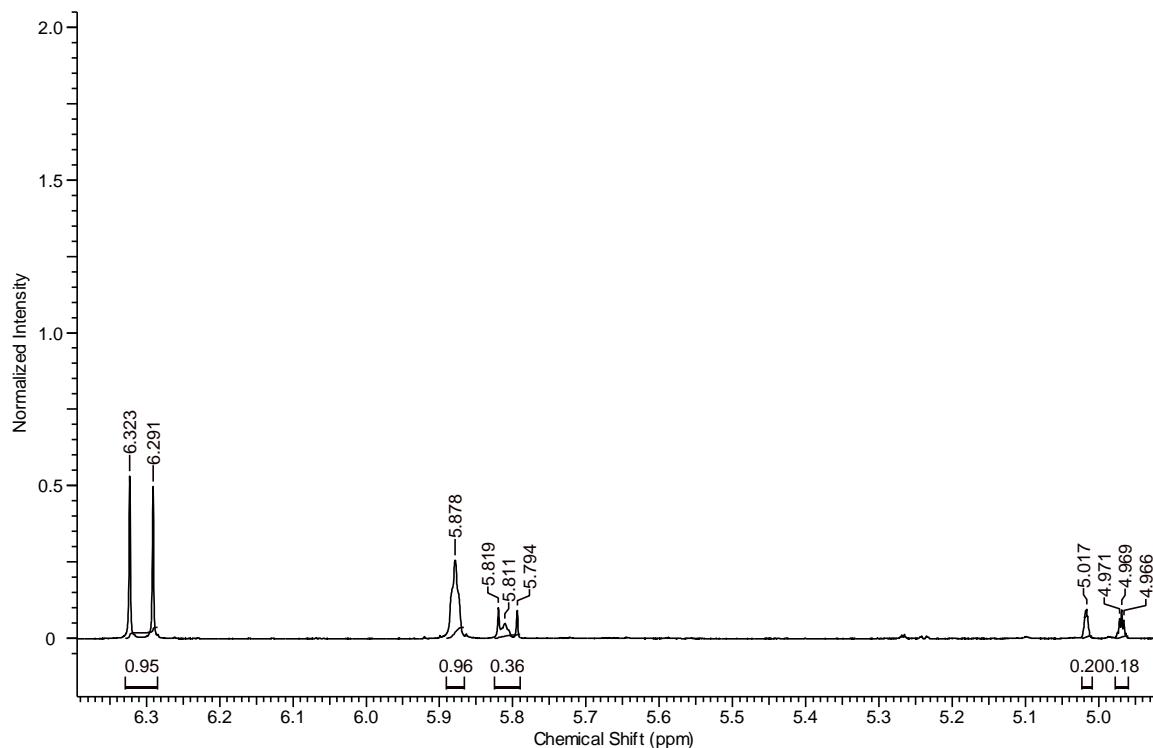


Figura 19.3: Ampliação do espectro de RMN de H<sup>1</sup> da fração (Vm-F19-20) (figuras. 19 -19.2) do extrato em acetato de etila de *Verbesina macrophylla* (Vm). Os dados espectrais foram adquiridos em espetrômetro Varian INOVA 500. Operando a 125 MHz.

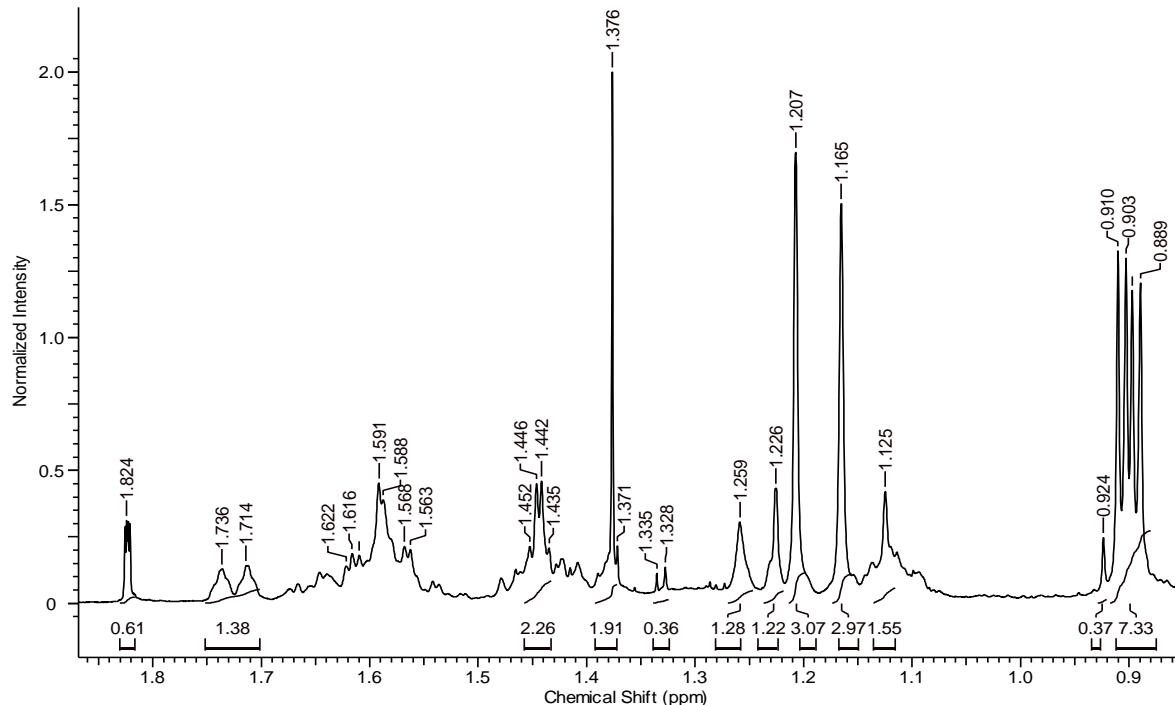


Figura 20: Espectro de RMN de C<sup>13</sup> da fração (Vm-F19-20) do extrato em acetato de etila de *Verbesina macrophylla* (Vm). Os dados espectrais foram adquiridos em espectrômetro Varian INOVA 500. Operando a 125 MHz.

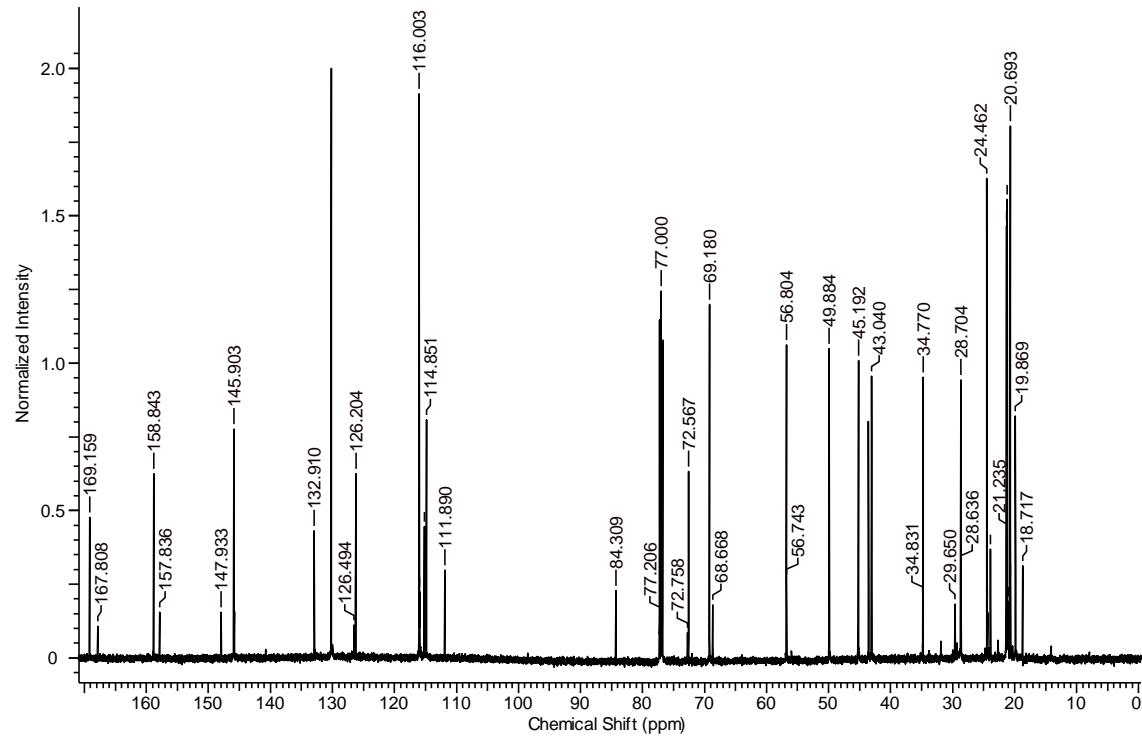


Fig. 21: Espectro de RMN de DEPT da fração (Vm-F19-20) do extrato em acetato de etila de *Verbesina macrophylla* (Vm). Os dados espectrais foram adquiridos em espectrômetro Varian INOVA 500. Operando a 125 MHz.

