

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DIRETORIA DE GRADUAÇÃO E EDUCAÇÃO PROFISSIONAL
COORDENAÇÃO DO CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS QUÍMICOS

ELIZABETH FIGUEIREDO PIRES

**POTENCIAL ANTIBACTERIANO E CITOTÓXICO DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA ASTERACEAE E SEUS
EFEITOS NA ASSOCIAÇÃO COM AMPICILINA**

TOLEDO, PR
2022

ELIZABETH FIGUEIREDO PIRES

**POTENCIAL ANTIBACTERIANO E CITOTÓXICO DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA ASTERACEAE E SEUS
EFEITOS NA ASSOCIAÇÃO COM AMPICILINA**

**ANTIBACTERIAL AND CYTOTOXIC POTENTIAL OF SPECIES OF THE ASTERACEAE FAMILY AND
ITS EFFECTS ON ASSOCIATION WITH AMPICILLIN**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos (COPEQ) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, câmpus Toledo, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tatiana Shioji Tiuman

TOLEDO, PR
2022



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

ELIZABETH FIGUEIREDO PIRES

POTENCIAL ANTIBACTERIANO E CITOTÓXICO DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA ASTERACEAE E SEUS EFEITOS NA ASSOCIAÇÃO COM AMPICILINA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do curso de Tecnologia em Processos Químicos da UTFPR, câmpus Toledo, como parte das exigências para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Aprovado em ____, de _____ de 20__.

Banca examinadora

Prof^a Dr^a Tatiana Shioji Tiuman
UTFPR, câmpus Toledo
Orientadora

Prof Dr Cleverson Busso
UTFPR, câmpus Toledo
Avaliador

Prof Dr^a Juliana Bernadi Wenzel
UFPR, câmpus Toledo
Avaliador

OBS: A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso de Tecnologia em Processos Químicos.

Resumo

A resistência a antimicrobianos coloca em risco a eficácia da prevenção e dos tratamentos de infecções. A associação de compostos naturais com atividade antimicrobiana a esses antibióticos é uma alternativa de aumentar o espectro de ação, visando diminuir danos adversos causados pelos compostos sintéticos. O objetivo deste trabalho foi determinar a atividade antibacteriana de extratos e frações de espécies vegetais da família Asteraceae e avaliar a associação com antibióticos. Em parceria com o Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá, foram obtidos extratos brutos e frações das plantas *Pterocaulon alopecuroides* (PA), *Stevia leptophylla* (SL), *Vernonanthura cuneifolia* (VC), *Vernonanthura discolor* (VD) e *Austroeupatorium inulaefolium* (AI), que foram testadas para quatro diferentes bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Salmonella*. na concentração de 10 mg/mL utilizando a metodologia de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por microdiluição e Concentração Bactericida Mínima (CBM) por subcultivo em ágar Mueller Hinton (MH). A CIM demonstrou potencial antibacteriano contra as bactérias gram-positivas. Posteriormente, os microrganismos foram submetidos ao teste de difusão em disco nas placas de ágar MH, utilizando ampicilina 10 µg isoladamente e o extrato + ampicilina (10 µL+10 µg). Os halos de inibição induzidos por fração acetato de etila de VC, SL e PA, extrato bruto de AI e fração hexano de PA apresentaram aumento significativo para *S. aureus* e *B. cereus*. O extrato bruto e fração acetato de etila de VC demonstraram sinergismo combinado com o antibiótico ampicilina no teste por “checkerboard”, caracterizado por seus isobogramas e um FICI de 0,025 e 0,200, respectivamente. Por fim foi realizado o teste de toxicidade para os extratos com *Artemia salina*, onde demonstraram letalidade de 100% na concentração de 2mg/mL, e o extrato de PA na fração diclorometano não demonstrou letalidade na concentração de 1mg/mL, se destacando dos demais que não apresentaram letalidade a partir de 0,5mg/mL. Desta forma, observou-se que espécies vegetais da família Asteraceae estudadas possuem atividade antibacteriana, destacando-se *P. alopecuroides*.

Palavras-chave: microdiluição; Asteraceae; checkerboard; combinação; sinergismo.

Abstract

Antimicrobial resistance jeopardizes the effectiveness of preventing and treating infections. The association of natural compounds with antimicrobial activity to these antibiotics is an alternative to increase the spectrum of action, aiming to reduce adverse damage caused by synthetic compounds. The objective of this work was to determine the antibacterial activity of extracts and fractions of plant species of the Asteraceae family and to evaluate the association with antibiotics. In partnership with the Chemistry Department of the State University of Maringá, crude extracts and fractions of the plants *Pterocaulon alopecuroides* (PA), *Stevia leptophylla* (SL), *Vernonanthura cuneifolia* (VC), *Vernonanthura discolor* (VD) and *Austro eupatorium inulaefolium* (AI) were obtained., which were tested for four different bacteria: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and *Salmonella*. at a concentration of 10 mg/mL using the methodology for determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by microdilution and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) by subculture in Mueller Hinton agar (MH). MIC demonstrated antibacterial potential against gram-positive bacteria. Subsequently, the microorganisms were submitted to the disk diffusion test on MH agar plates, using ampicillin 10 µg alone and the extract + ampicillin (10 µL+10 µg). The inhibition halos induced by the ethyl acetate fraction of VC, SL and PA, AI crude extract and hexane fraction of PA showed a significant increase for *S. aureus* and *B. cereus*. The crude extract and ethyl acetate fraction of VC demonstrated synergism combined with the antibiotic ampicillin in the checkerboard test, characterized by its isobolograms and a FICI of 0.025 and 0.200, respectively. Finally, the toxicity test was performed for the extracts with *Artemia salina*, where they demonstrated lethality of 100% at the concentration of 2mg/mL, and the extract of PA in the dichloromethane fraction did not demonstrate lethality at the concentration of 1mg/mL, standing out from the others that did not present lethality from 0.5mg/mL. Thus, it was observed that plant species of the Asteraceae family studied have antibacterial activity, with emphasis on *P. alopecuroides*.

Keywords: microdilution; Asteraceae; checkboard; combination; synergism.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	8
2.	OBJETIVOS	10
2.1.	Objetivo geral	10
2.2.	Objetivos específicos	10
3.	JUSTIFICATIVA	11
4.	REVISÃO DE LITERATURA	12
4.1.	Família Asteraceae	13
4.2.	Gêneros e espécies referentes a pesquisa	14
4.2.1.	<i>Austroeupatorium inulaefolium</i>	15
4.2.2.	<i>Pterocaulon alopecuroides</i>	16
4.2.3.	<i>Stevia leptophylla</i>	17
4.2.4.	<i>Vernonanthura cunefolia</i>	18
4.2.5.	<i>Vernonanthura discolor</i>	18
4.3.	Plantas como fonte de substâncias bioativas	19
4.4.	Atividade antibacteriana de espécies vegetais	20
4.5.	Bactérias	23
4.6.	Associação de extratos naturais	26
4.8.	Ensaio de toxicidade com <i>Artemia salina</i>	27
5.	MATERIAL E MÉTODOS	29
5.1.	Obtenção dos extratos e frações das plantas	29
5.2.	Preparo dos extratos e frações	30
5.3.	Soluções dos extratos e frações das plantas para avaliação da atividade antibacteriana	30
5.4.	Preparo dos inóculos	30

5.5. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM).....	31
5.5.1. Teste CIM.....	31
5.5.2. Teste CBM.....	31
5.6. Controle do CIM e CBM.....	32
5.7. Teste de difusão em ágar para testar as combinações.....	32
5.8. "Checkerboard".....	33
5.9. Teste de toxicidade com <i>Artemia salina</i>	34
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
7. CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS.....	43

1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos são as formas de vida mais abundantes na terra, e alguns deles são potencialmente patogênicos. Plantas e animais evoluíram sistemas de defesa para combater o ataque constante de microrganismos. Sendo assim, plantas possuem a habilidade de sintetizar seus compostos. Os metabólitos secundários são uma fonte de compostos bioativos, e a busca por novos produtos derivados de plantas desperta o interesse científico por eles. Extratos com atividade antibacteriana estabelecida é uma estratégia que tem muito valor, não só para a comunidade acadêmica, como para a saúde da população (MOTA, 2018).

A atividade antimicrobiana de extratos de plantas se dá por seu sistema de defesa contra microrganismos, insetos e herbívoros, assim como estresses físicos como luz ultravioleta e calor. E aos outros compostos que dão à planta odor, coloração ou sabor (ENDO,2007). Neste contexto, sabe-se que flavonoides da família Asteraceae têm apresentado atividade farmacológica em diversas pesquisas. Asteraceae é a maior família de plantas com flores, compreendendo cerca de 1100 gêneros e mais de 20.000 espécies, sendo que algumas destas, como a camomila (*Matricaria recutita L.*), foram relatadas anteriormente como tendo aplicações medicinais (MOURA, 2021).

O Brasil possui uma biodiversidade excepcional, com uma das floras mais ricas do mundo, atraindo países de primeiro mundo na busca e utilização dos recursos brasileiros na criação de produtos de alto valor. O país detém cerca de 20% da biodiversidade mundial, com mais de 200 mil espécies de plantas, animais e microrganismos já identificados, podendo chegar a 1,8 milhão de espécies (MALVEZZI, 2010). É de suma importância o conhecimento de aplicações desses recursos que a diversidade biológica brasileira apresenta, para que o país possa se tornar referência em fazer bom uso de seus recursos naturais.

Uma das dificuldades na utilização de plantas com atividade antimicrobiana pode estar relacionada com a quantidade de cada princípio ativo presente nos extratos, o uso de técnicas e procedimentos diferentes para extração, bem como a época do ano em que o material vegetal foi coletado (FERNANDES, 2011). Assim, é necessário que os extratos de

plantas com atividade antimicrobiana sejam bem descritos, incluindo: fonte e época de coleta do material vegetal, forma de processamento, concentrações adequadas de uso, para que a procura do antimicrobiano ideal, ou seja, aquele que apresenta maior espectro de ação, menor toxicidade, menor custo e menor índice de resistência bacteriana, seja mais rápida e eficaz.

