



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

**Jordana Damasceno Gitirana de Santana**

**Investigação da atividade antibacteriana do extrato de lavagem foliar e do glaucolídeo A  
de *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae)**

**Juiz de Fora**

**2015**

**Jordana Damasceno Gitirana de Santana**

**Investigação da atividade antibacteriana do extrato de lavagem foliar e do glicolídeo A de *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae)**

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

Orientador: Profa. Dra. Maria Silvana Alves  
Coorientador: Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho

**Juiz de Fora**

**2015**

**Jordana Damasceno Gitirana de Santana**

**Investigação da atividade antibacteriana do extrato de lavagem foliar e do glaucolídeo A de *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae)**

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

Aprovada em 30 de julho de 2015

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof. Dr. Marcos José Salvador  
Universidade Estadual de Campinas

---

Profa. Dra. Maria da Penha Henriques do Amaral  
Universidade Federal de Juiz de Fora

*À minha amada família, dedico.*

## *AGRADECIMENTOS*

A Deus, por sempre guiar meus passos e por permitir a realização de mais esta conquista.

Aos meus pais Rogério e Suely, pelo amor, carinho e apoio em todos os momentos e à minha irmã Amanda, pela amizade e torcida.

Ao César, pelo carinho, companheirismo, apoio e paciência nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Silvana Alves, pela oportunidade, dedicação, paciência e pelas palavras de incentivo sempre confortantes e inspiradoras. É com muita admiração que agradeço por toda sabedoria transmitida e pelo carinho.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho, pela parceria, dedicação, pelos conhecimentos transmitidos e pela disponibilização do Núcleo de Identificação e Pesquisa em Princípios Ativos Naturais (NIPPAN) da Faculdade de Farmácia (FF) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) para a realização deste trabalho.

À equipe do NIPPAN, pela parceria e experiências compartilhadas, especialmente à Luísa, minha amiga e companheira nesta jornada.

Aos alunos de iniciação científica, em especial à Laura, pela amizade, torcida e colaboração nos experimentos, essenciais para a concretização deste estudo.

Às Farmacêuticas e Técnicas Administrativas em Educação Fázia, Carolina e Vanessa pela amizade, colaboração, incentivo e conhecimentos compartilhados.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e da Faculdade de Farmácia da UFJF, pelos ensinamentos e contribuição científica.

À Central Analítica Multiusuária de Bioprodutos e Bioprocessos (CENTRALBIO)/FF/UFJF, pela realização das análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelos auxílios financeiros.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste estudo.

*“Uma vida sem desafios não vale a pena ser vivida”.*

*Sócrates*

## RESUMO

*Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae), popularmente conhecida como assa-peixe, é uma espécie vegetal nativa da América do Sul, principalmente do Brasil. Esta planta medicinal é tradicionalmente utilizada em casos de gripes, resfriados, tosses, febre, bronquite, contusões, hemorroidas, infecções do útero e no tratamento de malária. Farmacologicamente, *V. polyanthes* tem sido relatada como detentora de propriedades anti-hipertensiva, antinociceptiva, anti-ulcerogênica, anti-inflamatória, leishmanicida e antimicrobiana. Estudos fitoquímicos focando esta espécie, disponibilizados na literatura, relatam a presença de metabólitos secundários pertencentes, principalmente, às classes dos flavonoides e terpenos, especialmente lactonas sesquiterpênicas. O presente estudo descreve a avaliação da atividade antibacteriana do extrato de lavagem foliar (extrato VP) e da lactona sesquiterpênica glaucolídeo A isolada de *V. polyanthes*, no intuito de corroborar cientificamente com o uso tradicional dessa espécie vegetal e de verificar a potencialidade do extrato VP e desta molécula como prováveis fitoterápico e protótipo de um agente antibacteriano, respectivamente. O extrato VP foi obtido por meio da lavagem das folhas íntegras e secas de *V. polyanthes* com diclorometano e o glaucolídeo A isolado a partir do fracionamento desse extrato por métodos de cromatografia em coluna. A atividade antibacteriana foi investigada por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo, segundo recomendações do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI). Em seguida, procedeu-se ao estabelecimento da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e à classificação do efeito farmacológico bactericida ou bacteriostático. *Staphylococcus aureus* ATCC<sup>®</sup> 6538<sup>TM</sup>/ATCC<sup>®</sup> 29213<sup>TM</sup>, *Escherichia coli* ATCC<sup>®</sup> 10536<sup>TM</sup>/ATCC<sup>®</sup> 25922<sup>TM</sup>, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis ATCC<sup>®</sup> 10708<sup>TM</sup>, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Thyphimurium ATCC<sup>®</sup>13311<sup>TM</sup> e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC<sup>®</sup> 9027<sup>TM</sup>/ATCC<sup>®</sup> 27853<sup>TM</sup> foram usadas como cepas de referência. O extrato VP revelou atividade antibacteriana frente a 5 das 8 cepas testadas, sendo mais ativo contra *S. aureus* ATCC<sup>®</sup> 6538<sup>TM</sup> e ATCC<sup>®</sup> 29213, com valores de CIM iguais a 0,625 mg/mL, refletindo efeito bacteriostático e CBM de 2,5 mg/mL e 1,25 mg/mL, respectivamente. O glaucolídeo A apresentou atividade antibacteriana frente às referidas cepas de *S. aureus*, com valores de CIM de 250 µg/mL e 500 µg/mL, efeito bacteriostático e CBM de 500 µg/mL e > 500 µg/mL, nessa ordem, sendo inativo contra as demais cepas nas concentrações testadas. Os resultados do presente estudo sugerem que *V. polyanthes* e glaucolídeo A apresentam potencial antibacteriano, especialmente frente à *S. aureus*, sendo a atividade do extrato VP resultante, provavelmente, de um sinergismo entre essa lactona sesquiterpênica e outros metabólitos secundários presentes nessa planta medicinal.

**Palavras-chave:** *Vernonia polyanthes*. Asteraceae. Glaucolídeo A. Lactona Sesquiterpênica. Antibacteriano.

## ABSTRACT

*Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae), popularly known as "assa-peixe", is a native species of South America, especially in Brazil. This medicinal plant is traditionally used in cases of cold, flu, cough, fever, bronchitis, bruise, hemorrhoid, uterus infection and malaria's treatment. Pharmacologically, *V. polyanthes* has been reported as anti-hypertensive, antinociceptive, anti-ulcerogenic, anti-inflammatory, leishmanicidal and antimicrobial. Phytochemical studies focusing this plant, available in the literature, report the presence of secondary metabolites mainly belonging to the flavonoids and terpene classes, especially sesquiterpene lactones. The present study investigated the antibacterial activity of the leaf rinse extract (VP extract) and the sesquiterpene lactone glaucolide A isolated from *V. polyanthes* in order to scientifically corroborate with the traditional use of this plant species and to verify the potential of VP extract and this molecule as probable herbal and an antibacterial agent prototype, respectively. VP extract was obtained by washing the dried intact leaves of *V. polyanthes* with dichloromethane and the glaucolide A, isolated from the VP extract fractionation by column chromatography methods. Antibacterial activity was established by the determination of the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) using the microdilution method according to the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines followed by the Minimal Bactericidal Concentration (MBC), classifying the pharmacological effect as bacteriostatic or bactericidal. *Staphylococcus aureus* ATCC<sup>®</sup> 6538<sup>™</sup>/ATCC<sup>®</sup> 29213<sup>™</sup>, *Escherichia coli* ATCC<sup>®</sup> 10536<sup>™</sup>/ATCC<sup>®</sup> 25922<sup>™</sup>, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis ATCC<sup>®</sup> 10708<sup>™</sup>, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Thyphimurium ATCC<sup>®</sup> 13311<sup>™</sup> and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC<sup>®</sup> 9027<sup>™</sup>/ATCC<sup>®</sup> 27853<sup>™</sup> were used as reference bacterial strains. The VP extract revealed antibacterial activity against 5 of 8 tested strains, being more active against *S. aureus* ATCC<sup>®</sup> 6538<sup>™</sup> and ATCC<sup>®</sup> 29213<sup>™</sup> with MIC values of 0.625 mg/mL, demonstrating bacteriostatic effect and MBC of 2.5 mg/mL and 1.25 mg/mL, respectively. Glaucolide A showed antibacterial activity against *S. aureus* with MIC values of 250 µg/mL and 500 µg/mL and, revealing bacteriostatic effect and CBM of 500 µg/mL and > 500 µg/mL, in this order, being inactive against the other strains at the concentrations tested. Our results suggest the antimicrobial potential of *V. polyanthes* and glaucolide A, notably against *S. aureus*, and the VP extract activity is probably due to the synergism between this sesquiterpene lactone and other secondary metabolites of this medicinal plant.

**Keywords:** *Vernonia polyanthes*. Asteraceae. Glaucolide A. Sesquiterpene Lactone. Anti-bacterial Agents.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Número de novos antibióticos aprovados entre os anos de 1980 e 2012.....	22
Figura 2 – Estrutura básica dos flavonoides.....	32
Figura 3 – Estruturas básicas das subclasses de flavonoides.....	32
Figura 4 – Biogênese das lactonas sesquiterpênicas. ....	33
Figura 5– Esqueletos carbônicos e relações biogenéticas das subclasses de lactonas sesquiterpênicas.....	34
Figura 6 – Grupo $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona de lactonas sesquiterpênicas.....	35
Figura 7 – Fotografia das partes aéreas de <i>V. polyanthes</i> .....	35
Figura 8 – Fotografia do tricoma glandular de <i>V. polyanthes</i> . ....	36
Figura 9 – Fotografia da arvoreta de <i>V. polyanthes</i> cultivada no Horto Medicinal da Faculdade de Farmácia da UFJF.....	51
Figura 10 – Esquema representativo do processo de extração por lavagem foliar de <i>V. polyanthes</i> .....	53
Figura 11– Fotografia do processo de Cromatografia Líquida à Vácuo. ....	55
Figura 12 – Fotografia do processo de Cromatografia em Coluna Clássica. ....	56
Figura 13 – Fluxograma de isolamento da substância VP-S1.....	57
Figura 14 – Esquema ilustrativo do procedimento de diluição seriada realizada na microplaca. ....	62
Figura 15– Esquema ilustrativo dos controles do método de microdiluição em caldo Müeller-Hinton.....	63
Figura 16 – Imagem ilustrativa da microplaca utilizada para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por meio do método de microdiluição em caldo Müeller-Hinton....	63
Figura 17– Imagem ilustrativa do procedimento para determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e do efeito farmacológico bactericida ou bacteriostático.....	65
Figura 18 – Cromatograma do extrato VP obtido por CLAE-DAD a 210 nm.....	66
Figura 19 – Espectros de absorção na região do UV dos picos obtidos no cromatograma do extrato VP.....	67
Figura 20 – Fotografia dos cristais precipitados na subfração VP-5-5.....	69
Figura 21 – Fotografia do perfil cromatográfico em CCD da substância VP-S1.....	70
Figura 22 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância VP-S1 (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) e expansão dos sinais em $\delta= 6,14$ , $\delta= 5,69$ e $\delta= 1,92$ ppm.....	71

Figura 23 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância VP-S1 (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) e expansão do sinal em $\delta= 4,89$ ppm.....	72
Figura 24 – Estrutura química do glaucolídeo A.....	73
Figura 25 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do glaucolídeo A (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	75
Figura 26 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do glaucolídeo A (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	77
Figura 27 – Cromatograma do glaucolídeo A obtido por CLAE-DAD a 210 nm .....	78
Figura 28 – Espectro de absorção na região do UV do glaucolídeo A.....	78
Figura 29 – Comparação entre os perfis cromatográficos do glaucolídeo A e do extrato VP..	79

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Informações sobre substâncias isoladas de <i>V. polyanthes</i> descritas na literatura...	40
Tabela 2 – Descrição da composição das soluções-estoque (SEs) para realização do método de microdiluição em caldo. ....	61
Tabela 3 – Frações obtidas por CLV do extrato VP.....	68
Tabela 4 – Subfrações obtidas por CC da fração VP-5. ....	69
Tabela 5 – Dados obtidos de RMN de <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância VP-S1 e dados do glaucolídeo A descritos na literatura. ....	74
Tabela 6 – Dados de RMN de <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância VP-S1 e dados do glaucolídeo A descritos na literatura. ....	76
Tabela 7 – Valores de CIM determinados por microdiluição em caldo para o extrato VP e glaucolídeo A.....	80
Tabela 8 – Valores de CIM determinados por microdiluição em caldo para os antibacterianos de referência ampicilina e cloranfenicol.....	81
Tabela 9 – Valores de CIM e CBM e classificação do efeito farmacológico do extrato VP...82	
Tabela 10 – Valores de CIM e CBM e classificação do efeito farmacológico do glaucolídeo A. ....	82

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de etila
AMH	Ágar Müeller-Hinton
AMP	Ampicilina
ATCC	do inglês <i>American Type Culture Collection</i>
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CC	Cromatografia em Coluna Clássica
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDC	do inglês <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio Deuterado
CESJ	Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLOR	Cloranfenicol
CLSI	do inglês <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CLV	Cromatografia Líquida à Vácuo
CMH	Caldo Müeller-Hinton
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
CTT	Cloreto de trifeniltetrazólio
d	Dupleto
DAD	Detector de arranjo de fotodiodos
DCM	Diclorometano
dd	Duplo dupleto
ddd	Duplo dupleto duplo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSTs	Doenças Sexualmente Transmissíveis
FDA	do inglês <i>Food And Drug Administration</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Ácido fosfórico
Hex	Hexano
HPLC	do inglês <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>

IAM	Interferência das amostras sobre caldo Müeller-Hinton (meio)
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
ISC	Interferência do sistema solvente/diluente sobre o crescimento bacteriano
ISM	Interferência do sistema solvente/diluente sobre caldo Müeller-Hinton (meio)
LSTs	Lactonas sesquiterpênicas
m	Multiplete
MeCN	Acetonitrila
MHz	Megahertz
min	Minutos
MTC	Medicina Tradicional e Complementar
NaCl	Cloreto de sódio
NIPPAN	Núcleo de Identificação e Pesquisa em Princípios Ativos Naturais
pH	Potencial Hidrogeniônico
q	Quarteto
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Simpleto
SE	Solução-estoque
t	Triplete
Temp.	Temperatura
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta

## LISTA DE SÍMBOLOS

'	Minutos
"	Segundos
L	Litros
mL	Mililitro
$\mu$ L	Microlitro
m	Massa
g	Gramas
mg	Miligrama
$\mu$ g	Micrograma
n <sup>o</sup>	Número
°C	Grau Celsius
v	Volume
%	Porcentagem
$\mu$ m	Micrômetro
mm	Milímetro
rpm	Rotações por minuto
H	Hidrogênio
<sup>1</sup> H	Próton
C	Carbono
<sup>13</sup> C	Carbono 13
nm	Nanômetro
$\lambda$	Comprimento de onda
<i>J</i>	Constante de acoplamento

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
2.1 INFECÇÕES BACTERIANAS E MICRO-ORGANISMOS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA.....	19
2.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA E A URGÊNCIA DE NOVOS AGENTES ANTIBACTERIANOS.....	21
2.3 METABOLISMO SECUNDÁRIO VEGETAL: POTENCIAL FONTE DE AGENTES ANTIBACTERIANOS.....	23
2.4 MÉTODOS UTILIZADOS PARA A INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	26
2.5 CONTEXTUALIZAÇÃO DA ESPÉCIE VEGETAL ESTUDADA.....	27
<b>2.5.1 A Família Asteraceae e o gênero <i>Vernonia</i>.....</b>	<b>27</b>
2.5.1.1 <i>Tricomas Glandulares</i> .....	30
2.5.1.2 <i>Marcadores quimiotaxonômicos</i> .....	31
<b>2.5.2 A Espécie <i>Vernonia polyanthes</i> Less.....</b>	<b>35</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>50</b>
3.1 GERAL.....	50
3.2 ESPECÍFICOS.....	50
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>51</b>
4.1 MATERIAL VEGETAL .....	51
4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO DE LAVAGEM FOLIAR de <i>V. polyanthes</i> .....	52
4.3 ANÁLISE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO VP POR CLAE-DAD.....	53
4.4 ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO CONSTITUINTE MAJORITÁRIO DO EXTRATO VP.....	54
<b>4.4.1 Fracionamento do extrato VP .....</b>	<b>55</b>
<b>4.4.2 Fracionamento da VP-5 .....</b>	<b>56</b>
<b>4.4.3 Identificação da substância VP-S1 .....</b>	<b>58</b>
4.5 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS PERFIS CROMATOGRÁFICOS DA SUBSTÂNCIA VP-S1 E DO EXTRATO VP .....	58
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO VP E DA SUBSTÂNCIA VP-S1 .....	58

<b>4.6.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) .....</b>	<b>60</b>
<b>4.6.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e do Efeito Farmacológico Bactericida ou Bacteriostático.....</b>	<b>64</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>66</b>
5.1 OBTENÇÃO E ANÁLISE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO VP.....	66
5.2 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DO CONSTITUINTE MAJORITÁRIO DO EXTRATO VP.....	68
5.3 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA VP-S1.....	70
5.4 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS PERFIS CROMATOGRÁFICOS DO EXTRATO VP E DO GLAUCOLÍDEO A.....	78
5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO VP E DO GLAUCOLÍDEO A.....	80
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>89</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>90</b>

## 1 INTRODUÇÃO

---

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), a cada ano, doenças infecciosas são responsáveis pela morte de quase nove milhões de pessoas em todo o mundo (WHO, 2012). Esse dado é alarmante, considerando as altas taxas de resistência bacteriana, especialmente em ambientes hospitalares, e o decréscimo constante observado no número total de antimicrobianos aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Em 23 de setembro de 2014, Janet Woodcock, diretora do *FDA's Center for Drug Evaluation and Research*, relatou à *FDA Voice* que "*há um longo caminho a percorrer no sentido de construir um arsenal novo e eficaz de produtos antimicrobianos. E uma vez aprovado, será fundamental que os profissionais de saúde prescrevam adequadamente estes novos antibióticos*" (<http://blogs.fda.gov/fdavoice/index.php/2014/09/>, acessado em 11 de outubro de 2014). Assim, novas moléculas antibacterianas são urgentemente necessárias para responder à elevada frequência da resistência bacteriana a todas as principais classes de antibióticos conhecidos (GENILLOUD, 2014).

A natureza sempre constituiu uma fonte de recursos para o homem na busca de soluções para diversos problemas, inclusive de saúde. A utilização de plantas medicinais na prevenção e tratamento de doenças ocorre desde os tempos mais remotos da humanidade até os dias atuais (CRAGG; NEWMAN, 2013; KARAM et al., 2013; WHO, 2013). Essas plantas formam a base de sofisticados sistemas tradicionais de medicina cujos primeiros registros são bastante antigos e incluem espécies vegetais que permanecem sendo utilizadas no tratamento de doenças como resfriados, inflamações e infecções parasitárias. Logo, esses sistemas continuam cumprindo um importante papel nos cuidados com a saúde da maior parte da população mundial (CRAGG; NEWMAN, 2013; WHO, 2013).

O conhecimento associado às práticas alternativas preconizadas pela Medicina Tradicional e Complementar (MTC), entre elas a utilização de medicamentos fitoterápicos no tratamento de doenças, vem refletindo no surgimento de investigações científicas mais aprofundadas acerca do potencial das espécies vegetais como agentes terapêuticos, resultando no isolamento de diversos produtos naturais que se tornam importantes protótipos de fármacos seguros e eficazes. Dois clássicos exemplos são a salicina ou ácido salicílico, isolada da *Salix alba* L. e utilizada para a síntese do fármaco ácido acetilsalicílico, um agente anti-inflamatório, e o Taxol<sup>®</sup>, um agente antitumoral isolado da *Taxus brevifolia*, amplamente empregado no tratamento de câncer de mama (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012). Sob este

ponto de vista, estima-se que aproximadamente 25% dos medicamentos em uso clínico sejam derivados direta ou indiretamente de plantas medicinais (BRANDÃO et al., 2013; GURIB-FAKIM, 2006; NEWMAN; CRAGG, 2012).

As propriedades antimicrobianas de substâncias produzidas pelas plantas como uma consequência do seu metabolismo especial são reconhecidas empiricamente há um longo tempo e vêm sendo comprovadas cientificamente nos últimos anos (DUARTE, 2006; NITHA; REMASHREE; BALACHANDRAN, 2012; RÍOS; RECIO, 2005; SHER, 2009). Esse embasamento científico associado ao desenvolvimento de novas tecnologias exemplificadas pelas técnicas hifenadas associadas às ferramentas de elucidação estrutural justificam, portanto, o surgimento de um renovado interesse na triagem de produtos naturais na descoberta de novas substâncias com potencial antibacteriano (LAM, 2007; PATWARDHAN; VAIDYA, 2010; SALEEM et al., 2010).

Neste aspecto, o Brasil é detentor de uma biodiversidade promissora como fonte de produtos naturais terapêuticos, cujo potencial é pobremente explorado ou regulamentado, contrastando com o que ocorre em países desenvolvidos (SOUSA et al., 2008; VEIGA JUNIOR, 2008). Adicionalmente, muitas dessas espécies vegetais são empregadas como medicamentos naturais sem qualquer respaldo científico quanto à eficácia e segurança, o que demonstra a enorme lacuna entre a oferta de plantas e pesquisas que validem o seu uso popular (BRAGA et al.; 2007; FOGGIO et al., 2006).

Nesta biodiversidade, encontra-se *Vernonia polyanthes* (Asteraceae), uma planta nativa principalmente do Brasil e comum nos cerrados de São Paulo, Mato Grosso, Minas Gerais e Goiás, sendo popularmente conhecida como assa-peixe (ALVES; NEVES, 2003). É utilizada tradicionalmente em casos de gripes, resfriados, tosses, bronquite, contusões, hemorroidas, infecções do útero, como antifebril e no tratamento de malária (BARBASTEFANO et al., 2007; CORRÊA et al., 2004; RODRIGUES; CARVALHO, 2001).

O infuso de *V. polyanthes* é indicado como expectorante pelo Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2011) e essa espécie vegetal está incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) [*Vernonia* spp\* (*V. ruficoma* ou *V. polyanthes*) sob número 70], como umas das plantas com potencial para gerar produtos de interesse ao sistema público de saúde brasileiro, o que reforça a necessidade de bases científicas que contribuam para o seu uso seguro e eficaz (BRASIL, 2009).

Considerando-se este aspecto, os relatos encontrados na literatura que corroboram a sustentação do uso terapêutico de *V. polyanthes* ainda são escassos e têm como foco, até o

presente momento, investigações das atividades anti-hipertensiva (SILVEIRA; FOGGIO; GONTIJO, 2003), leishmanicida e antifúngica (BRAGA et al., 2007), antiulcerogênica (BARBASTEFANO et al., 2007), antinociceptiva, anti-inflamatória (TEMPONI et al., 2012) e antibacteriana (JORGETTO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2007; SILVA et al., 2012).

Apesar da vasta literatura sobre a composição química de espécies do gênero *Vernonia*, sete estudos fitoquímicos envolvendo triagens preliminares dos constituintes químicos e o isolamento de substâncias a partir de extratos de *V. polyanthes* publicados até o momento, demonstram a presença de metabólitos secundários pertencentes, principalmente, às classes dos flavonoides e terpenos, especialmente lactonas sesquiterpênicas (LSTs) (BARBASTEFANO et al., 2007; BENFATTI et al., 2007; BOHLMANN et al., 1981; BOHLMANN et al., 1983; IGUAL et al., 2013; SILVA et al., 2012; TEMPONI, 2012 ).

Portanto, a partir do complexo cenário da resistência microbiana e da premente necessidade de construção de um arsenal novo e eficaz de produtos antimicrobianos, além do potencial dos produtos naturais como protótipos de novos fármacos seguros e eficazes sustentado pelo conhecimento químico-biológico e da utilização das espécies vegetais como opções terapêuticas alternativas sob a ótica do uso racional dos fitomedicamentos, o presente estudo teve como objetivo investigar a atividade antibacteriana do extrato de lavagem foliar de *V. polyanthes* e de seu constituinte majoritário.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

---

### 2.1 INFECÇÕES BACTERIANAS E MICRO-ORGANISMOS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA

As doenças infecciosas, incluindo aquelas de origem bacteriana, estão entre as diversas patologias que afetam a saúde pública (ALVARENGA et al., 2007). As bactérias são micro-organismos ubíquos e embora sejam benéficas para o equilíbrio do meio ambiente, permitindo a existência de plantas, seres humanos e outros animais, podem ser responsáveis por um amplo espectro de doenças, desde infecções intestinais até doenças sexualmente transmissíveis (DSTs), constituindo os agentes etiológicos da maior parte das infecções graves do trato respiratório e infecções letais do trato intestinal (INGRAHAM; INGRAHAM, 2010; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

A descoberta e o desenvolvimento de antibióticos e/ou agentes antibacterianos representaram uma história de sucesso na terapêutica no século XX (BUTLER; BUSS, 2006; OVERBYE; BARRETT, 2005; WALSH; WRIGHT, 2005). No entanto, embora o surgimento desses fármacos tenha sido um grande avanço para a medicina, doenças infecciosas continuam sendo importante causa de morbidade e mortalidade mundialmente (MAHADY et al., 2008). Neste contexto, infecções bacterianas causam milhares de mortes em nível mundial, principalmente de idosos e crianças (BUTLER; BUSS, 2006).

Os avanços produzidos na medicina vêm levando ao envelhecimento da população, com um número crescente de pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos, transplantes de órgãos e quimioterapia, além do aumento de neonatos em unidades de cuidados intensivos, elevando o número de indivíduos imunocomprometidos e vulneráveis a essas infecções (BOUCHER et al., 2009; CHOPRA et al., 2008).

Entre as espécies bacterianas frequentemente associadas a infecções nosocomiais estão *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Estes micro-organismos podem sobreviver por meses em superfícies inanimadas de ambientes hospitalares, o que facilita a contaminação bacteriana e a transmissão desses patógenos (BARNIOL-XICOTA et al., 2015; KHAN; AHMAD; MEHBOOB, 2015; KRAMER; SCHWEBKE; KAMPF, 2006; OTTER; YEZLI; FRENCH, 2011). No entanto, as infecções causadas por essas bactérias não se restringem apenas aos ambientes de cuidados com a saúde. Este fato pode ser exemplificado por estudos recentes envolvendo a pesquisa da etiologia de bacteremias adquiridas na comunidade por neonatos e crianças de até um ano, em

países emergentes, os quais relatam *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* spp. e principalmente *S. aureus* como agentes responsáveis por grande parte dessas infecções (DOWNIE et al., 2013; HAMER et al., 2015; WATERS et al., 2011).

*S. aureus* são cocos Gram-positivos com distribuição muito ampla. Podem ser encontrados no ambiente, porém, o homem é seu principal reservatório, estando presentes em diversas partes do corpo, como garganta, intestino, pele e principalmente nas fossas nasais de indivíduos saudáveis. A colonização da pele e nasofaringe facilita a disseminação deste micro-organismo, responsável por muitas das infecções hospitalares. Estas bactérias são causadoras de doenças que abrangem desde simples infecções (espinhas, furúnculos e celulites) até aquelas de maior gravidade (pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, síndrome da pele escaldada e septicemia). Outro fator preocupante envolvendo esta espécie constitui no aumento crescente de cepas multirresistentes, especialmente *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *S. aureus* resistente à vancomicina (VRSA), sendo de extrema importância o desenvolvimento de novos agentes antiestafilocócicos (CATÃO et al., 2006; SARAVOLATZ; PAWLAK; JOHNSON, 2010).

Outra espécie que vêm emergindo como importante patógeno resistente, *E. coli*, é uma bactéria Gram-negativa habitante da microbiota normal do intestino humano. No entanto, pode causar infecções oportunistas em indivíduos imunocomprometidos ou quando há rompimento das barreiras gastrointestinais. Além disso, existem linhagens patogênicas que se diferem das comensais pela presença de fatores de virulência específicos, os quais conferem a seus portadores capacidade de causar doenças mesmo em indivíduos saudáveis. Alguns desses patótipos causam gastroenterites caracterizadas por quadros de diarreia, que em alguns casos podem levar a complicações mais graves. Outros patótipos estão associados a infecções extra-intestinais, sendo responsáveis por infecções do trato urinário e meningite (INGRAHAM; INGRAHAM, 2010; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; KHAN; AHMAD; MEHBOOB, 2015; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009; PINTO et al., 2011).