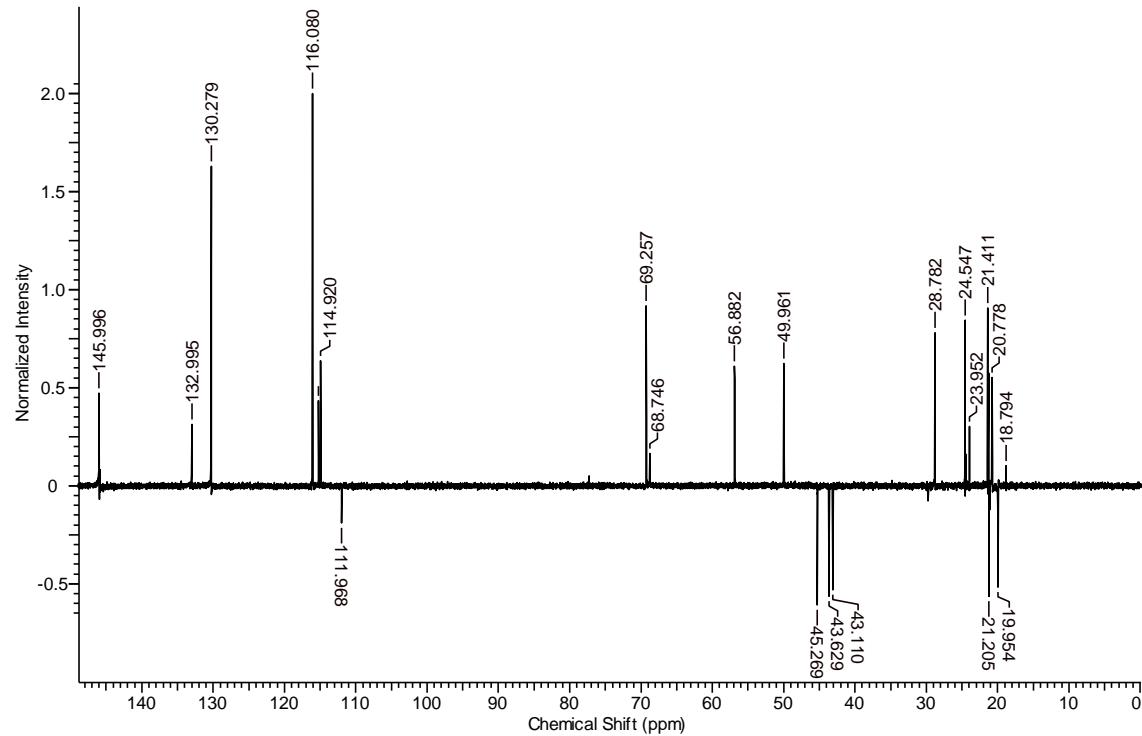


Figura 22: Espectro de RMN de HSQC da fração (Vm-F19-20) do extrato em acetato de etila de *Verbesina macrophylla* (Vm). Os dados espectrais foram adquiridos em espectrômetro Varian INOVA 500. Operando a 125 MHz.

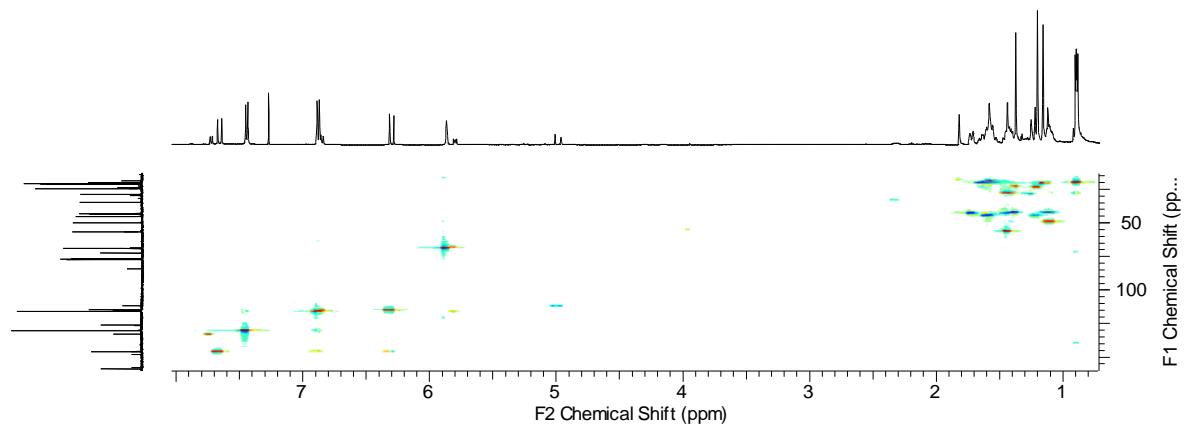


Figura 23: Espectro de RMN de HMBC da fração (F19-20) do extrato em acetato de etila de *Verbesina macrophylla* (Vm). Os dados espectrais foram adquiridos em espectrômetro Varian INOVA 500. Operando a 125 MHz.

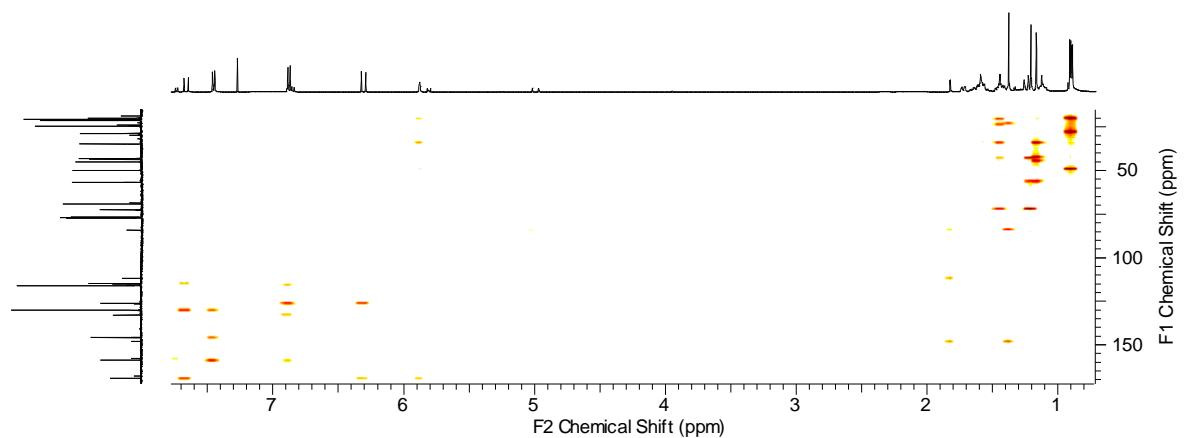
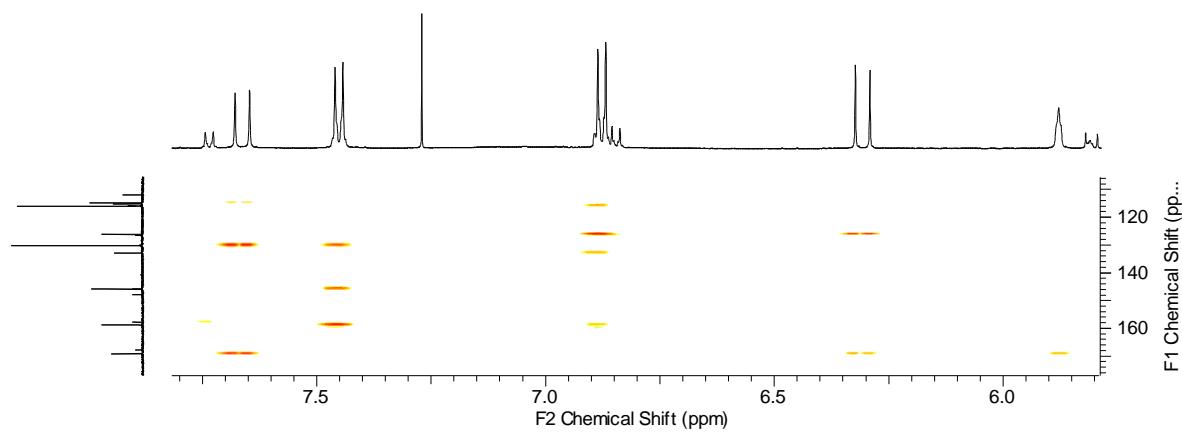


Figura 23.1: Ampliação do espectro de RMN de HMBC da fração (Vm-F19-20) do extrato em acetato de etila de *Verbesina macrophylla* (Vm). Os dados espetrais foram adquiridos em espectrômetro Varian INOVA 500. Operando a 125 MHz.