Neste mesmo contexto, importante levar em consideração as associações terapêuticas para tratamento de diversos tipos de doenças, por meio do uso de diferentes compostos naturais associados a antibióticos sintéticos que podem ser eficazes no tratamento de processos infecciosos, visando maior eficácia e menor toxicidade.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar o potencial antibacteriano e citotóxico de extratos e frações de espécies vegetais da família Asteraceae e avaliar os seus efeitos na associação dos extratos com um antibiótico.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a atividade antibacteriana das plantas por meio da concentração inibitória mínima dos extratos e frações.
- ✓ Considerar os melhores resultados, e realizar o ensaio de difusão para testar combinações das plantas com a ampicilina.
- ✓ Para os extratos com atividade sinérgica, realizar o método "checkerboard", para testar concentrações distintas de ampicilina e extrato.
- ✓ Avaliar a citotoxicidade dos extratos com melhor atividade com *Artemia salina*.

3. JUSTIFICATIVA

A família Asteraceae possui várias espécies utilizadas na medicina popular, tornando importante verificar o potencial terapêutico de algumas delas, pois existem diferenças nos achados antimicrobianos descritos na literatura sobre extratos de plantas. Este fato pode estar relacionado com a quantidade e diversidade de cada princípio ativo presente nos extratos (FERNANDES et al., 2011). Popularmente, estes materiais vegetais têm sido chamados de “plantas bioativas”. Esta expressão foi criada para denominar todas as plantas que têm algum tipo de ação sobre outros seres vivos (BERNADI, 2016).

Substâncias de origem natural atuam de forma sinérgica com fármacos utilizados clinicamente, permitindo a redução das doses necessárias para produzir o efeito desejado e, conseqüentemente, minimizar os efeitos adversos (CASANOVA; COSTA, 2017). O termo “sinergismo” indica que extratos de plantas possuem compostos que interagem entre si potencializando um efeito (WILLIAMSON, 2001). As plantas bioativas ou seus subprodutos podem inibir, intensificar ou mesmo não interferir no efeito terapêutico dos medicamentos convencionais.

E ainda, o interesse pela descoberta de extratos vegetais com diferentes atividades biológicas, tem crescido muito nos últimos anos. As informações de diversos meios levadas a população sobre a importância da escolha adequada de alimentos para o cuidado da saúde, e o aumento da procura por alimentos com menos conservantes sintéticos e maior tempo de duração, incentiva a busca por antimicrobianos (conservantes) de origem natural que possam ser utilizados nos alimentos de forma individual ou combinados com outra tecnologia (BARROS, et al., 2020).

Os produtos naturais, especialmente os de origem microbiana e de espécies vegetais são considerados fontes importantes para o desenvolvimento de novos antimicrobianos (ALVES, 2014). Assim, é de extrema importância investigar a existência de interações na utilização conjunta de plantas no tratamento de infecções e de interações entre plantas e antibióticos sintéticos avaliando o que essas interações podem oferecer, estimulando a realização de pesquisas visando novas fontes para o desenvolvimento de fármacos antimicrobianos.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Família Asteraceae

Asteraceae está entre as maiores famílias de plantas e contém cerca de 1.600 gêneros e 23.000 espécies. No Brasil, aproximadamente, 1600 gêneros e 1.900 espécies, são distribuídas em diferentes formações vegetacionais. Vista como a família de maior importância entre as fanerógamas, e representando dez por cento do total da flora de angiospermas, encontradas e disseminadas por todos os continentes, com exceção da Antártica, porém com representação mais ampla nas regiões temperadas e semiáridas dos trópicos e subtropicais (BESSADA; BARREIRA; OLIVEIRA, 2015; KOC et al., 2015).

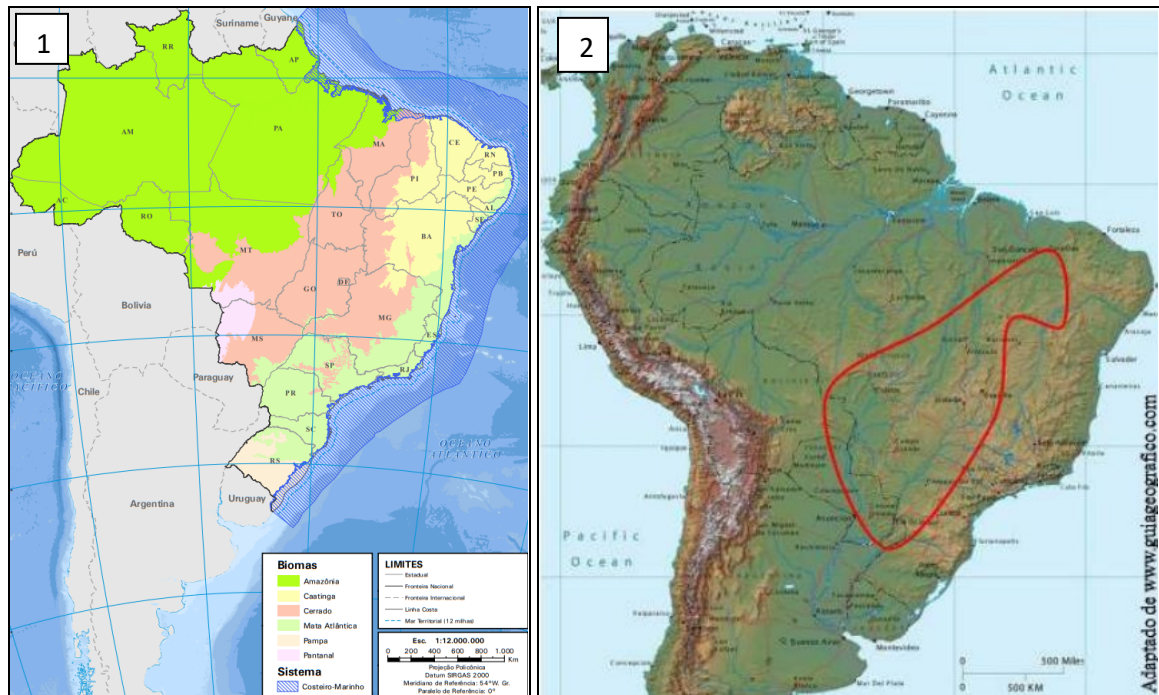
Diversos estudos sobre padrões biogeográficos de distribuição da flora relatam que a família está entre as dez mais frequentes na cobertura arbustivo-herbácea do Brasil extra-amazônico (ROQUE e BAUTISTA, 2008). Devido ao grande número de espécies e adaptações a diferentes ambientes, elas também desempenham um papel proeminente na estrutura, composição e funcionamento de comunidades e ecossistemas facilitando o estabelecimento de outras espécies ao promover a maturação dos solos.

Na flora brasileira, em particular, as Asteraceae encontram sua maior representatividade nos estados de Minas Gerais, Goiás e Bahia, onde se localizam exatamente as áreas da ocorrência da cobertura vegetal do tipo campo rupestre, campos gerais e outras formas de cerrado, cobrindo uma parte considerável do mapa de biomas do Brasil, observado na Figura 1. Nesses estados, as Asteraceae podem chegar a incluir-se entre as cinco famílias mais frequentes nos levantamentos de flora já realizados (PEREIRA et al., 2019).

No Cerrado, Asteraceae está entre as famílias com maior riqueza de espécies em diversos levantamentos florísticos, a família possui mecanismos muito eficientes para realizar dispersão anemocrática (dispersão pelo vento) ou zoocora (dispersão por animais), apresentam estratégias de reprodução sexuada e assexuada, possuem alta capacidade adaptativa e são altamente favorecidas em eventos de sucessão ecológica (PEREIRA et al., 2019). Estas são algumas características fundamentais para o sucesso da preservação da família em todo o mundo, permitindo-lhe alcançar uma importante e vasta cobertura

vegetal, aumentando o conteúdo de matéria orgânica no meio ambiente e ajudando na retenção e estabilidade dos solos.

Figura 1- (1) Mapa de biomas do Brasil, onde a região rosa representa o bioma cerrado. (2) Mapa com a distribuição geográfica das espécies da família Asteraceae da Estação Ecológica do Panga, Uberlândia, Minas Gerais com distribuição predominantemente nas regiões Sudeste e Sul do Brasil.