A microbiota normal da pele de seres humanos abriga, além de *S. aureus*, a *P. aeruginosa*, uma bactéria Gram-negativa causadora de infecções hospitalares graves com elevada letalidade em pacientes imunocomprometidos (ANDONOVA; URUMOVA, 2013; FIGUEIREDO et al., 2007). Está frequentemente relacionada à Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica (PAV) e é reconhecida como segunda causa mais frequente de infecções de pele em pacientes queimados (CARVALHO et al., 2005). Esta espécie é caracterizada pela suscetibilidade natural a um número limitado de agentes antibacterianos e elevadas taxas de

resistência adquirida a múltiplos antibióticos (BREIDENSTEIN; FUENTE-NÚÑEZ; HANCOCK, 2011; KOBAYASHI; SADOYAMA; VIEIRA, 2009).

No âmbito das infecções resultantes da ingestão de produtos alimentares contaminados e da transmissão orofecal, *S. enterica* é uma espécie em constante evidência. Esta bactéria Gram-negativa abrange mais de 2.500 sorotipos pertencentes a seis subespécies. Diversos fatores de virulência deste micro-organismo interagem com mecanismos de defesa do hospedeiro em vários tecidos e durante diferentes estágios da infecção, resultando em significativa imunopatologia, morbidade ou até mesmo na mortalidade do hospedeiro (COBURN; GRASSL; FINLAY, 2007; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). Entre os vários sorotipos existentes, estão *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. Typhimurium e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. Choleraesuis. O primeiro causa enterocolite auto limitante, estando entre os principais micro-organismos responsáveis por intoxicação alimentar em países industrializados (HAPFELMEIER et al., 2004), enquanto o segundo provoca infecções invasivas ao infectar humanos, sendo um dos agentes etiológicos mais comuns de aneurisma infeccioso, uma infecção endovascular devastadora em seres humanos (CHIU et al., 2005).

## 2.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA E A URGÊNCIA DE NOVOS AGENTES ANTIBACTERIANOS

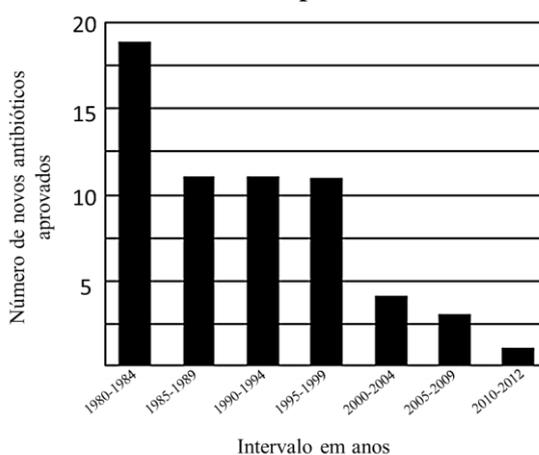
A resistência dos micro-organismos aos antimicrobianos constitui um dos problemas mais sérios de saúde da atualidade. Infecções causadas por bactérias resistentes têm sido recorrentes, assim como o surgimento de patógenos que apresentam resistência a múltiplas classes de antibióticos (CDC, 2013). Mundialmente, esse fenômeno exacerbado pelo uso indiscriminado de agentes antimicrobianos tem se tornado motivo de preocupação em virtude da iminência dos impactos social e econômico gerados pelo aumento da mortalidade e redução da qualidade de vida, ambos decorrentes das doenças infecciosas prolongadas e sem pronto tratamento (KPMG LLP, 2014).

A resistência adaptativa e ambientalmente adquirida pelas bactérias podem limitar severamente o tempo de vida útil dos agentes antibacterianos, tornando-os obsoletos em relação à eficácia terapêutica. A resistência adaptativa ocorre como resultado de mutações nas proteínas e nos genes expressados em resposta a estímulos ambientais. Alternativamente, micro-organismos do ambiente abrigam reservatórios de genes de resistência que podem ser transmitidos horizontalmente às bactérias patogênicas (SILVER, 2011; ZAKERI; LU, 2013).

De acordo com Fernandes (2006), além da resistência aos agentes antibacterianos disponíveis no mercado, as bactérias vêm adquirindo genes de virulência que têm transformado micro-organismos de ocorrência comum em patógenos invasivos e produtores de toxinas. O surgimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas multirresistentes à antibióticos, inclusive àqueles descobertos recentemente, vem esgotando as possibilidades de tratamento tanto contra infecções recorrentes quanto frente àquelas originadas como complicações de outras doenças (CDC, 2013; GWYNN et al., 2010). Assim, as bactérias demonstram possuir a capacidade de desenvolver mecanismos de resistência a novos fármacos rapidamente, à medida que eles são introduzidos na terapêutica, conseqüentemente, cada antibacteriano possui um tempo de vida útil quanto à sua eficácia terapêutica (MAHADY et al., 2008; SHER, 2009).

A maior parte dos antibióticos utilizados atualmente foi descoberta entre as décadas de 1940 e 1960, sendo a maioria derivados de produtos naturais (BUTLER; BUSS, 2006; LEWIS, 2013; PELÁEZ, 2006; SINGH; BARRETT, 2006; WALSH; WRIGHT, 2005; ZHOU et al., 2012). Entretanto, devido a diversas razões envolvendo questões regulatórias e econômicas, além do surgimento de tecnologias que prometiam o pronto fornecimento de uma grande biblioteca de substâncias sintéticas, muitas companhias farmacêuticas, a partir do final da década de 80, reduziram ou até mesmo eliminaram seus investimentos na pesquisa com produtos naturais (BROWN; LISTER; MAY-DRACKA, 2014; LAM, 2007; LEWIS, 2013; PELÁEZ, 2006). Essa mudança de paradigma na descoberta de novas substâncias, no entanto, não se mostrou tão eficiente na produção de novos agentes antibacterianos, resultando na redução progressiva do número de antibióticos aprovados, conforme apresentado na Figura 1 (FERNANDES, 2006; LEWIS, 2013).

Figura 1 – Número de novos antibióticos aprovados entre os anos de 1980 e 2012.



Fonte: ADAPTADO DE CDC, 2013.

Desta forma, o desenvolvimento de resistência aos antibióticos representa atualmente um problema para a saúde humana, diminuindo o arsenal terapêutico efetivo disponível. Isto reforça a necessidade contínua de identificação de novas entidades químicas com ação antibacteriana (MACLEAN et al., 2010; ZHOU et al., 2012).

Boucher e colaboradores (2009) relataram, em documento sobre fármacos antibacterianos potencialmente eficazes em fase final de desenvolvimento, a necessidade de que a indústria e a academia em conjunto com outras instituições e agências de atendimento, pesquisa e vigilância de cuidados com a saúde, trabalhem na criação de uma infraestrutura robusta e sustentável para a pesquisa e desenvolvimento de agentes antibacterianos, no intuito de responder e prevenir o desenvolvimento da resistência bacteriana.

Neste contexto, o desenvolvimento tecnológico e de novos métodos têm revolucionado a triagem de produtos naturais frente às limitações desse processo, levando a um renovado interesse nesses produtos como fonte de diversidade química e geração de protótipos (KOEHN; CARTER, 2005; LAM, 2007; RISHTON, 2008).

### 2.3 METABOLISMO SECUNDÁRIO VEGETAL: POTENCIAL FONTE DE AGENTES ANTIBACTERIANOS

A transformação e interconversão de uma variedade de moléculas orgânicas são necessárias à sobrevivência, crescimento e reprodução dos organismos. O metabolismo primário compreende as vias de modificação e síntese de diversas substâncias essenciais como proteínas, gorduras, carboidratos e ácidos nucleicos. Os metabólitos secundários são originados a partir de intermediários biossintéticos do metabolismo primário. Esses derivados, produzidos por meio dos processos fundamentais da fotossíntese, glicólise e ciclo de Krebs, são conhecidos como blocos de construção, do inglês *building blocks* e embora estejam presentes em número limitado, suas unidades comuns podem ser identificadas nas mais diversas estruturas do metabolismo secundário (DEWICK, 2009; DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012).

As plantas produzem um amplo arsenal de metabólitos secundários que abrangem mais de 200.000 substâncias já identificadas em termos de estrutura química. A composição e concentração desses produtos podem variar em nível individual e populacional, nos diferentes tipos de tecidos, órgãos e estágios de desenvolvimento (HARTMANN, 2007; NEILSON et al., 2013; WINK, 2003). A distribuição diferencial dessas substâncias possui valor

taxonômico, tendo em vista que certos grupos de metabólitos secundários predominam dentro de determinados gêneros ou famílias do reino vegetal (WINK, 2003).

Durante algum tempo, os aspectos funcionais do metabolismo secundário vegetal foram cientificamente negligenciados e os metabólitos secundários, considerados resíduos do metabolismo primário ou produtos de desintoxicação. No entanto, a partir do desenvolvimento do conhecimento bioquímico, este conceito se modificou e atualmente, sabe-se que os metabólitos secundários são produzidos como resultado da adaptação ao ambiente circundante, exercendo funções de defesa da planta contra predadores e atração de polinizadores, contribuindo para sua sobrevivência (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012; HARTMANN, 2007; WINK, 2013). A fim de se defenderem contra herbívoros, plantas concorrentes e patógenos, as espécies vegetais produzem uma diversidade de metabólitos que apresentam uma grande variedade de propriedades biológicas e toxicológicas (DEWICK, 2009; THEIS; LERDAU, 2003; WINK, 2013).

O isolamento da morfina da *Papaver somniferum* foi um marco significativo no estudo dos metabólitos secundários como a primeira demonstração de que um princípio ativo de planta medicinal poderia ser isolado. Desde então, se sucedeu o isolamento de diversas moléculas naturais como a digitoxina, pilocarpina e quinina, isoladas das espécies *Cinchona succirubra*, *Digitalis purpurea*, *Pilocarpus jaborandi* e *C. succirubra*, respectivamente, que são utilizadas na medicina popular até os dias atuais (BUTLER, 2004; DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012; HARTMANN, 2007).

Diversos metabólitos secundários têm sido reportados como potenciais agentes antitumorais, imunossupressores, antioxidantes e antimicrobianos, além de constituírem uma fonte inestimável de diversidade química, que vem sendo utilizada na busca de protótipos para o desenvolvimento de novos medicamentos. Dessa forma, esses constituintes químicos continuam demonstrando benefícios para a medicina atual e se apresentando como uma grande promessa para o futuro (VAISHNAV; DEMAIN, 2010; GURIB-FAKIM, 2006). Em recente revisão de literatura onde foram computados dados de trinta anos de pesquisa, Newman e Cragg (2012) relataram que "*a utilidade de produtos naturais como fontes de novas estruturas, não necessariamente entidades finais de fármacos, ainda está viva e bem*".

Em recente artigo de revisão, Pan e colaboradores (2014) relataram que tem havido um ressurgimento do uso de plantas medicinais devido aos efeitos adversos dos produtos sintéticos disponíveis no mercado, à falta de opções terapêuticas curativas modernas para várias doenças crônicas e à resistência microbiana, bem como em virtude do investimento sem precedentes na pesquisa e no desenvolvimento farmacêutico (P&D). Como

resultado desse momento temporal, o uso destas espécies vegetais e de produtos à base dessas plantas para fins de cuidados com a saúde aumentou em popularidade em todo o mundo ao longo dos últimos 40 anos, tanto em países em desenvolvimento ou emergentes (por exemplo, África do Sul, Brasil, China, Índia e México) quanto desenvolvidos ou centrais (por exemplo, EUA, Canadá, a maioria dos países da Europa Ocidental, e o Japão).

As plantas medicinais constituem uma das fontes mais importantes destas substâncias bioativas e podem contribuir para a descoberta de novos agentes antibacterianos, devido à capacidade que possuem de biossintetizar moléculas naturais com propriedades antimicrobianas para prevenir ou combater o ataque de micro-organismos patogênicos (BRAZ FILHO, 2010; CALIXTO, 2005; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; MILLER, 2011). Assim, a pesquisa com plantas medicinais têm atraído a atenção de pesquisadores em todo o mundo, devido à variedade de metabólitos secundários que essas espécies vegetais produzem, incluindo alcaloides, flavonoides e terpenos, cujas propriedades antimicrobianas *in vitro* têm sido reveladas em inúmeros trabalhos científicos (NITHA; REMASHREE; BALACHANDRAN, 2012; SHER, 2009).

Tendo em vista a ausência de agentes antiestafilocócicos derivados de plantas medicinais utilizados clinicamente, Gibbons (2004), em um trabalho que reuniu dados reportados na literatura entre 1995 e 2003, cita diversos exemplos de metabólitos secundários considerados modificadores da resistência em *S. aureus* ou que apresentaram atividade antibacteriana frente a esse micro-organismo.

Saleem e colaboradores (2010), em um estudo de revisão compreendendo o período de 2000 a 2008, reportaram a existência de uma vasta gama de metabólitos secundários, muitos destes isolados de espécies vegetais e pertencentes a diferentes classes químicas, que apresentaram atividade antimicrobiana significativa frente a diversas espécies bacterianas e fúngicas.

Produtos naturais vegetais também têm sido apontados como inibidores de bombas de efluxo, conhecidas como “bombas de resistência a múltiplos fármacos”, constituindo um novo alvo na busca por novos agentes antibacterianos no contexto de enfrentamento ao desenvolvimento crescente da resistência bacteriana (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; MAHADY et al., 2008).

O Brasil possui uma biodiversidade que se destaca como uma fonte promissora para descoberta de novos constituintes químicos com propriedades biológicas importantes. No entanto, ainda são poucos os dados científicos tanto fitoquímicos quanto farmacológicos

acerca dessas espécies vegetais, incluindo as nativas como a *V. polyanthes*, que constitui a espécie vegetal objeto deste estudo (BRAZ FILHO, 2010; DUARTE, 2006).

Tendo em vista este fato aliado ao cenário atual da resistência bacteriana, assim como a escassez de novas opções terapêuticas eficazes no enfrentamento contra a emergência de patógenos multirresistentes, a avaliação da atividade antibacteriana se faz essencial na triagem de extratos e metabólitos secundários isolados de espécies vegetais para descoberta de novos agentes antibacterianos (KLANČNIK et al., 2010; EUCAST, 2000).

## 2.4 MÉTODOS UTILIZADOS PARA A INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Diversas técnicas de avaliação da atividade antimicrobiana estão disponíveis, como os métodos de difusão, de diluição, técnicas espectroscópicas, ensaios de fluorescência, bioautografia e modelos de infecção animal (EUCAST, 2000; KLANČNIK et al., 2010; OSTROSKY et al., 2008; VALGAS et al., 2007; WILKINSON, 2006; ZHOU et al., 2012).

Os métodos de difusão em disco e de diluição (macrodiluição e microdiluição) são estabelecidos como padrão pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2012a, 2012b) e aceitos pelo *Food and Drug Administration* (FDA), estando entre os métodos *in vitro* mais utilizados para a avaliação da atividade antibacteriana de produtos naturais. Adicionalmente, a bioautografia constitui uma técnica comumente aplicada por ter a vantagem de aliar, simultaneamente, a separação dos componentes de uma mistura à identificação dos constituintes bioativos (CHOMA; GRZELAK, 2011; MARSTON, 2011; OSTROSKY et al., 2008; VALGAS et al., 2007; WILKINSON, 2006; ZHOU et al., 2012).

Apesar do surgimento de novas tecnologias mais avançadas, estes métodos são simples, reprodutíveis e não requerem maior infraestrutura laboratorial ou equipamentos sofisticados, portanto, apresentam boa aplicabilidade em triagens de rotina para avaliação da atividade antibacteriana (CHOMA; GRZELAK, 2011; ZHOU et al., 2012). Na realidade, não existe uma metodologia padronizada para a avaliação da atividade antimicrobiana de produtos naturais e sim aquela mais adequada, de acordo com o objetivo do ensaio e com as limitações e vantagens do método (WILKINSON, 2006; ZHOU et al., 2012).

Embora o método de difusão em disco seja bastante utilizado na rotina de avaliação da atividade antibacteriana, uma de suas limitações consiste na impossibilidade de se mensurar a quantidade de amostra teste que se difundiu pelo ágar, o que torna este método

menos adequado, em relação ao método de diluição em caldo, na determinação do valor da Concentração Inibitória Mínima (CIM) (CHOMA; GRZELAK, 2011).

Os métodos de bioautografia se assemelham ao método de difusão em ágar por seus procedimentos e característica qualitativa. Assim como na difusão, a finalidade da bioautografia é a observação de zonas de inibição do crescimento bacteriano, indicativas de atividade antibacteriana. A diferença é que, na bioautografia, as substâncias testadas devem ser primeiramente separadas por cromatografia em papel ou CCD para, em seguida, se difundirem através do ágar (CHOMA; GRZELAK, 2011; WILKINSON, 2006).

O método de diluição avalia a relação entre o crescimento visível do micro-organismo desafiado e a concentração da substância (ou extrato) testada, fornecendo resultados quantitativos, podendo ser aplicado a extratos e substâncias puras polares ou apolares (CHOMA; GRZELAK, 2011; OSTROSKY et al., 2008). O valor da CIM é definido como a menor concentração de uma substância capaz de inibir visualmente o crescimento de um micro-organismo e é expresso, geralmente, em miligramas por mililitros (VALGAS et al., 2007; ZHOU et al., 2012).

Para a interpretação dos resultados, observa-se visualmente a turvação do meio ou mede-se a por espectrofotômetro. A utilização de indicadores de viabilidade celular, como os sais de tetrazólio, tem resultado em uma melhora na detecção do crescimento microbiano, onde a variação de cor é mais facilmente identificada, mesmo com uma menor densidade celular do micro-organismo (KLANČNIK et al., 2010; VALGAS et al., 2007; WILKINSON, 2006).

## 2.5 CONTEXTUALIZAÇÃO DA ESPÉCIE VEGETAL ESTUDADA

### 2.5.1 A Família Asteraceae e o gênero *Vernonia*

A família Asteraceae, também conhecida como Compositae, constitui o maior grupo sistemático entre as angiospermas, compreendendo cerca de 1.620 gêneros e 23.600 espécies. As plantas pertencentes a essa família possuem distribuição praticamente cosmopolita, sendo encontradas em todos os tipos de habitats e especialmente diversificadas nas regiões tropicais e subtropicais da América do Norte, nos Andes, leste do Brasil, África do Sul, na região do Mediterrâneo, Ásia Central e sudoeste da China (GARCÍA-SÁNCHEZ; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ; VILLASEÑOR, 2014; KENNY et al., 2014; MAIA et al., 2010; VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005; <http://tolweb.org/Asteraceae/20780>, acessado em 16 de julho de 2015).

As espécies da família Asteraceae apresentam variações quanto à forma de vida, estrutura floral, mecanismos de polinização, dispersão das sementes (GARCÍA-SÁNCHEZ; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ; VILLASEÑOR, 2014) e têm sido extensivamente estudadas em relação à sua morfologia, anatomia, fitoquímica e atividade biológica, fornecendo bases para o desenvolvimento de novos fármacos (protótipos) (HATTORI; NAKAJIMA, 2008; NAKAJIMA; SEMIR, 2001; VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005).

De acordo com Fabri e colaboradores (2011), a família Asteraceae é conhecida pelas propriedades terapêuticas, cosméticas e aromáticas de suas espécies representantes, constando relatos na literatura que apontam o uso medicinal dessas plantas como anti-inflamatório, anti-helmíntico, diurético, adstringente, analgésico, antiespasmódico, antioxidante e antimicrobiano (BOSCOLO; VALLE, 2008; DUARTE, 2006; LORENZI; MATOS, 2008).

Segundo Maia e colaboradores (2010), plantas como *Baccharis trimera* (carqueja), *Matricaria chamomilla* (camomila), *Cynara scolimus* (alcachofra), *Vernonia condensata* (boldo-da-bahia) e *Arnica montana* (arnica verdadeira), amplamente comercializadas como fitoterápicos, conferem destaque à família Asteraceae, especialmente como produtora de compostos bioativos.

As diversas propriedades farmacológicas apresentadas pelas espécies da família Asteraceae se devem à presença de vários metabólitos secundários, entre os quais, terpenos, flavonoides, cumarinas, poliacetilenos, ácidos clorogênicos, ácidos graxos, alcaloides e lactonas sesquiterpênicas (DIAS; MIGUEL; MIGUEL, 2009; KENNY et al., 2014; RAUH, 2008; RIBEIRO; SILVA; CASTRO, 2010; STEVENS, 2001).

Entre os gêneros pertencentes à família Asteraceae, o *Vernonia* constitui um dos maiores e mais importantes com aproximadamente 1.500 espécies distribuídas, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais, tendo a África e a América do Sul como os principais centros de dispersão (MAIA et al., 2010; MISEREZ et al., 1996).

Inúmeras espécies desse gênero são utilizadas como plantas medicinais em várias regiões do mundo, principalmente nos continentes Africano e Americano, inclusive no Brasil (MACHADO et al., 2013; MAIA et al., 2010), destacando-se a *Vernonia amygdalina*, utilizada popularmente no tratamento da esquistossomose, disenteria amebiana, distúrbios gastrointestinais, malária, doenças venéreas, hepatites, diabetes, entre outras doenças (ERASTO; GRIERSON; AFOLAYAN, 2006; FAROMBI; OWOEYE, 2011; YEAP et al., 2010) e a *Vernonia colorata*, empregada em inúmeras enfermidades, como por exemplo, no tratamento de tosse, pneumonia, dores de estômago, doenças de pele, parasitoses, desordens

do fígado e no controle da diabetes mellitus (GAKUYA et al., 2013; MACHADO et al., 2013; NADEMBEGA et al., 2011; SY et al., 2005).

No Brasil, *Vernonia condensata* é popularmente utilizada no tratamento de problemas digestivos, insuficiência hepática, inflamação da vesícula, dores de estômago e musculares, além de ser empregada como analgésico e estimulante do apetite (ALBUQUERQUE et al., 2007; LORENZI; MATOS, 2008). O extrato alcoólico das folhas de *Vernonia scorpioides* é amplamente empregado no tratamento de várias desordens de pele, como ferimentos crônicos e úlceras (BUSKUHL et al., 2010). *Vernonia tweediana* e *Vernonia cognata* são utilizadas para tratar doenças respiratórias e alérgicas (PETRI et al., 2008), assim como as folhas e raízes de *V. polyanthes* são popularmente empregadas em quadros de bronquites, tosses, além de reumatismo (BRAGA et al., 2007).

A ampla utilização de espécies de *Vernonia* na medicina tradicional para o tratamento de diversas patologias vem estimulando a investigação do ponto de vista farmacológico pela comunidade científica, revelando importantes propriedades, entre as quais, antiplasmódica, analgésica, antipirética, anti-inflamatória, antioxidante, hipoglicemiante e antimicrobiana (COSTA et al., 2008; TOYANG; VERPOORTE, 2013).

Estudos fitoquímicos relacionados às plantas desse gênero relatam a ocorrência de classes distintas de metabólitos secundários como glicosídeos esteroidais, lignoides, carotenoides, taninos, alcaloides, principalmente flavonoides e terpenos (COSTA et al., 2008; MACHADO et al. 2013, MARTUCCI et al., 2014; MORALES-ESCOBAR et al., 2007; ZANON et al., 2008).

Estudos recentes envolvendo espécies do gênero em questão têm demonstrado propriedades anti-inflamatória (YOUN et al., 2012), antiplasmódica (TOYANG et al., 2013a), citotóxica (TOYANG et al., 2013b) e antibacteriana (ERASTO; GRIERSON; AFOLAYAN, 2006) de LSTs isoladas de espécies de *Vernonia*, enquanto os flavonoides são reconhecidos, principalmente, por suas propriedades antioxidantes (AHMAD et al., 2011; EYONG et al., 2011). Diversas espécies de *Vernonia* têm sido avaliadas em relação à atividade antibacteriana, incluindo a espécie *V. polyanthes*, assim como vários constituintes químicos com essa propriedade biológica têm sido isolados em estudos fitoquímicos, demonstrando o potencial antibacteriano de plantas pertencentes a esse gênero (TOYANG; VERPOORTE, 2013).

### 2.5.1.1 *Tricomas Glandulares*

Os tricomas são definidos como apêndices epidérmicos que possuem ampla variação quanto à morfologia, conteúdo e função, sendo encontrados com frequência na superfície das folhas e outros órgãos de inúmeras espécies vegetais (JERBA; FERNANDES, 2004; SCHILMILLER; LAST; PICHERSKY, 2008; WAGNER, 1991).

De acordo com Valkama e colaboradores (2003), o interesse científico em relação aos tricomas baseia-se não somente na importância funcional e taxonômica que representam, como também na relevância econômica de produtos gerados por algumas dessas estruturas anatômicas.

Os tricomas são divididos em duas categorias gerais que podem coexistir: não glandulares e glandulares. Os primeiros, também denominados tricomas tectores, são simples pelos que formam uma barreira mecânica protetora contra agentes externos, como herbívoros, patógenos, radiação, temperaturas extremas, além de evitar a perda excessiva de água (GONZÁLES et al., 2008; JAIME et al., 2013; JERBA; FERNANDES, 2004, SCHILMILLER; LAST; PICHERSKY, 2008; VALKAMA et al., 2003; WAGNER, 1991), enquanto os tricomas glandulares (ou secretores) são mais especializados e estão envolvidos com a biossíntese, armazenamento e secreção de uma série de moléculas naturais, em geral lipofílicas, como néctar, mucilagens, lipídeos, enzimas digestivas e metabólitos secundários, relacionadas com a defesa química da planta e/ou atração de polinizadores (APPEZZATO-DA-GLÓRIA et al., 2012; LANGE; TURNER, 2013; MCDOWELL et al., 2011; WANG et al., 2009).

Derivados de fenilpropanoides, metilcetonas e flavonoides estão entre as classes de metabólitos secundários encontradas nos exudatos de tricomas glandulares. No entanto, a presença de terpenos parece ser mais significativa. Muitas dessas substâncias apresentam importante valor comercial como produtos farmacêuticos, cosméticos, aditivos alimentares e pesticidas naturais, o que têm atraído a atenção de pesquisadores na perspectiva de explorar o potencial dessas estruturas como fornecedoras de produtos naturais de interesse (SCHILMILLER; LAST; PICHERSKY, 2008; WAGNER; WANG; SHEPHERD, 2004).

Tricomas secretores de diversos tipos são amplamente encontrados na família Asteraceae (APPEZZATO-DA-GLÓRIA et al., 2012; MILAN; HAYASHI; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2006; TISSIER, 2012). Normalmente, estão localizados em depressões da epiderme (SMILJANIC, 2005) e produzem uma variedade de metabólitos secundários, com destaque para as LSTs (LANGE; TURNER, 2013).

Em relação ao gênero *Vernonia*, a literatura disponível também é vasta acerca da existência de tricomas glandulares, cuja ocorrência já foi relatada em várias espécies, entre as quais, *Vernonia brasiliiana* (FILIZOLA et al., 2003), *V. condensata* (MILAN; HAYASHI; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2006), *Vernonia herbacea*, *Vernonia platensis* (HAYASHI; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2005) e *V. polyanthes* (ALVES; NEVES, 2003).

Considerando-se a obtenção do perfil metabólico dos tricomas glandulares, a localização dessas estruturas nas superfícies dos órgãos vegetais permite a extração dos compostos secretados por meio de simples lavagens utilizando solventes orgânicos, restringindo, dessa forma, a complexidade do extrato às substâncias armazenadas nos tricomas e reduzindo o tempo de extração (TISSIER, 2012).

#### 2.5.1.2 Marcadores quimiotaxonômicos

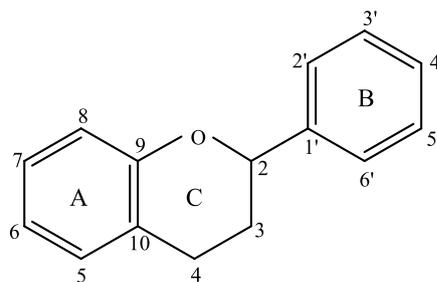
Os marcadores quimiotaxonômicos podem ser definidos como as micromoléculas, em sua maior parte metabólitos secundários, que permitam a diferenciação entre espécies em qualquer nível hierárquico (FERREIRA, 2010).