O espectro de RMN de  $\text{H}^1$  (Figura 19) da fração Vm-19-20 mostra um conjunto de sinais, característicos da presença de componente aromático e de dupla olefinica como parte estrutural dos constituintes moleculares, localizados entre  $\delta$  5,80 e 7,65 ppm. Entre eles observa-se que há uma diferença de intensidade. A integração dos sinais revelou que o componente majoritário corresponde aproximadamente a 70 % da amostra, caracterizado pelos sinais: 7,65 (d) integrando para 1H( 16,0 Hz); 7,45 (d), integrando para dois H (8,5 Hz); 6,87 d (8,5Hz, 1H); 6,32 d (16,0 Hz); 5,87 s l e o de menor proporção, próximo de 30 %, pelos sinais: 7,73 d, integrando para 1H( 12,0 Hz); 6,88 (d), integrando para dois H (8,5 Hz); 6,84 d (8,5Hz, 1H); 5,80 d (12,0 Hz); 5,81 s l. Na região de menor proteção entre  $\delta$  0,88 e 1,82 um conjunto de sinais característicos de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos que sugerem a presença de um grupamento com esqueleto terpênico.

No espectro de RMN  $\text{C}^{13}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (Figura 20), verificou-se a presença de 56 sinais. Os quais, em comparação com espectro de DEPT (Figura 21), permitiram determinar a presença de 11 sinais referentes a carbonos não hidrogenados, 11 de carbonos metínicos, 13 metilênicos e 07 metílicos. A análise dos dados da Tabela 11, juntamente com as correlações observadas nos espectros de HSQC / HMBC (Figuras 22 e 23, respectivamente) e pela comparação com a literatura (Tabela 11), (BOHLMAN et al., 1980; XU et al., 2010) permitiram sugerir que a fração Vm-F9-20 se trata de uma mistura dos isômeros 6-O- $\beta$ -E-p-cumorail-4 $\alpha$ -hidroxieudesmano (Vm-A),

com aproximadamente 70% e do 6-O- $\beta$ -Z-p-cumorail-4 $\alpha$ -hidroxieudesmano (Vm-B) com aproximadamente 30% (Figura 24).

Figura 24: Componentes majoritários da fração (F19-20) do extrato em acetato de etila de *Verbesina macrophylla* (Vm).

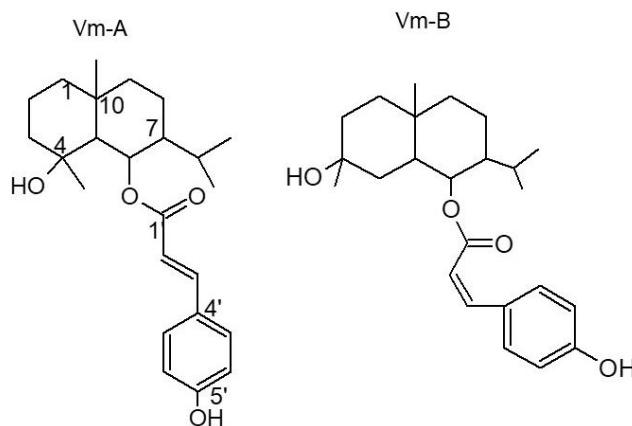


Tabela 11: Dados espectrais de RMN de H<sup>1</sup>, C<sup>13</sup> e HMBC dos componentes da fração (Vm-F19-20) do extrato em acetato de etila de *Verbesina macrophylla* (Vm) em comparação com dados da literatura.

Dados das amostras					(BOHLMANN, 1980) / (XU et al., 2010).		
A			B		A	B	
C	C1 <sup>3</sup>	H <sup>1</sup>	C1 <sup>3</sup>	H <sup>1</sup>	C1 <sup>3</sup>	H <sup>1</sup>	C1 <sup>3</sup>
1	45,19	1,57	45,19		45,5		45,5
2	19,86	1,86	19,84		20,1		20,1
3	43,04	1,72	43,04		43,9	1,69	43,9
4	72,56	---	72,75	-----	72,7	-----	72,7
5	56,80	1,44	56,74	1,37	57,1	1,43 m	57,1
6	69,18	5,86	68,66		68,9	5,86 br	68,9
7	49,88	1,11	49,85		50,1		50,1
8	21,12	1,48	21,01		21,2		21,2
9	43,56	1,44	43,56		43,3		43,3
10	34,77	---	34,83	-----	35,0	-----	35,0
11	28,90	1,44	28,63		28,8	1,43 m	28,8
12	21,33	0,90 d	21,23		21,5	0,92 d	21,5
13	21,18	0,89 d	21,12		21,4	0,90 d	21,4
14	20,69	1,15	20,65		20,8	1,16 s	20,8
15	24,46	1,20	24,37		24,5	1,19 s	24,5
1'	169,15	---	167,80	-----	168,0	-----	168,0
2'	114,85	6,30 d [16,0Hz]	115,16	5,78 d [12,0Hz]	115,4	6,31 d	115,4
3'	145,90	7,65 d [16,0Hz]	145,70	6,86 d [12,0Hz]	146,1	7,65 d	146,1
4'	126,20	---	126,49	-----	126,5	-----	126,5

5'	116,02	7,44 d [8,5Hz]	115,16	7,72 [8,5Hz]	115,9	7,46 d	115,9
6'	130,20	6,88 d [8,5Hz]	132,91	6,85 [8,5Hz]	133,2	6,85 d	133,2
7'	158,84	----	157,83	-----	157,8	-----	157,8
8'	130,20	6,88 d [8,5Hz]	132,91	6,85 [8,5Hz]	133,2	6,85 d	133,2
9'	116,02	7,44 d [8,5Hz]	115,16	7,72 [8,5Hz]	115,9	7,46 d	115,9

Fonte: Elaborado pela autora (2022)

## 5 CONCLUSÃO

O presente trabalho possibilitou ampliar o conhecimento científico relacionado ao metabolismo secundário e atividade biológica da espécie *Verbesina macrophylla* (Cass). Blake (Asteraceae), colaborando para a valorização da flora do Brasil.

A investigação fitoquímica realizada com o extrato bruto Acetato de Etila oriundo das folhas de *Verbesina macrophylla*, utilizando-se como base à fração em Hexano e Acetato de Etila, permitiu o isolamento de duas substâncias já descritas na literatura (6-O-b-E-p-coumaroyl-4a-hydroxyeudesmane e 6-O-b-Z-p-coumaroyl-4a-hydroxyeudesmane), das quais tiveram a sua atividade biológica relatada pela primeira vez neste estudo.

Os extratos brutos em Hexano, Acetato de Etila e Etanol apresentaram-se ativos contra Bactérias Gram-positivas e contra as cepas fúngicas filamentosas e leveduriformes.

A partir dos dados obtidos no ensaio de citotoxicidade não houve hemólise para o extrato bruto Acetato de Etila, enquanto o extrato em Hexano apresentou ligeira hemólise apenas na maior concentração testada, no entanto, é importante salientar a necessidade de que mais estudos frente células sanguíneas humanas *in vitro* além de estudos *in vivo* precisam ser realizados para confirmar o perfil toxicológico dos extratos.

Quando avaliada a atividade biológica das 51 frações obtidas do extrato Acetato de Etila, observa-se melhor efeito tanto antibacteriano quanto antifúngico nas frações apolares. Entretanto as análises químicas não conseguiram identificar todos os compostos presentes nas amostras devido à grande complexidade na realização de estudos fitoquímicos. Assim novas análises são necessárias a fim de isolar e caracterizar esses compostos, alguns presentes até de forma expressiva em frações que apresentaram boa atividade, pois é importante realizar a associação dos constituintes químicos das frações com as atividades biológicas observadas.