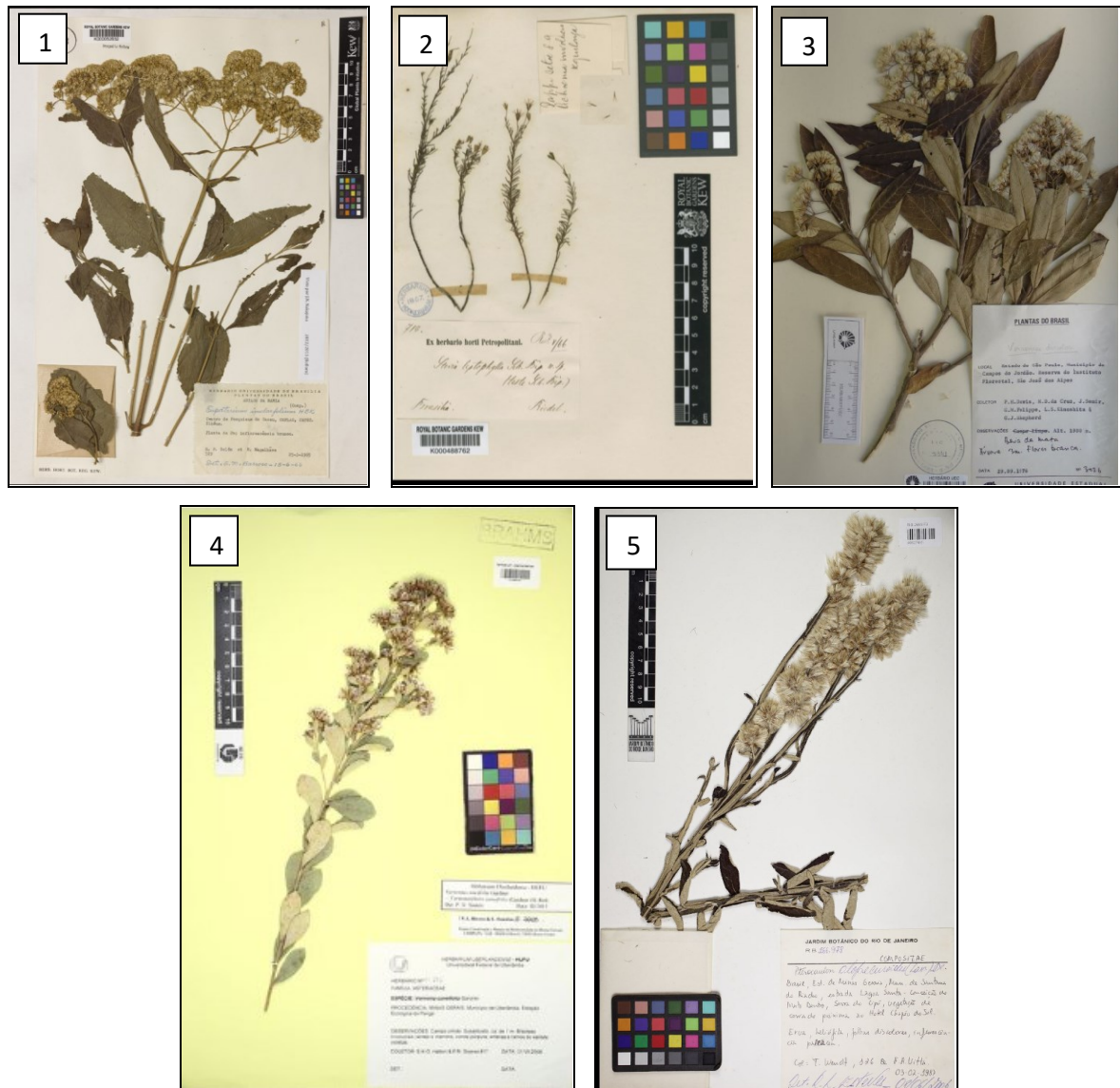
Fonte: IBGE, 2022.

Seu sucesso evolutivo pode ser atribuído em parte ao desenvolvimento de um sistema químico de defesa que inclui a produção combinada de compostos secundários, do tipo poliacetilenos e lactonas sesquiterpênicas. A família Asteraceae é conhecida pelas propriedades terapêuticas, cosméticas e aromáticas. Já é relatado na literatura o uso medicinal dessa família como anti-helmíntico, anti-inflamatório, adstringente, colestérico, antihemorrágico, antimicrobiano, diurético, analgésico e antiespasmódico (ROQUE e BAUTISTA, 2008).

4.2 Gêneros e Espécies referentes a pesquisa

Na Figura 2, pode-se observar as espécies da família Asteraceae que foram utilizadas no trabalho.

Figura 2 – Espécies da família Asteraceae testadas no trabalho.



*1- *Austro eupatorium inulaefolium*; 2- *Stevia leptophylla*; 3- *Vernonanthur a discolor*; 4- *Vernonanthur a cuneifolia*; 5- *Pterocaulon alopecuroides*.

Fonte: Flora e Funga do Brasil (2022).

4.2.1 *Austro eupatorium inulaefolium*

Austro eupatorium inulaefolium é uma erva daninha ambiental nativa da América do Sul. Espécies de plantas neste gênero também tem sido utilizada por muitas décadas na medicina popular como antibacteriano, e agentes antifúngicos. Uma série de bioativos, principalmente lactonas e sesquiterpênicos, foram relatados no extrato dessa espécie *Austro eupatorium* (Bua et al., 2017).

Austroeupatorium inulaefolium é um arbusto perene, desta espécie, suas partes aéreas são tradicionalmente utilizadas. Pelos estudos etno farmacológicos realizados, constatou-se que esta planta é utilizada em alguns municípios do departamento de Caldas na Colômbia para o tratamento de doenças da garganta. Também é utilizado como inseticida no controle de ectoparasitas (carrapatos e piolhos) em animais, principalmente em bovinos, na zona rural do departamento de Cauca (Colômbia), a planta é utilizada como repelente de insetos, onde o chão dos quartos é coberto com folhagem para "repelir pulgas". No Brasil a espécie é usada para aliviar a inflamação ocular. Também é usado como anticoncepcional e abortivo (CÁRDENAS et al., 2013).

Extratos e óleos essenciais obtidos da espécie têm mostrado sua atividade inseticida e antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, incluindo na sua composição compostos semelhantes a flavonoides dessas espécies do gênero *Eupatorium* (LUCENA et al., 2019). Outros relatos indicam a presença de flavonas como 5,6,3'-trihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona e pedalitina nas espécies.

Pode-se concluir que essa planta pode ter efeitos antimicrobianos sobre bactérias, vírus e parasitas, além de sua atividade moduladora da inflamação, o que ajudaria sua utilidade em processos inflamatórios. Da mesma forma, sua atividade inseticida.

4.2.2 *Pterocaulon alopecuroides*

No estado do Rio Grande do Sul a espécie foi coletada e observada em todas as regiões fisiográficas, habitando, preferencialmente, campos sujos ou vassourais. Conforme observações de campo e em material herborizado, a espécie é bastante variável em seu padrão de ramificação e na densidade das espigas, porém facilmente reconhecida por suas folhas largas, obovais ou elípticas (LIMA e MATZENBACHER, 2008).

Vários países vêm estudando suas fontes bioativas, seus metabólitos comuns incluem flavonóides e cumarinas. Plantas do gênero *Pterocaulon* são usadas na medicina tradicional em diferentes zonas do mundo com atividades antibióticas, antivirais, citotóxicas e antifúngicas, as partes aéreas de *Pterocaulon alopecuroides* em estudos, foi relatado que o isolamento e elucidação estrutural de três novos flavonoides, bem como a atividade antibacteriana e compostos isolados conhecidos (MEDEIROS-NEVES, 2018).

4.2.3 *Stevia leptophylla*

S. leptophylla é uma erva nativa do Brasil, todavia não é endêmica, sendo confirmada sua presença no sul do estado do Paraná. É descrito como um arbusto baixo perene com raízes extensas, caules quebradiços e folhas pequenas e elípticas. Sob algumas condições ambientais e situações de gestão, comporta-se como anual ou uma mistura de plantas de ambos os tipos (CNCFLORA, 2012).

Um estudo fitoquímico de *Stevia leptophylla* levou ao isolamento de uma substância pertencente à classe dos guaianolídeos, comumente encontrados em espécies do gênero *Stevia*. As frações de acetato de etila, butanólica e hidrometanólica apresentaram em estudos atividade antioxidante e baixa toxicidade, sendo que estas foram selecionadas para avaliação em ensaios antivirais. Vários produtos naturais foram isolados de *S. rebaudiana*, outra espécie do mesmo gênero, sendo os mais conhecidos os esteviol e seus glicosídeos, esteviosídeo, rebaudiosídeo A e B, esteviolbiosídeo, diidroisosteviol, rubusosídeo e dulcosídeo A. Nutrientes em *Stevia* incluem água (80-85%), proteína, fibra, monossacarídeos, lipídios, óleos essenciais, vitamina C, b-caroteno, vitamina B2, vitamina B1. Inclui compostos antioxidantes como apigenina, quercetina, isoquercitrina, luteolina, mioceno, caempferol, ácido clorogênico e ácido caféico. Além disso, inclui minerais como cobalto, magnésio, ferro, potássio e fósforo (RUIZ-RUIZ et al., 2015).

Stevia tem sido usada para vários fins em todo o mundo; as tribos Guarani usavam *S. rebaudiana*, como adoçante em infusões de ervas. O Japão foi o primeiro país da Ásia a comercializar glicosídeos de esteviol na indústria de alimentos e medicamentos. Desde então, o cultivo se expandiu para a China, Malásia, Cingapura, Coreia do Sul, Taiwan e Tailândia (BERNADI; et al., 2016).

Os glicosídeos de esteviol também têm sido usados para substituir a sacarose, para o tratamento de diabetes mellitus, obesidade, hipertensão e cárie. Estudos têm sugerido que glicosídeos de esteviol exibem benefícios terapêuticos com anti-hiperglicêmico, anti-hipertensivo, anti-inflamatório, efeitos antitumorais, antidiarreicos, diuréticos e imunomoduladores. As folhas de *Stevia* têm propriedades funcionais e sensoriais superiores às de muitos outros adoçantes (FREDERICO et al., 1996).

4.2.4 *Vernonanthura cuneifolia*

Vernonanthura cuneifolia é uma espécie de ocorrência no Paraguai e no Brasil, nos estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e no Distrito Federal. *V. cuneifolia* pode ser reconhecida pela folha em forma de cunha (SOSA et al., 2019).

A literatura contempla poucos estudos químicos sobre a espécie *V. cuneifolia*, porém, produtos naturais de *V. nebularum*, uma espécie de mesmo gênero pode desempenhar um papel importante na defesa de insetos, principalmente quando aplicados em mistura, sugerindo que um efeito sinérgico estaria envolvido nos resultados observados. Porém, mais estudos são necessários para encontrar a concentração mais eficaz para melhorar essa atividade (PORTILLO et al., 2005).

O extrato etanólico de *V. nudiflora*, outra espécie, apresentou potente atividade antiproliferativa contra linhagens tumorais de leucemia, evidenciando potencial terapêutico promissor. Investigação fitoquímica prévia desta espécie revelou a presença de triterpenos, esteróides, flavonóides e principalmente lactonas sesquiterpênicas das classes glaucolídeo, hirsutinolídeo e cadinanolídeo. As lactonas sesquiterpênicas ainda são uma classe importante de metabólitos secundários, fornecendo novas pistas terapêuticas, principalmente para o desenvolvimento de agentes anti-inflamatórios e anticâncer (RAMOS et al., 2019).