De acordo com relatos da literatura, os flavonoides e as LSTs são considerados importantes marcadores quimiotaxonômicos da família Asteraceae e do gênero *Vernonia*, devido a essas classes de metabólitos secundários serem identificadas, com maior frequência, em estudos fitoquímicos envolvendo espécies pertencentes a essas categorias taxonômicas (ABDEL-BASET et al., 1971; COSTA et al., 2008; EMERENCIANO et al., 2001; SEAMAN, 1982; VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005).

Os flavonoides constituem uma das mais amplas classes de metabólitos secundários e estão distribuídos entre inúmeras espécies vegetais (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009; SALEEM et al., 2010).

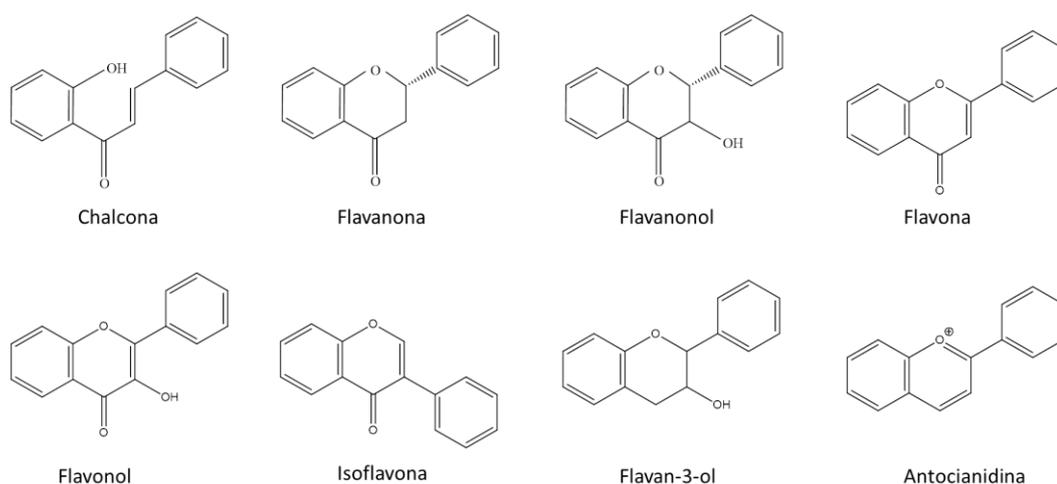
Do ponto de vista químico, os flavonoides são substâncias aromáticas que possuem uma estrutura básica contendo 15 átomos de carbono, o núcleo flavano (Figura 2), caracterizado pela presença de dois anéis aromáticos (A e B) e um heterociclo oxigenado (anel C) (ARAÚJO et al., 2005; BEHLING et al., 2004; PIETTA, 2000). As oxidações e substituições no anel C dessas substâncias levam à diferenciação em subclasses distintas, cujas estruturas básicas estão expostas na Figura 3 (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009; PIETTA, 2000).

Figura 2 – Estrutura básica dos flavonoides.



Fonte: ARAÚJO et al., 2005.

Figura 3 – Estruturas básicas das subclasses de flavonoides.



Fonte: ADAPTADO DE COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009.

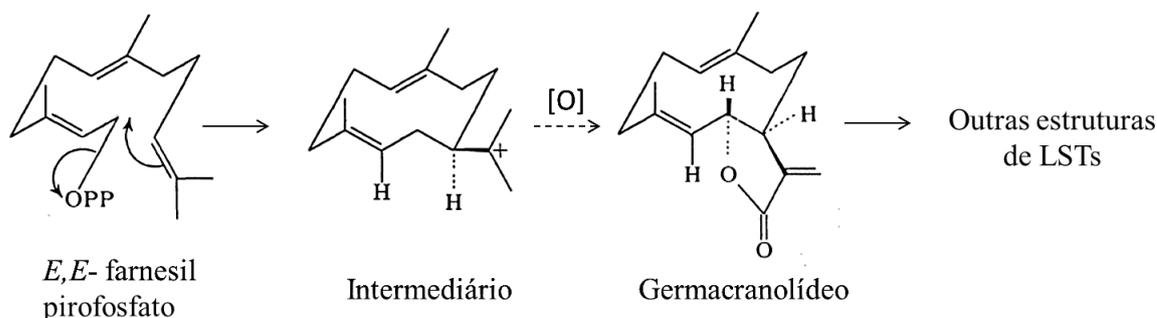
A diversidade estrutural dos flavonoides, que confere a essa classe de produtos naturais diferentes propriedades biológicas, pode ser atribuída aos níveis de oxidação e às variações de complexidade no esqueleto carbônico básico promovidas por reações de alquilação, glicosilação, oligomerização e outras (TAHARA, 2007).

Os flavonoides são reconhecidamente importantes para a medicina no tratamento e prevenção de doenças por suas propriedades biológicas, entre as quais, antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, hepatoprotetora, antidiabética e antimicrobiana (BUER; IMIN; DJORDJEVIC, 2010; DOVICH; LAJOLO, 2011; HAVSTEEN, 2002; TAPAS; SAKARKAR; KAKDE, 2008). Substâncias pertencentes a essa classe, como apigenina, luteolina, narigenina, quercetina, dentre outras, têm sido identificadas como potentes agentes antibacterianos (CUSHNIE; LAMB, 2005; MARTINI; KATERERE; ELOFF, 2004; SALEEM et al., 2010).

Além dos flavonoides, as LSTs são amplamente encontradas em espécies da família Asteraceae (MATEJIĆ; ŠARAC; RANĐELOVIĆ, 2010; PICMAN, 1986). O gênero *Vernonia* é caracterizado como fonte de LSTs altamente oxigenadas, tais como glaucolídeos e hirsutinolídeos (BUSKUHL et al, 2010; LOPES, 1991). Estes metabólitos secundários são encontrados nas folhas e inflorescências das plantas, sendo armazenados em grande quantidade nos tricomas glandulares da superfície foliar (AMBRÓSIO et al., 2008; APPEZZATO-DA-GLÓRIA et al., 2012; FAVI et al., 2008; WAGNER; WANG; SHEPHERD, 2004).

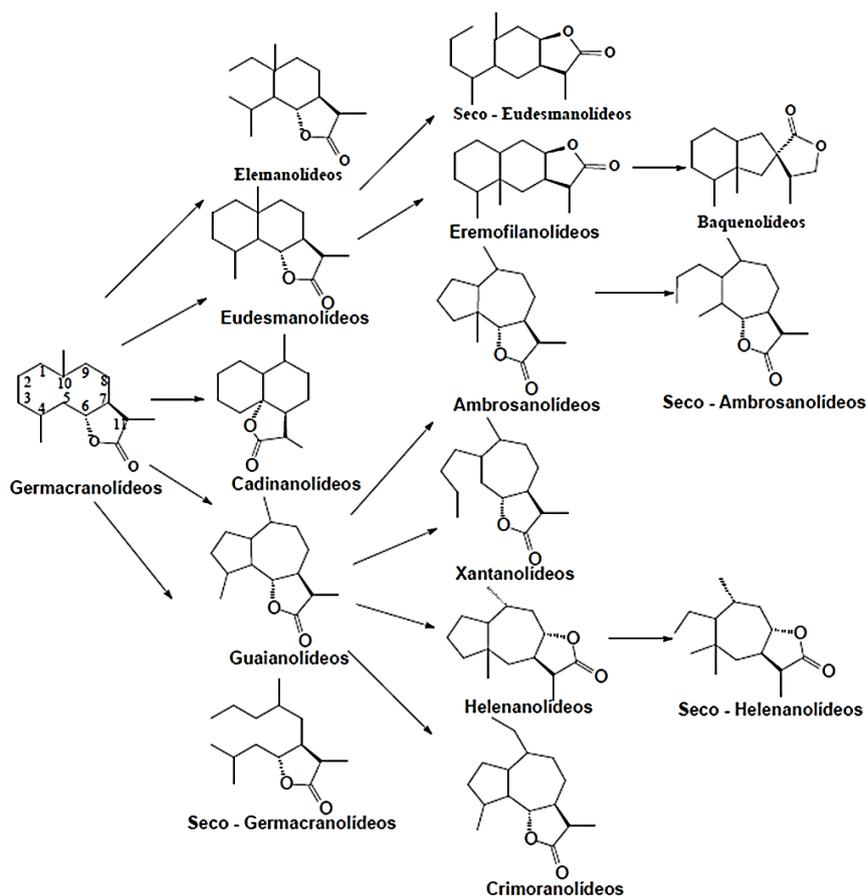
As LSTs são biogeneticamente derivadas do farnesil pirofosfato, o sesquiterpeno biossinteticamente mais simples, formado a partir de três unidades de isopreno. A ciclização do *E, E*-farnesil pirofosfato resulta na formação do *E, E*-germacradieno. A partir da oxidação de um dos carbonos da cadeia lateral deste intermediário é formado o anel lactônico, produzindo a LST (Figura 4) (FISCHER; OLIVIER; FISCHER, 1979; SEAMAN, 1982). Após a lactonização ou mesmo antes, o precursor germacrano pode sofrer uma série de modificações estruturais, como ciclizações, abertura de anéis ou migração de grupos metila, gerando diferentes estruturas de LSTs. Assim, essas substâncias são classificadas em diversas subclasses, de acordo com o tipo de esqueleto carbocíclico básico, sendo precursora a subclasse dos germacranolídeos, conforme apresentado na Figura 5 (ARANTES, 2007; MAJDI et al., 2011; PICMAN, 1986). As modificações na estrutura do esqueleto carbônico básico dessas substâncias envolvem a incorporação de epóxidos, hidroxilas e grupos ácidos (RODRIGUEZ; TOWERS; MITCHELL, 1976).

Figura 4 – Biogênese das lactonas sesquiterpênicas.



(*E, E*): trans,trans. Fonte: ADAPTADO DE FISCHER; OLIVIER; FISCHER, 1979.

Figura 5– Esqueletos carbônicos e relações biogênicas das subclasses de lactonas sesquiterpênicas.

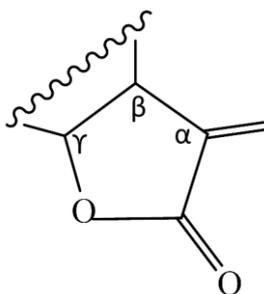


Fonte: COSTA, 2008.

Em função do amplo espectro de atividade biológica que apresentam, as LSTs constituem substâncias com elevado potencial terapêutico, destacando-se propriedades anti-inflamatórias, antiparasitárias, citotóxicas e antimicrobianas (KIM et al., 2006; MATEJÍČ; ŠARAC; RANĐELOVIĆ, 2010; MERFORT, 2002; PICMAN, 1986).

Nos diversos relatos científicos que abordam a relação estrutura-atividade das LSTs, as propriedades biológicas são atribuídas à presença de grupos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados, mas principalmente do grupo  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona, demonstrado na Figura 6. Estes grupos são considerados potentes agentes alquilantes e reagem com nucleófilos, especialmente grupos sulfidrila de cisteína presentes nas proteínas, através de reações de adição tipo *Michael*. Entretanto, em algumas estruturas, centros eletrofílicos adicionais também atuam como sítios para essas reações de alquilação (ALVES, 2011; DEWICK, 2009; DIRSCH et al., 2000; FABIAN et al., 2013; SCOTTI et al., 2007).

Figura 6 – Grupo  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona de lactonas sesquiterpênicas.



Fonte: RODRIGUEZ; TOWERS; MITCHELL, 1976.

### 2.5.2 A Espécie *Vernonia polyanthes* Less.

*V. polyanthes* Less. é uma planta nativa do Brasil e amplamente distribuída (LORENZI; MATOS, 2008), tendo sido descrita nos estados da Bahia, Distrito Federal, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro e São Paulo, constando também registros em outros países, como Argentina, Bolívia, Equador e Venezuela (<http://tropicos.org/Name/2708839?tab=specimens>, acessado em 16 de julho de 2015).

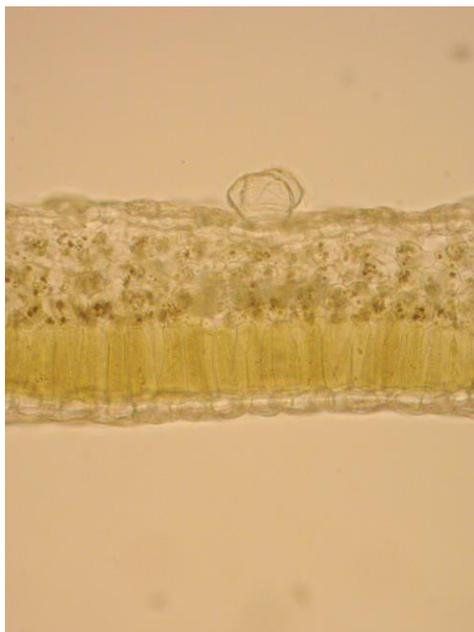
Anatomicamente, *V. polyanthes* (Figura 7) apresenta características típicas da família Asteraceae e gênero *Vernonia*. As folhas são simples, ásperas ao toque e possuem, em sua face abaxial, tricomas glandulares implantados em depressões do estrato epidérmico (Figura 8) (ALVES; NEVES, 2003).

Figura 7 – Fotografia das partes aéreas de *V. polyanthes*.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Figura 8 – Fotografia do tricoma glandular de *V. polyanthes*.



Corte transversal da folha de *V. polyanthes* fotografado em microscópio de luz modelo BX41 com câmera digital acoplada modelo Power Shot A640. Procedimento realizado pela Técnica Administrativa em Educação Flavia Bonizol Ferrari, no Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFJF. Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2015.

A espécie, popularmente conhecida como assa-peixe, assa-peixe branco, estanca-sangue, tramanhém, mata-pasto, cambará-guassu e enxuga, é conhecida por fornecer bom mel e suas folhas são utilizadas no tratamento de doenças do aparelho respiratório, problemas renais, fraturas, torções, contusões e luxações e como agente cicatrizante e anti-inflamatório em ferimentos cutâneos, sendo também indicadas por suas propriedades tônica, emenagoga e diurética (ALVES; NEVES, 2003; CORRÊA et al., 2004; SOUZA et al., 2008). Segundo Lorenzi e Matos (2008), as folhas podem ser utilizadas na forma de compressa para afecções da pele, dores musculares e reumatismo, e o chá é indicado para eliminação de cálculos renais e em quadros de tosses noturnas.

As propriedades diuréticas e hipotensoras da infusão das folhas de *V. polyanthes* foram investigadas por Silveira, Rúbio e Alves (2000) e os resultados demonstraram um aumento significativo do fluxo urinário e da excreção de sódio em ratos, resultando na diminuição da pressão arterial nesses animais. Seguindo a mesma linha de investigação, outro estudo realizado para avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico de *V. polyanthes*, administrado por via oral, frente à pressão arterial e excreção renal de sódio em ratos normotensos, sugeriu que o extrato dessa planta é um potente agente vasodilatador, reduzindo a pressão arterial sem alterar os mecanismos renais de autorregulação (SILVEIRA; FOGGIO; GONTIJO, 2003).

Em uma investigação realizada por Barbastefano e colaboradores (2007), os extratos metanólico e clorofórmico obtidos das partes aéreas de *V. polyanthes* inibiram significativamente, em 64% e 90%, respectivamente, a produção de lesões na mucosa gástrica induzidas por etanol em ratos, indicando que ambos os extratos apresentam efeitos gastroprotetores e corroborando com o uso popular dessa planta como cicatrizante.

Braga e colaboradores (2007), em estudo realizado para investigar as atividades leishmanicida e antifúngica de vinte espécies de plantas da flora brasileira, tradicionalmente utilizadas em quadros inflamatórios e infecciosos, reportaram que o extrato metanólico das folhas de *V. polyanthes* apresentou o melhor resultado na inibição de formas promastigotas de *Leishmania amazonenses*, demonstrando o potencial dessa espécie como fonte de novos compostos capazes de tratar a leishmaniose, uma doença endêmica no Brasil.

Devido à inexistência de validação científica para o uso tradicional de *V. polyanthes* no tratamento de processos dolorosos e inflamatórios, Temponi e colaboradores (2012) investigaram os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato etanólico das folhas dessa espécie vegetal por meio da utilização de modelos animais. Os resultados obtidos sugerem que *V. polyanthes* pode ser uma excelente fonte de substâncias ativas com atividades antinociceptiva e anti-inflamatória.

No intuito de fornecer subsídios científicos adicionais para o uso medicinal popular do assa-peixe, Rodrigues (2013) avaliou o efeito anti-inflamatório tópico dos extratos hexânico, em acetato de etila e etanólico das folhas de *V. polyanthes* e os resultados do estudo configuram essa espécie como potencial candidata para a busca de novos agentes com propriedade anti-inflamatória tópica e explicam parcialmente o uso tradicional dessa planta no tratamento de ferimentos cutâneos.

A utilização de diversas plantas medicinais pela comunidade indígena Vanuúre no tratamento de doenças respiratórias, somada ao aumento do número de casos de tuberculose multirresistente, impulsionaram Oliveira e colaboradores (2007) a avaliarem a atividade antimicobacteriana do extrato hidroalcoólico das raízes de *V. polyanthes*, entre outros, frente à cepa *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv - ATCC 27294 por meio do ensaio cinético antimicobacteriano. O extrato avaliado apresentou atividade antimicobacteriana promissora, de acordo com os resultados do estudo.

Tendo em vista a escassez de investigações microbiológicas de *V. polyanthes*, contemplando um espectro mais abrangente de micro-organismos, Jorgetto e colaboradores (2011) avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das folhas dessa espécie vegetal frente a 16 cepas de referência, incluindo amostras bacterianas e fúngicas,

utilizando o método de difusão em ágar. O extrato foi ativo frente às cepas de *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, revelando o potencial antibacteriano dessa espécie vegetal.

Considerando-se a necessidade de ampliar e fortalecer o embasamento científico em relação ao potencial antimicrobiano de *V. polyanthes*, Temponi (2012) investigou a atividade antibacteriana de extratos e frações dessa espécie vegetal frente à *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 por meio dos métodos de difusão em ágar e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), utilizando o método de microdiluição de acordo com as orientações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Os resultados observados por esta autora concordaram com aqueles relatados no estudo realizado por Jorgetto e colaboradores (2011) descrito acima, visto que a fração diclorometânica foi ativa frente a *S. aureus*, *E. coli* e *S. Typhimurium*. No entanto, essa fração foi também ativa frente às cepas de *P. aeruginosa*, verificando-se atividade antibacteriana de *V. polyanthes* frente a essa espécie e divergindo dos resultados apresentados por Jorgetto e colaboradores (2011), onde não se observou ação antibiótica contra essa bactéria.

Adicionalmente, Silva e colaboradores (2012) investigaram a atividade antibacteriana dos extratos metanólicos brutos e óleos essenciais de três representantes da família Asteraceae, entre elas *V. polyanthes*, frente à cepas de *Staphylococcus aureus* e de *Escherichia coli* isoladas de espécimes clínicos humanos. Neste estudo, os extratos e os óleos essenciais de *V. polyanthes* apresentaram atividade antibacteriana contra às amostras bacterianas testadas, especialmente *S. aureus*.

Prospecções fitoquímicas preliminares de extratos das partes aéreas de *V. polyanthes* detectaram a presença de ácidos fixos, aminogrupos, cumarinas, esteroides, triterpenos, glicosídeos flavônicos, saponínicos e antraquinônicos, alcaloides, flavonoides, taninos hidrolisáveis, fenois, chalconas, auronas, ácidos graxos, saponinas e quinonas. (SILVA et al., 2012; SOUZA et al., 2008; TEMPONI, 2012). O perfil fitoquímico realizado por Barbastefano e colaboradores (2007) apontou como compostos majoritários presentes nos extratos das partes aéreas de *V. polyanthes*, triterpenos, LSTs e flavonoides.

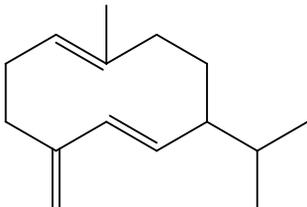
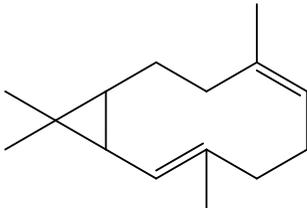
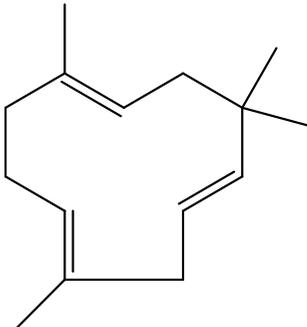
Em 1981, Bohlmann e colaboradores procederam ao estudo fitoquímico das partes aéreas de *V. polyanthes*, isolando e identificando os sesquiterpenos germacreno D, biciclogermacreno e  $\alpha$ - humuleno, o esteroide estigmasterol, o triterpeno acetato de lupeol e uma LST do tipo hirsutinolídeo. Uma investigação seguinte das frações polares dessa espécie

forneceu dois hirsutinolídeos epiméricos adicionais e um dihidroderivado do vernopoliantofurano (BOHLMANN et al., 1983).

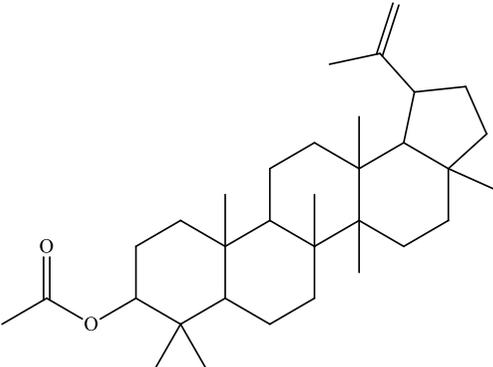
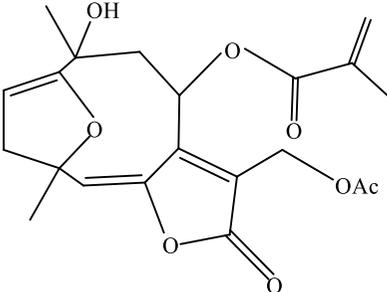
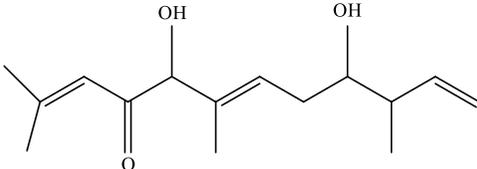
Benfatti e colaboradores (2007) realizaram um estudo químico do extrato clorofórmico das folhas de *V. polyanthes*, o qual permitiu o isolamento dos triterpenos  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina e lupeol. Em concordância a esses resultados, Rodrigues (2013) caracterizou quimicamente extratos obtidos das folhas de *V. polyanthes*, detectando a presença de  $\beta$ -amirina, além de dois triterpenos derivados do ácido ursólico e dos flavonoides luteolina, apigenina e rutina.

O estudo fitoquímico mais recente de *V. polyanthes* reporta o isolamento das LSTs piptocarфина A e glaucolídeo A, dos flavonoides luteolina, apigenina, quercetina, quercetina-3-O- $\beta$ -glicose, isoramnetina, apigenina, 3',4'-dimetoxiluteolina, 3,7-dimetóxi-5,3',4'-trihidroxi-flavona, dos ácidos clorogênicos 3,5-di-O-(E)-cafeoilquínico e 4,5-di-O-(E)-cafeoilquínico e do ácido fenólico protocatecuico (IGUAL et al., 2013). As estruturas químicas das substâncias isoladas de *V. polyanthes* até o presente momento podem ser observadas na Tabela 1. Em conformidade com os dados fornecidos pelas triagens fitoquímicas preliminares, os estudos realizados até o momento, envolvendo o isolamento de metabólitos secundários de *V. polyanthes*, evidenciam a presença de flavonoides e terpenos, principalmente LSTs como marcadores químicos dessa espécie vegetal. No entanto, esses estudos se restringem a apenas quatro relatos encontrados na literatura e não estão associados a nenhuma investigação de atividade biológica das substâncias isoladas.

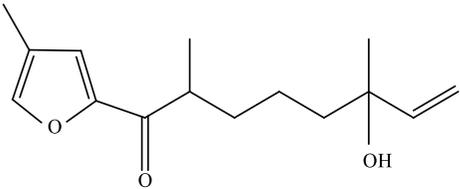
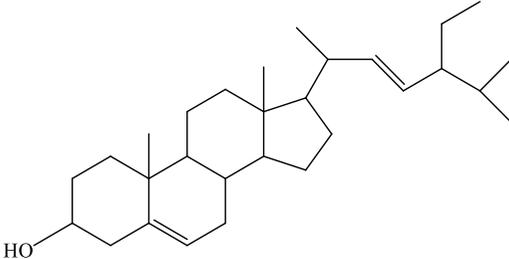
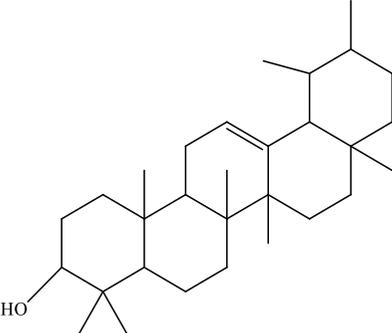
Tabela 1 – Informações sobre substâncias isoladas de *V. polyanthes* descritas na literatura.