Os compostos encontrados na fração Vm-19-20 estão relacionados com a atividade biológica observada nos testes preliminares com o extrato bruto acetato de etila, indicando uma possível aplicação contra infecções bacterianas, podendo futuramente servir como base para que sejam desenvolvidos medicamentos com essa finalidade, sendo necessário novos estudos desta fração para melhor análise biológica frente essa atividade.

Os dados de RMN demonstraram que os metabólitos responsáveis pela atividade antifúngica das frações são majoritariamente ácidos graxos. Dessa forma sugere-se novos estudos para caracterizar tais substâncias, bem como realizar novas análises biológicas frente essa atividade.

De acordo com a cinética de morte microbiana a fração FVM19-20 apresenta efeito bacteriostático dependente da concentração, para a cepa *Bacillus subtilis* já que o aumento da concentração potencializa a inviabilidade das células bacterianas.

## REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F; FREITAS, P. F; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known amedicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 114-140, 2007.
- AL-DABBAS, M. M. et al. Antibacterial activity of an eudesmane sesquiterpene isolated from common *Varthemia*, *Varthemia iphionoides*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 237-240, 2005.
- ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, 2001.
- ALLINGTON, D R.; RIVEY, M. P. Quinupristin/dalfopristin: a therapeutic review. **Clinical therapeutics**, v. 23, n. 1, p. 24-44, 2001.
- ALMEIDA, S. P D et al. Cerrado: espécies vegetais úteis. **Planaltina: Embrapa-CPAC**, v. 464, 1998.
- AL-OQAIL, M. M. et al. *Verbesina encelioides*: cytotoxicity, cell cycle arrest, and oxidative DNA damage in human liver cancer (HepG2) cell line. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 16, n. 1, p. 1-10, 2016.
- ALVES, M. et al. Unveiling the antifungal potential of two Iberian thyme essential oils: effect on *C. albicans* germ tube and preformed biofilms. **Frontiers in pharmacology**, v. 10, p. 446, 2019.
- Alves, M. V. D., Kleibert, K. R. U., Beber, S. C., Plestsh, M U., Staudt, K. J., Alves, I. A., Colet, C. de F. Atividade antibacteriana de óleos essenciais frente à *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. **Revista de Biotecnologia & Ciência**, v. 11(1), p.32-42, 2022.
- AMARO-LUIS, J. M. et al. Eudesmane derivatives from *Verbesina turbacensis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, p. 352-357, 2002.
- ANDRADE, F. A. **Atividade de compostos naturais e sintéticos na presença de espécies de Candida**. 2017. 61 f. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.
- ARAÚJO, N. R. R. **Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre microrganismos relacionados à lesão de mucosite oral**. 2010. 99f. 2010. Dissertação (Mestrado Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Pará, Pará.
- BAKER, J. G. Compositae. III. Asteroideae, Inuloideae. **Flora brasiliensis**, v. 6, n. 3, p. 1-134, 1882.

BARNES, J.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D. **Fitoterápicos (Porto Alegre: Artmed).** 2012.

BASILE, A. et al. Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. **Fitoterapia**, v. 71, p. S110-S116, 2000.

BATT, C. *Bacillus cereus*. In: BATT, C. A.; TORTORELLO, M. L. **Encyclopedia of food microbiology**. London: Elsevier, v. 1, ed. 2, p. 125-128, 2014.

BAYOUB, K. et al. Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against *Listeria monocytogenes* and some other pathogenic strains. **African Journal of Biotechnology**, v.9, n.27, p.4251-4258, 2010.

BERTINI, L. M.; PEREIRA, A.F.; OLIVEIRA, C. L. L.; MENEZES, E. A.; MORAIS, S. M.; CUNHA, F. A.; CAVALCANTI, E. S. B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Informa**, v.17, n. 3/4, p. 80-83, 2005.

BEZERRA, D. A. C. **Estudo fitoquímico, bromatológico e microbiológico de Mimosa tenuiflora (Wild) Poiret e Piptadenia stipulacea (Benth) Ducke**. 2008. 61 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Paraíba, Brasil, 2008. Disponível em: <http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/jspui/handle/riufcg/2987>. Acesso em 28 maio 2022.

BEZERRA, L. D. A. et al. Leaf blade structure of *Verbesina macrophylla* (Cass.) FS Blake (Asteraceae): ontogeny, duct secretion mechanism and essential oil composition. **Plant Biology**, v. 20, n. 3, p. 433-443, 2018

BHATTACHARYA, S. Medicinal plants and natural products in amelioration of arsenic toxicity: a short review. **Pharmaceutical biology**, v. 55, n. 1, p. 349-354, 2017.

BOHLMANN, F., GRENZ, M., GUPTA, K., DHAR, A. K., AHMED, M., KING, R. M; ROBINSON, H. Eudesmane derivates from *Verbesina* species. **Phytochemistry**, (Oxford) V.19, p.2391-2397, 1980.

BOTTA, B. et al. Novel hypotensive agents from *Verbesina caracasana*: Structure, synthesis and pharmacology. **Current medicinal chemistry**, v. 10, n. 18, p. 1845-1862, 2003.

BRAIBANTE, M. E. F. et al. A química dos chás. **Química Nova na escola**, v. 36, n. 3, p. 168-175, 2014.

BRASIL M DA, S.; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DAS DOENÇAS, Transmissíveis. **Plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos no âmbito da saúde única 2018-2022 (PAN-BR)**. 2018.

**BRASIL. Farmacopeia Brasileira volume 1 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Brasília: Anvisa, 546p, 2010.

**BRASIL.** Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPICT-SUS** / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. - Brasília: Ministério da Saúde, 2006. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pnpic.pdf>. Acesso em: 18 abril 2022

**BRASIL.** Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais Rename /** Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília: Ministério da Saúde, 2022. Disponível em:[https://www.gov.br/saude/ptbr/composicao/seccs/daf/cbaf/qualifarsus/arquivos/20210367-rename\\_2022\\_final.pdf](https://www.gov.br/saude/ptbr/composicao/seccs/daf/cbaf/qualifarsus/arquivos/20210367-rename_2022_final.pdf). Acesso em: 18 abril 2022.

BRESCIANIA, L. F. V. et al. Seasonal variation of kaurenoic acid, a hypoglycemic diterpene present in *Wedelia paludosa* (Acmella brasiliensis) (Asteraceae). **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 59, n. 3-4, p. 229-232, 2004.

BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. Ciências Farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. **Editora Univali, Itajaí, Santa Catarina, Brasil**, 2003.

BUEHRLE, D. J. et al. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: risk factors for mortality and microbiologic treatment failure. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 1, p. e01243-16, 2017.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, vol. 55, n3, p. 37-39, 2003.

CANTUÁRIA, V. L. **Estudo fitoquímico e atividades biológicas da espécie Eremanthus erythropappus (DC) MacLeish (Asteraceae)**. 2018. 200 p. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2018.

CARVALHO, C. E. et al. Monitoramento microbiológico sequencial da secreção traqueal em pacientes intubados internados em unidade de terapia intensiva pediátrica. **Jornal de Pediatria**, v. 81, p. 29-33, 2005.

CARVALHO, G.J.A.; CARVALHO, M.E. Diterpenos, triterpenos e esteroides das flores da *Wedelia paludosa*. **Quim. Nova**, v. 24, n.1, p. 24-26, 2001.

CAVALCANTI, S. M. M et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a university hospital. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, p. 56-63, 2005.

CECHINEL FILHO, V. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI. **Química Nova**, v. 23, p. 680-685, 2000.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estudo químico de plantas medicinais orientado para análise biológica. **Obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos**. Chapecó: Argos Editora Universitária. 523p, 2001.

COLEBUNDERS, R. et al. Prosthetic valve endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Micrococcus* species successfully treated with rifampicin combined with other antibiotics. **Journal of Infection**, v. 11, n. 1, p. 35-39, 1985.

COLLE, G. J. et al. **"Microbiologia médica"**: Fundação Calouste Gulbenkian. 6<sup>a</sup> Edição. 1993.

CONTRUCCI, B. A. et al. Efeito de óleos essenciais sobre bactérias gram-negativas isoladas de alimentos. **Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 23, n. 3, p. 180-184, 2019.

CORREA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. In: **Dicionário das plantas uteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. p. 747-747. 1926.

COSTA, J. G. M. et al. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzygium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 304-309, 2005.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CRONQUIST, A. The evolution and classification of flowering plants. 2. ed. New York: **New York Botanical Garden**, p. 417, 446, 514, 1988.