4.2.5 *Vernonanthura discolor*

A espécie floresce de setembro a novembro. As sementes são dispersas logo a seguir, quando as flores adquirem um tom marrom sendo uma espécie nativa da floresta mista e é típica de vegetação secundária, comum em clareiras e florestas jovens. É uma planta pioneira, de rápido crescimento e tolerante a baixas temperaturas, considerada uma opção de plantios mistos em áreas de preservação permanente para preparar o meio ambiente para o desenvolvimento das espécies climáticas (GRZYBOWSKI et al., 2019).

Seu nome popular é vassourão preto. Até o momento, estudos fitoquímicos relacionados a espécie são mais difíceis de se encontrar (ADENESKY-FILHO et al., 2017).

4.3 Plantas como fonte de substâncias bioativas

O homem utiliza os recursos da natureza para proporcionar o seu bem-estar e aumentar sua qualidade de vida (LUNA, 2006). As plantas são fontes de medicamentos para o tratamento de inúmeras enfermidades para os humanos a milhões de anos, o conhecimento sobre plantas bioativas simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos, Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas bioativas são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais.

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos. Dessa forma, usuários de plantas bioativas de todo o mundo, mantêm em prática o consumo de fitoterápicos, tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos. De maneira indireta, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial (MACIEL et al., 2002).

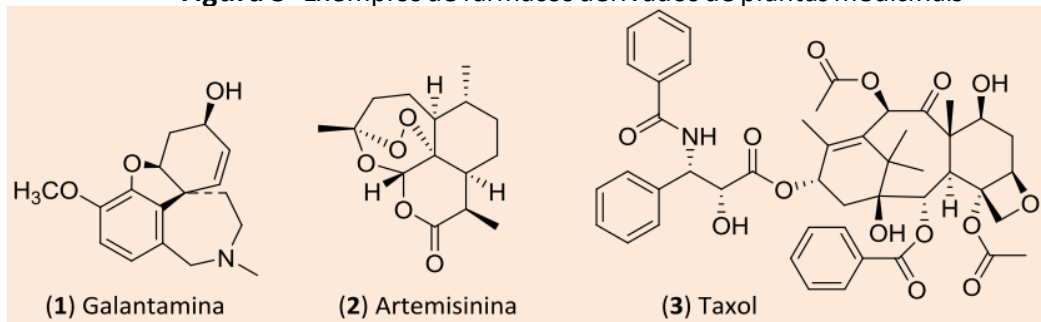
Em termos acadêmicos científicos, as plantas têm sido chamadas de “Plantas bioativas”. Esta expressão foi criada para denominar todas as plantas que tem algum tipo de ação sobre outros seres vivos, e que este efeito pode apresentar-se tanto pela sua presença em um ambiente, quanto pelo uso direto de substâncias delas extraídas (BERNADI, 2016).

Embora existam inúmeras estratégias e metodologias disponíveis para que se possa sintetizar e descobrir novos fármacos, a química de produtos naturais representa uma dessas alternativas de sucesso, historicamente privilegiada. Plantas são fontes importantes de substâncias biologicamente ativas, sendo que a maioria dos fármacos em uso clínico ou são de origem natural ou foram desenvolvidas por síntese química planejada a partir de produtos naturais (BARREIRO e BOLZANI, 2009). São inúmeros os exemplos de medicamentos que foram desenvolvidos, direta ou indiretamente de fontes naturais, especialmente de plantas, a morfina (LUNA, 2006), conhecida mundialmente, é derivada de ópio, substância extraída da Papoula, que é uma flor da família das Papaveraceae, abundante

no hemisfério norte, entre outras como: pilocarpina, digitálicos, curares, quinina, artemisina, atropina, escopolamina e o crimolin.

Estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos sintéticos disponíveis, 25% são cópias das estruturas de plantas bioativas. Exemplos mais recentes de fármacos de origem vegetal incluem a galantamina (1), a artemisinina (2) e o taxol (3), utilizados no tratamento de doença de Alzheimer, malária e câncer, respectivamente (Figura 3). A maioria da vegetação do nosso planeta ainda é desconhecida sob o ponto de vista científico, onde entre 250 - 500 mil espécies estimadas, somente cerca de 5% foram estudadas, desta forma as plantas constituem ainda uma fonte importante para a descoberta de novas substâncias biologicamente ativas (LUNA, 2006).

Figura 3- Exemplos de fármacos derivados de plantas medicinais



Fonte: CASANOVA, 2017.

4.4 Atividade antibacteriana de espécies vegetais

As plantas sintetizam uma enorme variedade de metabólitos que são geralmente classificados em dois grupos de acordo com as suas funções. Os metabólitos primários que são essenciais ao crescimento e desenvolvimento da planta, e os metabólitos secundários que são extremamente diversos e variáveis, desempenhando o papel de garantir a sobrevivência da planta em seu habitat natural (MIRANDA et al., 2013).

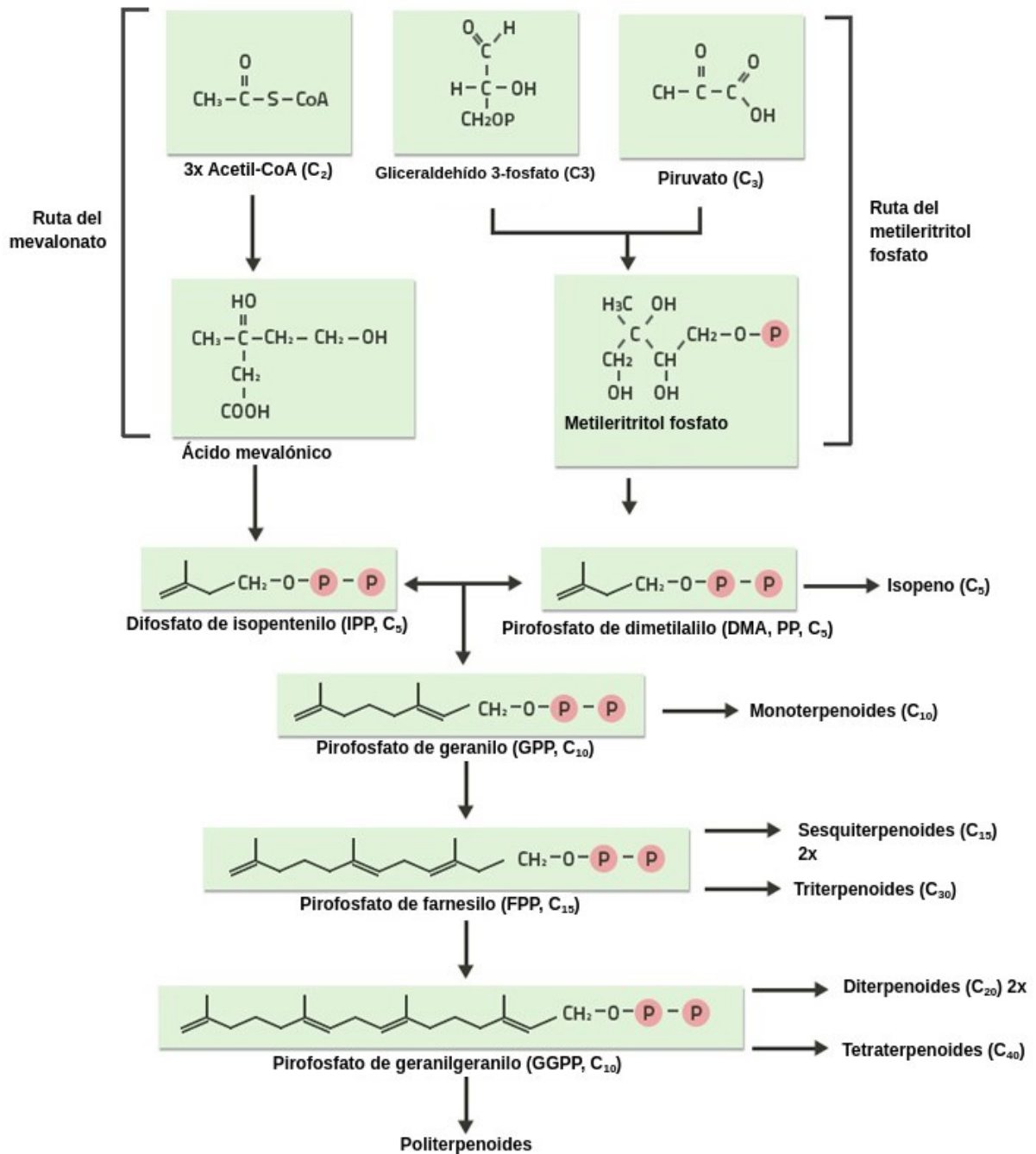
Espécies vegetais tem suas propriedades antibacterianas investigadas, contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, permitindo detectar seu potencial farmacológico, esses estudos são de grande importância devido ao crescente problema de resistência de bactérias aos antimicrobianos em uso no terapêutico. As plantas contêm inúmeros constituintes e seus extratos, quando testados podem apresentar efeitos sinérgicos entre os

diferentes princípios ativos devido a presença de compostos de classes ou estruturas diferentes contribuindo para a mesma atividade.

Na literatura, trabalhos estudam que para a atividade antibacteriana de extratos vegetais é importante a seleção de bioensaios para a detecção do efeito específico. Foram verificados que os extratos etanólicos apresentam maior atividade e um espectro muito mais amplo de ação em relação aos extratos aquosos (MACIEL et al., 2002)

Dentre as substâncias do metabolismo secundário relacionados à defesa química, estão os alcaloides, saponinas, flavanoides e os terpenos que são chamados de inseticidas naturais e esta classe integra os limonoides, limoneno e o mirceno, os quais desempenham um papel de proteção as plantas contra os insetos. Os terpenos são formados por unidades básicas de pirofosfato de isopentenila ou isopreno ativo, originando os triterpenos e os sesquiterpenos. Através da formação de pirofosfato de geranyl geral, componente básico da clorofila, por isso é uma molécula essencial de todas as espécies de plantas, esquematizado na Figura 4. Já foram citados na literatura como substâncias dotadas de ações bactericidas (MIRANDA et al., 2013).