Substância	Estrutura química	Classe	Parte da planta	Referência
Germacreno D		Sesquiterpeno	Partes aéreas e raízes	(BOHLMANN et al., 1981)
Biciclogermacreno		Sesquiterpeno	Partes aéreas	(BOHLMANN et al., 1981)
$\alpha$ -humuleno		Sesquiterpeno	Partes aéreas e raízes	(BOHLMANN et al., 1981)

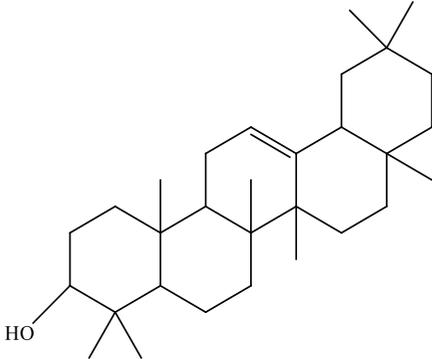
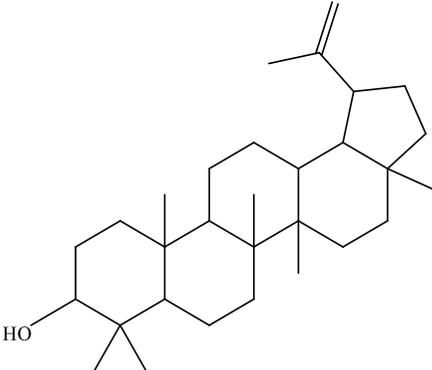
Continuação da Tabela 1

Substância	Estrutura química	Classe	Parte da planta	Referência
Acetato de lupeol		Triterpeno	Partes aéreas e raízes	(BOHLMANN et al., 1981)
8 $\beta$ -2 metilacrilóiloxi-isohirsutinólídeo		Lactona sesquiterpênica	Partes aéreas	(BOHLMANN et al., 1981) (BOHLMANN et al., 1983)
Vernopoliântona		Sesquiterpeno	Raízes	(BOHLMANN et al., 1981)

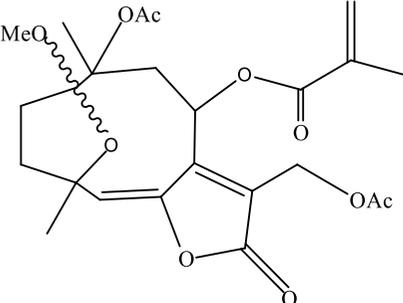
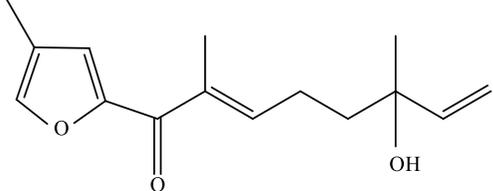
Continuação da Tabela 1

Substância	Estrutura química	Classe	Parte da planta	Referência
Vernopoliántofurano		Sesquiterpeno	Partes aéreas e raízes	(BOHLMANN et al., 1981) (BOHLMANN et al., 1983)
Estigmasterol		Esteróide	Partes aéreas	(BOHLMANN et al., 1981)
$\alpha$ -amirina*		Triterpeno	Folhas	(BENFATTI et al., 2007)

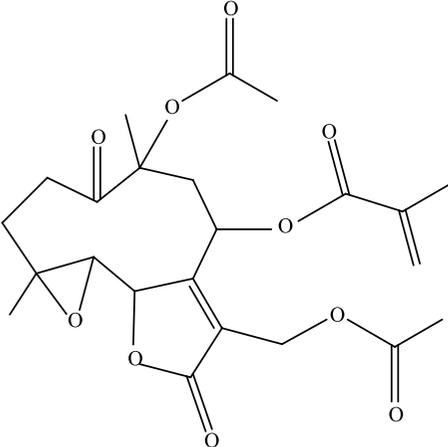
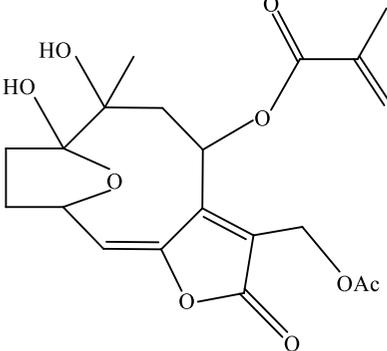
## Continuação da Tabela 1

Substância	Estrutura química	Classe	Parte da planta	Referência
$\beta$ -amirina*		Triterpeno	Folhas	(BENFATTI et al., 2007)
Lupeol		Triterpeno	Folhas	(BENFATTI et al., 2007)

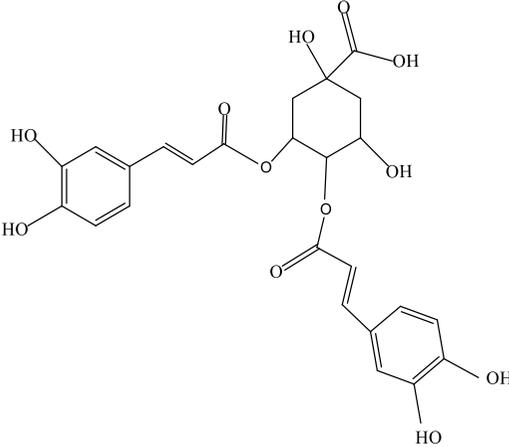
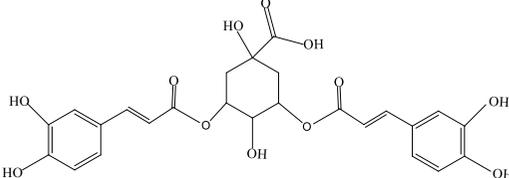
## Continuação da Tabela 1

Substância	Estrutura química	Classe	Parte da planta	Referência
<p>10<math>\alpha</math>-Acetóxi-8<math>\alpha</math>- metilacrilóiloxi-1<math>\alpha</math>- 13-O-acetato (1)</p> <p>1<math>\beta</math>- metóxihirsutinólídeo- 13-Oacetato (2)</p> <p>(Hisurtinolídeos epiméricos)</p>	 <p>1<math>\alpha</math> OMe 2<math>\beta</math> OMe</p>	Lactonas sesquiterpênicas	Partes aéreas	(BOHLMANN et al., 1983)
<p>6,7 E- Dihidrovernopoliante furano</p>		Sesquiterpeno	Partes aéreas	(BOHLMANN et al., 1983)

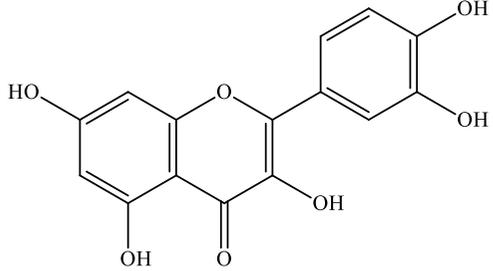
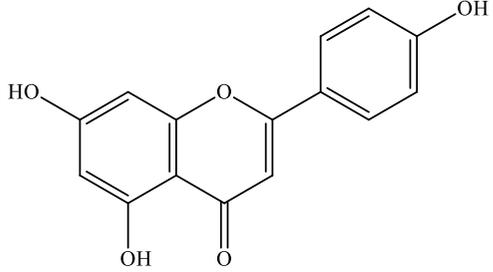
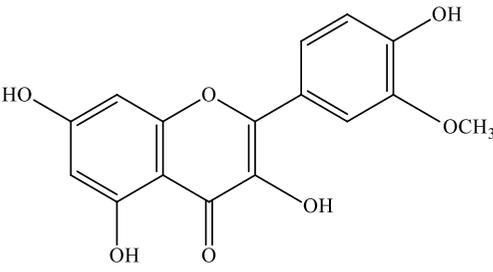
## Continuação da Tabela 1

Substância	Estrutura química	Classe	Parte da planta	Referência
Glaucolídeo A		Lactona sesquiterpênica	Folhas	(IGUAL et al., 2013)
Piptocarфина A		Lactona sesquiterpênica	Folhas	(IGUAL et al., 2013)

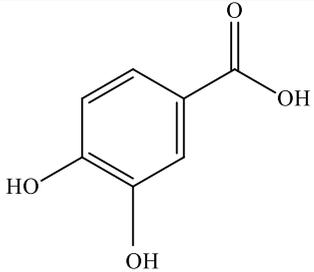
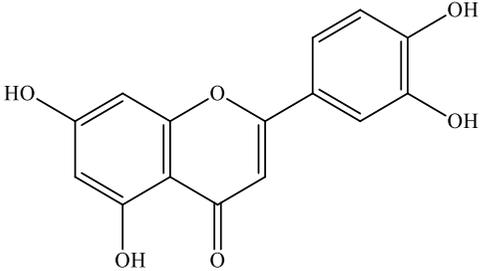
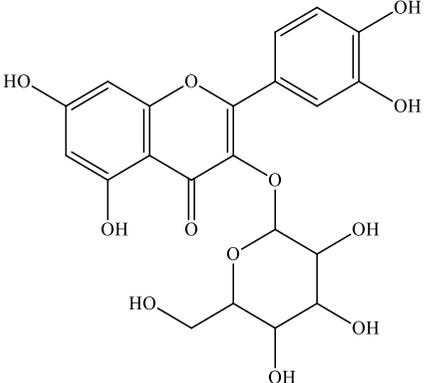
## Continuação da Tabela 1

Substância	Estrutura química	Classe	Parte da planta	Referência
Ácido 4,5-di-O-(E)-cafeoilquínico		Ácido clorogênico	Folhas	(IGUAL et al., 2013)
Ácido 3,5-di-O-(E)-cafeoilquínico		Ácido clorogênico	Folhas	(IGUAL et al., 2013)

Continuação da Tabela 1

Substância	Estrutura química	Classe	Parte da planta	Referência
Quercetina		Flavonoide	Folhas	(IGUAL et al., 2013)
Apigenina		Flavonoide	Folhas	(IGUAL et al., 2013)
Isoramnetina		Flavonoide	Folhas	(IGUAL et al., 2013)

Continuação da Tabela 1

Substância	Estrutura química	Classe	Parte da planta	Referência
Ácido protocatecuico		Ácido polifenólico	Folhas	(IGUAL et al., 2013)
Luteolina		Flavonoide	Folhas	(IGUAL et al., 2013)
Quercetina-3-O-β-glucosídeo		Flavonoide	Folhas	(IGUAL et al., 2013)



### 3 OBJETIVOS

---

#### 3.1 GERAL

O presente estudo teve como objetivo geral investigar a atividade antibacteriana do extrato de lavagem foliar de *V. polyanthes* Less. (Asteraceae) e do seu constituinte majoritário, no intuito de corroborar cientificamente com seu uso tradicional e isolar uma molécula como possível protótipo natural com potencial antibacteriano, visando o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos para compor o arsenal terapêutico contra micro-organismos multirresistentes.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

Em virtude da proposta geral supramencionada, este estudo teve como objetivos específicos:

- Obter o perfil cromatográfico do extrato de lavagem foliar de *V. polyanthes* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD);
- Isolar, purificar e identificar o constituinte majoritário do extrato de lavagem foliar;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato de lavagem foliar e do constituinte majoritário frente às cepas Gram-positivas *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC<sup>®</sup> 6538<sup>TM</sup>) e *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC<sup>®</sup> 29213<sup>TM</sup>), às Gram-negativas fermentadoras *Escherichia coli* (ATCC<sup>®</sup>10536<sup>TM</sup>), *Escherichia coli* (ATCC<sup>®</sup>25922<sup>TM</sup>), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. Choleraesuis (ATCC<sup>®</sup> 10708<sup>TM</sup>) e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. Typhimurium (ATCC<sup>®</sup> 13311<sup>TM</sup>) e às Gram-negativas não fermentadoras *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC<sup>®</sup> 9027<sup>TM</sup>) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC<sup>®</sup> 27853<sup>TM</sup>);
- Classificar o efeito farmacológico como bactericida ou bacteriostático das CIM estabelecidas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

---

### 4.1 MATERIAL VEGETAL

Folhas de *V. polyanthes* (Figura 9) foram coletadas da planta cultivada no Horto Medicinal da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, Minas Gerais, 21°46' S, 43°22' W, entre 07:00 e 08:00 horas do dia 21 de Janeiro de 2014. Uma exsicata (CESJ nº 10.329), identificada pela Dra. Fátima Regina Gonçalves Salimena, encontra-se depositada no Herbário Leopoldo Krieger (CESJ), Instituto de Ciências Biológicas, UFJF. As folhas foram selecionadas pela exclusão daquelas deterioradas ou com presença de materiais estranhos e, após, submetidas à secagem em temperatura ambiente por seis dias. Em seguida, foram pesadas para posterior preparo do extrato de lavagem foliar.

Figura 9 – Fotografia da arvoreta de *V. polyanthes* cultivada no Horto Medicinal da Faculdade de Farmácia da UFJF.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2015.

#### 4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO DE LAVAGEM FOLIAR de *V. polyanthes*

Os procedimentos de obtenção do extrato de lavagem foliar de *V. polyanthes* (extrato VP) bem como a etapa de isolamento, purificação e identificação do constituinte majoritário desse extrato foram realizados no Laboratório do Núcleo de Identificação e Pesquisa em Princípios Ativos Naturais (NIPPAN) da Faculdade de Farmácia da UFJF, no qual foram disponibilizados os seguintes equipamentos:

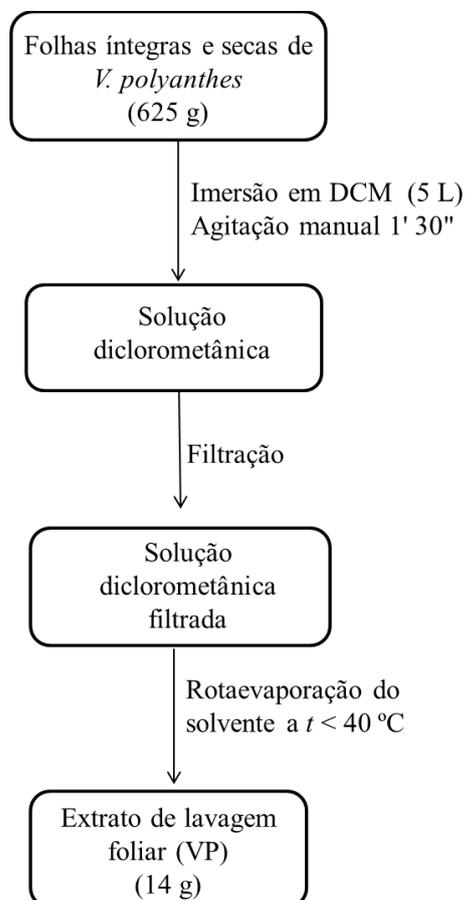
- Rotaevaporador RII (Buchi)
- Bomba V-700 (Buchi)
- Balança AY220 (Marte científica)
- Câmara U.V. SL-204 ( $\lambda = 254$  e  $366$  nm)
- Cabine de Segurança Química (Lucadema)

A estratégia de obtenção do extrato VP foi desenhada em virtude dos resultados anteriormente obtidos pelo nosso grupo, onde foi relatada a presença de flavonoides (apigenina, luteolina e rutina) e terpenos ( $\beta$ -amirina e dois triterpenos derivados do ácido ursólico) nos extratos hexânico, em acetato de etila e etanólico obtidos de *V. polyanthes* (RODRIGUES, 2013). Adicionalmente, como descrito no capítulo 2. Revisão de Literatura, tópico 2.5.1.2 *Marcadores quimiotaxonômicos*, algumas LSTs possuem atividade antimicrobiana, rompendo a parede celular de bactérias invasivas e fungos, enquanto outras protegem a planta de estresses ambientais que poderiam causar dano oxidativo (CHADWICK et al., 2013). Considerando-se que o presente estudo teve como um dos objetivos específicos a investigação da atividade antibacteriana do constituinte majoritário presente no extrato VP, a opção pelo método de lavagem foliar teve como propósito favorecer a extração preferencial das substâncias presentes no interior dos tricomas glandulares e na superfície foliar, como flavonoides e terpenos, especialmente as LSTs (IGUAL et al., 2013).

Para obtenção do extrato, 625 g de folhas íntegras e secas de *V. polyanthes* foram lavadas por meio da imersão total em 5 L de diclorometano (DCM), seguida de agitação manual por 1 minuto e 30 segundos, realizada no interior de uma cabine de segurança química. A solução resultante deste procedimento (solução diclorometânica) foi filtrada em papel de filtro e concentrada com auxílio de rotaevaporador em temperatura inferior a 40°C. O resíduo foi transferido para um frasco de vidro temperado transparente de boca larga, previamente pesado e mantido aberto para a completa evaporação do DCM. Após a realização

dessas etapas, obteve-se 14 g do extrato VP. A seguir, a Figura 10 ilustra o esquema deste processo de extração.

Figura 10 – Esquema representativo do processo de extração por lavagem foliar de *V. polyanthes*.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2015.

#### 4.3 ANÁLISE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO VP POR CLAE-DAD

As análises por CLAE-DAD foram realizadas na Central Analítica Multiusuária de Bioprodutos e Bioprocessos (CENTRALBIO), localizada na Faculdade de Farmácia da UFJF, com auxílio dos seguintes equipamentos e materiais:

- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Waters), composto por bomba binária 1525, detector DAD 2998, injetor auto *sampler* 2707 e *software Empower 3* para aquisição e tratamento dos dados;
- Coluna analítica de fase reversa C<sub>18</sub> (Sunfire) (4,6 mm x 250 mm, 5 μm);

- Acetonitrila e metanol graus HPLC (J.T. Baker), água purificada e ácido ortofosfórico 85% (Merck);
- Microcentrífuga (Kasvi);
- Purificador de água Purelab Classic (Elga);
- Lavadora Ultrassônica Digital Aquecida (Sanders);
- Kit filtração à vácuo.

O extrato VP foi submetido à análise por CLAE acoplada ao detector UV-visível DAD em fase reversa visando a obtenção de seu perfil cromatográfico. Aproximadamente 2 mg da amostra foram solubilizados em metanol grau HPLC. Para aumento da solubilidade, a solução extrato VP + metanol foi sonicada em ultrassom aquecido a 35°C por 5 minutos. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 10.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante filtrado através de uma membrana de poro 45 µm diretamente para o *vial*. O gradiente de eluição consistiu de uma fase binária composta de água acidificada com 0,5% de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e acetonitrila (MeCN) em um gradiente linear de 40% a 100% de MeCN em 35 minutos, terminando com 100% de MeCN em 5 minutos. Utilizou-se coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (4,6 mm x 250 mm, 5 µm), fluxo de 1 mL/min e volume de injeção de 30 µL. A presença de algumas classes de metabólitos secundários foi inferida através de seus espectros de absorção no UV obtidos por CLAE-DAD e comparação com dados da literatura.

#### 4.4 ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO CONSTITUINTE MAJORITÁRIO DO EXTRATO VP

Com base no perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD, iniciou-se o processo de isolamento e purificação do constituinte majoritário do extrato VP. Para isso, foram utilizados métodos cromatográficos em coluna e em camada delgada, com auxílio dos seguintes materiais disponibilizados pelo NIPPAN:

- Cromatografia Líquida à Vácuo (CLV): utilizaram-se como adsorvente 200 g de sílica gel 60 H (partículas menores que 55 µm) + 200 g de sílica gel (partículas de 40 a 63 µm) empacotadas em coluna de vidro com 10 cm de diâmetro, contendo placa sinterizada;
- Cromatografia em Coluna Clássica: utilizaram-se como adsorvente 320 g de sílica gel (partículas de 40 a 63 µm) empacotada em coluna de vidro com 5 cm de diâmetro, contendo placa sinterizada;

- Cromatografia em Camada Delgada (CCD): utilizaram-se cromatofolhas de sílica gel 60 GF<sub>254</sub> com espessura de 0,25 mm, eluídas em diferentes proporções do sistema solvente hexano:acetato de etila (Hex:AcOEt) com gotas de ácido acético e revelação com irradiação no UV (254 nm e 366 nm) e solução de vanilina em ácido sulfúrico;
- Para todos os sistemas cromatográficos utilizaram-se solventes de grau P.A., das marcas Vetec, Cromato Produtos Químicos LTDA, Quemis, Isofar e Alphatec.

#### 4.4.1 Fracionamento do extrato VP

Com o intuito de separar os constituintes do extrato VP, 10 g foram submetidos à CLV utilizando como fase móvel misturas de Hex:AcOEt em grau crescente de polaridade (Figura 11). Foram recolhidas 10 frações, as quais foram agrupadas em 6 outras novas (VP-1 a VP-6) de acordo com a semelhança entre os perfis cromatográficos observados na CCD. Considerando-se o rendimento das frações obtidas pela CLV, foi selecionada aquela de maior massa (VP-5) para dar continuidade ao estudo fitoquímico.

Figura 11– Fotografia do processo de Cromatografia Líquida à Vácuo.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2015.

#### 4.4.2 Fracionamento da VP-5

Com o objetivo de separar os constituintes da fração VP-5 (3,588 g) previamente selecionada, conforme descrito no item 4.4.1, procedeu-se à Cromatografia em Coluna Clássica (CC) utilizando como fase móvel misturas de Hex:AcOEt em grau crescente de polaridade (Figura 12). Foram recolhidas 114 subfrações, as quais foram posteriormente agrupadas em 7 outras novas (VP-5-1 a VP-5-7) de acordo com a semelhança entre os perfis cromatográficos observados na CCD.

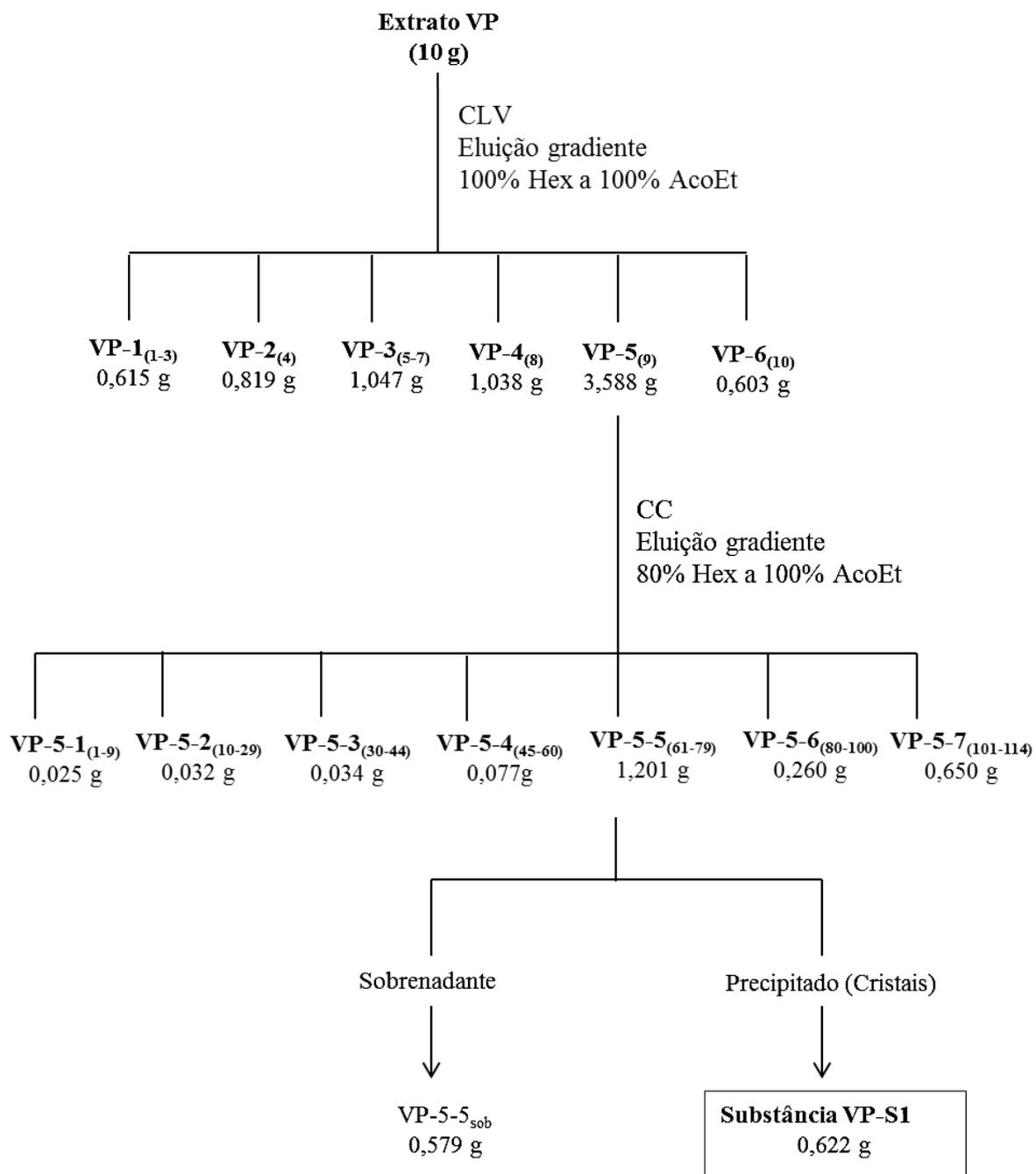
Figura 12 – Fotografia do processo de Cromatografia em Coluna Clássica.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Em seguida, observou-se uma nítida precipitação de cristais nos frascos de vidro transparente que continham a subfração VP-5-5. Com o intuito de verificar a pureza dessa substância na forma de cristais, procedeu-se à retirada do sobrenadante e completa evaporação do solvente para que a mesma pudesse ser submetida à análise em CCD, utilizando como sistema solvente Hex:AcOEt 1:1 (v/v) e revelação com vanilina sulfúrica 5%. Tendo em vista os perfis cromatográficos obtidos nesta CCD, a substância obtida foi codificada como VP-S1. O fluxograma do processo de isolamento pode ser visualizado na Figura 13.

Figura 13 – Fluxograma de isolamento da substância VP-S1.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2015.

#### 4.4.3 Identificação da substância VP-S1

Com o objetivo de identificar a estrutura química, a substância VP-S1 foi submetida à análise espectroscópica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , realizada no Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da UFJF. A substância isolada foi solubilizada em clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ , Cambridge Isotope Laboratories) e analisada em espectrômetro BRUKER Ascend<sup>TM</sup> 500 operado em 500 MHz (RMN de  $^1\text{H}$ ) e 125 MHz (RMN de  $^{13}\text{C}$ ) com software TopSpin 3.2. Os espectros obtidos foram comparados com os existentes na literatura.

#### 4.5 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS PERFIS CROMATOGRÁFICOS DA SUBSTÂNCIA VP-S1 E DO EXTRATO VP

Inicialmente, com objetivo de obter o perfil cromatográfico, a substância VP-S1 foi submetida à análise por CLAE-DAD nas mesmas condições analíticas descritas no item 4.3, porém, sendo solubilizada em MeCN grau HPLC. Em seguida, uma análise comparativa entre os perfis dessa substância e do extrato VP foi realizada por meio da sobreposição dos cromatogramas obtidos para ambas as amostras.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO VP E DA SUBSTÂNCIA VP-S1

Os ensaios de atividade antibacteriana foram realizados no Laboratório de Bioatividade Celular e Molecular, localizado no Centro de Pesquisas Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFJF, com auxílio dos seguintes equipamentos e materiais:

- Cabine de Segurança biológica classe II B2 (Veco);
- Estufa bacteriológica (Quimis);
- Autoclave (Primatec);
- Micropipetas (Thermo Scientific);
- Microplacas de 96 poços (SPL Life Sciences);
- Placas de Petri 90 x 15 mm (Plastlabor);
- Meios de cultura: Ágar Müller-Hinton (Difco), Caldo Müller-Hinton (Difco);
- Antibacterianos: Ampicilina (Sigma-Aldrich), Cloranfenicol (Sigma-Aldrich);

- Indicador biológico: cloreto de trifeniltetrazólio (Vetec);
- Solução padronizada 0,5 de Mc Farland (DME Diagnósticos Microbiológicos Especializados).

A atividade antibacteriana do extrato VP e da substância VP-S1 foi investigada por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) empregando-se o método de microdiluição em caldo conforme as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2012b, 2014), com pequenas adaptações. Adicionalmente, foram determinados a Concentração Bactericida Mínima (CBM), assim como o efeito farmacológico bactericida ou bacteriostático das amostras segundo método descrito por Andrews (2001), com pequenos ajustes.

Os procedimentos microbiológicos foram realizados com cepas de referência da *American Type Culture Collection* (ATCC), na segunda passagem, obtidas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil. Os ensaios incluíram as seguintes cepas representativas de grupos bacterianos Gram-positivos e Gram-negativos fermentadores e não fermentadores:

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

Durante o texto, os termos adotados para referenciar as cepas descritas anteriormente foram:

- *S. aureus* ATCC 6538;
- *S. aureus* ATCC 29213;
- *E. coli* ATCC 10536;
- *E. coli* ATCC 25922;
- *S. Choleraesuis* ATCC 10708;
- *S. Typhimurium* ATCC 13311;
- *P. aeruginosa* ATCC 9027;
- *P. aeruginosa* ATCC 27853.

O armazenamento das cepas de referência foi feito através da manutenção das mesmas como suspensões densas em solução contendo leite desnatado (Molico, Nestlé) a 10% (p/v) acrescido de glicerol (Synth) a 10% (v/v) (solução LDG). Para cada cepa foi preparada uma suspensão densa (obtida a partir de crescimento de 24 horas) diretamente em 1,0 mL de solução LDG distribuída previamente em tubos plásticos com tampa de rosca próprios para congelamento (Inlab). A seguir, estes tubos foram armazenados em uma temperatura de cerca de 20°C negativos.

#### **4.6.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

Para a determinação da CIM, utilizando o método de microdiluição em caldo, soluções-estoque (SEs) das amostras (extrato VP e substância VP-S1) e dos antibacterianos de referência (ampicilina e cloranfenicol) foram preparadas com diferentes sistemas solvente/diluyente, obtendo-se concentrações finais de 10 mg/mL para a SE do extrato e 1mg/mL para as SEs da substância VP-S1, ampicilina e cloranfenicol, conforme demonstrado na Tabela 2.

As amostras testadas foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO), cuja concentração final nas SEs não ultrapassou 2%. Este valor foi estabelecido de acordo com parâmetros validados para o método, no intuito de cumprir o limite máximo de 1% de DMSO no poço da microplaca, conforme recomendação descrita no documento M100-S24 (CLSI, 2014). Estes percentuais também estavam em consonância com aqueles preconizados por Langfield e colaboradores (2004). Estes autores empregaram microplaca para determinação rápida e sensível da atividade antibacteriana, visando a triagem de plantas medicinais e a identificação de seus princípios ativos. A recomendação era de que as SEs não ultrapassassem 5% de DMSO antes da diluição, de modo que as concentrações finais desse diluyente nos poços fossem tipicamente menores que 1% (LANGFIELD et al., 2004) (Tabela 2).

Para o preparo da SE da VP-S1, levou-se em consideração a limitada solubilidade dessa substância em água e, por isso, foram adicionados 2% de Tween 80 ao diluyente com o objetivo de evitar sua precipitação na solução (MAZUR et al., 2015). As SEs dos antibacterianos selecionados como referência foram preparadas utilizando-se os solventes e diluentes descritos no documento M100-S24 (CLSI, 2014) (Tabela 2).