CUNHA, A. L. et al. Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. **Diversitas Journal**, v. 1, n. 2, p. 175-181, 2016.

DA CUNHA N. C. **Caracterização físico-química e atividade antifúngica dos óleos essenciais da cúrcuma**. 2006. 61 p. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2006.

DA SILVA FILHO, A. A et al. Atividade antileishmania, antiplasmódial e citotóxica in vitro de compostos fenólicos e triterpenóides de *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Fitoterapia**, v. 80, n. 8, pág. 478-482, 2009.

DA SILVA, R. Z. et al. Investigação fitoquímica e avaliação da atividade antibacteriana da *Mikania lanuginosa* DC (Asteraceae). **Visão acadêmica**, v. 3, n. 2, 2002.

- DE ABREU, P. A. P; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana dos extratos de *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Sabios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 5, n. 2, 2010.
- DE ARAÚJO SILVA, F; BIZERRA, A. M. C.; FERNANDES, P. R. D. Testes fitoquímicos em extratos orgânicos de *Bixa orellana* L (Urucum). **Holos**, v. 2, p. 484-498, 2018.
- DE HARO MORENO, A. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotoxicidade hemolítica em diferentes extratos vegetais. **Arquivos de Ciências Da Saúde**, v. 25, n. 1, p. 11-12, 2018.
- DE MATOS, V. A. M. et al. Investigação da atividade antibacteriana de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). **Visão Acadêmica**, v. 2, n. 1, 2001.
- DE VERAS, B. O. et al. The essential oil of the leaves of *Verbesina macrophylla* (Cass.) SF Blake has antimicrobial, anti-inflammatory and antipyretic activities and is toxicologically safe. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 265, p. 113248, 2021.
- DEL FIOL, F. D. S. et al. Perfil de prescrições e uso de antibióticos em infecções comunitárias. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p. 68-72, 2010.
- DENNING, David W. Invasive aspergillosis. **Clinical infectious diseases**, p. 781-803, 1998.
- DO NASCIMENTO MARTINEZ, L. et al. Avaliação Etnobotânica das Espécies das Famílias Asteraceae e Lamiaceae Utilizadas com Potencial Medicinal na Região de Porto Velho–Rondônia. **Interfaces Científicas-Saúde e Ambiente**, v. 8, n. 2, p. 431-445, 2020.
- DÖBEREINER, J; DE REZENDE, A. M. L; TOKARNIA, C. H. Intoxicação experimental por *Baccharis coridifolia* em coelhos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 11, n. 9, p. 27-35, 1976.
- DORMAN, H. J. D; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of applied microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.
- DUFFY, C. F.; POWER, R. F. Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. **International journal of antimicrobial agents**, v. 17, n. 6, p. 527-530, 2001.
- DUTRA, F. S. G. et al. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais frente à bactérias de importância médica. **Biológicas & Saúde**, v. 6, n. 20, 2016.
- ERBAŞ, S; BAYDAR, H. Defoliation effects on sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed yield and oil quality. **Turkish Journal of Biology**, v. 31, n. 2, p. 115-118, 2007.

- ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v.64, p.711–713., 1998.
- EMERENCIANO, V. P. et al. Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. **Biochemical systematics and ecology**, v. 29, n. 9, p. 947-957, 2001.
- ESTRELA, T. S. Resistência antimicrobiana: enfoque multilateral e resposta brasileira. **Brasil. Ministério da Saúde. Saúde e Política Externa: os**, v. 20, p. 1998-2018, 2018.
- EZZAT, S. M. et al. Antiprotozoal activity of major constituents from the bioactive fraction of *Verbesina encelioides*. **Natural product research**, v. 31, n. 6, p. 676-680, 2017.
- FAGUNDES, N. C. A., OLIVEIRA, G. L., SOUZA, B. G. D. Etnobotânica de plantas medicinais utilizadas no distrito de Vista Alegre, Claro dos Poções-Minas Gerais. **Revista Fitos**, 11, 62-80. 2017.
- FARIA, F. D. C. **Estudo fitoquímico e avaliação de potencial tóxico da espécie *Ageratum fastigiatum* (Gardner) RM King & H. Rob (Asteraceae)**. 2019. 88 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.
- FELIPE, L. O; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos. **Química Nova na Escola**, v. 39, n. 02, p. 120-130, maio 2017.
- FENNELL, C. W et al. Avaliação de plantas medicinais africanas quanto à eficácia e segurança: triagem farmacológica e toxicologia. **Journal of ethnopharmacology**, v. 94, n. 2-3, pág. 205-217, 2004.
- FERNANDES, Prabhavathi. Antibacterial discovery and development—the failure of success? **Nature biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1497-1503, 2006.
- FLORES, M. M. **Evaluación genotóxica de extractos y compuestos obtenidos de *Verbesina persicifolia* DC**. 2010. 75 f. Dissertação (Mestrado Biología Experimental) – Universidad Nacional Autónoma de México, 2010.
- FLORES-SANCHEZ, I. J. et al. Elicitation studies in cell suspension cultures of *Cannabis sativa* L. **Journal of biotechnology**, v. 143, n. 2, p. 157-168, 2009.
- FOSSE, T. et al. Meningitis hervorgerufen durch *Micrococcus luteus*. **Infection**, v. 13, p. 280-281, 1985.
- FREIRE, J. C. P. et al. Atividade antifúngica de fitoterápicos sobre espécies de *Candida*: uma revisão de literatura. **Archives Of Health Investigation**, v. 5, n. 6, 2016.

FUMAGALI, E et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 04, p. 627-641, out/dez 2008.

FUNK, V. A. et al. Classification of Compositae. In: Systematics, evolution and biogeography of Compositae. **IAPT, Austria**. p. 171-176, 2009

GARCIA, A. A resistência dos fungos como consequência da utilização de fungicidas sistêmicos: mecanismos de resistência, monitoramento e estratégias anti-resistência. **Porto Velho: Embrapa-CPAF Rondônia**, 1999. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/704150>. Acesso em 26 de maio 2022.

GARCIA, C. C. et al. Evaluation of the antiviral activity against Junin virus of macrocyclic trichothecenes produced by the hypocrealean epibiont of *Baccharis coridifolia*. **Planta medica**, v. 68, n. 03, p. 209-212, 2002.

GHOSH, T. et al. In-vitro study on the hemolytic activity of different extracts of Indian medicinal plant *Croton bonplandianum* with phytochemical estimation: a new era in drug development. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 8, n. 4, p. 155-160, 2018.

GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; QUEIROZ, L. P.; WANDERLEY, M. G. L.; BERG, C. V. D.; Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Mega diversidade**, Volume 1, nº 1, 2005.

GOBBO-NETO, L; LOPES, N. P. Plantas Medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 02, p. 374-381, 2007.

GÓES, V. F. F. **Ação de extratos, óleos essenciais e frações isoladas de plantas medicinais sobre a formação do biofilme em *Candida* spp.** 2009. 141 f. Tese (doutorado em Biologia Buco-Dental), UNICAMP, Piracicaba, SP, 2009.

GOŁAŚ, M. et al. Tendências na suscetibilidade antifúngica de espécies de *Candida* - observação de um ano. **Polish Journal of Microbiology** , v. 63, n. 2, pág. 217, 2014.

GÓMEZ, J. et al. Candidemias nosocomiales: nuevos retos de un problema emergente. **Rev. esp. quimioter**, p. 158-168, 2010.

GONÇALVES, D. M. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. 2, p. 197–202, 2011.

GONÇALVES, J. M. **Atividades biológicas e composição química dos óleos essenciais de *Achyrocline satureoides* (Lam) DC e *Ageratum conyzoides* L. encontradas no semiárido baiano.** 2015, 111f. Tese (Doutorado Acadêmico em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2015.

GRIECO, D.; PIEPOLI, G. Composition en acides gras des huiles végétales alimentaires. **Oléagineux**, v. 22, p. 611-612, 1967.

GUALTERI, M. et al. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Verbesina turbacensis* Kunth, HBk. **Revista Latinoamericana de Quimica**, v. 33, n. 3, p. 128, 2005.

HABERMEHL, G. G. et al. Macrocyclic trichothecenes: cause of livestock poisoning by the Brazilian plant *Baccharis coridifolia*. **Toxicon**, v. 23, n. 5, p. 731-745, 1985.