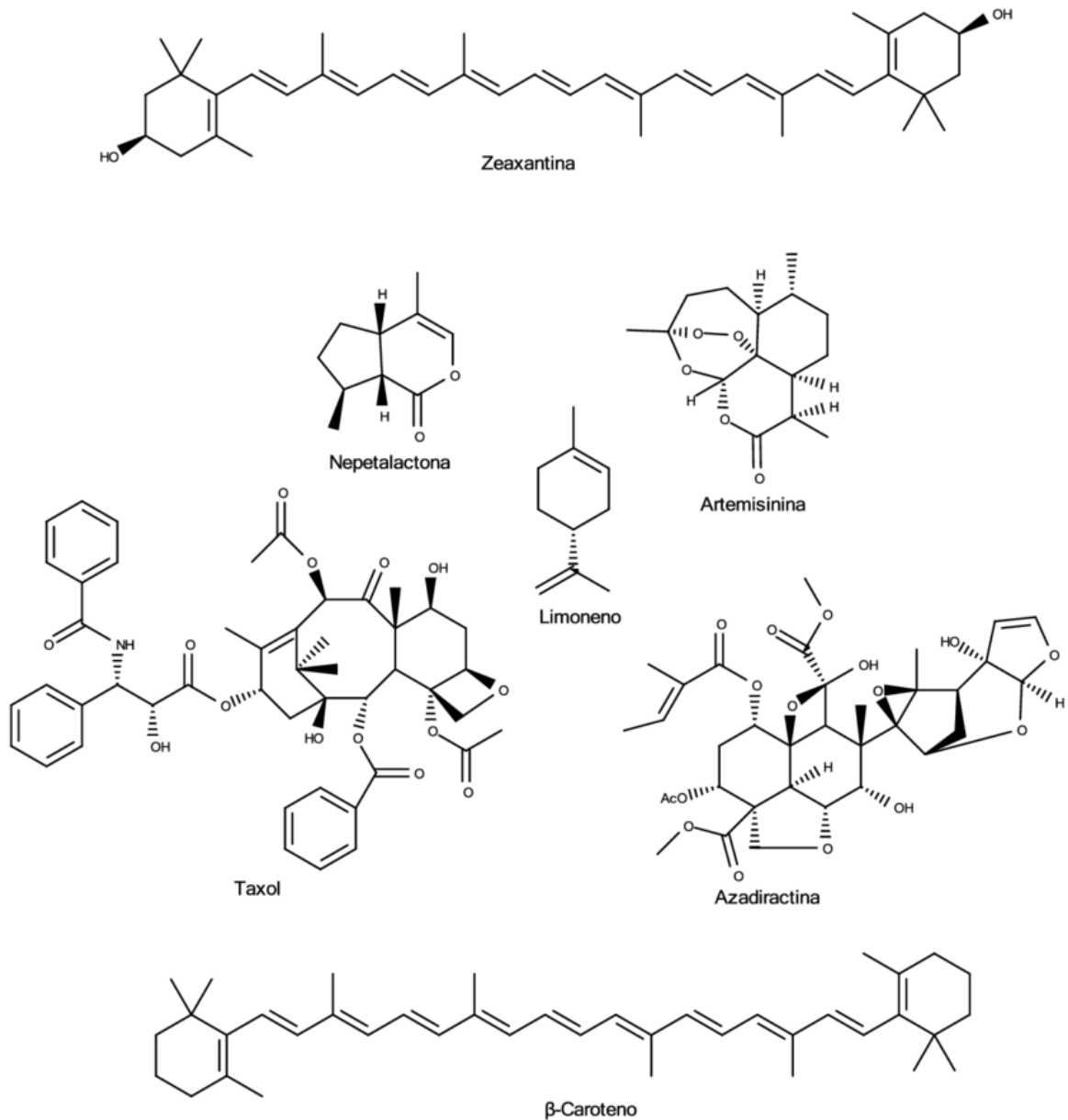
Figura 4- Biosíntese de terpenoides.



Fonte: Labster Theory, 2021.

Tem sido demonstrado que os terpenos são ativos contra diversos microrganismos e seu mecanismo de ação provável envolve a ruptura da membrana celular por compostos lipofílicos, na Figura 5 é possível observar os terpenoides produzidos pelos metabólitos secundários das plantas.

Figura 5 – Terpenoides produzidos pelo metabolismo secundário das plantas.

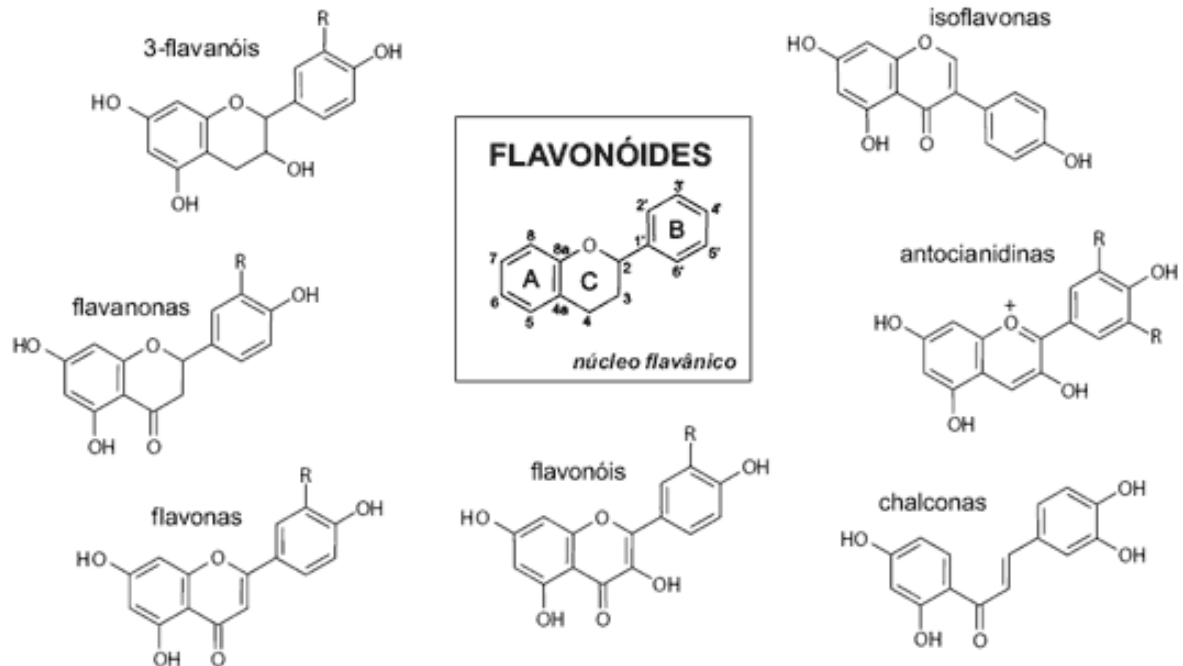


Fonte: Research gate, 2016.

Além disso os compostos fenólicos, sendo os flavonoides e taninos também se encontram classificados como um grande grupo de pigmentos vegetais de ampla distribuição na natureza que protegem as plantas contra infecções bacterianas.

A habilidade dos flavonoides em formar complexos com proteínas solúveis extracelulares e com a parede celular e o caráter lipofílico pode ser responsável pela ruptura da membrana celular dos microrganismos, assim como os terpenos, na Figura 6 as estruturas químicas dos flavonoides mostram o conjunto de estruturas que ele pode formar.

Figura 6 – Estrutura química dos flavonoides.



Fonte: Revista de nutrição Scielo, 2012.

No entanto, tal evidência deve ser objeto de novas pesquisas que possam verificar se a atividade das plantas depende de um único princípio ativo ou do conjunto de várias substâncias, podendo ser justificado uma ação sinérgica entre os metabólitos encontrados (MACIEL et al., 2002).

4.5 Bactérias

A bactéria *Staphylococcus aureus* foi uma das primeiras a ser monitorada nos estudos com a descoberta dos antibióticos, porém, em consequência da sua enorme capacidade de adaptação e resistência, é uma das espécies de grande importância no quadro das infecções hospitalares e comunitárias (SANTOS et al., 2008). Como membro da família dos cocos gram-positivos e componente da microbiota humana, o *S. aureus* pode causar uma variedade de doenças, das mais leves (como furúnculos e espinhas) às mais graves (como meningite, choque tóxico, e septicemia) (SANTOS et al., 2008).

Esse microrganismo pode ser encontrado no ambiente de circulação dos seres humanos, estando presente em diversas partes do corpo. Caso as barreiras naturais, isto é, pele e mucosas, estejam comprometidas por trauma ou cirurgia, o *S. aureus* pode se alojar no tecido e provocar uma lesão local (SANTANA, 2006). *Staphylococcus* são capazes de

produzir infecções alimentares devido à produção de exotoxinas durante o crescimento em alimentos contaminados (HENNEKINNE et al., 2012). Na identificação de uma intoxicação alimentar por estafilococos, é confirmado pela identificação de contagens superior a 10^5 UFC g^{-1} de *S. aureus*, a partir de restos de alimentos ou pela detecção de EE (enterotoxinas estafilocócicas) remanescentes nos alimentos (SANTANA, 2006).

Bacillus cereus é uma importante espécie bacteriana, pertence ao gênero *Bacillus* identificado como grandes bastonetes Gram-positivos, anaeróbios facultativos, móveis, fortemente beta-hemolíticos, possuem a capacidade de formar esporos em circunstâncias desfavoráveis e amplamente distribuídos na natureza (MOSTAFA et al., 2022). É encontrado no solo e em vários alimentos, causa sintomas de intoxicação alimentar em humanos e tem um grande nível de contaminação de produtos cárneos e lácteos. A contaminação por *B. cereus* depende da produção de várias enzimas exógenas como hemolisinas, fosfolipases, proteases e da capacidade de formar biofilmes, além da presença de genes codificadores de toxinas que desempenham um papel importante na sua patogenicidade (MOSTAFA et al., 2022).