Tabela 2 – Descrição da composição das soluções-estoque (SEs) para realização do método de microdiluição em caldo.

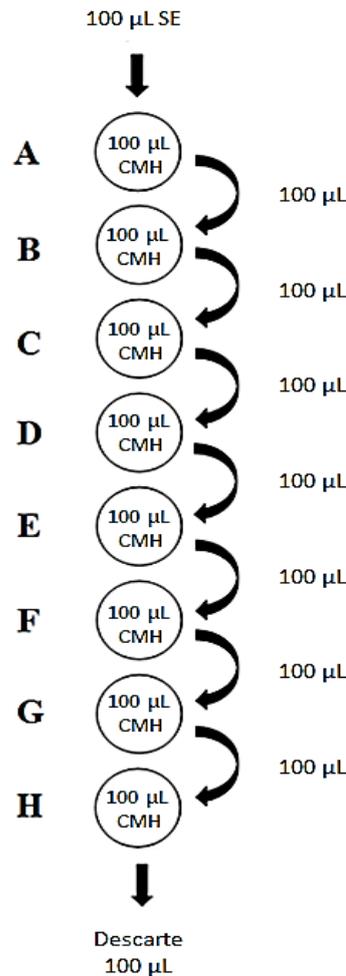
SE	Solvente	Diluyente	Concentração Final SE (mg/mL)
<b>Extrato VP</b>	Dimetilsulfóxido	Água destilada estéril	10,0
<b>Substância VP-S1</b>	Dimetilsulfóxido	Água destilada estéril + Tween 80	1,0
<b>Ampicilina</b>	Tampão fosfato 0,1 M pH 8,0	Tampão fosfato 0,1 M pH 6,0	1,0
<b>Cloranfenicol</b>	Etanol 95%	Água destilada estéril	1,0

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Para o preparo das suspensões bacterianas, as cepas de referência foram inicialmente inoculadas em Ágar Müeller-Hinton (AMH) e incubadas por 16 a 18 horas, em estufa bacteriológica a  $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , em aerobiose. Após o crescimento bacteriano, cinco Unidades Formadoras de Colônia (UFC) foram transferidas para um tubo de ensaio 13 x 100 mm contendo 3,5 mL de solução salina estéril (NaCl 0,9% p/v). As suspensões obtidas foram comparadas visualmente e ajustadas à escala padrão 0,5 de Mc Farland (CLSI, 2012b).

O método de microdiluição em caldo foi realizado em microplacas de 96 poços de fundo plano, utilizando-se uma microplaca para cada amostra e cepa de referência. A partir das SEs foram realizadas diluições seriadas diretamente nas microplacas, conforme esquema ilustrativo apresentado pela Figura 14, obtendo-se um gradiente de concentração de 0,039 a 5,0 mg/mL para o extrato VP e de 3,9 a 500  $\mu\text{g/mL}$  para a substância VP-S1 e os antibacterianos de referência. Inicialmente, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de caldo Müeller-Hinton (CMH) aos poços da microplaca. Em seguida, foram acrescentados 100  $\mu\text{L}$  das SEs aos poços 1 a 7 da fileira A. Após homogeneização, foram transferidos 100  $\mu\text{L}$  da fileira A para B e assim sucessivamente até a fileira H. Dos poços da fileira H foram descartados 100  $\mu\text{L}$ , remanescendo igual volume em toda a coluna. Após a realização das diluições seriadas das amostras e antibacterianos de referência em triplicata e duplicata, respectivamente, foram adicionados aos poços 10  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana previamente padronizada.

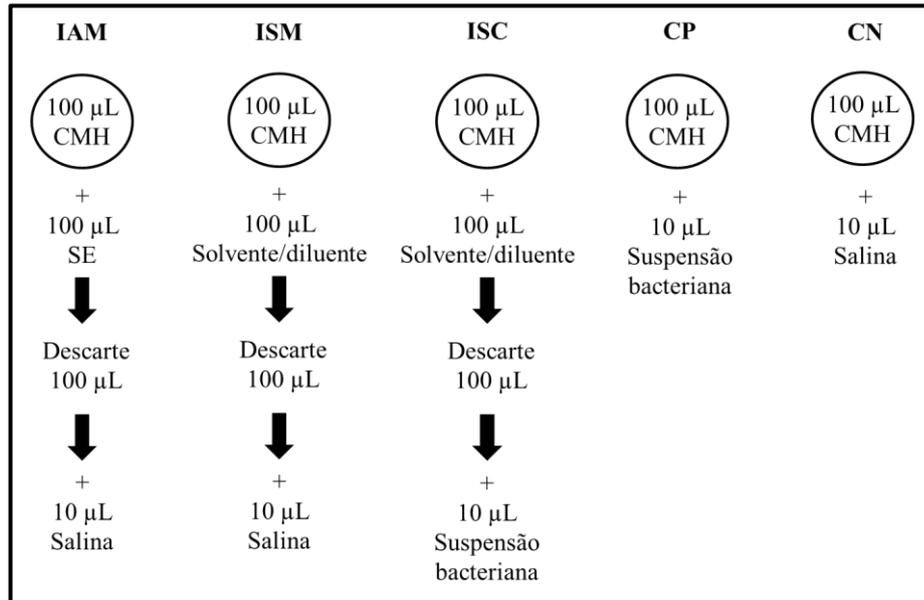
Figura 14 – Esquema ilustrativo do procedimento de diluição seriada realizada na microplaca.



SE: solução-estoque; CMH: caldo Müller-Hinton. Fonte: ADAPTADO DE TEMPONI, 2012.

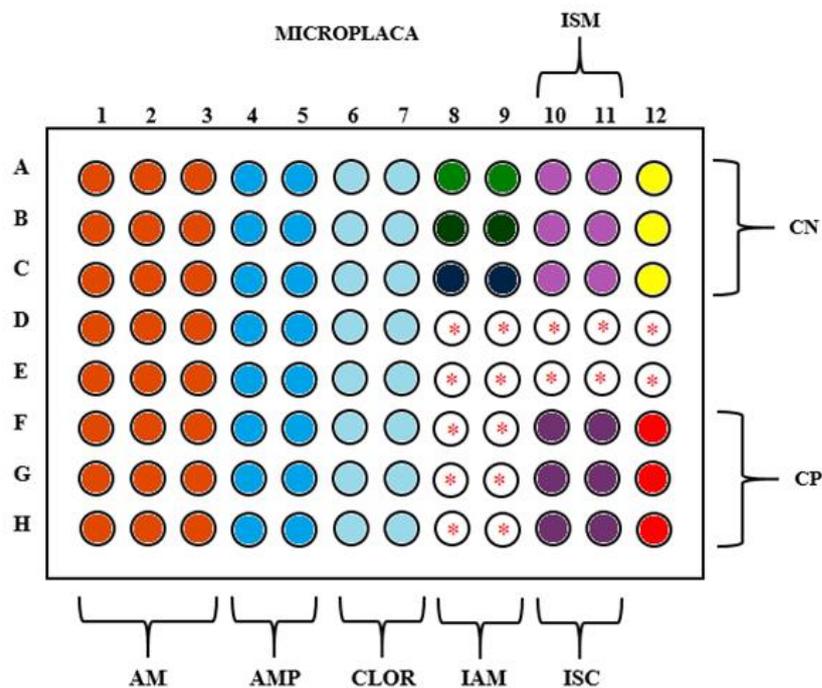
No intuito de garantir a confiabilidade dos resultados foram realizados, em cada microplaca, controles referentes à interferência das amostras sobre o caldo Müller-Hinton (meio) (IAM) e dos sistemas solvente/diluyente sobre o caldo Müller-Hinton (meio) (ISM) e sobre o crescimento bacteriano (ISC), além dos controles negativo (CN) e positivo (CP), demonstrados na Figura 15. Os controles IAM, ISM e ISC foram realizados para o extrato VP, substância VP-S1 e também para os antibacterianos de referência. A disposição das amostras e dos controles na microplaca está apresentada na Figura 16.

Figura 15– Esquema ilustrativo dos controles do método de microdiluição em caldo Müeller-Hinton.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Figura 16 – Imagem ilustrativa da microplaca utilizada para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por meio do método de microdiluição em caldo Müeller-Hinton.



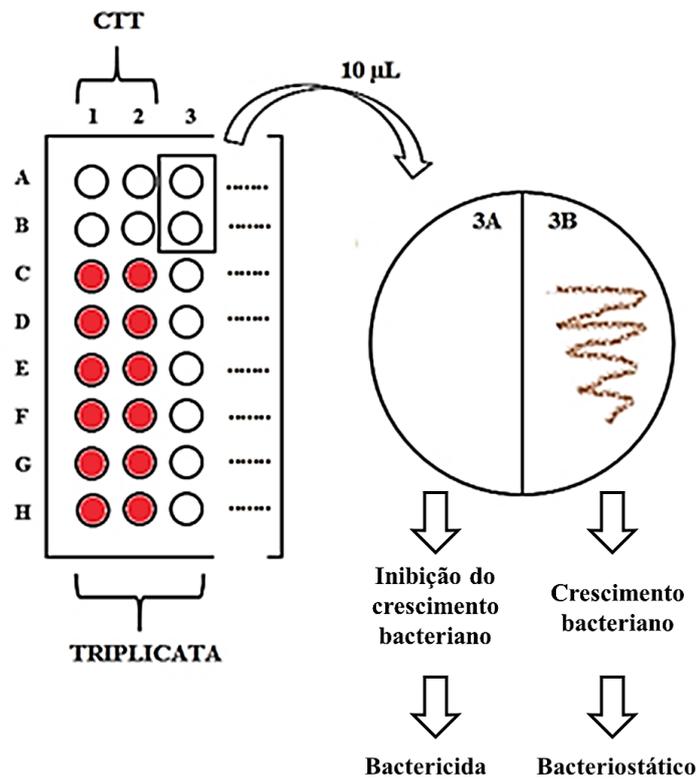
AM: amostra (extrato VP ou VP-S1); AMP: ampicilina; CLOR: cloranfenicol; IAM: interferência das amostras sobre o caldo Müeller-Hinton; ISM: interferência dos sistemas solvente/diluyente sobre o caldo Müeller-Hinton; ISC: interferência dos sistemas solvente/diluyente sobre o crescimento bacteriano; CN: controle negativo; CP: controle positivo; \*: poço vazio. Fonte: ADAPTADO DE GASPARETTO, 2014.

Após incubação a  $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , em aerobiose, por 16 a 20 horas, realizou-se a leitura das microplacas pela observação da presença ou ausência de turbidez indicativa de crescimento bacteriano. Para melhor visualização dos resultados, foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de solução de cloreto de trifeniltetrazólio (CTT) a 1 mg/mL em todos os poços, exceto naqueles da coluna 3, referentes a uma das triplicatas da amostra testada, cujos conteúdos foram utilizados para a determinação da Concentração Bactericida Mínima e para a classificação do efeito farmacológico bactericida ou bacteriostático. Em seguida, as microplacas foram incubadas por mais 30 minutos nas mesmas condições anteriormente descritas. Após incubação, os poços que apresentaram coloração rosa a avermelhada indicaram crescimento bacteriano e os que mantiveram a cor original, ausência de crescimento. A CIM foi, então, determinada como a menor diluição capaz de inibir o crescimento visível da cepa testada, conforme conceito descrito no documento M07-A9 (CLSI, 2012b).

#### **4.6.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e do Efeito Farmacológico Bactericida ou Bacteriostático**

A partir das colunas das microplacas que não receberam solução de CTT foram retiradas, com auxílio de alça microbiológica calibrada, alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  dos poços correspondentes àqueles onde não foi observado crescimento bacteriano. Essas alíquotas foram estriadas em placas de Petri contendo AMH e após incubação das placas em estufa a  $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , em aerobiose, por 18 a 20 horas, analisou-se a presença ou ausência de crescimento de colônias. Assim, as concentrações do extrato VP ou da substância VP-S1 que permitiram o desenvolvimento bacteriano no AMH foram definidas como bacteriostáticas e as que inibiram o crescimento, como bactericidas (Figura 17).

Figura 17– Imagem ilustrativa do procedimento para determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e do efeito farmacológico bactericida ou bacteriostático.



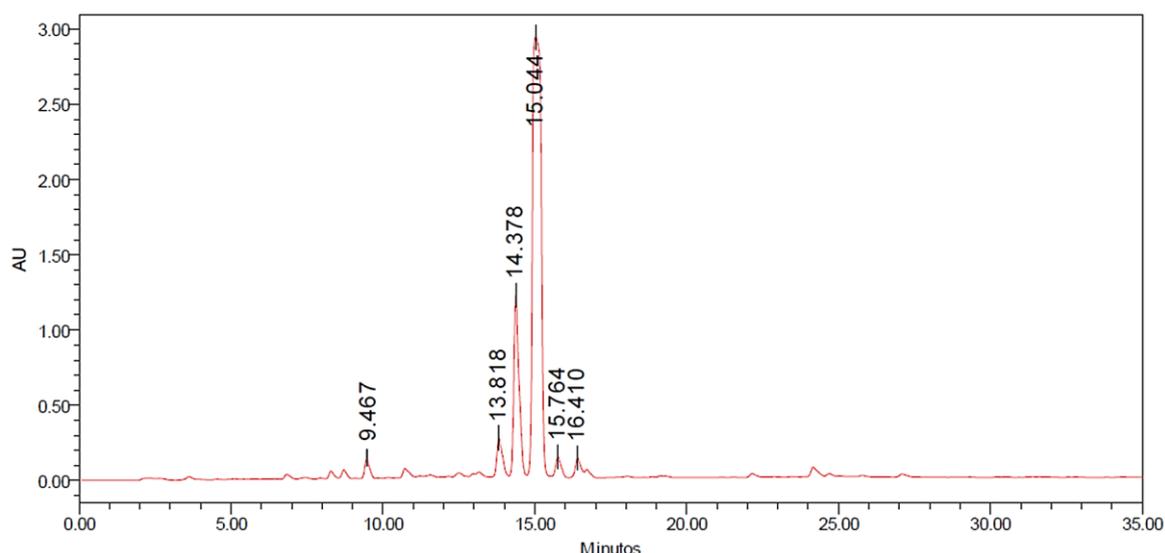
CTT: Cloreto de trifeniltetrazólio. Fonte: ADAPTADO DE GASPARETTO, 2014.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 OBTENÇÃO E ANÁLISE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO VP

No presente estudo foram obtidos 14 g do extrato VP e, após o devido preparo, esse extrato foi submetido à análise em CLAE-DAD no comprimento de onda de 210 nm (Figura 18). A partir do perfil cromatográfico obtido, foi possível observar a presença de 6 picos nos tempos de retenção (tr) de 9.467, 13.818, 14.378, 15.044, 15.746 e 16.410 minutos, sendo nítida a presença de uma substância majoritária correspondente ao pico no tr de 15.044.

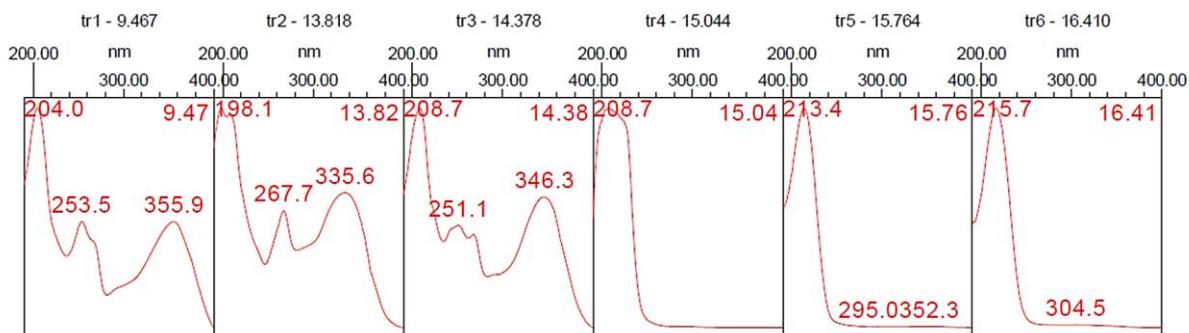
Figura 18 – Cromatograma do extrato VP obtido por CLAE-DAD a 210 nm.



Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (4,6 mm x 250 mm, 5 μm); fase móvel binária composta de H<sub>2</sub>O (0,5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e MeCN em um gradiente linear de 40% a 100% de MeCN em 35 minutos e 100% de MeCN em 5 minutos; fluxo de 1mL/min; [ ] amostra: 2mg/mL. Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Na Figura 19, observam-se os espectros de absorção na região do UV correspondentes aos picos detectados no cromatograma. Os três primeiros espectros apresentam perfis sugestivos de flavonoides. De acordo com Tsimogiannis e colaboradores (2007), espectros típicos dessas substâncias apresentam bandas de absorção nas faixas de comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 300-385nm e 250-295 nm. Os demais espectros no UV sugerem a presença de LSTs, considerando-se as bandas de absorção obtidas dentro da faixa de  $\lambda$  de 210-220 nm característica dessas substâncias (FISCHER; OLIVIER; FISCHER, 1979; XU; YE; ZHAO, 2011).

Figura 19 – Espectros de absorção na região do UV dos picos obtidos no cromatograma do extrato VP.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Os resultados derivados de duas Dissertações intituladas "Investigação dos constituintes e atividades farmacológicas de *Vernonia polyanthes* Less" (TEMPONI, 2012) e "Caracterização química e investigação das atividades antibacteriana e anti-inflamatória tóxica de *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae)" (RODRIGUES, 2013), produtos do nosso grupo de pesquisa, demonstraram a necessidade de se delinear estratégias visando à aplicação de um método de extração mais eficiente para obtenção de flavonoides e terpenos e o aprofundamento dos dados químicos e de atividade antibacteriana do extrato obtido e de seu constituinte majoritário. Com este foco, optou-se pelo extrato de lavagem foliar, visto que plantas do gênero *Vernonia* produzem uma variedade de flavonoides e LSTs importantes para a saúde humana e que esses constituintes encontram-se principalmente nas folhas e nos tricomas glandulares (FAVI et al., 2008; SCHILMILLER; LAST; PICHERSKY, 2008; WAGNER; WANG; SHEPHERD, 2004).

Por meio da adoção da mesma estratégia para obtenção de constituintes químicos presentes nos tricomas glandulares de *V. polyanthes*, Igual e colaboradores (2013) procederam à extração por lavagem foliar com MeOH e, a partir desse extrato, foram isoladas diversas substâncias, com destaque para os flavonoides e LSTs. Embora não tenham sido encontrados na literatura relatos adicionais de investigações fitoquímicas deste tipo de extrato para esta planta medicinal, a predominância de flavonoides e LSTs em extratos de lavagem foliar de espécies distintas da família Asteraceae é reportada em outros estudos (APPEZZATO-DA-GLÓRIA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2011).

Ambrósio e colaboradores (2008), a partir da análise por CLAE-DAD do extrato de lavagem foliar de *Tithonia diversifolia* com DCM e posterior comparação com biblioteca de compostos, identificaram 14 LSTs, um diterpeno e um flavonoide. Finalmente, em um estudo fitoquímico do extrato de lavagem foliar de *Viguiera gardneri*, também com DCM, foram

isoladas 5 LSTs (SCHORR et al., 2002). Os dados no presente estudo corroboram a extração preferencial de substâncias pertencentes a classes de flavonoides e LSTs pelo método de lavagem foliar e condizem com os resultados descritos na literatura.

## 5.2 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DO CONSTITUINTE MAJORITÁRIO DO EXTRATO VP

A análise prévia de extratos ou frações tornou-se mais eficiente devido ao desenvolvimento de modernas técnicas hifenadas como CLAE-DAD. Porém, um extrato é uma mistura de substâncias, sendo difícil a aplicação de uma única técnica de separação para o isolamento de seus constituintes. Dessa forma, o extrato é inicialmente separado em várias frações que contêm substâncias de polaridades ou tamanhos moleculares semelhantes (SARKER; LATIF; GRAY, 2005; SARKER; NAHAR, 2012). Assim, com base no perfil cromatográfico do extrato VP obtido por CLAE-DAD (Figura 18), procedeu-se à separação dos componentes desse extrato, no intuito de se isolar seu constituinte majoritário.

O fracionamento inicial do extrato VP por CLV resultou na obtenção de 6 frações apresentadas na Tabela 3. A fração VP-5 foi obtida com maior massa, sendo selecionada para dar continuidade ao processo de isolamento. Posteriormente, a separação dos constituintes da fração VP-5 por CC permitiu a obtenção de 7 subfrações (Tabela 4).

Tabela 3 – Frações obtidas por CLV do extrato VP.

<b>Código da Fração</b>	<b>Frações agrupadas</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Sistema Eluente</b>
<b>VP-1</b>	1-3	0,615	Hex 100% → Hex:AcOEt 5%
<b>VP-2</b>	4	0,819	Hex:AcOEt 10%
<b>VP-3</b>	5-7	1,047	Hex:AcOEt 20% → Hex:AcOEt 30%
<b>VP-4</b>	8	1,038	Hex:AcOEt 50%
<b>VP-5</b>	9	3,588	Hex:AcOEt 70%
<b>VP-6</b>	10	0,603	AcOEt 100%

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2015.

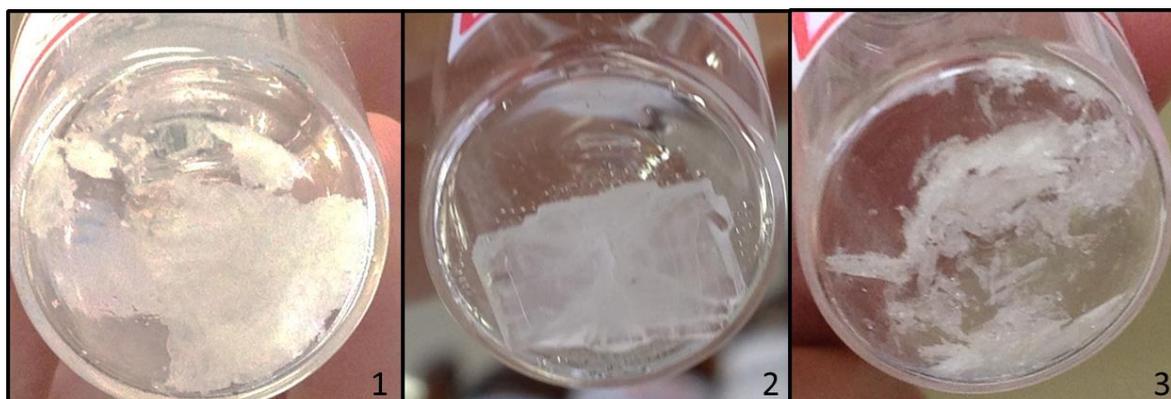
Tabela 4 – Subfrações obtidas por CC da fração VP-5.

<b>Código da Subfração</b>	<b>Frações agrupadas</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Sistema Eluente</b>
<b>VP-5-1</b>	1-9	0,025	Hex:AcOEt 10%
<b>VP-5-2</b>	10-29	0,032	Hex:AcOEt 10% →Hex:AcOEt 20%
<b>VP-5-3</b>	30-44	0,034	Hex:AcOEt 20% →Hex:AcOEt 25%
<b>VP-5-4</b>	45-60	0,077	Hex:AcOEt 25% →Hex:AcOEt 30%
<b>VP-5-5</b>	61-79	1,201	Hex:AcOEt 30% →Hex:AcOEt 40%
<b>VP-5-6</b>	80-100	0,260	Hex:AcOEt 40% →Hex:AcOEt 80%
<b>VP-5-7</b>	101-114	0,650	AcOEt 100%

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2015.

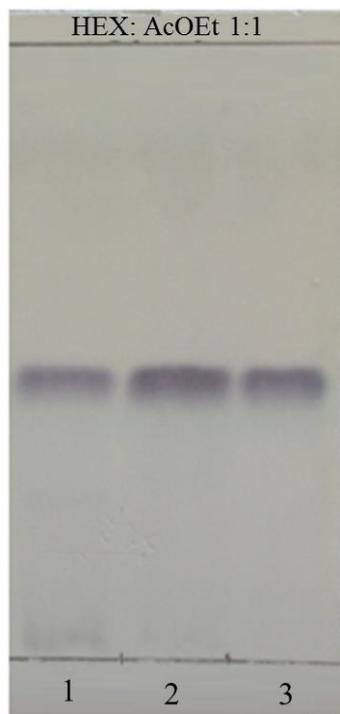
Além das subfrações, a aplicação da CC à fração VP-5 resultou no isolamento de 0,622 g de uma substância obtida na forma de cristais precipitados na subfração VP-5-5 (Figura 20). A observação do perfil cromatográfico dessa substância obtido por CCD permitiu a verificação da presença de mancha única, indicativa de uma substância pura, como mostra a Figura 21. Esta substância isolada foi codificada como VP-S1.

Figura 20 – Fotografia dos cristais precipitados na subfração VP-5-5.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Figura 21 – Fotografia do perfil cromatográfico em CCD da substância VP-S1.

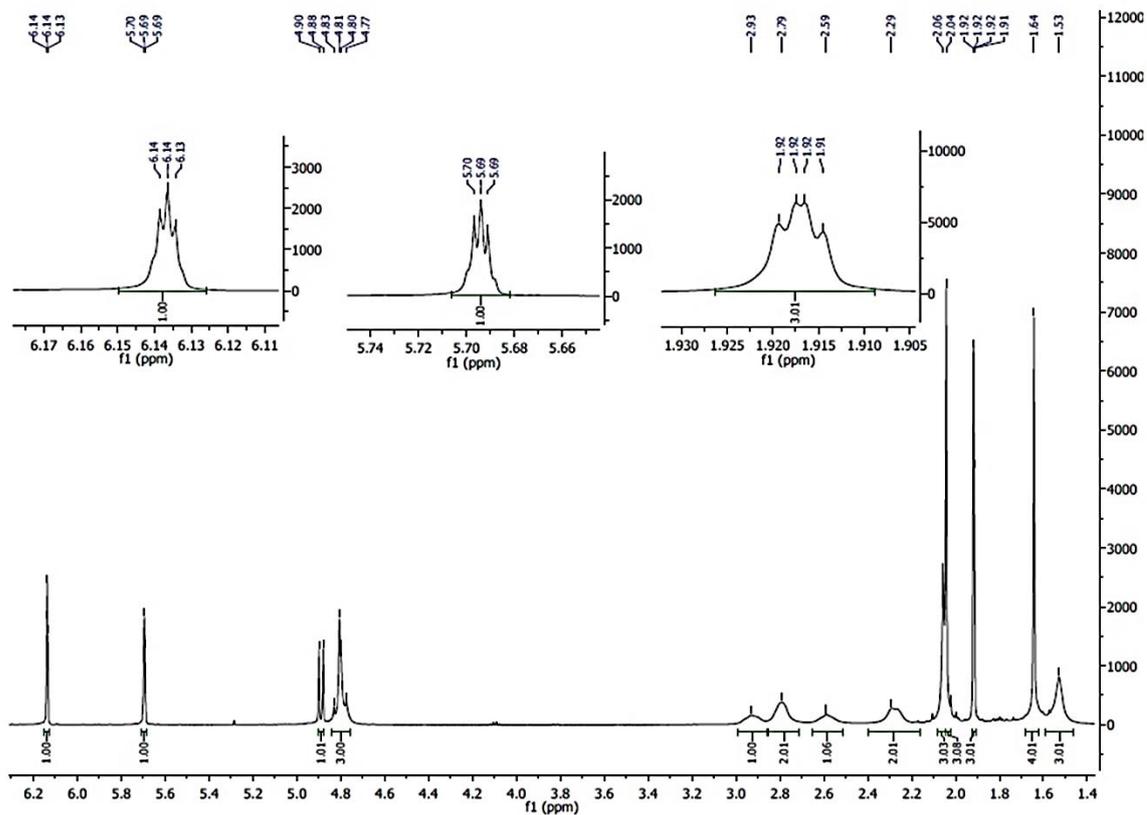


Perfil cromatográfico em CCD eluída com fase móvel composta por Hex:AcOEt 1:1 (v/v) e revelação com vanilina sulfúrica 5%. 1, 2 e 3 correspondem aos frascos da subfração VP-5-5 apresentados na Figura 20. Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2015.