HAPPI, C. T. et al. Polymorphisms in Plasmodium falciparum dhfr and dhps genes and age related in vivo sulfadoxine-pyrimethamine resistance in malaria-infected patients from Nigeria. **Acta tropica**, v. 95, n. 3, p. 183-193, 2005.

HARBORNE, J. B. Classes and functions of secondary products from plants. In: **Chemicals from plants: perspectives on plant secondary products**. P.1-25, 1999.

HARTMANN, Thomas. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22-24, p. 2831-2846, 2007.

HEARD, S. C.; WU, G; WINTER, J. M. Antifungal natural products. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 69, p. 232-241, 2021.

HEIMESAAT, M. M. et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* accelerate intestinal, extra-intestinal, and systemic inflammatory responses in human microbiota-associated mice with subacute ileitis. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 49, 2019.

HELAL, I. M. et al. Antimicrobial efficiency of essential oils from traditional medicinal plants of Asir region, Saudi Arabia, over drug resistant isolates. **BioMed research international**, v. 2019, 2019.

HENRIQUES, A. T; KERBER, V. A; MORENO, P. R. H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 1999

HENRY, J. B. **Diagnósticos Clínicos por Métodos laboratoriais**. 18. Ed. São Paulo: Manole, 1995.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p.1027-1031, 2002.

HORCAJADA, J. P. et al. Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Clinical microbiology reviews**, v. 32, n. 4, p. e00031-19, 2019.

JAKUPOVIC, J. et al. Further eudesmane derivatives from *Verbesina* species. **Planta medica**, v. 53, n. 01, p. 39-42, 1987.

JANSEN, J. J. et al. The photographer and the greenhouse: how to analyse plant metabolomics data. **Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques**, v. 21, n. 1, p. 48-60, 2010.

JEFFREY, C.; KADEREIT, J. W.; JEFFREY, C. Compositae: Introduction with key to tribes. Families and Genera of Vascular Plants, Vol. VIII, Flowering Plants, Eudicots, Asterales (Editör: Kubitzki). **Springer-Verlag, Berlin**, v. 61, p. 87, 2007.

JIANG, B. et al. PAP inhibitor with in vivo efficacy identified by *Candida albicans* genetic profiling of natural products. **Chemistry & biology**, v. 15, n. 4, p. 363-374, 2008.

KARIS, P. O. & RYDING O. Tribe Heliantheae. In: BREMER, K. (ed.) Asteraceae. Cladistics and Classification. **Portland: Timber Press**. p. 559-625. 1994.

KATO, T. et al. Sesquiterpenes with antibacterial activity from *Epaltes mexicana*. **Planta medica**, v. 62, n. 01, p. 66-67, 1996.

KHAN, M. A. S; AHMAD, I; CAMEOTRA, S. S. Phenyl aldehyde and propanoids exert multiple sites of action towards cell membrane and cell wall targeting ergosterol in *Candida albicans*. **AMB Express**, Heidelberg, v. 3, n. 1, p. 54, 2013.

KHAN, M. S. A.; AHMAD, I. Herbal Medicine: Current Trends and Future Prospects. In: **New Look to Phytomedicine**. Academic Press, p. 3-13, 2019.

KHWAIRAKPAM, Amrita Devi et al. *Acorus calamus*: a bio-reserve of medicinal values. **Journal of basic and clinical physiology and pharmacology**, v. 29, n. 2, p. 107-122, 2018.

KIM, H. K. et al. Metabolic classification of South American *Ilex* species by NMR-based metabolomics. **Phytochemistry**, v. 71, n. 7, p. 773-784, 2010.

KIM, H. K; CHOI, Y. H; VERPOORTE, Robert. NMR-based plant metabolomics: where do we stand, where do we go?. **Trends in biotechnology**, v. 29, n. 6, p. 267-275, 2011.

KIM, M; CHOI, G; LEE, H. Fungicidal property of *Curcuma longa* L. rhizome-derived curcumin against phytopathogenic fungi in a greenhouse. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 6, p. 1578-1581, 2003.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P.; Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada**, v. 30, n. 3, 2009.

KLEPSER, M. E. et al. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 5, p. 1207-1212, 1998.

KONG, K.F.; SCHNEPER, L.; MATHEE, K. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. **APMIS**, v. 118, n. 1, p. 1-36. 2010.

LAMBERT, P. A. Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. **Advanced drug delivery reviews**, v. 57, n. 10, p. 1471-1485, 2005.

LAZZARINI, C. et al. Acylhydrazones as antifungal agents targeting the synthesis of fungal sphingolipids. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 5, p. e00156-18, 2018.

LEITE, J. P. V. Química dos produtos naturais: Uma abordagem Biosintética. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**, p. 47-97, 2009.

LIMA, E. O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. **Chapecó: Argos**, 481-501, 532p, 2001

LIU, N. Q. et al. Metabolomic investigation of the ethnopharmacological use of Artemisia afra with NMR spectroscopy and multivariate data analysis. **Journal of ethnopharmacology**, v. 128, n. 1, p. 230-235, 2010.

LOBITZ, G. O. et al. Bornyl cinnamate derivatives with antiinflammatory activity from *Verbesina turbacensis*. **Pharmaceutical and pharmacological letters**, v. 8, n. 3, p. 115-118, 1998.

LOPEZ, A. M. Botânica no Inverno. São Paulo: **Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo**, 2012. 210 p.

LÓPEZ-MARTÍNEZ, R. Candidosis, a new challenge. **Clinics in dermatology**, v. 28, n. 2, p. 178-184, 2010.

LORENZI, H; MATOS, F. J. A. "Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas 2 ed.", **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, São Paulo, p. 544. 2021.

LOUREIRO, R. J. et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de saúde pública**, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016.

LOWY, Franklin D. *Staphylococcus aureus* infections. **New England journal of medicine**, v. 339, n. 8, p. 520-532, 1998.

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

MADDILA, S; HEMALATHA, K. P. J. Phytochemical screening and in vitro antimicrobial properties of crude leaf extracts of Wrightia tinctoria R. **Br. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 1, p. 707-720, 2017.

MAIA, G. L. de A. et al. p-Coumarate of borneol isolated of *Verbesina macrophylla*; p-Cumaratos de borneol isolados de *Verbesina macrophylla*. **Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, 2011.

MALHEIROS, A.; PERES, M. T. L. P. Alelopatia: interações químicas entre espécies. In: YUNES R. A, CALIXTO J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, p. 503-523, 2001.

MARR, K. A. et al. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 100, n. 13, p. 4358-4366, 2002.

MARTINEZ, L. N., RODRIGUES, F. L. S., SILVA, N. B., E. V., SANTOS, J. D., & COSTA, A. N. Avaliação etnobotânica das espécies das famílias Asteraceae lamiaceae utilizadas com potencial medicinal na região de porto velho–rondônia. **Interfaces Científicas-Saúde e Ambiente**, 8, 431-445. 2020.

MATTOS, G., CAMARGO, A., SOUSA, C. A. D., ZENI, A. L. B. Plantas medicinais e fitoterápicos na Atenção Primária em Saúde: percepção dos profissionais. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 23, p. 3735-3744, 2018.

MELLEGARD, H. et al. A inibição da *Bacillus cereus* consequência de esporos e a multiplicação por quitosana. **Jornal Internacional de microbiologia de alimentos**, v. 149, n. 3, p. 218-225, 2011.

MONDIN, C.A.; BRINGEL Jr., J.B. A. *Verbesina* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**, 2015. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil2015.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB16375>. Acesso em 15 maio 2022.

MONTEIRO R. F. DOS S.; SANTOS V. R. R. DOS; FERREIRA A. A. C. T.; ABREU J. R. G. DE. O uso indiscriminado de antimicrobianos para o desenvolvimento de micro-organismos resistentes. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, n. 53, p. e3597, 23 jul. 2020.

MORA, F. D. et al. Chemical and biological aspects of the genus *Verbesina*. **The natural products journal**, v. 3, n. 2, p. 140-150, 2013.

MORA, F. D. et al. Chemical Composition and in vitro Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Verbesina negrensis* from the Venezuelan Andes. **Natural product communications**, v. 10, n. 7, p. 1934578X1501000743, 2015.

MORA, F. D. et al. New antibacterial germacrene from *Verbesina negrensis*. **Planta medica**, v. 79, n. 08, p. 707-710, 2013.

MORAIS-BRAGA, M. F. B. et al. Compostos fenólicos e interação entre aminoglicosídeos e produtos naturais de *Lygodium venustum* SW contra bactérias multirresistentes. **Quimioterapia**, v. 58, n. 5, pág. 337-340, 2012.