Inúmeras toxinas produzidas por *B. cereus* causam problemas de saúde aos consumidores em decorrência de sua capacidade de estragar os alimentos e causar doenças (OWUSU-KWARTENG et al., 2017), essas enterotoxinas agem no epitélio, células do intestino delgado danificando sua membrana plasmática e causa diarreia como resultado dessas proteínas destrutivas dos tecidos. Dores abdominais e diarreia são sintomas de intoxicação alimentar por *B. cereus* que aparecem entre 8 e 16 horas após o consumo de alimentos contaminados e desaparecem geralmente dentro de 12 a 24 horas.

Por outro lado, foram definidos casos mais graves com necessidade de internação; endocardite; meningite, além de casos fatais (LOGAN, 2006). Os surtos alimentares de *B. cereus* são geralmente benignos e resolvidos naturalmente, porém, pode causar hospitalização de pessoas imunossuprimidas ou até mesmo a morte (MOSTAFA et al., 2022).

Escherichia coli é a espécie tipo do gênero *Escherichia*, que contém principalmente bacilos gram-negativos móveis dentro da família Enterobacteriaceae e da tribo Escherichia, é uma bactéria anaeróbica facultativa predominante da flora humana (NATARO e KAPER,

1998). O organismo é tipicamente colonizado no trato gastrointestinal infantil dentro de algumas horas de vida e, posteriormente, *E. coli* e o hospedeiro obtêm benefícios mútuos.

Geralmente permanece inofensivamente no intestino, no entanto, o hospedeiro debilitado ou imunossuprimido, ou quando as barreiras gastrointestinais são violadas, mesmo cepas normais de *E. coli*, isso quer dizer não patogênicas; podem causar infecção (DRASAR et al., 1974).

E. coli que causam infecção intestinal em homens e animais, sendo denominadas de *E. coli* diarreiogênicas que são diferenciadas pela presença de fatores de virulência como adesinas fimbriais e afimbriais, toxinas e invasinas, e classificadas em: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) ou *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* aderente difusa (DAEC).

Investigações sobre epidemias têm implicado alimentos e água contaminados como os veículos mais comuns para a infecção por *E. coli*. Isso não é inesperado, assim, a contaminação fecal de fontes de água e alimentos é a principal razão para a alta incidência de infecção por *E. coli* em todo o mundo em desenvolvimento (NATARO e KAPER, 1998).

Salmonella emergiu como um grande problema avícola e de saúde pública no Brasil a partir de 1993, O sucesso da avicultura brasileira nas cadeias agroalimentares tem alguns efeitos negativos à saúde, como: o uso de ovos de matrizes com *Salmonella*, ovos de cama sujos ou ovos com casca de má qualidade e impróprios para eclosão; aumento do uso de antibióticos para tratar a infecção por *Salmonella* em aves em todas as fases de produção, desde pintos de incubação até frangos de corte, a fim de reduzir as perdas e ocultar a infecção (SILVA e DUARTE, 2002).

Transmitida ao homem através de alimentos crus de origem animal, *Salmonella* é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa, não fermentadora de lactose, pertencente à família das *Enterobacteriaceae* (AFSHARI, 2018). Encontra-se amplamente distribuída no ambiente, mas o trato intestinal dos animais é o principal habitat da bactéria.

A contaminação por *Salmonella* ocorre através do consumo de alimentos contaminados como ovo, leite e carne de aves. A multirresistência por *Salmonella* é

conhecida como um grande problema de saúde pública em todo o mundo e há um aumento do uso de antibióticos em ambientes humanos e animais (AFSHARI, 2018).

4.5 Associação de extratos naturais

Estudos vêm sendo desenvolvidos e direcionados à descoberta de novos agentes antimicrobianos provenientes de extratos vegetais e outros produtos naturais, na tentativa de descobrir compostos com atividade comparada à dos tradicionalmente utilizados, porém, com menor toxicidade, mais eficazes contra a resistência de micro-organismos patogênicos e sem comprometer a ação antibacteriana (ENDO, 2007).

Essas interações são descritas como aditivas, indiferentes, antagônicas ou sinérgicas, que representa respectivamente quando a combinação é igual à soma dos resultados de cada substância separadamente; quando o resultado da combinação não difere do resultado obtido com a substância mais efetiva sozinha; quando o resultado da combinação é menor que a resposta aditiva; quando o resultado da combinação é maior que a resposta aditiva, explica o efeito observado na combinação de substâncias resultando em maior atividade do que a esperada para cada substância individualmente, ou seja, um aumento no efeito.

Substâncias de origem natural podem atuar de forma sinérgica com fármacos já utilizados clinicamente, permitindo a redução das doses necessárias para produzir o efeito desejado e, conseqüentemente, minimizando os efeitos adversos. Para os testes antimicrobianos se utiliza métodos de microdiluição em caldo para determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM), onde cada poço contém uma combinação única de concentrações diferentes das drogas testadas (ENDO, 2007). Combinações duplas ou triplas começam com testes *in vitro* que demonstram interações positivas com inibição do crescimento do microrganismo de interesse, é utilizado método de difusão em ágar para testar combinações com outra substância (MARCHETTI et al., 2000). Outro método utilizado para avaliar a combinação é o “checkerboard” (SCOTT et al., 1995; MARCHETTI et al., 2000), uma amplificação do método de microdiluição em caldo, onde se determina o valor de inibição do crescimento dos microrganismos na presença de diferentes combinações das drogas em relação ao controle somente com microrganismos (ENDO, 2007).

Pallaniapan e Holey (2010) investigaram o efeito de antimicrobianos naturais (eugenol, timol, cravo e cinemaldeído) em combinação com antibióticos (ampicilina, penicilina, tetracilina, eritromicina e bacitracina) contra isolados resistentes de *Salmonella* Typhimurium, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. Na concentração inibitória mínima dos antimicrobianos combinados foi observado uma diminuição entre 12% e 25%.

A baicaleína da *Scutellaria baicalensis* Georgi, uma das ervas mais usadas na China, tornou os isolados de *S. aureus*, multirresistentes, vulneráveis à ciprofloxacina, de acordo com Chan et al. (2011).

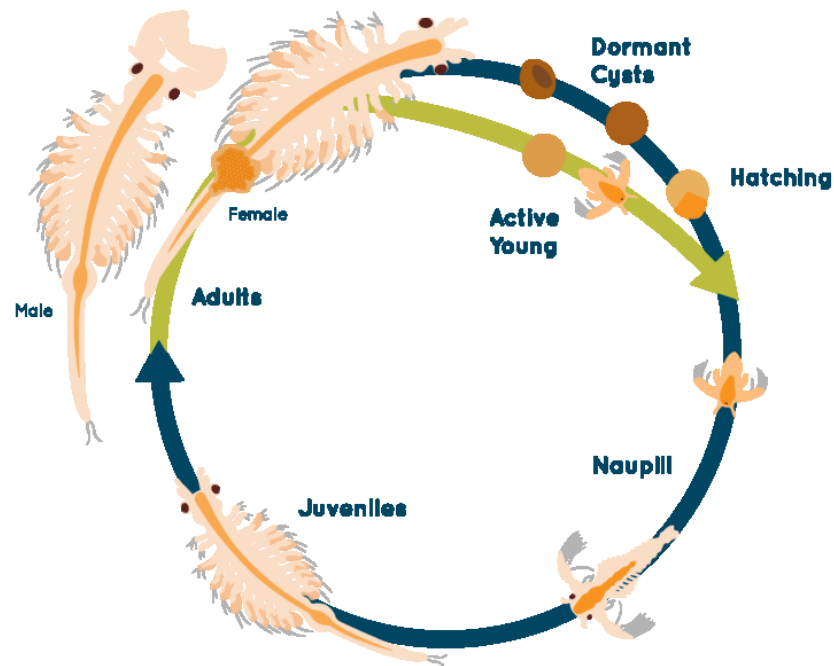
Os efeitos sinérgicos são o início da compreensão da atuação na maioria dos extratos vegetais sobre sistemas biológicos. Composições químicas complexas dos extratos favorecem a atuação conjunta sobre múltiplos alvos celulares e moleculares, conduzindo a inúmeros efeitos biológicos. Podendo ser observados tanto entre componentes de extratos vegetais quanto entre produtos naturais e fármacos sintéticos, podem ser explorados no desenvolvimento de medicamentos e/ou estratégias terapêuticas mais seguras e eficazes para o tratamento de patologias, sobretudo aquelas de caráter multifatorial (CASANOVA e COSTA, 2017).

4.6 Ensaio de toxicidade com *Artemia salina*

A *Artemia salina* é um micro crustáceo, invertebrado de habitats aquáticos salgados e marinhos. É empregado em estudos de toxicidade de laboratório e outros procedimentos de cálculo de dosagem letal (AYO et al., 2007). *Artemia salina* passa por vários estágios em seu ciclo de vida, incluindo náuplios, metanáuplios, pré-adultos e adultos, ilustrado na Figura 7.

Os ovos de *A. salina* são comercializados em lojas de animais a um baixo custo e permanecem viáveis por anos se armazenados em condições ideais. Quando colocados em água marinha, os ovos eclodem dentro de 48h e geram um grande número de larvas (fase náuplio) para o uso experimental, o que confere vantagens a esse tipo de ensaio biológico além de poder ser utilizado como bioindicador e biomonitor da qualidade da água (HARADA, 2009).

Figura 7- Ciclo de vida da *Artemia salina*



Fonte: A Benchmark company (2022).

Segundo McLaughlin e Rogers (1998), a letalidade *in vivo* de um único organismo zoológico pode ser empregada como uma ferramenta prática para avaliação e fracionamento na descoberta e monitoramento de compostos naturais bioativos.

Sua aplicação na avaliação de extratos vegetais, de acordo com Pimenta et al. (2003) é considerado um teste eficaz, rápido e acessível que requer apenas uma pequena quantidade de amostra, sendo uma indicação do bioensaio de letalidade em *A. salina*. Como método de triagem de potenciais produtos químicos para testes especializados e mais caros, como o bioensaio anticancerígeno, foram descobertos trabalhos baseados em resultados positivos em testes com *A. salina*.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Obtenção dos extratos e frações das plantas

Os extratos brutos e frações das plantas *Pterocaulon alopecuroides*, *Stevia leptophylla*, *Vernonanthura cuneifolia*, *Vernonanthura discolor* e *Austroeupatorium inulaefolium* foram fornecidos pelo Departamento de Química - Grupo de Síntese e Produtos Naturais (GSPN) da Universidade Estadual de Maringá. Na Tabela 1 é possível verificar todas as plantas com seus extratos brutos, frações e abreviações utilizadas.