### 5.3 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA VP-S1

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  evidencia a presença de dois tripletos integrados para 1H cada nas regiões de  $\delta$  6,14 e 5,69 ppm e de 1 quarteto integrado para 3H na região de  $\delta$  1,92 (Figura 22). Os dois primeiros sinais foram atribuídos aos hidrogênios v́nicos na posição 3' e o terceiro, ao grupo metila na posição 4', devido a esses sinais serem correspondentes aos hidrogênios do éster metacrilato (BARDÓN et al., 1990; PADOLINA et al., 1974).

Figura 22 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância VP-S1 (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e expansão dos sinais em  $\delta= 6,14$ ,  $\delta= 5,69$  e  $\delta= 1,92$  ppm.

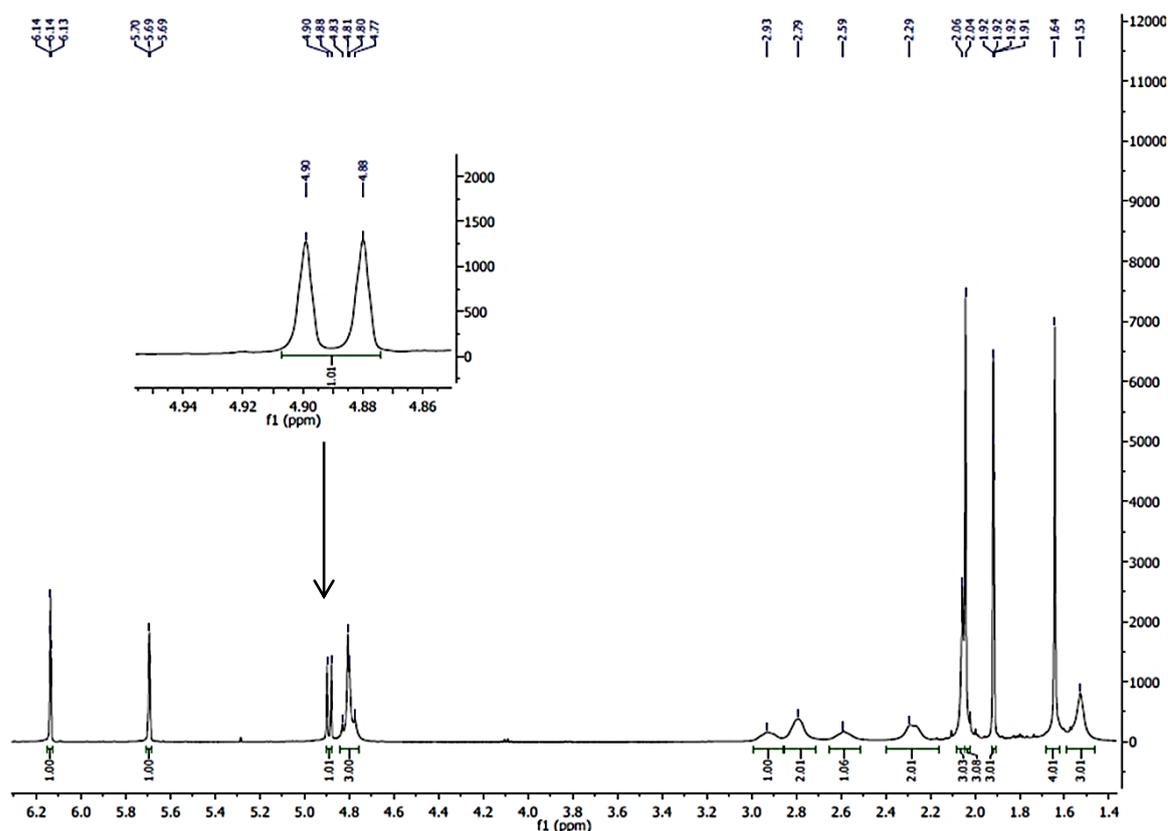


Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2015.

A presença de 2 simpletos integrados para 3H cada nas regiões de  $\delta$  2,06 e 2,04 ppm indicam a presença de dois grupos acetato, sendo atribuídos, portanto, aos hidrogênios dos grupos metila nas posições 2" e 2"', respectivamente. O simpleto largo em  $\delta$  1,53 ppm integrado para 3H foi identificado como correspondente ao grupo metila na posição 15, enquanto o simpleto agudo em  $\delta$  1,64 ppm foi atribuído ao outro grupo metila na posição 14 (BARDÓN et al., 1990; PADOLINA et al., 1974). No entanto, como este sinal foi integrado para 4H, sugere-se que o sinal do hidrogênio 3b, relacionado ao sinal  $\sim 1,70$  nos dados da literatura de referência (BARDÓN et al., 1990), esteja sobreposto neste simpleto em  $\delta$  1,64 ppm. Segundo Pavia e colaboradores (2010), grupos metila são identificados com frequência como um pico isolado e agudo, mesmo quando sobrepõem outras absorções de CH.

Ainda em relação ao espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , observa-se 1 duplete em  $\delta$  4,89 ppm ( $J= 9,5$  Hz) integrado para 1H (Figura 23), atribuído ao H-6 de acordo com os dados verificados na literatura de referência (BARDÓN et al., 1990).

Figura 23 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância VP-S1 (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e expansão do sinal em  $\delta = 4,89$  ppm.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2015.

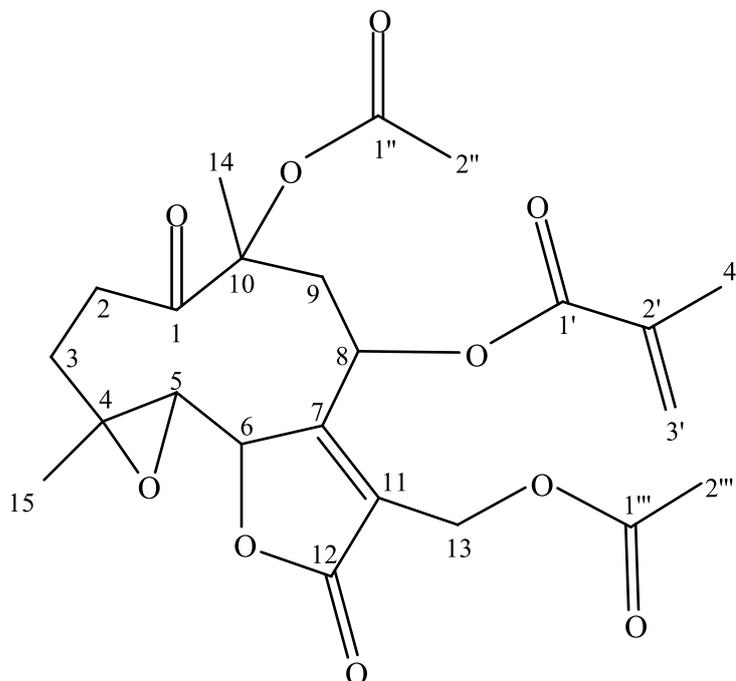
Além disso, o espectro mostra sinais mal resolvidos nas regiões de  $\delta$  4,80 ppm (3H) e  $\delta$  2,22 – 3,0 ppm (6H). Dessa forma, por meio da integração e da comparação com os dados de referência, os sinais nessas regiões foram identificados como multipletos e atribuídos aos três hidrogênios (H-8, H-13a, H-13b) e aos seis hidrogênios (H-2a, H-2b, H-3a, H-5, H-9a, H-9b), respectivamente, conforme apresentado na Tabela 5.

De acordo com Costa e colaboradores (2000), que reportou dados de RMN de  $^1\text{H}$  para o glaucolídeo B, o espectro obtido a  $27^\circ\text{C}$ , demonstrou sinais mal resolvidos nas regiões em  $\delta$  4,75 ppm (3H) e  $\delta$  2,22 – 3,0 ppm (6H) e associa esse fato à existência de vários confôrmeros em equilíbrio, devido à flexibilidade do anel de dez membros da molécula. Considerando que o glaucolídeo B se difere da substância referência glaucolídeo A, apenas pela presença do grupo acetato ao invés do metacrilato na posição C-8, esta pode ser a explicação para a presença destes sinais no espectro obtido a  $25^\circ\text{C}$  no presente estudo.

Em relação ao espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Tabela 6, Figura 26), observa-se a presença de 23 tipos de carbonos magneticamente distintos. Em função do deslocamento de

206,6 ppm, foi possível identificar a presença de um grupo carbonila em C-1. Comparando-se os dados obtidos com a literatura, 4 sinais na região de  $\delta$  169,7 – 170,2 ppm, compatíveis com carbonos da função éster, foram atribuídos a C-12, C-1', C-1'' e C-1'''. Já os 4 sinais entre  $\delta$  125,0 – 163,3 ppm foram relacionados aos carbonos não saturados ( $sp^2$ ) C-7, C-11, C-2' e C-3'. Neste espectro, observa-se também a presença de 6 sinais entre  $\delta$  55,0 – 84,7 ppm compatíveis com os carbonos saturados ( $sp^3$ ) ligados a oxigênio C-4, C-5, C-6, C-8, C-10 e C-13. Por fim, os 8 sinais na região de  $\delta$  18,0 – 40,3 ppm foram atribuídos aos carbonos metilênicos C-2, C-3, C-9 e metila C-14, C-15, C-4', C-2'' e C-2''', não ligados a elemento eletronegativo (BARDÓN et al., 1990; PAVIA et al., 2010). Assim, a comparação dos dados espectroscópicos obtidos dos espectros de RMN de  $^1H$  e de  $^{13}C$  da substância VP-S1 com os dados oriundos da literatura (BARDÓN et al., 1990; PADOLINA et al., 1974), permitiu concluir que essa substância é a LST glaucolídeo A ( $C_{23}H_{28}O_{10}$ ), representada a seguir (Figura 24).

Figura 24 – Estrutura química do glaucolídeo A.



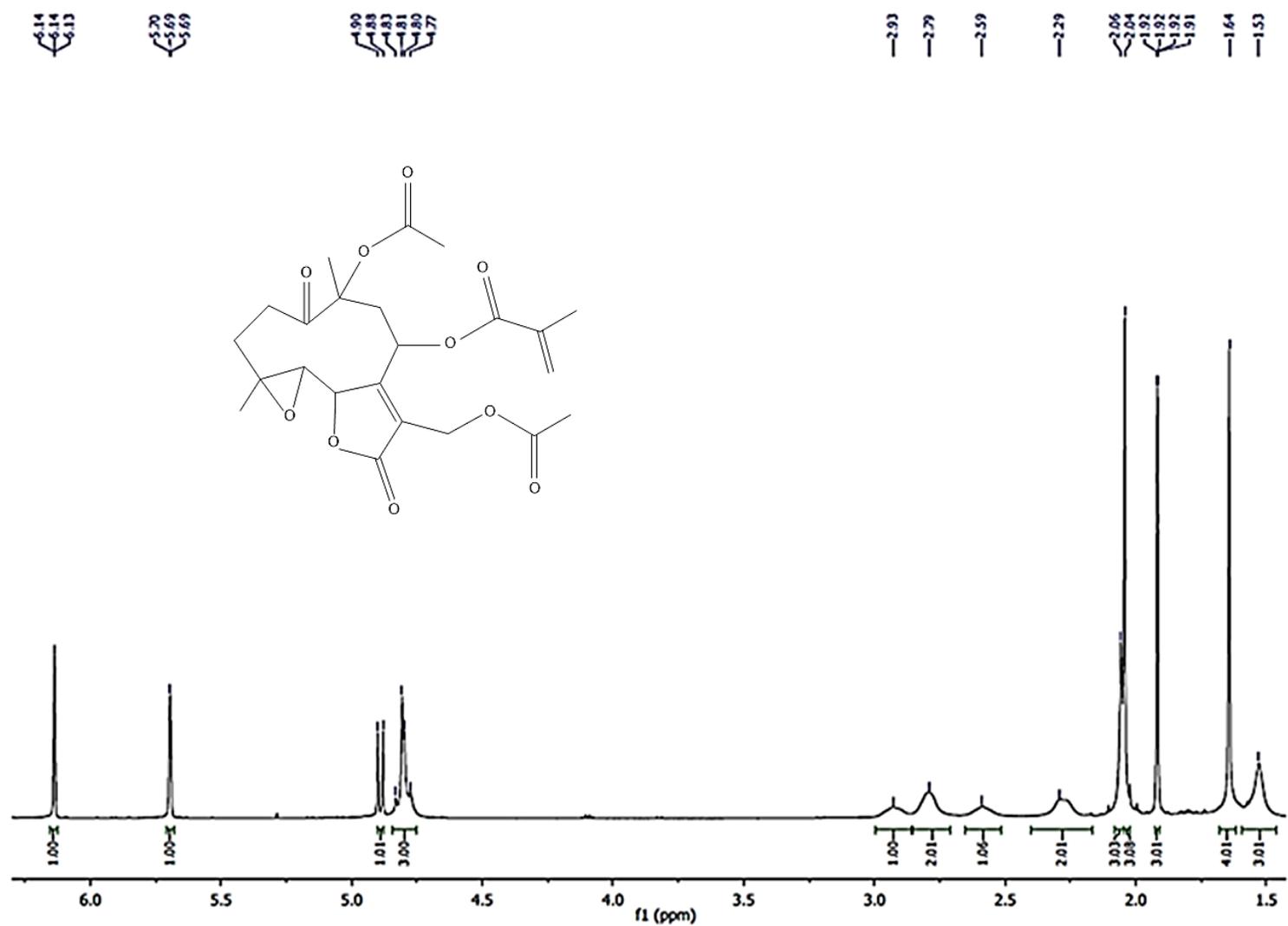
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Tabela 5 – Dados obtidos de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância VP-S1 e dados do glaucolídeo A descritos na literatura.

Hidrogênios	Dados Observados $\delta$ ppm	Literatura* $\delta$ ppm
2a	2,93 (1H, m)	2,93 (1H, ddd, $J= 17,0$ ; 11,0 e 5,5 Hz)
2b 3a	2,29 (2H, m)	2,50 (2H, m)
5 9a	2,79 (2H, m)	2,74 (1H, d, $J= 9,5$ Hz) 2,82 (1H, dd, $J= 15,5$ ; 7,5 Hz)
8 13a 13b	4,80 (3H, m)	4,83 (1H, dd, $J= 13,1$ ) 4,90 (1H, dd, $J= 13,1$ ) 4,93 (1H, d, $J= 7,5$ )
6	4,89 (1H, d, $J= 9,5$ Hz)	4,89 (1H, d, $J= 9,5$ Hz)
9b	2,59 (1H, m)	2,41 (1H, d, $J= 15,5$ Hz)
3b 14	1,64 (4H, s)	~1,70 1,67 (3H, s)
15	1,53 (3H; s)	1,61 (3H, s)
3'	6,14 (1H, t, $J= 1,0$ Hz) 5,69 (1H, t, $J= 1,0$ Hz)	6,16 (1H, t, $J= 1,0$ Hz) 5,69 (1H, t, $J= 1,0$ Hz)
4'	1,92 (3H, q, $J= 1,0$ Hz)	1,96 (3H, q, $J= 1,0$ Hz)
2''	2,06 (3H, s)	2,07 (3H, s)
2'''	2,04 (3H, s)	2,06 (3H, s)

\*: BARDÓN et al., 1990 (270 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).  $\delta$ : deslocamento químico,  $J$ : constante de acoplamento, s: simpleto, d: dupleteo, dd: duplo dupleteo, ddd: duplo dupleteo duplo, t: tripleto, q: quarteto, m: multipleteo. Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Figura 25 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do glaucolídeo A (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

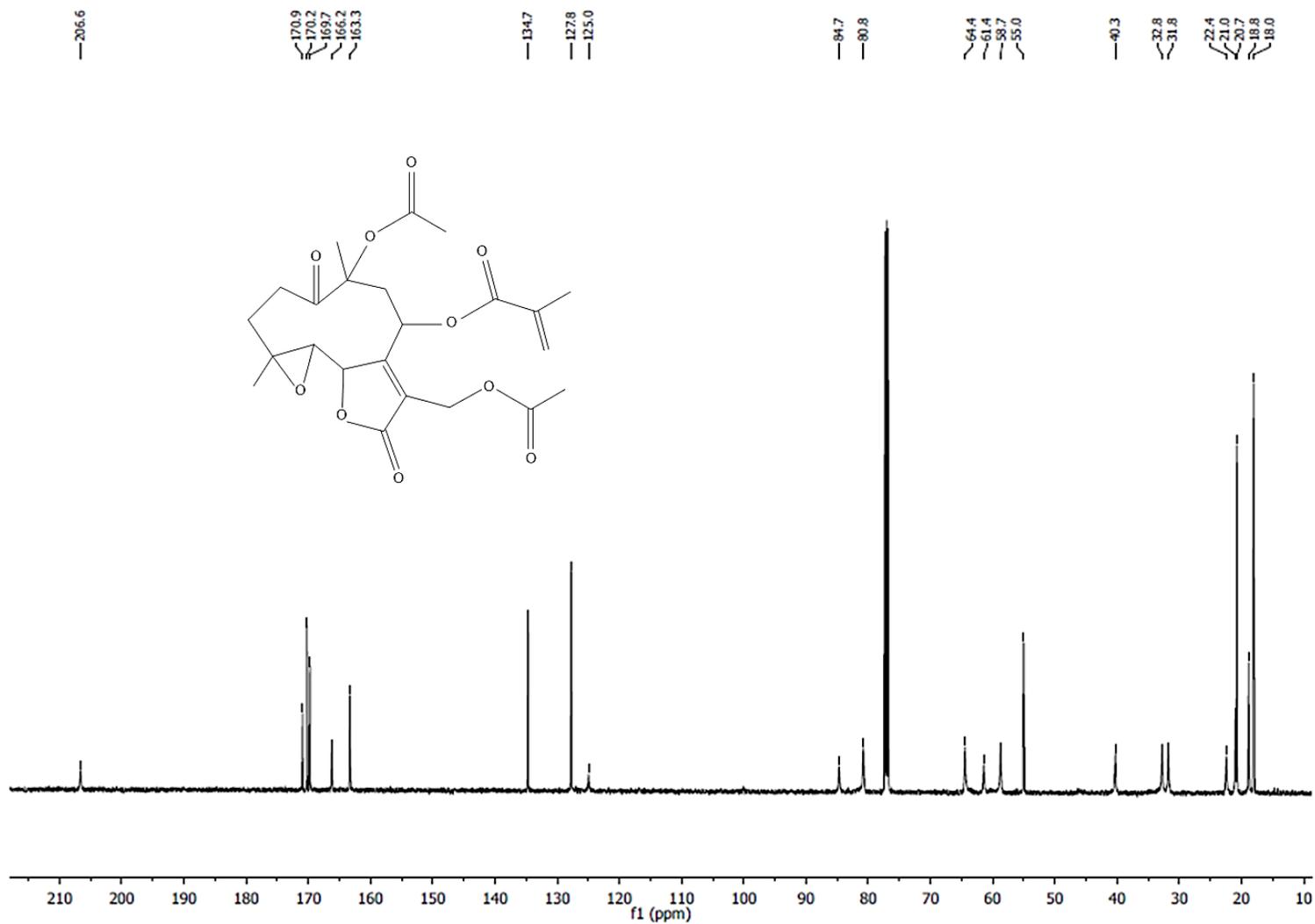


Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Tabela 6 – Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância VP-S1 e dados do glaucolídeo A descritos na literatura.

<b>Carbono</b>	<b>Dados Observados <math>\delta</math> (ppm)</b>	<b>Literatura* <math>\delta</math> (ppm)</b>
<b>1</b>	206,6	207,1
<b>2</b>	32,8	33,3
<b>3</b>	31,8	32,5
<b>4</b>	61,4	61,0
<b>5</b>	58,7	59,5
<b>6</b>	80,8	81,1
<b>7</b>	163,3	162,8
<b>8</b>	64,4	64,5
<b>9</b>	40,3	42,0
<b>10</b>	84,7	84,5
<b>11</b>	125,0	126,0
<b>12</b>	169,7	169,5
<b>13</b>	55,0	55,3
<b>14</b>	18,8	19,1
<b>15</b>	20,7 <sup>a</sup>	19,1
<b>1'</b>	166,2	166,3
<b>2'</b>	134,7	135,2
<b>3'</b>	127,8	127,2
<b>4'</b>	18,0	17,8
<b>1''</b>	170,9	170,6
<b>2''</b>	22,4 <sup>a</sup>	20,8
<b>1'''</b>	170,2	170,0
<b>2'''</b>	21,0	20,5

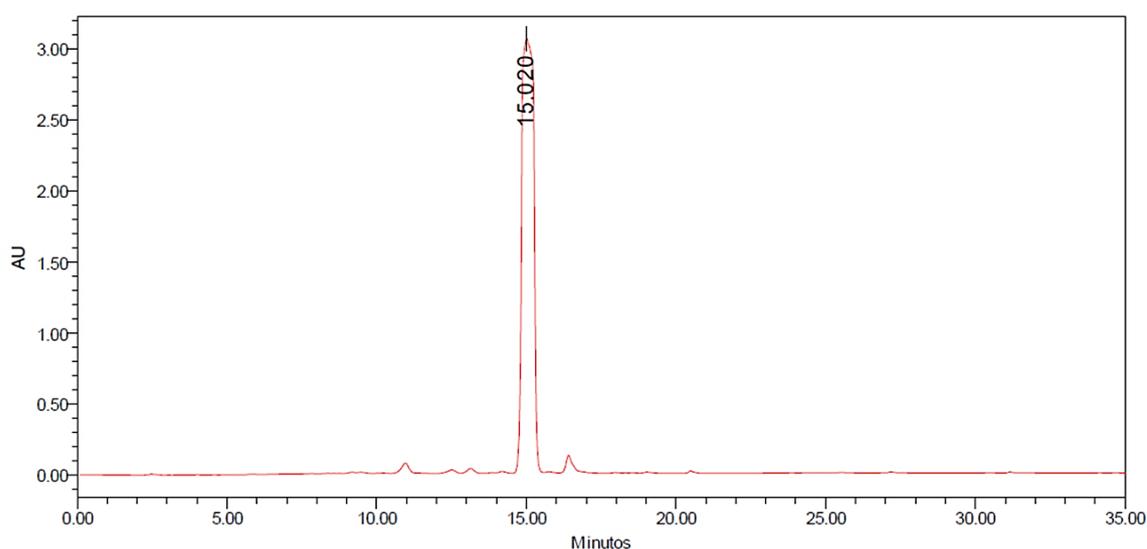
\*: BARDÓN et al., 1990 (67 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). a: Os sinais podem estar trocados.  
 Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Figura 26 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do glaucolídeo A (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

#### 5.4 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS PERFIS CROMATOGRÁFICOS DO EXTRATO VP E DO GLAUCOLÍDEO A

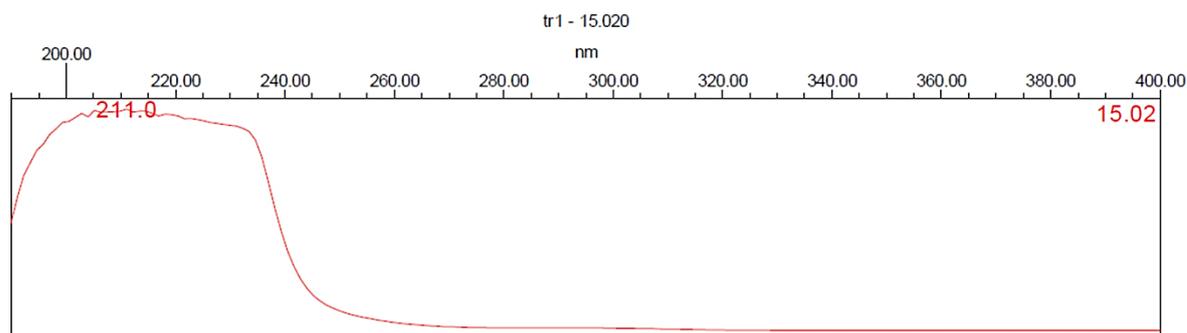
O perfil cromatográfico obtido a partir da análise do glaucolídeo A por CLAE-DAD (Figura 27), nas mesmas condições analíticas utilizadas para o extrato VP, demonstrou a presença de pico único (tr = 15.020 min.) próximo àquele da substância majoritária observado no cromatograma do extrato VP (tr = 15.044 min.) (Figura 18, p. 66). O espectro no UV revelou a absorção desta substância no comprimento de onda de 211 nm, dentro da faixa de  $\gamma$  característica de LSTs (FISCHER; OLIVIER; FISCHER, 1979; XU; YE; ZHAO, 2011). (Figura 28). A análise comparativa dos cromatograma obtidos neste estudo permitiu confirmar que o glaucolídeo A isolado é a substância majoritária do extrato VP (Figura 29).

Figura 27 – Cromatograma do glaucolídeo A obtido por CLAE-DAD a 210 nm



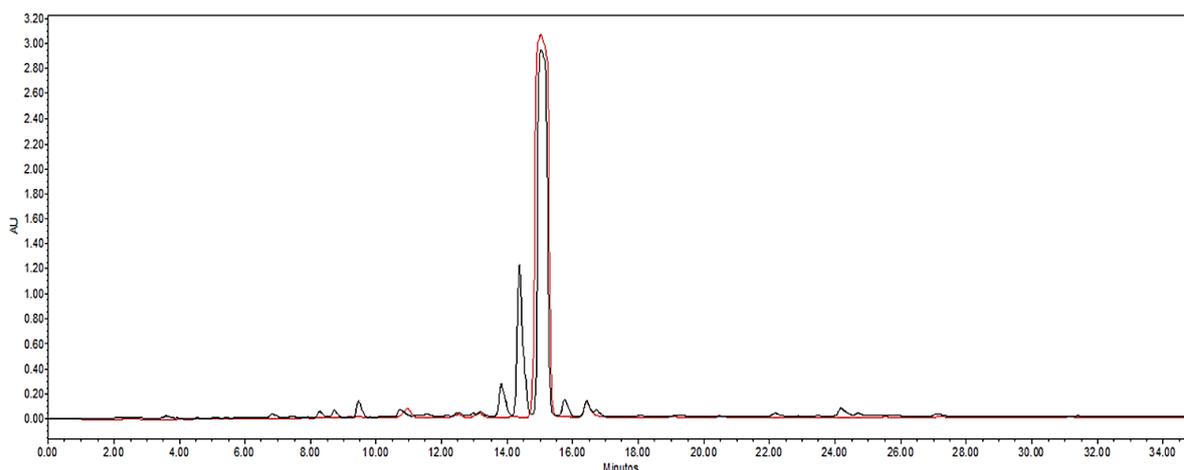
Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa  $C_{18}$  (4,6 mm x 250 mm, 5  $\mu$ m); fase móvel binária composta de  $H_2O$  (0,5%  $H_3PO_4$ ) e MeCN em um gradiente linear de 40% a 100% de MeCN em 35 minutos e 100% de MeCN em 5 minutos; fluxo de 1mL/min; [ ] amostra: 2mg/mL. Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Figura 28 – Espectro de absorção na região do UV do glaucolídeo A.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Figura 29 – Comparação entre os perfis cromatográficos do glaucolídeo A e do extrato VP.



Glaucolídeo A (perfil em cor vermelha), Extrato VP (perfil em cor preta). Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2015.

O glaucolídeo A é uma LST  $\gamma$ -lactona conjugada do tipo germacranolídeo que, em 1975, já era relatada por Mabry e colaboradores como a LST majoritária de diversas espécies mundialmente distribuídas do gênero *Vernonia* (MABRY et al., 1975), tendo sido isolada primeiramente de *V. polyanthes* por Igual e colaboradores (2013). Assim, o presente estudo constitui o segundo relato de isolamento do glaucolídeo A dessa espécie vegetal.

No contexto biológico, o glaucolídeo A é conhecido por inibir o apetite e o desenvolvimento de larvas de insetos herbívoros da ordem *Lepidoptera*, possuindo ação inseticida (BURNETT JR et al., 1974; VIEGAS JÚNIOR, 2003). Cunha e colaboradores (1999) demonstraram a atividade antinociceptiva do glaucolídeo A. Embora esta LST seja amplamente identificada em espécies do gênero *Vernonia*, ainda são escassos os relatos de suas atividades biológicas e farmacológicas. Outros glaucolídeos são apresentados como detentores de propriedades relaxantes do músculo uterino (CAMPOS et al., 2003), além de apresentarem atividades moluscicida (BORKOSKY et al., 2009) e citotóxica (WILLIAMS et al., 2005).