MOREIRA, G. L; CAVALCANTI, T. B. *Verbesina* (Asteraceae: Heliantheae) do Brasil. **Rodriguésia**, v. 71, 2020.

MOREIRA, G.L. *Verbesina in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2022. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB16370>. Acesso em: 01 dez. 2022

MORENO, R. B. D. S. P. **Caracterização do potencial biotecnológico do *Crambe abyssinica* na alimentação de ruminante**. 2013. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2013.

MORS, W. B. et al. **Medicinal plants of Brazil**. Reference Publications, Inc, 2000.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOTA, F. S; OLIVEIRA, H. A. D; SOUTO, R. C. F. Perfil e prevalência de resistência aos antimicrobianos de bactérias Gram-negativas isoladas de pacientes de uma unidade de terapia intensiva. **RBAC**, v. 50, n. 3, p. 270-277, 2018.

NASCIMENTO, L. C. S; SILVA, T. A.; ORLANDA, J. F. F. Atividade antimicrobiana in vitro de extratos vegetais de *Solanum paniculatum* L. sobre o crescimento de *Ralstonia solanacearum*. In: **Congresso Brasileiro de Química**. p. 16-19. 2006.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard**. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 2012.

NCCLS (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS); WAYNE, P. A. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents. **Approved Guideline M26-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards**, 1998.

NETO, G. G.; MORAIS, R.G. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botanica Brasilica**, v.17, n.4, p.561-84, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of natural products**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of natural products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NICOLAOU, K. C.; MONTAGNON, T. **Molecules that changed the world**. Weinheim: Wiley-VCH, cap. 13, 2008.

NÓBREGA, J. S. et al. Avaliação do conhecimento etnobotânico e popular sobre o uso de plantas medicinais junto a alunos de graduação. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 07-13, 2017.

OKADA, T. et al. Metabolomics of medicinal plants: the importance of multivariate analysis of analytical chemistry data. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 6, n. 3, p. 179-196, 2010.

OLIVEIRA, F. D F. S. D. **Pesquisa de dados botânicos de plantas úteis coletadas por naturalistas europeus no século XIX no norte/nordeste de Minas Gerais: dados botânicos, químicos e ensaios antioxidantes de *Erythroxylum suberosum* A. St.-Hil (Erythroxylaceae)**. 2014. 141p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós- graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2014.

OLIVEIRA, M; PEREIRA, K. D. S. P. S; ZAMBERLAM, C. R. RESISTÊNCIA BACTERIANA PELO USO INDISCRIMINADO DE ANTIBIÓTICOS: UMA QUESTÃO DE SAÚDE PÚBLICA: doi. org/10.29327/4426668. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 6, n. 11, p. 183-201, 2020.

OREN, I.; PAUL, M. Epidemiologia, diagnóstico e manejo atualizados de infecções fúngicas invasivas. **Microbiología Clínica e Infecção**, v. 20, p. 1-4, 2014.

PANERO, J. L.; CROZIER, B. S. Macroevolutionary dynamics in the early diversification of Asteraceae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 99, p. 116-132, 2016.

PATRICK, G. L. **An introduction to medicinal chemistry**. Oxford university Press: New York, 2005, cap.16.

PAULA, C. S. et al. Atividade antioxidante e toxicidade preliminar do extrato e frações obtidas das folhas e cascas do caule de *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, p. 189-195, 2014.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S. et al. Phenolic content and antioxidant capacity of four *Cnidoscolus* species (Euphorbiaceae) used as ethnopharmacologicals in Caatinga, Brazil. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 20, p. 2310-2316, 2011.

PEMÁN, J; SALAVERT, M. Epidemiología y prevención de las infecciones nosocomiales causadas por especies de hongos filamentosos y levaduras. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 31, n. 5, p. 328-341, 2013.

PEREIRA, M. E. T. et al. Avaliação da citotoxicidade em hemárias de humanos do extrato etanólico de *Praxelis clematidea* (Griseb.). **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 51, n. 2, 2022

PERSON, A. K. et al. *Aspergillus niger*: an unusual cause of invasive pulmonary aspergillosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 7, p. 834-838, 2010.

- PFALLER, M. A.; SHEEHAN, D. J.; REX, J. H. Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. **Clinical microbiology reviews**, v. 17, n. 2, p. 268-280, 2004.
- PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, n. 3, p. 237-243, 2001.
- POSER, G. L. V; MENTZ, L. A. Diversidade Biológica e sistemas de Classificação. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira et al. (org). **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. cap. 4, p.75-90.
- PRADEEPA, S.; SUBRAMANIAN, S.; KAVIYARASAN, V. Evaluation of antimicrobialactivity of Pithecellobium Dulce pod pulp extract. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v.7, p.32-37, 2014.
- PROJAN, S. J.; SHLAES, D. M. Antibacterial drug discovery: is it all downhill from here? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, p. 18-22, 2004.
- PRUSKI, J. F.; SANCHO, G. Asteraceae or Compositae (Aster or Sunflower Family). 33–39. **Flowering Plants of the Neotropics**. Princeton University Press, Princeton, 2004.
- RANG, H. P; DALE, M. M; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 692 p.
- RASKO D.R, ALTHERR M.R, HAN C.S, RAVEL J. Genomics do grupo *Bacillus cereus* de organismos. **FEMS Microbiology comentários**, v. 29, n. 2, p. 303-329, 2005.
- REDA, S. Y; CARNEIRO, P. I. B. Óleos e gorduras: aplicações e implicações. **Revista Analytica**, v. 27, p. 60-67, 2007.
- REZENDE, D. A. D. C. S. et al. Essential Oils from *Mentha piperita*, *Cymbopogon citratus*, *Rosmarinus officinalis*, *Peumus boldus* and *Foeniculum vulgare*: inhibition of phospholipase A2 and cytotoxicity to human erythrocytes. **American Journal of Plant Sciences**, v. 8, n. 09, p. 2196, 2017.
- RI POLL, M. A. Con los antibióticos no se juega. **Medicina General**, v. 42, p. 167-8, 2002.
- ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. Farmacognosia e farmacobiotecnologia. **São Paulo: Premier**, p. 92-121, 1997.
- ROBERTS, S.; CHAMBERS, S. Diagnosis and management of *Staphylococcus aureus* infections of the skin and soft tissue. **Internal Medicine Journal**, v. 35, p. S97-105, 2005.

ROIG, F. A. Flora medicinal mendocina: las plantas medicinales y aromáticas, de la provincia de Mendoza (Argentina): aborígenes, exóticas espontáneas o naturalizadas y cultivadas. **Argentina. Universidad Nacional de Cuyo. EDIUNC**, pág 91, 2001.

ROQUE, N; BAUTISTA, H. Asteraceae: caracterização e morfologia floral. **Ed. Edufba, Salvador**. 71p, 2008.

ROZATTO, M. R. **Determinação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos, frações e compostos isolados de Arrabidaea brachypoda**. 2012. 100 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2012. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/94817>. Acesso em 23 Maio 2022.

RUSSELL, A. D. Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: Food additives and food and pharmaceutical preservatives. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 71, n. 3, p. 191-201, 1991.

SACCHETTI, G. et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food chemistry**, v. 91, n. 4, p. 621-632, 2005.

SAEZ-LLORENS, Xavier et al. Impact of an antibiotic restriction policy on hospital expenditures and bacterial susceptibilities: a lesson from a pediatric institution in a developing country. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 19, n. 3, p. 200-206, 2000.

SAMPAIO, P; PAIS, C. Epidemiologia da candidíase invasiva e desafios para o laboratório de micologia: especificidades da *Candida glabrata*. **Current Clinical Microbiology Reports**, v. 1, p. 1-9, 2014.

SANTOS, A. L. D. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, p. 413-423, 2007.

SAROGLOU, V. et al. Sesquiterpene Lactones from *Centaurea spinosa* and their antibacterial and cytotoxic activities. **Journal of natural products**, v. 68, n. 9, p. 1404-1407, 2005.

SARTORI, M. R. K. **Antimicrobial activity of extracts, fractions and pure compounds of flowers from acmela brasiliensis spren (Wedelia paludosa) (Asteraceae)**. 2005. 81 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Substâncias Bioativas) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

SARTORI, M. R. K. et al. Antifungal activity of fractions and two pure compounds of flowers from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae). **Pharmazie**, v. 58, n. 8, p. 567-569, 2003.