Tabela 1- Relação de extratos brutos e frações de plantas da família Asteraceae.

Planta	Código	Amostra
<i>Pterocaulon alopecuroides</i>	PA-EB	Extrato Bruto
	PA-FHX	Fração hexânica
	PA-FDC	Fração diclorometano
	PA-FAC	Fração acetato de etila
	PA-FHM	Fração hidrometanólica
<i>Stevia leptophylla</i>	SL-FHX	Fração hexânica
	SL-FCHCl ₃	Fração clorofórmica
	SL-FAC	Fração acetato de etila
	SL-FBuOH	Fração butanólica
	SL-FHM	Fração hidrometanólica
<i>Vernonanthura cuneifolia</i>	VC-EB	Extrato Bruto
	VC-FHX	Fração hexânica
	VC-FDC	Fração diclorometano
	VC-FAC	Fração acetato de etila
	VC-FHM	Fração hidrometanólica
<i>Vernonanthura discolor</i>	VDI-EB	Extrato Bruto
	VDI-FHX	Fração hexânica
	VD-FDC	Fração diclorometano
	VDI-FAC	Fração acetato de etila
	VDI-FHM	Fração hidrometanólica
<i>Austroeupatorium inulaefolium</i>	AI-EB	Extrato Bruto
	AI-FHX	Fração hexânica
	AI-FDC	Fração diclorometano
	AI-FAC	Fração acetato de etila
	AI-FHM	Fração hidrometanólica

Fonte: Autoria Própria (2021).

As plantas foram coletadas na região de Campos Gerais no município de Ponta Grossa, Paraná. As plantas foram identificadas e as exsicatas são encontradas depositadas no herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

5.2 Preparo dos extratos e frações

Para o preparo dos extratos brutos, foi utilizado o método de maceração exaustiva, adicionando etanol ao material vegetal (partes aéreas – folhas e caules) seco e moído. Após 24 h, a solução foi filtrada e o solvente orgânico evaporado com auxílio de um evaporador rotativo.

O solvente (etanol) recuperado é novamente adicionado no frasco de extração. Este processo foi repetido de 4 a 5 vezes, para se obter a máxima extração, dos constituintes químicos da planta. Para o processo de fracionamento, uma parte de cada extrato bruto, é dissolvida em uma mistura de MeOH/H₂O 1:1 (v/v), e em seguida, submetidos à partição com solventes orgânicos em gradiente crescente de polaridade (n-hexano, diclorometano ou clorofórmio, acetato de etila e butanol (o butanol não se aplica a todas as plantas).

Após a remoção dos solventes em um evaporador rotativo é obtida as frações hexânica, diclorometano ou clorofórmio, acetato de etila, butanol e fração remanescente hidrometanólica referente a cada espécie.

5.3 Soluções dos extratos e frações das plantas para avaliação da atividade antibacteriana

Com os extratos previamente secos. As soluções dos extratos ou frações foram preparadas na concentração de 10 mg/mL, utilizando 10% de dimetilsufóxido (DMSO) e completando com caldo Mueller Hinton (MH), foi pesado $10 \pm 0,01$ mg do extrato em microtubos de centrifugação e adicionado 100 µL de DMSO para solubilizar e agitar em vortex, em seguida foi colocado 900 µL de caldo MH e homogeneizado novamente em vortex.

5.4 Preparo dos inóculos

Foram utilizadas as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) e *Bacillus cereus* (INCQ5-00003) e as gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC25922) e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (ATCC13076). Para ativação, são inoculadas em caldo MH e incubadas a 35 °C por 24 horas, as bactérias foram padronizadas em salina 0,9 % com escala 0,5 Mc Farland. Apenas para o teste CIM e “checkerboard” foram diluídas (1: 20) em caldo MH.

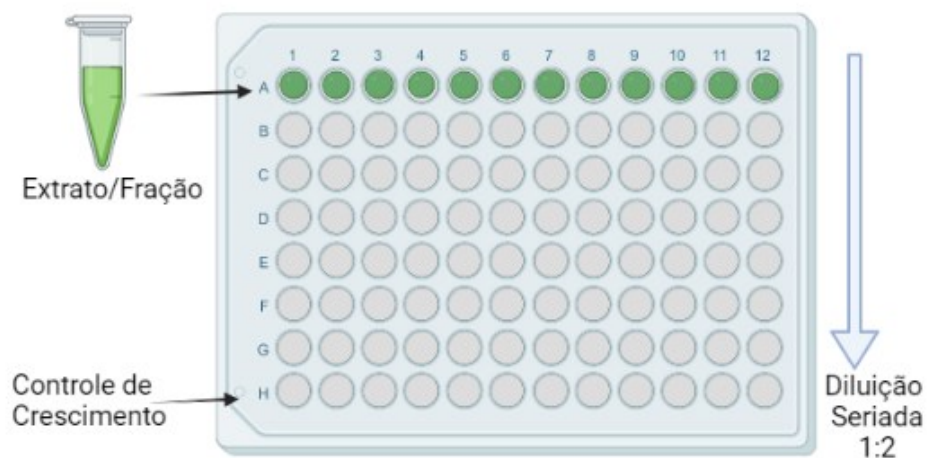
5.5 Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

Os testes foram preparados de acordo com o padrão M7-11 aprovado pelo NCCLS.

5.5.1 Teste CIM

Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) - maior diluição do extrato que inibe o crescimento dos microrganismos. Nas microplacas de 96 poços, foi adicionado 100 μL de caldo MH em cada poço, e apenas na primeira linha é colocado 100 μL das soluções diluídas dos extratos ou frações. Em seguida foi realizado as diluições seriadas (1:2) até a linha G. Por último adicionou-se 10 μL da suspensão bacteriana em cada poço. Os últimos poços de cada coluna foram utilizados como controle do crescimento microbiano. O conteúdo das microplacas foi homogeneizado e as incubadas em estufa a 35 $^{\circ}\text{C}$ por 24 hrs. Esquematizado na Figura 8.

Figura 8 – Representação ilustrativa da disposição das amostras de extratos/frações das plantas em microplaca de 96 poços.



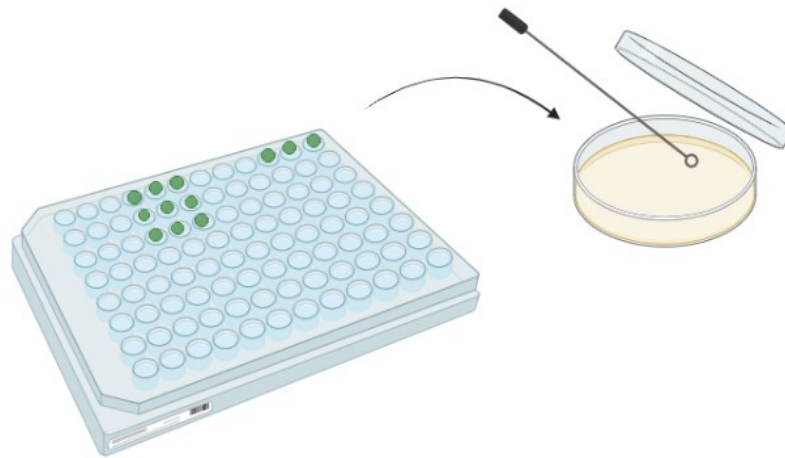
Fonte: autoria própria (2022).

5.5.2 Teste CBM

Após o período de incubação da microplaca, o conteúdo dos poços sem crescimento visível foram subcultivados em ágar MH, ilustrado na Figura 9, e incubados em estufa 35 $^{\circ}\text{C}$ por 24 h para a determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM - menor concentração que não apresenta crescimento após semeadura). Após este procedimento, na microplaca adiciono-se 10 μL nos poços, uma solução de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio

(CTT) a 0,5 % em água, e incubado por 3 horas em estufa a 35 °C. O CTT é utilizado para a detecção do crescimento microbiano, pois quando há desenvolvimento de coloração rosa, indica atividade microbiana. Isso ocorre, porque o sistema de elétrons dos microrganismos reduz o cloreto de tetrazólio em formazan, o qual tem cor rosa, indicando que as bactérias viáveis são capazes de metabolizar e reduzir esse corante. Este procedimento é feito para confirmar os valores da Concentração Inibitória Mínima.

Figura 9- Esquema de Subcultivo em ágar



Fonte: autoria própria (2022).

5.6 Controle do CIM e CBM

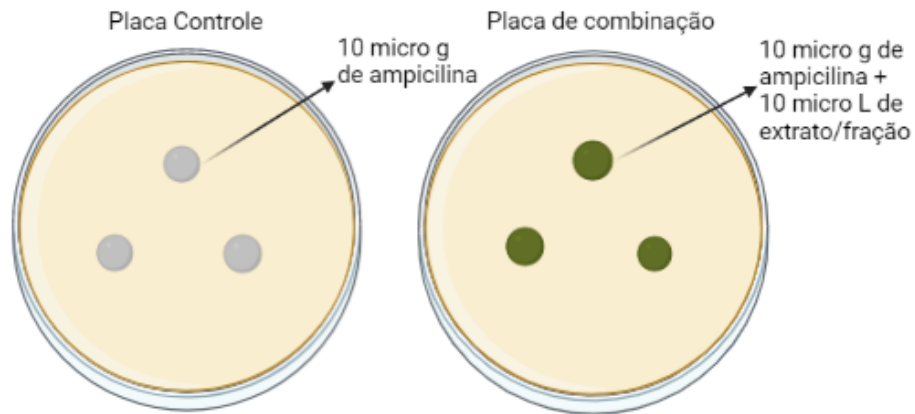
Os controles são realizados da mesma forma, com o DMSO na mesma quantidade usada nas diluições dos extratos (10 %) e como controle positivo foi utilizada uma solução de Ampicilina na concentração de 1,0 mg/mL para todas as bactérias. Todos os testes foram realizados em triplicata.