## 5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO VP E DO GLAUCOLÍDEO A

Os valores de CIM, obtidos pelo método de microdiluição em caldo para o extrato VP e para o glaucolídeo A, estão apresentados na Tabela 7. Nas condições do ensaio, o extrato VP apresentou atividade antibacteriana, inibindo o crescimento de 5 das 8 cepas testadas, sendo mais ativo frente à *S. aureus* ATCC 6538 e ATCC 29213, com valores de CIM iguais a 0,625 mg/mL.

Tabela 7 – Valores de CIM determinados por microdiluição em caldo para o extrato VP e glaucolídeo A.

Cepa de Referência	CIM	
	Extrato VP (mg/mL)	Glaucolídeo A (µg/mL)
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	0,625	250
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,625	500
<i>E. coli</i> ATCC 10536	5,0	> 500*
<i>E. coli</i> ATCC 25922	> 5,0*	> 500
<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 10708	5,0	> 500
<i>S. Thyphimurium</i> ATCC 13311	5,0	> 500
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	> 5,0	> 500
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	> 5,0	> 500

\*: Valores > 5,0 mg/mL e < 0,039 mg/mL para o extrato VP e > 500 µg/mL e < 3,9 µg/mL para o glaucolídeo A não foram avaliados neste estudo. Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2015.

De forma semelhante ao extrato VP, o glaucolídeo A apresentou atividade antibacteriana frente às referidas cepas de *S. aureus*, com valores de CIM de 250 µg/mL e 500 µg/mL, respectivamente, no entanto, esta substância foi inativa frente às outras cepas nas concentrações testadas, ou seja, até 500 µg/mL. Os antibacterianos de referência apresentaram valores de CIM compatíveis com aqueles preconizados pelo documento M100-S24 (CLSI, 2014), conforme apresentado na Tabela 8. Os controles realizados descartaram quaisquer possíveis interferências nos resultados.

Tabela 8 – Valores de CIM determinados por microdiluição em caldo para os antibacterianos de referência ampicilina e cloranfenicol.

Cepa de Referência	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>*</sup>	
	AMP	CLOR
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	$\leq 3,9$ <sup>#</sup>	7,8
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	$\leq 3,9$	15,6 <sup>*</sup>
<i>E. coli</i> ATCC 10536	$\leq 3,9$	$\leq 3,9$
<i>E. coli</i> ATCC 25922	$\leq 3,9$	$\leq 3,9$
<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 10708	$\leq 3,9$	$\leq 3,9$
<i>S. Thyphimurium</i> ATCC 13311	$\leq 3,9$	$\leq 3,9$
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	$> 500$ <sup>#</sup>	62,5
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	$> 500$	62,5

AMP: ampicilina; CLOR: cloranfenicol. \*: valores de CIM obtidos para os antibacterianos de referência estão de acordo com aqueles estabelecidos pelo CLSI (2014) para *S. aureus* ATCC 29213 (0,5 a 2 – ampicilina) e (2 a 16 – cloranfenicol); *E. coli* ATCC 25922 (2 a 8) e *P. aeruginosa* ATCC 27853 (não responde), conforme documento M100-S24 <sup>#</sup>: valores  $> 500 \mu\text{g/mL}$  e  $< 3,9 \mu\text{g/mL}$  para os antibacterianos de referência não foram avaliados neste estudo. Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Conforme descrito no item 4.6.2, alíquotas dos poços correspondentes às concentrações do extrato VP e do Glaucolídeo A que inibiram o crescimento bacteriano no ensaio de microdiluição em caldo foram transferidas para placas de Petri contendo Ágar Müeller-Hinton, no intuito de avaliar se o efeito farmacológico foi bactericida ou bacteriostático e, assim, determinar a CBM.

A Tabela 9 mostra que os valores de CIM  $\leq 5,0 \text{ mg/mL}$  obtidos para o extrato VP refletiram efeito bacteriostático. Dessa forma, os valores da CBM frente a *S. aureus* ATCC 6538 e *S. aureus* ATCC 29213 foram de 2,5 mg/mL e 1,25 mg/mL, respectivamente. Tendo em vista que valores de CIM  $> 5,0 \text{ mg/mL}$  para o extrato não foram avaliados no ensaio, não foi possível determinar a CBM para as outras cepas testadas, ficando estabelecido, portanto, CBM  $> 5,0 \text{ mg/mL}$ .

Tabela 9 – Valores de CIM e CBM e classificação do efeito farmacológico do extrato VP.

<b>Cepa de Referência</b>	<b>CIM (mg/mL)</b>	<b>Efeito Farmacológico</b>	<b>CBM (mg/mL)</b>
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	0,625	Bacteriostático	2,5
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,625	Bacteriostático	1,25
<i>E. coli</i> ATCC 10536	5,0	Bacteriostático	> 5,0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	> 5,0	Não determinado	> 5,0
<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 10708	5,0	Bacteriostático	> 5,0
<i>S. Thyphimurium</i> ATCC 13311	5,0	Bacteriostático	> 5,0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	> 5,0	Não determinado	> 5,0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	> 5,0	Não determinado	> 5,0

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Conforme apresentado na Tabela 4, valores de CIM obtidos para o glaucolídeo A frente as referidas cepas de *S. aureus* também refletiram efeito bacteriostático. Assim, a CBM desta substância para *S. aureus* ATCC 6538 foi de 500 µg/mL, ao passo que frente a *S. aureus* ATCC 29213 foi determinada CBM > 500 µg/mL, visto que valores de CIM > 500 µg/mL para o glaucolídeo A não foram considerados no presente estudo.

Tabela 10 – Valores de CIM e CBM e classificação do efeito farmacológico do glaucolídeo A.

<b>Cepa de Referência</b>	<b>CIM (µg/mL)</b>	<b>Efeito Farmacológico</b>	<b>CBM (µg/mL)</b>
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	250	Bacteriostático	500
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	500	Bacteriostático	> 500
<i>E. coli</i> ATCC 10536	> 500	Não determinado	> 500
<i>E. coli</i> ATCC 25922	> 500	Não determinado	> 500
<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 10708	> 500	Não determinado	> 500
<i>S. Thyphimurium</i> ATCC 13311	> 500	Não determinado	> 500
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	> 500	Não determinado	> 500
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	> 500	Não determinado	> 500

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2015.

De acordo com Assis, Morelli-Amaral e Pimenta (2015), "Diversos autores vêm alertando acerca dos efeitos da escassez de estudos científicos e, também advertindo para uma possível marginalização do uso de plantas medicinais". Estes pesquisadores reiteraram o relato anteriormente realizado por Simões e Schenkel (2002) onde se reportou que a maior diversidade genética vegetal do planeta, presente no Brasil, não é conhecida dada à sua complexidade, embora as plantas medicinais brasileiras sejam consideradas altamente promissoras. Em nosso país, um vasto número de espécies vegetais tem sido empregado sob a forma de extratos brutos, infusões ou emplastos no tratamento de diversas doenças, incluindo infecções comuns (LIMA et al., 2006; ZUANAZZI; MAYORGA, 2010), porém sem o devido subsídio científico para esse uso (SIMÕES; SCHENKEL, 2002).

Neste cenário, as doenças infecciosas estão associadas a altas taxas de mortalidade e se agravam à medida que o surgimento da resistência bacteriana a múltiplos fármacos tem levado à perda da efetividade dos agentes antibacterianos disponíveis no mercado farmacêutico, se tornando um problema de saúde pública global (CDC, 2013). Este fato, aliado ao aperfeiçoamento das técnicas cromatográficas e dos instrumentos de análise espectroscópica para a elucidação estrutural de constituintes químicos, tem reduzido as dificuldades e desafios na pesquisa com produtos naturais, renovando, de modo especial, o interesse pelo potencial das plantas medicinais como fonte para a busca de novas opções terapêuticas e moléculas com ação antimicrobiana (BUTLER; BUSS, 2006; MILLER, 2011; RODRIGUES; SOUZA FILHO; FERREIRA, 2009).

Sob a ótica da atividade antibacteriana, dados microbiológicos previamente obtidos por nosso grupo de pesquisa corroboraram os resultados observados em estudo anterior (JORGETTO et al., 2011), visto que as frações diclorometânica e butanólica de *V. polyanthes* foram ativas frente a *S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 10536 e *S. Typhimurium* ATCC 13311, com valores de CIM de 1,25 e 5,0 mg/mL, respectivamente (TEMPONI, 2012). Além disso, essa autora observou o potencial antibacteriano desta espécie vegetal frente às cepas de *S. Typhimurium* ATCC 13311 e *P. aeruginosa* ATCC 27853, cujos achados também foram observados por Rodrigues (2013) com os extratos hexânico, em acetato de etila e etanólico (2013).

Considerando-se os fatores supracitados e a necessidade de se aprofundar as investigações microbiológicas anteriormente realizadas pelo nosso grupo de pesquisa, o presente estudo investigou a atividade antibacteriana do extrato de lavagem foliar de *V. polyanthes* (extrato VP) e de seu constituinte majoritário glaucolídeo A (substância VP-S1), no intuito de corroborar cientificamente com seu uso tradicional e contribuir para o

conhecimento da atividade farmacológica do glaucolídeo A, além de sua participação no potencial antibacteriano de *V. polyanthes*.

Existe uma vasta literatura que evidencia o potencial antibacteriano de espécies do gênero *Vernonia* frente a micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos. Esta atividade já foi relatada para o extrato clorofórmico das partes aéreas de *V. incana* (BARDÓN et al., 2007), extrato etanólico e fração clorofórmica das partes aéreas de *V. ambigua*, *V. blumeoides* e *V. oocephala* (ALIYU et al., 2011), extrato etanólico e frações de *V. condensata* (SILVA, 2012) e extrato etanólico das folhas de *V. amygdalina* (JOHNSON; KOLAWOLE; OLUFUNMILAYO, 2015). Contudo, os relatos sobre atividade antimicrobiana de *V. polyanthes*, até o presente momento, ainda são escassos, sendo encontrado um total de dois artigos quando consultada base científica de dados de livre acesso [BRAGA et al., 2007 (atividade antifúngica); SILVA et al., 2012 (atividade antibacteriana)] (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=antimicrobial+activity+and+vernonia+polyanthes>, acessado em 16 de julho de 2015).

Silva e colaboradores (2012) demonstraram, por meio do método de diluição em ágar, atividade antibacteriana do extrato metanólico e do óleo essencial de *V. polyanthes* frente às cepas de rotina de *S. aureus* (CIM<sub>90%</sub> de 3,3 mg/mL e 2,8 mg/mL, respectivamente) e de *E. coli* (CIM<sub>90%</sub> de 26,9 mg/mL e 24,1 mg/mL, nessa ordem), sendo o representante Gram-positivo mais sensível aos produtos naturais testados. Temponi (2012), por meio da determinação da CIM pelo método de microdiluição em caldo, reportou que a fração diclorometânica do extrato etanólico de *V. polyanthes* apresentou atividade antibacteriana frente à *S. aureus* ATCC 29213 com CIM de 1,25 mg/mL e CBM de 2,5 mg/mL. Para *E. coli* ATCC 10536, *S. Thyphimurium* ATCC 13311 e *P. aeruginosa* ATCC 27853, os valores de CIM e CBM foram iguais a 5,0 mg/mL.

Os resultados obtidos com o extrato VP, empregando-se o mesmo método para determinação da CIM, CBM e classificação do efeito farmacológico utilizados por Temponi (2012), foram semelhantes aos obtidos por essa autora e revelaram atividade antibacteriana frente a 5 das 8 cepas de referência testadas, destacando-se a ação frente à *S. aureus* ATCC 29213 e ATCC 6538 com valores de CIM de 0,625 mg/mL para ambas as cepas e CBM de 1,25 mg/mL e 2,5 mg/mL, respectivamente. Apesar de não ter sido proposta uma classificação que relacione os valores de CIM e eficiência da atividade antibacteriana para extrato de lavagem foliar, considerando-se os resultados do estudo realizado por Aligiannis e colaboradores (2001) empregando óleo essencial, dadas as devidas proporções, a CIM de

0,625 mg/mL do extrato VP corresponde à uma atividade extremamente forte, alinhada a uma espécie vegetal de efeito terapêutico promissor.

Portanto, os resultados obtidos com o extrato VP corroboram o potencial antibacteriano de *V. polyanthes*, principalmente frente à *S. aureus*. Esse fato pode ser devido à relativa simplicidade estrutural da parede celular de bactérias Gram-positivas, composta essencialmente por peptidoglicano, a qual facilita a penetração dos compostos em contraste à complexidade dessa estrutura em bactérias Gram-negativas (RANG et al., 2008). *P. aeruginosa*, por exemplo, é um micro-organismo intrinsecamente resistente a um vasto número de agentes antibacterianos devido à baixa permeabilidade de sua parede celular, equivalente a um centésimo da permeabilidade dessa mesma estrutura em *E. coli*, somada a diversos mecanismos de resistência natural ou adquirida, relacionados à transferência de genes de resistência inter e intraespécies (STRATEVA; YORDANOV, 2009). Estes fatores podem explicar a incapacidade do extrato VP de inibir, nas concentrações testadas, o crescimento das cepas de *P. aeruginosa* (MESAROS et al., 2007; POOLE, 2011; STRATEVA; YORDANOV, 2009).

De acordo com a descrição constante na ficha de identificação da cepa ATCC, *S. aureus* ATCC 29213 produz uma fraca  $\beta$ -hemólise em ágar-sangue de carneiro, enquanto *S. aureus* ATCC 6538 promove clássica lise de eritrócitos. A diferença de valores de CIM e CBM entre as cepas de *S. aureus* testadas pode ser atribuída à variação da expressão gênica entre elas, exemplificada pela presença do gene de virulência que codifica a hemolisina do tipo  $\beta$ . *S. aureus* pode albergar diferentes genes de virulência que codificam enterotoxinas estafilocócicas, leucocidinas, esfoliatinas, hemolisinas, toxina 1 da síndrome do choque tóxico, alelos do gene acessório regulador (*agr*) e aqueles que codificam resistência a antibióticos, sendo que a presença ou ausência desses elementos genéticos é essencial na determinação do potencial de virulência das cepas, existindo, portanto, uma relação íntima entre virulência e resistência (SPANU et al., 2012).

A mesma observação quanto à escassez de dados na literatura sobre a atividade antimicrobiana detectada com o extrato VP pode ser extrapolada para o glaucolídeo A (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=antimicrobial+activity+and+glaucolide+A+and+vernonia+polyanthes>, acessado em 16 de julho de 2015). Sendo assim, os resultados obtidos neste estudo foram semelhantes àqueles observados com outras LSTs isoladas de espécies do gênero *Vernonia*.

Rabe, Mullholland e Staden (2002) demonstraram a atividade antibacteriana de duas LSTs, vernolídeo e vernodalina, isoladas de *V. colorata*. Essas substâncias foram ativas,

pelo método de microdiluição em caldo, frente a *S. aureus* ATCC 12600 com valores de CIM de 500 e 250 µg/mL, respectivamente, e CIM > 8000 µg/mL e 8000 µg/mL frente a *E. coli* ATCC 11775, nessa ordem. Em outro estudo realizado por Erasto, Grierson e Afolayan (2006), também verificou-se a atividade antibacteriana de vernolídeo e vernodalol (LST) isoladas de *V. amygdalina* frente às cepas de rotina de Gram-positivos e de Gram-negativos. Nessa investigação, vernolídeo também se mostrou ativo frente à *S. aureus*, com valor de CIM de 500 µg/mL, enquanto vernodalol não apresentou atividade. Vernolídeo e vernodalol foram inativos quando testados em um gradiente de concentração entre 50 µg/mL e 500 µg/mL frente à *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Em relação à atividade antibacteriana do glaucolídeo A avaliado no presente estudo, essa LST se mostrou ativa frente às cepas de *S. aureus* ATCC 6538 e ATCC 29213, com valores de CIM de 250 µg/mL e 500 µg/mL, respectivamente. O glaucolídeo A não apresentou atividade frente à *E. coli*, *S. Choleraesuis*, *S. Thyphimurium* e *P. aeruginosa* testadas no gradiente de concentração máximo de 500 µg/mL.

Na tentativa de melhor entendimento dos resultados obtidos com o glaucolídeo A nos testes de atividade antibacteriana, realizou-se uma comparação entre as estruturas químicas dessa substância e das LSTs supracitadas, assim como uma discussão do provável grupamento responsável por essa ação.

As LSTs mencionadas acima, vernolídeo, vernodalina e vernodalol, possuem o grupo  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona em suas estruturas. No entanto, verifica-se a ausência desse grupamento no glaucolídeo A (Figura 24, item 5.3) e, ainda assim, os resultados da atividade antibacteriana são semelhantes entre estas substâncias frente aos representantes Gram-positivos e Gram-negativos testados. Além disso, o vernodalol, apesar de possuir o grupo  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona, não foi ativo frente à *S. aureus*, opostamente ao glaucolídeo A. Dessa forma, sugere-se que este grupo não seja o determinante da atividade antibacteriana destas LSTs. Essa informação já havia sido relatada por Picman (1986) em seu artigo de revisão sobre atividade biológica de LSTs, reportando opiniões divergentes quanto à dependência do grupo  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona como responsável pela atividade antibacteriana.

Os resultados da literatura são sugestivos de que a eficiência antimicrobiana das LSTs não está correlacionada apenas com a presença da porção  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona ou com o resíduo do anel ciclopentenona  $\beta$ - substituído, mostrando que outros fatores desempenham importante papel na determinação da atividade antimicrobiana, incluindo os grupos substituintes, suas posições e configuração no esqueleto básico, aumentando ou diminuindo o potencial de atividade das substâncias (GIESBRECHT et al., 1990; PICMAN, 1986).

Conclusões semelhantes foram reportadas por Cartagena, Montanaro e Bardón (2008). Nesse estudo, 30 LSTs, incluindo representantes do tipo germacranolídeo, também apresentaram atividade antibacteriana seletiva para micro-organismos Gram-positivos e, da mesma forma, os resultados demonstraram a independência do grupo  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona na determinação da eficiência dessas substâncias. Nessa investigação, LSTs inativas se diferenciaram daquelas ativas pela ausência de grupos hidroxila e carbonila adicionais, confirmando a influência de outros grupos funcionais na atividade biológica dessas substâncias. Além disso, estas autoras sugerem que a inatividade destas LSTs frente às bactérias Gram-negativas seja devido à retenção dessas substâncias na camada lipopolissacarídica presente na parede celular desses micro-organismos.

Em um estudo realizado por Bachelier, Mayer e Klein (2006), era esperado que o partenolídeo inibisse a enzima MurA, responsável pela biossíntese do peptidoglicano de *E. coli* e *P. aeruginosa*, pela ligação do grupo epóxido ao composto tiólico de forma análoga à fosfomicina. No entanto, a atividade inibitória foi relativamente baixa e estes autores concluíram que um impedimento estérico foi responsável por esse efeito. Evidentemente, este não é o único mecanismo de ação antibacteriana das LSTs. Entretanto, este resultado demonstra a possibilidade de fatores inerentes à geometria molecular dessas substâncias contribuírem para a inatividade frente às bactérias Gram-negativas, além da possível associação com a complexidade da parede celular desses micro-organismos, que parece impedir a penetração das LSTs lipofílicas na célula bacteriana (CARTAGENA; MONTANARO; BARDÓN, 2008).

A presença de outros grupos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados, como ésteres conjugados e grupos epóxidos, hidroxila e O-acila, podem aumentar a atividade biológica de LSTs. No entanto, outros fatores tais como geometria molecular, lipofilicidade e o ambiente químico podem influenciar nesta atividade (RODRIGUEZ; TOWERS; MITCHELL, 1976; SCOTTI et al., 2007).

Considerando a ausência do grupo  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona e do resíduo do anel ciclopentenona  $\beta$ - substituído na estrutura química do glaucolídeo A e com base nos dados da literatura, a atividade antibacteriana frente à *S. aureus* apresentada por essa substância pode estar relacionada, estruturalmente, à porção lactônica  $\alpha,\beta$ -insaturada, bem como à presença do éster metacrilato e outros grupos reativos como epóxido e acetato (OAc). Esses grupamentos podem reagir com os grupos sulfidrilas presentes em substâncias com grupos tiois.

Em relação às cepas Gram-negativas testadas, apesar das suposições, são necessários estudos aprofundados e específicos que permitam relacionar, de forma inequívoca, a relação estrutura-atividade para o glaucolídeo A.

Finalmente, considerando-se a propriedade antibacteriana de *V. polyanthes* reportada no presente estudo, se o glaucolídeo A fosse a substância responsável por essa atividade observada com o extrato VP, esperaria-se valor de CIM nos patamares inferiores do gradiente de concentração utilizado, ou seja, valores menores. No entanto, os resultados obtidos foram  $\geq 250 \mu\text{g/mL}$ , o que sugere sinergismo entre substâncias. Sob esta ótica, a compreensão da atividade de plantas medicinais pode não ser possível se seus constituintes forem analisados separadamente. Esse argumento baseia-se no fato de que as propriedades biológicas das espécies vegetais seriam devidas às interações entre seus múltiplos metabólitos secundários (WINK, 2003; WINK, 2008).

## 6 CONCLUSÕES

---

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

- O método de extração por lavagem foliar mostrou-se adequado para a extração preferencial de LSTs e flavonoides presentes nos tricomas glandulares e folhas de *V. polyanthes*;
- O glaucolídeo A, pertencente à classe das LSTs do tipo germacranolídeo é o constituinte majoritário do extrato de lavagem foliar de *V. polyanthes* obtido no presente estudo;
- O extrato de lavagem foliar de *V. polyanthes* e o glaucolídeo A foram ativos frente às cepas de referência de Gram-positivos testadas;
- A atividade antibacteriana do extrato de lavagem foliar deve-se, provavelmente, ao sinergismo entre os seus constituintes químicos revelando, dessa forma, o potencial dessa espécie vegetal para a busca de outras moléculas como possíveis protótipos de fármacos antibacterianos;
- A atividade antibacteriana do glaucolídeo A está provavelmente relacionada ao grupo lactônico  $\alpha,\beta$ -insaturado e a outros grupos reativos presentes na molécula, como ésteres e epóxido, sendo necessária a realização de estudos aprofundados que elucidem de forma inequívoca a relação estrutura-atividade dessa substância;
- Os resultados microbiológicos obtidos no presente estudo revelaram o potencial de *V. polyanthes* e do glaucolídeo A como possível fitoterápico e protótipo de um fármaco antibacteriano, respectivamente, como novas opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por cepas de *S. aureus*, sendo necessária a realização de estudos toxicológicos no intuito de confirmar a viabilidade da utilização desses produtos naturais na terapêutica em humanos, de forma segura e eficaz;
- O potencial do glaucolídeo A como possível protótipo de um fármaco antibacteriano baseia-se na perspectiva de utilização de ferramentas químicas para obtenção de análogos dessa molécula;
- A atividade antibacteriana do glaucolídeo A deve ser explorada na perspectiva do efeito sinérgico com antibióticos sintéticos utilizados no tratamento das infecções por *S. aureus*, como novas opções terapêuticas.

## REFERÊNCIAS

---

ABDEL-BASET, Z. H.; SOUTHWICK, L.; PADOLINA, W. G.; YOSHIOKA, H.; MABRY, T. J.; JONES JR, S. B. Sesquiterpene lactones: a survey of 21 United States taxa from the genus *Vernonia* (Compositae). **Phytochemistry**, v. 10, p. 2201-2204, 1971.

AHMAD, I.; CHAUDHARY, B. A.; JANBAZ, K. H.; UZAIR, M.; ASHRAF, M. Urease inhibitors and antioxidants from *Vernonia cinerascens*. **Journal of the Chemical Society of Pakistan**, v. 33, p. 114-117, 2011.

ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; LINS NETO, E. M. F.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325-354, 2007.

ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4168-4170, 2001.

ALIYU, A. B.; MUSA, A. M.; ABDULLAHI, M. S.; IBRAHIM, H.; OYEWALE, A. O. Phytochemical screening and antibacterial activities of *Vernonia ambigua*, *Vernonia blumeoides* and *Vernonia ocephala* (Asteraceae). **Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research**, v. 68, p. 67-73, 2011.

ALVARENGA, A. L.; SCHWAN, R. F.; DIAS, D. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; BRAVO-MARTINS, C. E. C. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias patogênicas humanas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, p. 86-91, 2007.

ALVES, J. C. F. A review on the chemistry of eremanthine: a sesquiterpene lactone with relevant biological activity. **Organic Chemistry International**, v. 2011, p. 1-35, 2011.

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

AMBRÓSIO, S. R.; OKI, Y.; HELENO, V. C. G.; CHAVES, J. S.; NASCIMENTO, P. G. B. D.; LICHSTON, J. E.; CONSTANTINO, M. G.; VARANDA, E. M.; DA COSTA, F. B. Constituents of glandular trichomes of *Tithonia diversifolia*: relationships to herbivory and antifeedant activity. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2052-2060, 2008.

ANDONOVA, M.; URUMOVA, V. Immune surveillance mechanisms of the skin against the stealth infection strategy of *Pseudomonas aeruginosa* - Review. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 36, p. 433-448, 2013.

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

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; DA COSTA, F. B.; SILVA, V. C.; GOBBO-NETO, L.; REHDER, V. L. G.; HAYASHI, A. H. Glandular trichomes on aerial and underground organs in *Chrysolaena* species (*Vernonieae* - Asteraceae): structure, ultrastructure and chemical composition. **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 207, p. 878-887, 2012.

ARANTES, F. F. P. **Síntese e avaliação da fitotoxicidade de novas lactonas sesquiterpênicas**. 2007. Dissertação. (Mestrado em Agroquímica) - Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

ARAÚJO, P. W. B.; QUINTANS JÚNIOR, L. J.; VASCONCELOS, H. D.; ALMEIDA, J. R. S. Flavonoides e hipertensão. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 12, p.188-189, 2005.

ASSIS, M. A.; MORELLI-AMARAL, V. F.; PIMENTA, F. P. Grupos de pesquisa e sua produção científica sobre plantas medicinais: um estudo exploratório no Estado do Rio de Janeiro. **Revista Fitos**, v. 9, p. 1-72, 2015.

BACHELIER, A.; MAYER, R.; KLEIN, C. D. Sesquiterpene lactones are potent and irreversible inhibitors of the antibacterial target enzyme MurA. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 5605-5609, 2006.

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

BARDÓN, A.; BORKOSKY, S.; YBARRA, M. I.; MONTANARO, S.; CARTAGENA, E. Bioactive plants from Argentina and Bolivia. **Fitoterapia**, v. 78, p. 227-231, 2007.

BARDÓN, A.; CATALÁN, C. A. N.; GUTIÉRREZ, A. B.; HERZ, W. Glaucolides and related sesquiterpene lactones from *Vernonia incana*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 313-315, 1990.

BARNIOL-XICOTA, M.; ESCANDELL, A.; VALVERDE, E.; JULIÁN, E.; TORRENTS, E.; VÁZQUEZ, S. Antibacterial activity of novel benzopolycyclic amines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, p. 290-296, 2015.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Flavonoide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, p. 285-292, 2004.

BENFATTI, A. C.; BARBASTEFANO, V.; RODRIGUES, J.; RINALDO, D.; SANTOS, L. C.; BRITO, A. R. M. S. Estudo químico do extrato clorofórmico das folhas de *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 30., 2007, Águas de Lindoia. Disponível em: <<https://sec.sbq.org.br/cdrom/30ra/listaresumos.htm>>. Acesso em 16 jul. 2015.