SCHAECHTER, M. E; ENGLEBEG N. C; EISENSTEIN, B. I; MEDOFF, G. **Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas.** 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R; CRUZ, M. E. S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 554-556, 2003.

SELITRENNIKOFF, C. P. Antifungal proteins. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 7, p. 2883-2894, 2001.

SIEDLE, B. et al. The effect of sesquiterpene lactones on the release of human neutrophil elastase. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 65, n. 5, p. 897-903, 2003.

SILVA JÚNIOR, A. A. Plantas medicinais e aromáticas. **Itajaí: Epagri**, v. 1, 1997.

SILVA, D. F. **Avaliação da atividade biológica de β- citronelol sobre Candida albicans.** 2016. 62f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos – Farmacologia) – Universidade Federal da Paraíba, 2016.

SILVA, L. F. et al. Essential oils from *Mentha viridis* (L). L. And *Mentha pulegium* L.: cytogenotoxic effects on human cells. **American Journal of Plant Sciences**, v. 8, n. 6, p. 1423-1437, 2017.

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. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/ Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ Da Universidade Federal de Santa Catarina, 2010, 1102 p.

SINGH, S. et al. Vaginitis due to *Candida krusei*: epidemiology, clinical aspects, and therapy. **Clinical infectious diseases**, v. 35, n. 9, p. 1066-1070, 2002.

SMITH, K. J. et al. *Micrococcus folliculitis* in HIV-1 disease. **British journal of Dermatology**, v. 141, n. 3, p. 558-561, 1999.

SOBRINHO, A. C. N. et al. Citotoxicidade, atividades antifúngicas e antioxidantes do óleo essencial de *Eupatorium ballotifolium* Kunth (Asteraceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 10, n. 16, pág. 346-355, 2016.

SOUSA, H. W. O; SILVA, J. L.; NETO, M. S. A importância do profissional farmacêutico no combate à automedicação no Brasil. **Revista eletrônica de farmácia**, v. 5, n. 1, 2008.

SOUZA, M. M. et al. Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos. **Ciências Farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos.** Itajaí: Ed. Univali, p. 108-166, 2003.

SOUZA, V. C; LORENZI, H. "Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil. (2a ed.)", **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, São Paulo, p.223, 2008.

SPRING, O. Chemotaxonomy based on metabolites from glandular trichomes. **Advances in Botanical Research**, London, v. 31, p.153-174, 2000.

STEFANOVIC, O. D.; STANOJEVIC, D. D.; COMIC, L. R. Atividade antibacteriana sinérgica de extratos de *Salvia officinalis* e *Cichorium intybus* e antibióticos. **Acta Pol Pharm**, v. 69, n. 3, pág. 457-463, 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed. 2009

TEETHAISONG, Y. et al. Atividade sinérgica e mecanismo de ação do extrato de *Stephania suberosa* Forman e combinação de ampicilina contra *Staphylococcus aureus* resistente à ampicilina. **Journal of Biomedical Science**, v. 21, p. 1-11, 2014.

TELES, A. M.; NAKAJIMA, J. N; STEHMANN, J. R. *Senecio albus*, a new species of *Senecio* sect. Adamantina (Senecioneae–Asteraceae) with an emendment to the section. **Kew Bulletin**, v. 64, p. 161-165, 2009.

TOLEDO, A. C. O.; HIRATA, L. L.; BUFFON, M. C. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, Bragança Paulista, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, 2003.

TORIBIO, M. S. et al. Actividad antimicrobiana de *Verbesina encelioides*. **InVet**, v. 7, n. 1, p. 41-45, 2005.

TORIBIO, M. S. et al. Actividad biológica de los extractos metanólicos de *Verbesina encelioides* frente a aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina. **Ars Pharmaceutica (Internet)**, v. 53, n. 2, p. 45-47, 2012

TOURSARKISSIAN, M. Plantas medicinales de la Argentina: sus nombres botánicos, vulgares usos y distribución geográfica. **Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina**, pág. 41.1980.

TSCHERNER, M; SCHWARZMÜLLER, T; KUCHLER, K. Pathogenesis and antifungal drug resistance of the human fungal pathogen *Candida glabrata*. **Pharmaceuticals**, v. 4, n. 1, p. 169-186, 2011.

TSEVEGSÜREN, N. et al. Seed oil fatty acids of Mongolian Compositae: The trans-fatty acids of *Heteropappus hispidus*, *Astrothamnus centrali-asiaticus* and *Artemisia palustris*. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 23, n. 5, p. 360-366, 2000.

TSEVEGSÜREN, N., AITZETMÜLLER, K.; VOSMANNB, K. Occurrence of γ-Linolenic Acid in Compositae: A Study of *Youngia tenuicaulis* Seed Oil. **Lipids**, V. 34 (5), p. 525-529, 1999.

TSEVEGSÜREN, N; AITZETMÜLLER, K.  $\gamma$ -Linolenic and stearidonic acids in *Mongolian Boraginaceae*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 73, n. 12, p. 1681-1684, 1996.

UNDERHILL, E. W.; BELL, E. A.; CHARLWOOD, B. V. Secondary Plant Products. **Encyclopedia of Plant Physiology**, v. 8, p. 493, 1980

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

VIZZOTTO, M; KROLOW, A. C; WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Clima Temperado documento 316**, Pelotas/RS, 2010. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/886074>. Acesso em: 2 nov. 2019.

VON NUSSBAUM, F. et al. Cover Picture: Antibacterial Natural Products in Medicinal Chemistry—Exodus or Revival? (Angew. Chem. Int. Ed. 31/2006). **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, n. 31, p. 5027-5027, 2006.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J; KOWALSKA, T. Thin Layer Chromatography in Phytochemistry. v. 99. **Chromatographic Science Series**, 2008

WALSH, C. et al. Antibiotics: actions, origins, resistance. **American Society for Microbiology (ASM)**, 2003.

WALSH, C. T.; Where will new antibiotics come from? **Nature Reviews Microbiology**. 2003.

WALSH, C. **Antibiotics: actions, origins, resistance**. American Society for Microbiology (ASM), 2003.

WANG, B., DENG, J., GAO, Y., ZHU, L., HE, R., & XU, Y. A caixa de ferramentas de triagem de substâncias bioativas de produtos naturais: uma revisão. **Fitoterapia**, v. 82, n. 8, pág. 1141-1151, 2011.

WEBSTER, D. et al. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. **Journal of ethnopharmacology**, v. 115, n. 1, p. 140-146, 2008.

WHARTON, M. et al. Septic arthritis due to *Micrococcus luteus*. **The Journal of rheumatology**, v. 13, n. 3, p. 659-660, 1986.

WILKENS, M. et al. Characterization of the bactericidal activity of the natural diterpene kaurenoic acid. **Planta medica**, v. 68, n. 05, p. 452-454, 2002.

WILLIAMS, J. E. Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the Peruvian rainforest with a particular emphasis on Una de Gato and Sangre de Grado. **Alternative Medicine Review**, v. 6, n. 6, p. 567-580, 2001.

WOODFORD, N. Biological counterstrike: antibiotic resistance mechanisms of Gram-positive cocci. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, p. 2-21, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) et al. **Global action plan on antimicrobial resistance**. 2015. Disponível em: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/193736/9789241509763\\_eng.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/193736/9789241509763_eng.pdf). Acesso em: 22 abril 2022.

WRIGHT, G. D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. **Advanced drug delivery reviews**, v. 57, n. 10, p. 1451-1470, 2005.

WU, Q. X; SHI, Y. P; JIA, Z. J. Eudesmane sesquiterpenoids from the Asteraceae family. **Natural product reports**, v. 23, n. 5, p. 699-734, 2006.

XU, W. H. et al. Two new eudesmane derivatives from *Verbesina virginica*. **Chinese Chemical Letters**, v. 21, n. 6, p. 693-695, 2010.

YANG, R. et al. The anti-inflammatory activity of licorice, a widely used Chinese herb. **Pharmaceutical biology**, v. 55, n. 1, p. 5-18, 2017.

ZACCHINO, S. Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Ed. Argos**, p. 435-479, 2001.

ZACCHINO, S. et al. The need for new antifungal drugs: Screening for antifungal compounds with a selective mode of action with emphasis on the inhibitors of the fungal cell wall. **Plant Derived Antimycotics, Haworth Press (New York)**, p. 1-47, 2003.

ZOHRA, M; FAWZIA, A. Hemolytic activity of different herbal extracts used in Algeria. **Int J Pharm Sci Res**, v. 5, n. 8, p. 495-500, 2014.