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

- BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; KING, R. M.; ROBINSON, H. Further hirsutinolides from *Vernonia polyanthes*. **Phytochemistry**, v. 22, p. 2863-2864, 1983.
- BORKOSKY, S.; LEÓN, S. P.; JUÁREZ, G.; SIERRA, M. G.; BARDÓN, A. Molluscicidal sesquiterpene lactones from species of the tribe *Vernonieae* (Compositae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, p. 513-519, 2009.
- BOSCOLO, O. H.; VALLE, L. S. Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil. **Iheringia, Série Botânica**, v. 63, p. 263-277, 2008.
- BOUCHER, H.; TALBOT, G. H.; BRADLEY, J. S.; EDWARDS, J. E.; GILBERT, D.; RICE, L. B.; SCHELD, M.; SPELLBERG, B.; BARTLETT, J. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, p. 1-12, 2009.
- BRAGA, F. G.; BOUZADA, M. L. M.; FABRI, R. L.; MATOS, M. O.; MOREIRA, F. O.; SCIO, E.; COIMBRA, E. S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 396-402, 2007.
- BRANDÃO, M. G. L.; COSENZA, G. P.; PEREIRA, F. L.; VASCONCELOS, A. S.; FAGG, C. W. Changes in the trade in native medicinal plants in Brazilian public markets. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, p. 7013-7023, 2013.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. Brasília, 2011. 126 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. Espécies vegetais**. DAF/SCTIE/MS - RENISUS - fev/2009. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso em 16 jul. 2015.
- BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, p. 229-239, 2010.
- BREIDENSTEIN, E. B. M.; FUENTE-NÚÑEZ, C.; HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. **Trends in Microbiology**, v. 19, p. 419-426, 2011.
- BROWN, D. G.; LISTER, T.; MAY-DRACKA, T. L. New natural products as new leads for antibacterial drug discovery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 413-418, 2014.
- BUER, C. S.; IMIN, N.; DJORDJEVIC, M. A. Flavonoids: new roles for old molecules. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 52, p. 98-111, 2010.
- BURNETT JR, W. C.; JONES JR, S. B.; MABRY, T. J.; PADOLINA, W. G. Sesquiterpene lactones - insect feeding deterrents in *Vernonia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 2, p. 25-29, 1974.

BUSKUHLE H.; OLIVEIRA, F. L.; BLIND, L. Z.; FREITAS, R. A.; BARISON, A. CAMPOS, F. R.; CORILO, Y. E.; EBERLIN, M. N.; CARAMORI, G. F.; BIAVATTI, M. W. Sesquiterpene lactones from *Vernonia scorpioides* and their *in vitro* cytotoxicity. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1539-1544, 2010.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 2141-2153, 2004.

BUTLER, M. S.; BUSS, A. D. Natural products - The future scaffolds for novel antibiotics? **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 919-929, 2006.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CAMPOS, M.; OROPEZA, M.; PONCE, H.; FERNÁNDEZ, J.; JIMENEZ-ESTRADA, M.; TORRES, H.; REYES-CHILPA, R. Relaxation of uterine and aortic smooth muscle by glaucolides D and E from *Vernonia liatroides*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, p. 112-115, 2003.

CARTAGENA, E.; MONTANARO, S.; BARDÓN, A. Improvement of the antibacterial activity of sesquiterpene lactones. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 36, p. 43-51, 2008.

CARVALHO, C. E.; BEREZIN, E. N.; PISTELLI, I. P.; MÍMICA, L.; CARDOSO, M. R. A. 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.

CATÃO, R. M. R.; ANTUNES, R. M. P.; ARRUDA, T. A.; PEREIRA, M. S. V.; HIGINO, J. S.; ALVES, J. A.; PASSOS, M. G. V. M.; SANTOS, V. L. Atividade antimicrobiana "in vitro" do extrato etanólico de *Punica granatum linn.* (romã) sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 38, p. 111-114, 2006.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Antibiotic resistance threats in the United States, 2013**. Atlanta, 2013, 113p.

CHADWICK, M.; TREWIN, H.; GAWTHROP, F.; WAGSTAFF, C. Sesquiterpenoids lactones: benefits to plants and people. **International Journal of Molecular Science**, v. 14, p. 12780-12805, 2013.

CHIU, C. H.; TANG, P.; CHU, C.; HU, S.; BAO, Q.; YU, J.; CHOU, Y. Y.; WANG, H. S.; LEE, Y. S. The genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis, a highly invasive and resistant zoonotic pathogen. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. 1690-1698, 2005.

CHOMA, I. M.; GRZELAK, E. M. Bioautography detection in thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 2684-2691, 2011.

CHOPRA, I.; SCHOFIELD C.; EVERETT, M.; O'NEILL, A.; MILLER, K.; WILCOX, M.; FRÈRE, J. M.; DAWSON, M.; CZAPLEWSKI, L.; URLEB U.; COURVALIN, P. Treatment of health-care-associated infections caused by Gram-negative bacteria: a consensus statement. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, p. 133-139, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Eleventh Edition**. CLSI document M02-A11. Wayne, 2012a.

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

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

COBURN, B.; GRASSL, G. A.; FINLAY, B. B. *Salmonella*, the host and disease: a brief review. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, p. 112-118, 2007.

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

COSTA, A. V. **Atribuição inequívoca dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  do glaucolídeo B, síntese de seus derivados e síntese de 2-fenil-6, 7-exo-isopropilidenodioxi-8-oxabicyclo-[3.2. 1]-oct-2-eno, visando a obtenção de novos herbicidas**. 2008. Tese (Doutorado em Ciências - Química) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

COSTA, A. V.; BARBOSA, L. C. A.; LOPES, J. L. C.; PILÓ-VELOSO, D. Complete  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR signal assignments of glaucolide B. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 38, p. 675-679, 2000.

COSTA, F. J.; BANDEIRA, P. N.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; PESSOA, O. D. L.; SILVEIRA, E. R.; BRAZ-FILHO, R. Constituintes químicos de *Vernonia chalybaea* Mart. **Química Nova**, v. 31, p. 1691-1695, 2008.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, p. 241-256, 2009. Disponível em: < <http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/issue/view/8>>. Acesso em: 16 jul. 2015.

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

CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A; BARBOSA, R. D.; VICHNEWSKI, W.; LOPES, J. L. C. Antinociceptive activity of *Stilpnopappus ferruginea* aerial parts. **Fitoterapia**, v. 70, p. 175-177, 1999.

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

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3. ed. Chinchester: John Wiley & Sons Ltda, 2009. 539 p.

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

DIAS, J. F. G.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. Composition of essential oil and allelopathic activity of aromatic water of *Aster lanceolatus* Wild. (Asteraceae). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, p. 469-474, 2009.

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

DOVICH, S. S.; LAJOLO, F. M. Flavonoides e sua relação com doenças do Sistema Nervoso Central. **Nutrire**, v. 36, p. 123-135, 2011.

DOWNIE, L.; ARMIENTO, R.; SUBHI, R.; KELLY, J.; CLIFFORD, V.; DUKE, T. Community-acquired neonatal and infant sepsis in developing countries: efficacy of WHO's currently recommended antibiotics - systematic review and meta-analysis. **Archives of Disease in Childhood**, v. 98, p. 146-154, 2013.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **MultiCiência**, v. 7, p. 1-16, 2006.

EMERENCIANO, V. P.; MILITÃO, J. S. L. T.; CAMPOS, C. C.; ROMOFF, P.; KAPLAN, M. A. C.; ZAMBON, M.; BRANT, A. J. C. Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 947-957, 2001.

ERASTO, P.; GRIERSON, D. S.; AFOLAYAN, A. J. Bioactive sesquiterpene lactones from the leaves of *Vernonia amygdalina*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 117-120, 2006.

EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING of the EUROPEAN SOCIETY OF CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. EUCAST Definitive Document E. Def 3.1. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 6, p. 509-15, 2000.

EYONG, E. U.; AGIANG, M. A.; ATANGWHO, I. J.; IWARA, I. A.; ODEY, M. O.; EBONG, P. E. Phytochemicals and micronutrients composition of root and stem bark extracts of *Vernonia amygdalina* Del. **Journal of Medicine and Medical Science**, v. 2, p. 900-903, 2011.

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

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

FAROMBI, E. O.; OWOEYE, O. Antioxidative and chemopreventive properties of *Vernonia amygdalina* and *Garcinia biflavonoid*. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, p. 2533-2555, 2011.

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

FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development - the failure of success? **Nature Biotechnology**, v. 24, p. 1497-1503, 2006.

FERREIRA, L. S. **Análise de variação populacional e caracterização dos metabólitos secundários presentes nas folhas de *Lychnophora granmongolense* (Duarte) Semir & Leitão Filho**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

FIGUEIREDO, E. A. P.; RAMOS, H.; MACIEL, M. A. V.; VILAR, M. C. M.; LOUREIRO, N. G.; PEREIRA, R. G. *Pseudomonas Aeruginosa*: frequência de resistência a múltiplos fármacos e resistência cruzada entre antimicrobianos no Recife/PE. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 19, p. 421-427, 2007.

FILIZOLA, L. R. S.; PIMENTEL, R. M. M.; RANDAU, K. P.; XAVIER, H. S. Anatomia dos órgãos vegetativos de *Vernonia brasiliana* (L.) Druce. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 22, p. 299-303, 2003.

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

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

GAKUYA, D. W.; ITONGA, S. M.; MBARIA, J. M.; MUTHEE, J. K.; MUSAU, J. K. Ethnobotanical survey of biopesticides and other medicinal plants traditionally used in Meru central district of Kenya. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, p. 547-553, 2013.

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

GASPARETTO, C. M. **Propriedades Biológicas e Toxicológicas de *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae)**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2014.

GENILLOUD, O. The re-emerging role of microbial natural products in antibiotic discovery. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 106, p. 173-188, 2014.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural Product Reports**, v. 21, p. 263-277, 2004.

GIESBRECHT, A. M.; DAVINO, S. C.; NASSIS, C. Z.; YOUNG, M. C. M.; LOPES, J. L. C.; RODRIGUES, D. C.; VICHNEWSKI, W.; NASI, A. M. T. T.; DIAS, D. A.; LOPES, J. N. C. Antimicrobial activity of sesquiterpene lactones. **Química Nova**, v. 13, p. 312-314, 1990.

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

GONZÁLES, W. L.; NEGRITTO, M. A.; SUÁREZ, L. H.; GIANOLI, E. Induction of glandular and non-glandular trichomes by damage in leaves of *Madia sativa* under contrasting water regimes. **Acta Oecologica**, v. 33, p. 128-132, 2008.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, p. 667-679, 2010.

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

GWYNN, M. N.; PORTNOY, A.; RITTENHOUSE, S. F.; PAYNE, D. J. Challenges of antibacterial discovery revisited. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1213, p. 5-19, 2010.

HAMER, D. H.; DARMSTADT, G. L.; CARLIN, J. B.; ZAIDI, A. K. M.; YEBOAH-ANTWI, K.; SAHA, S. K.; RAY, P.; NARANG, A.; MAZZI, E.; KUMAR, P.; KAPIL, A.; JEENA, P. M.; DEORARI, A.; CHOWDURY, A. K. A.; BARTOS, A.; BHUTTA, Z. A.; ADU-SARKODIE, Y.; ADHIKARI, M.; ADDO-YOBO, E.; WEBER, M. W. Etiology of bacteremia in young infants in six countries. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 34, p. 1-8, 2015.

HAPFELMEIER, S.; EHRBAR, K.; STECHER, B.; BARTHEL, M.; KREMER, M.; HARDT, W. D. Role of the *Salmonella* pathogenicity island 1 effector proteins sipA, sopB, sopE, and sopE2 in *Salmonella enterica* subspecies 1 serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 795-809, 2004.

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

HATTORI, E. K. O.; NAKAJIMA, J. N. A família Asteraceae na estação de pesquisa e desenvolvimento ambiental Galheiro, Perdizes, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 59, p. 687-749, 2008.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, p. 67-202, 2002.

HAYASHI, A. H.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. The origin and anatomy of rhizophores in *Vernonia herbacea* and *V. platensis* (Asteraceae) from the Brazilian Cerrado. **Australian Journal of Botany**, v. 53, p. 273-279, 2005.

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

INGRAHAM, J. L.; INGRAHAM, C. A. **Introdução à Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

JAIME, R.; REY, P. J.; ALCÁNTARA, J. M.; BASTIDA, J. M. Glandular trichomes as an inflorescence defence mechanism against insect herbivores in Iberian columbines. **Oecologia**, v. 172, p. 1051-1060, 2013.

JERBA, V. F.; FERNANDES, C. D. Caracterização dos tipos de tricomas do sistema caulinar do estilosantes mineirão. **Publicatio UEPG-Ciências Exatas e da Terra, Agrárias e Engenharias**, v. 10, p. 7-12, 2004.

JOHNSON, M.; KOLAWOLE, O. S.; OLUFUNMILAYO, L. A. Phytochemical analysis, *in vitro* evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of methanolic leaf extract of *Vernonia amygdalina* (bitter leaf) against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, p.411-426, 2015.

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

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 123-140, 2004.

KARAM, T. K.; DALPOSSO, L. M.; CASA, D. M.; DE FREITAS, G. B. L. Carqueja (*Baccharis trimera*): utilização terapêutica e biossíntese. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, p. 280-286, 2013.

KENNY, O.; SMYTH, T. J.; WALSH, D.; KELLEHER, C. T.; HEWAGE, C. M.; BRUNTON, N. P. Investigating the potential of under-utilised plants from the Asteraceae family as a source of natural antimicrobial and antioxidant extracts. **Food Chemistry**, v. 161, p. 79-86, 2014.

KHAN, H. A.; AHMAD, A.; MEHBOOB, R. Nosocomial infections and their control strategies. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, p. 509-514, 2015.

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

KLANČNIK, A.; PISKERNIK, S.; JERŠEK, B.; MOŽINA, S. S. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. **Journal of Microbiological Methods**, v. 81, p. 121-126, 2010.

KOBAYASHI, C. C. B. A.; SADOYAMA, G.; VIEIRA, J. D. G. Determinação da resistência antimicrobiana associada em isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* em um hospital público de Goiânia, Estado de Goiás. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 404-410, 2009.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 206-220, 2005.

KPMG LLP. **The global economic impact of anti-microbial resistance**, Reino Unido, 2014. 41 p.

KRAMER, A.; SCHWEBKE, I.; KAMPF, G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. **BMC Infectious Diseases**, v. 6, p. 1-8, 2006.

LAM, K. S. New aspects of natural products in drug discovery. **Trends in Microbiology**, v. 15, p. 279-289, 2007.

LANGE, B. M.; TURNER, G. W. Terpenoid biosynthesis in trichomes - current status and future opportunities. **Plant Biotechnology Journal**, v. 11, p. 2-22, 2013.

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

LEWIS, K. Platforms for antibiotic discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, p. 371-387, 2013.

LIMA, M. R. F.; XIMENES, E. C. P. A.; LUNA, J. S.; SANT'ANA, A. E. G. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 300-306, 2006.

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

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

MABRY, T. J.; ABDEL-BASET, Z.; PADOLINA, W. G.; JONES JR, S. B. Systematic implications of flavonoids and sesquiterpene lactones in species of *Vernonia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 2, p. 185-192, 1975.

MACHADO, A. L.; ARAGÃO, F. M.; BANDEIRA, P. N.; SANTOS, H. S.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; PESSOA, O. D. L.; SILVEIRA, E. R.; NUNES, E. P.; BRAZ-FILHO, R. Constituintes químicos de *Vernonia scorpioides* (Lam) Pers. (Asteraceae). **Química Nova**, v. 36, p. 540-543, 2013.

MACLEAN, R. C.; HALL, A. R.; PERRON, G. G.; BUCKLING, A. The population genetics of antibiotic resistance: integrating molecular mechanisms and treatment contexts. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, p. 405-414, 2010.

MAHADY, G. B.; HUANG, Y.; DOYLE, B. J.; LOCKLEAR, T. Natural products as antibacterial agents. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 35, p. 423-444, 2008.

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

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

MARSTON, A. Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 2676-2683, 2011.

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

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

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

MAZUR, M.; SKROBISZEWSKI, A.; GŁADKOWSKI, W.; PODKOWIK, M.; BANIA, J.; NAWROT, J.; KLEJDYSZ, T.; WAWRZEŃCZYK, C. Lactones 46. Synthesis, antifeedant and antibacterial activity of  $\gamma$ -lactones with *p*-methoxyphenyl substituent. **Pest Management Science**, 2015. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com.ez25.periodicos.capes.gov.br/doi/10.1002/ps.4012/epdf>>. Acesso em 16 jul. 2015.

MCDOWELL, E. T.; KAPTEYN, J.; SCHMIDT, A.; LI, C.; KANG, J. H.; DESCOUR, A.; SHI, F.; LARSON, M.; SCHILLMILLER, A.; AN, L.; JONES, A. D.; PICHERSKY, E.; SODERLUND, C. A.; GANG, D. R. Comparative functional genomic analysis of *Solanum* glandular trichome types. **Plant Physiology**, v. 155, p. 524-539, 2011.

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

MESAROS, N.; NORDMANN, P.; PLÉSIAT, P.; ROUSSEL-DELVALLEZ, M.; ELDERE, J. V.; GLUPCZYNSKI, Y.; LAETHEM, Y. V.; JACOBS, F.; LEBECQUE, P.; MALFROOT, A.; TULKENS, P. M.; BAMBEKE, F. V. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. **Clinical Microbiology and Infection**, v.13, p. 560-578, 2007.

MILAN, P.; HAYASHI, A. H.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Comparative leaf morphology and anatomy of three Asteraceae species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, p. 135-144, 2006.

MILLER, J. S. The discovery of medicines from plants: a current biological perspective. **Economic Botany**, v. 65, p. 396-407, 2011.

MISEREZ, F.; POTTERAT, O.; MARSTON, A.; MUNGAI, G. M.; HOSTETTMANN, K. Flavonol glycosides from *Vernonia galamensis* ssp. *Nairobiensis*. **Phytochemistry**, v. 43, p. 283-286, 1996.

MORALES-ESCOBAR, L.; BRACA, A.; PIZZA, C.; TOMMASI, N. New phenolic derivatives from *Vernonia mapirensis* Gleason. **Arkivoc**, v. 7, p. 349-358, 2007.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

NADEMBEGA, P.; BOUSSIM, J. I.; NIKIEMA, J. B.; POLI, F.; ANTOGNONI, F. Medicinal plants in Baskoure, Kourittenga Province, Burkina Faso: an ethnobotanical study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 378-395, 2011.

NAKAJIMA, J. N.; SEMIR, J. Asteraceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, p. 471-478, 2001.

NEILSON, E. H.; GOODGER, J. Q. D.; WOODROW, I. E.; MØLLER, B. L. Plant chemical defense: at what cost? **Trends in Plant Science**, v. 18, p. 250-258, 2013.

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, p. 311-335, 2012.

NITHA, B.; REMASHREE, A. B.; BALACHANDRAN, I. Antibacterial activity of some selected Indian medicinal plants. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, p. 2038-2042, 2012.

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

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

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 301-307, 2008.

OTTER, J. A.; YEZLI, S.; FRENCH, G. L. The role played by contaminated surfaces in the transmission of nosocomial pathogens. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 32, p. 687-699, 2011.

OVERBYE, K. M.; BARRETT, J. F. Antibiotics: where did we go wrong? **Drug Discovery Today**, v. 10, p. 45-52, 2005.

PADOLINA, W. G.; YOSHIOKA, H.; NAKATANI, N.; MABRY, T. J.; MONTI, S. A.; DAVIS, R. E.; COX, P. J.; SIM, G. A.; WATSON, W. H.; WU, I. B. Glaucolide-A and -B, new germacranolide-type sesquiterpene lactones from *Vernonia* (Compositae). **Tetrahedron**, v. 30, p. 1161-1170, 1974.

PAN, S. Y.; LITSCHER, G.; GAO, S. H.; ZHOU, S. F.; YU, Z. L.; CHEN, H. Q.; ZHANG, S. F.; TANG, M. K.; SUN, J. N.; KO, K. M. Historical perspective of traditional indigenous medical practices: the current renaissance and conservation of herbal resources. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1-20, 2014.

PATWARDHAN, B.; VAIDYA, A. D. B. Natural products drug discovery: accelerating the clinical candidate development using reverse pharmacology approaches. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, p. 220-227, 2010.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**. Tradução da 4<sup>a</sup> edição norte-americana. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PELÁEZ, F. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products - Can history repeat? **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 981-990, 2006.

PETRI, R. D.; PLETSCH, M. U.; ZEIFERT, M.; SCHWEIGERT, I. D. Efeito de extratos hidroetanólicos de *Vernonia tweediana* e *Vernonia cognata* sobre imunidade de camundongos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, p. 139-141, 2008.

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

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

PINTO, F. A.; DIAS, C. R.; RAMOS, M.; ELLIOT, S. L. Interações simbióticas entre *Escherichia coli* e seres humanos: a instabilidade de uma relação. **Revista HCPA**, v. 31, p. 451-455, 2011.

POOLE, K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p.1-13, 2011.

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

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Rang and Dale Farmacologia**. Tradução da 6ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

RAUH, L. K. **Avaliação da atividade anti-inflamatória tópica da *Vernonia scorpioides* (Lam) Persons em modelos de inflamação cutânea em camundongos**. 2008. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

RIBEIRO, A. O.; SILVA, A. F.; CASTRO, A. H. F. Identificação de espécies da família Asteraceae, revisão sobre usos e triagem fitoquímica do gênero *Eremanthus* da Reserva Boqueirão, Ingaí-MG. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, p. 456-465, 2010.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 80-84, 2005.

RISHTON, G. M. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. **The American Journal of Cardiology**, v. 101, p. 43-49, 2008.

RODRIGUES, I. M. C.; SOUZA FILHO, A. P. S.; FERREIRA, F. A. Estudo fitoquímico de *Senna alata* por duas metodologias. **Planta Daninha**, v. 27, p. 507-513, 2009.

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

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

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

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

SARAVOLATZ, L. D.; PAWLAK, J.; JOHNSON, L. B. *In vitro* activity of oritavancin against community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA), vancomycin-intermediate *S. aureus* (VISA), vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA) and daptomycin-non-susceptible *S. aureus* (DNSSA). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, p. 69-72, 2010.

SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. I. **Natural products isolation**. 2. ed. Totowa: Humana Press, 2005.

SARKER, S. D.; NAHAR, L. An introduction to natural products isolation. In: **Natural products isolation**. Humana Press, 2012. p. 1-25.

SCHILMILLER, A. L.; LAST, R. L.; PICHERSKY, E. Harnessing plant trichome biochemistry for the production of useful compounds. **The Plant Journal**, v. 54, p. 702-711, 2008.

SCHORR, K.; GARCÍA-PIÑERES, A. J.; SIEDLE, B.; MERFORT, I.; DA COSTA, F. B. Guaianolides from *Viguiera gardneri* inhibit the transcription factor NF- $\kappa$ B. **Phytochemistry**, v. 60, p. 733-740, 2002.

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

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

SHER, A. Antimicrobial activity of natural products from medicinal plants. **Gomal Journal of Medical Sciences**, v. 7, p. 72-78, 2009.

SILVA, J. B. **Investigação do potencial químico e biológico de *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae)**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.

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

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

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

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

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 35-40, 2002.

SINGH, S. B.; BARRETT, J. F. Empirical antibacterial drug discovery - Foundation in natural products. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 1006-1015, 2006.

SMILJANIC, K. B. A. **Anatomia foliar de espécies de Asteraceae de um afloramento rochoso no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (MG)**. 2005. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

SOUSA, F. C. F.; MELO, C. T.; CITÓ, M. C.; FÉLIX, F. H. C.; VASCONCELOS, S. M.; FONTELES, M. M.; BARBOSA FILHO, J. M.; VIANA, G. S. B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 642-654, 2008.

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

SPANU, V.; SPANU, C.; VIRDIS, S.; COSSU, F.; SCARANO, C.; DE SANTIS, E. P. L. Virulence factors and genetic variability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw sheep's cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, p. 53-57, 2012.

STEVENS, P. F. (2001 onwards). Angiosperm Phylogeny Website. Version 12, July 2012 [and more or less continuously updated since]. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. Acesso em 16 jul. 2015.

STRATEVA, T.; YORDANOV, D. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 1133-1148, 2009.

SY, G. Y.; CISSÉ, A.; NONGONIERMA, R. B.; SARR, M.; MBODJI, N. A.; FAYE, B. Hypoglycaemic and antidiabetic activity of acetic extract of *Vernonia colorata* leaves in normoglycaemic and alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 171-175, 2005.

TAHARA, S. A journey of twenty-five years through the ecological biochemistry of flavonoids. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, p. 1387-1404, 2007.

TAPAS, A. R.; SAKARKAR, D. M.; KAKDE, R. B. Flavonoids as nutraceuticals: a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, p. 1089-1099, 2008.

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

TEMPONI, V. S.; SILVA, J. B.; ALVES, M. S.; RIBEIRO, A.; PINHO, J. J. R. G.; YAMAMOTO, C. H.; PINTO, M. A. O. P.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; SOUSA, O. V. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of ethanol extract from *Vernonia polyanthes* leaves in rodents. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 3887-3899, 2012.

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

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

TOYANG, N. J.; KRAUSE, M. A.; FAIRHURST, R. M.; TANE, P.; BRYANT, J.; VERPOORTE, R. Antiplasmodial activity of sesquiterpene lactones and a sucrose ester from *Vernonia guineensis* Benth. (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, p. 618-621, 2013a.

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

TOYANG, N. J.; WABO, H. K.; ATEH, E. N.; DAVIS, H.; TANE, P.; SONDEGAM, L. B.; BRYANT, J.; VERPOORTE, R. Cytotoxic sesquiterpene lactones from the leaves of *Vernonia guineensis* Benth. (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, p. 552-556, 2013b.

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

VAISHNAV, P.; DEMAIN, A. L. Unexpected applications of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 223-229, 2010.

VALGAS, C.; SOUZA, S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA JÚNIOR, A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 369-380, 2007.

VALKAMA, E.; SALMINEN, J. P.; KORICHEVA, J.; PIHLAJA, K. Comparative analysis of leaf trichome structure and composition of epicuticular flavonoids in Finnish birch species. **Annals of Botany**, v. 91, p. 643-655, 2003.

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

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

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, p. 390-400, 2003.

XU, R.; YE, Y.; ZHAO, W. **Introduction to natural products chemistry**. 1ed. Boca Raton: CRC Press, 2011.

WAGNER, G. J. Secreting glandular trichomes: more than just hairs. **Plant Physiology**, v. 96, p. 675-679, 1991.

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

WALSH, C. T.; WRIGHT, G. Introduction: antibiotic resistance. **Chemical Reviews**, v. 105, p. 391-393, 2005. Editorial.

WANG, W.; WANG, Y.; ZHANG, Q.; QI, Y.; GUO, D. Global characterization of *Artemisia annua* glandular trichome transcriptome using 454 pyrosequencing. **BMC Genomics**, v. 10, p. 1-10, 2009.

WATERS, D.; JAWAD, I.; AHMAD, A.; LUKŠIĆ, I.; NAIR, H.; ZGAGA, L.; THEODORATOU, E.; RUDAN I.; ZAIDI, A. K. M.; CAMPBELL, H. Aetiology of community-acquired neonatal sepsis in low- and middle- income countries. **Journal of Global Health**, v. 1, p. 154-170, 2011.

WILKINSON, J. M. Methods for testing the antimicrobial activity of extracts. In: AHMAD, I.; AQIL, F.; OWAIS, M. (Eds). **Modern phytomedicine: turning medicinal plants into drugs**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., 2006. p. 157-171.

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

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

WINK, M. Evolutionary advantage and molecular modes of action of multi-component mixtures used in phytomedicine. **Current Drug Metabolism**, v. 9, p. 996-1009, 2008.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Report for Research on Infectious Diseases of Poverty**. Geneva, 2012. 168 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Traditional Medicine Strategy: 2014-2023**. Hong Kong, 2013. 78 p.

YEAP, S. K.; HO, W. Y.; BEH, B. K.; LIANG, W. S.; KY, H.; YOUSR, A. H. N.; ALITHEEN, N. B. *Vernonia amygdalina*, an ethnoveterinary and ethnomedical used green vegetable with multiple bioactivities. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, p. 2787-2812, 2010.

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

ZAKERI, B.; LU, T. K. Synthetic biology of antimicrobial discovery. **ACS Synthetic Biology**, v. 2, p. 358-372, 2013.

ZANON, R. B.; PEREIRA, D. F.; BOSCHETTI, T. K.; SANTOS, M.; ATHAYDE, M. L. Fitoconstituintes isolados da fração em diclorometano das folhas de *Vernonia tweediana* Baker. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 226-229, 2008.

ZHOU, M.; LUO, H.; LI, Z.; WU, F.; HUANG, C.; DING, Z.; LI, R. Recent advances in screening of natural products for antimicrobial agents. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 15, p. 306-315, 2012.

ZUANAZZI, J. A. S.; MAYORGA, P. Fitoprodutos e desenvolvimento econômico. **Química Nova**, v. 33, p. 1421-1428, 2010.