5.7 Teste de difusão em ágar para testar as combinações

Na verificação da atividade antibacteriana sozinha ou em combinação com a ampicilina, o inóculo padronizado foi aplicado sobre a superfície da ágar MH com swabs de algodão. Em seguida foram preparadas 2 placas, uma para cada triplicata de discos, sendo: uma para ampicilina 10 µg, o disco controle, e outra para combinação 10 µg de ampicilina +10 µL do extrato/fração, foram aplicados sobre a placa, representado na Figura 10. Os

testes foram realizados para as quatro bactérias. Após incubação a 37 °C durante 24h, os diâmetros dos halos de inibição foram medidos (NCCLS, M2-13, 2018).

Figura 10 – Representação ilustrativa da disposição do teste de combinação em ágar.



Fonte: autoria própria (2022).

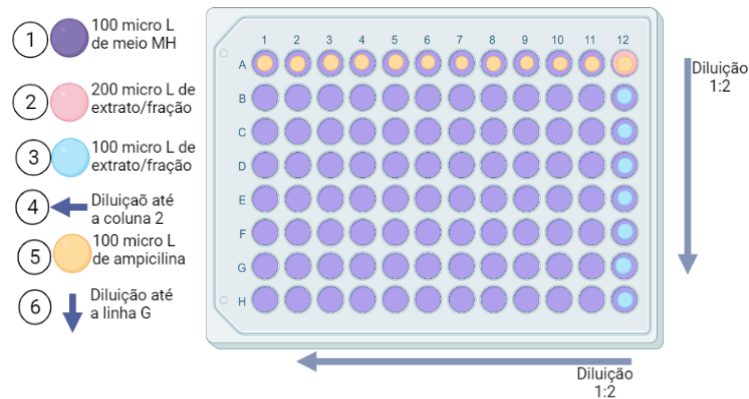
5.8 “Checkerboard”

Com os resultados obtidos nos ensaios de difusão em ágar, os extratos/fração que obtiveram melhor atividade foram submetidos ao “checkerboard”. Na placa de 96 poços foi colocado 100 µL de meio MH em todos os poços. Exceto no poço 12 A, recebeu 200 µL de extrato/fração. Os demais poços da coluna 12, recebem 100 µL de extrato/fração, e em seguida foi realizada uma diluição seriada até a coluna 2. Depois, os poços da linha A devem receber 100 µL de ampicilina, e por fim se realiza a diluição seriada até a linha G, a linha H e a coluna 1 são os controles dos extratos/fração e da ampicilina, por último foi colocado 5 µL do inóculo em cada poço, esquematizado na Figura 11. Foi deixado em incubação a 37 °C durante 48h.

Em seguida foram feitos os isobogramas para avaliar a curva dos efeitos combinatórios, e os valores do índice de concentração inibitória fracionada (FICI) foram calculados de acordo com a equação (1), onde A e B referem-se as diferentes substâncias testadas.

$$FICI = FIC_A + FIC_B = \frac{CIM_A \text{ em combinação}}{CIM_A \text{ isolado}} + \frac{CIM_B \text{ em combinação}}{CIM_B \text{ isolado}} \quad (1)$$

Figura 11 - Representação ilustrativa de como deve ser realizado o checkerboard.



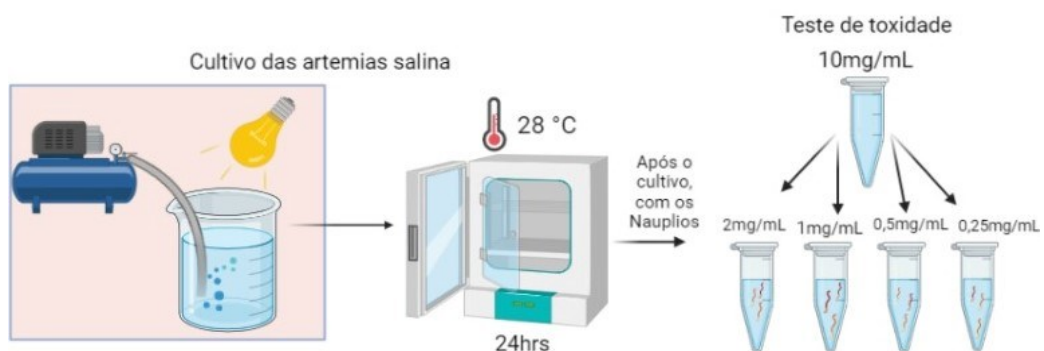
Fonte: autoria própria (2022).

5.9 Teste de toxicidade com *Artemia salina*

O teste de toxicidade foi realizado de acordo com a metodologia de Meyer (1982), com *Artemia salina*. Foi preparada uma solução salina de 3g de sal por litro de água mineral e foi separado 200 mL dessa mesma solução para ser usada posteriormente. O ambiente de cultivo foi preparado dentro da estufa a 28°C sob luz e aeração constante, depois foi adicionado 0,2 g de cistos de *Artemia*, o sistema foi mantido por 48 horas.

No microtubo foi adicionado 0,01 g de extrato, 40 µL de DMSO e 960 µL de salina (mesma usada no cultivo das salinas) para a concentração de 10 mg/mL, dessa diluição foram preparada as diluições de 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, o controle negativo foi preparado na mesma concentração de DMSO. Por fim foram inseridos 10 náuplios em cada microtubo das triplicatas, ilustrado na Figura 12, e mantido sob iluminação por 24 horas, após esse tempo foi contado o número de larvas vivas e mortas.

Figura 12 – Representação ilustrativa do cultivo das *Artemias* e esquema das concentrações testadas



Fonte: autoria própria (2022).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A família Asteraceae possui várias espécies utilizadas na medicina popular, tornando importante verificar o potencial terapêutico de algumas dessas espécies, pois existe diferenças nos achados antimicrobianos descrito na literatura sobre extratos de plantas, o que pode estar relacionado com a quantidade de cada princípio ativo presente nos extratos, o uso de técnicas e procedimentos diferentes para extração, bem como a época do ano em que foi feita a colheita do material vegetal (FERNANDES,2011). No trabalho de Aligiannis et al. (2001), é considerado CIM até 0,5 mg/mL forte, de 0,6 e 1,5 mg/mL é moderada e acima de 1,6 mg/mL é fraca. No presente estudo, nos testes para determinação da CIM, as melhores atividades antimicrobianas encontradas foram para PA-FAC, SL-FAC e PA-FHM contra *S. aureus* e VC-FHM contra *S. enteritidis*, na concentração de 0,04 mg/mL. Na concentração de 0,62 mg/mL, as frações VC-FDC, SL-FAC e PA-FDC apresentaram atividade inibitória contra o *B. cereus*, o que é uma concentração moderada (Tabela 1).

Para os testes de determinação da CBM a menor concentração foi de 1,25 mg/mL para PA-EB conta o *S. aureus* (Tabela 1).

Tabela 1- Resultados dos testes Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de extratos e frações de plantas da família Asteraceae.

Extratos	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>
	Média CIM/CBM (mg/mL)			
VC-EB	1,25/5,0	5,0/>5,0	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0
VC-FHX	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0
VC-FDC	0,62/5,0	0,62/>5,0	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0
VC-FAC	1,25/>5,0	2,5/>5,0	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0
VC-FHM	2,5/>5,0	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0	0,04/>5,0
VDI-EB	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0
VDI-FHX	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0
VD-FDC	>5,0/>5,0	5,0/>5,0	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0
VDI-FAC	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0
VDI-FHM	>5,0/>5,0	5,0/>5,0	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0
SL-FHX	>5,0/>5,0	5,0/>5,0	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0
SL-FCHCL3	>5,0/>5,0	2,5/>5,0	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0
SL-FAC	0,62/2,5	0,62/>5,0	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0
SL-FBuOH	>5,0/>5,0	5,0/>5,0	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0
SL-FHM	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0
AI-EB	0,62/>5,0	2,5/>5,0	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0
AI-FHX	5,0/>5,0	2,5/>5,0	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0
AI-FDC	1,25/5,0	5,0/>5,0	5,0/>5,0	>5,0/>5,0
AI-FAC	5,0/>5,0	2,5/>5,0	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0
AI-FHM	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0
PA-EB	0,62/1,25	1,25/>5,0	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0
PA-FHX	>5,0/>5,0	1,25/2,5	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0
PA-FDC	>5,0/>5,0	0,62/>5,0	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0
PA-FAC	0,04/5,0	1,25/>5,0	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0
PA-FHM	0,04/2,5	>5,0/>5,0	5,0/>5,0	5,0/>5,0
Ampicilina	0,001/0,001	0,062/0,125	0,004/0,004	0,001/0,002

Fonte: Autoria Própria, (2021).

Observou-se para os demais extratos e frações que a atividade antimicrobiana foi maior contra as bactérias gram-positivas, sugerindo que a susceptibilidade esteja relacionada às características da parede celular destes microrganismos. As gram-positivas possuem a parede celular composta de polissacarídeos acídicos (ácido teicóico) e peptidoglicano com abundância de poros, que promove a adesão de algumas moléculas estranhas que acabam entrando na célula (KONG, 2010).

Ainda foi observado que o controle de DMSO não apresentou atividade na inibição dos microrganismos na concentração utilizada para dissolver os extratos e a ampicilina foi eficiente como droga antimicrobiana.

Com base nesses resultados foi aplicado o teste de difusão em ágar para avaliar as diferentes interações nas combinações antimicrobianas possibilitando testar os efeitos dos compostos dos extratos com a ampicilina e observar possível efeito sinérgico. Foi observado no teste (Tabela 2), considerando, o cálculo de quantas vezes houve um aumento da zona de inibição, utilizando a fórmula: $C=B2 -A2 /A2$, onde A é a ampicilina e B é extrato + ampicilina.

Tabela 2- Resultados dos testes de combinação com difusão em ágar testados com discos em triplicata com os extratos que apresentaram melhor atividade no teste CIM.

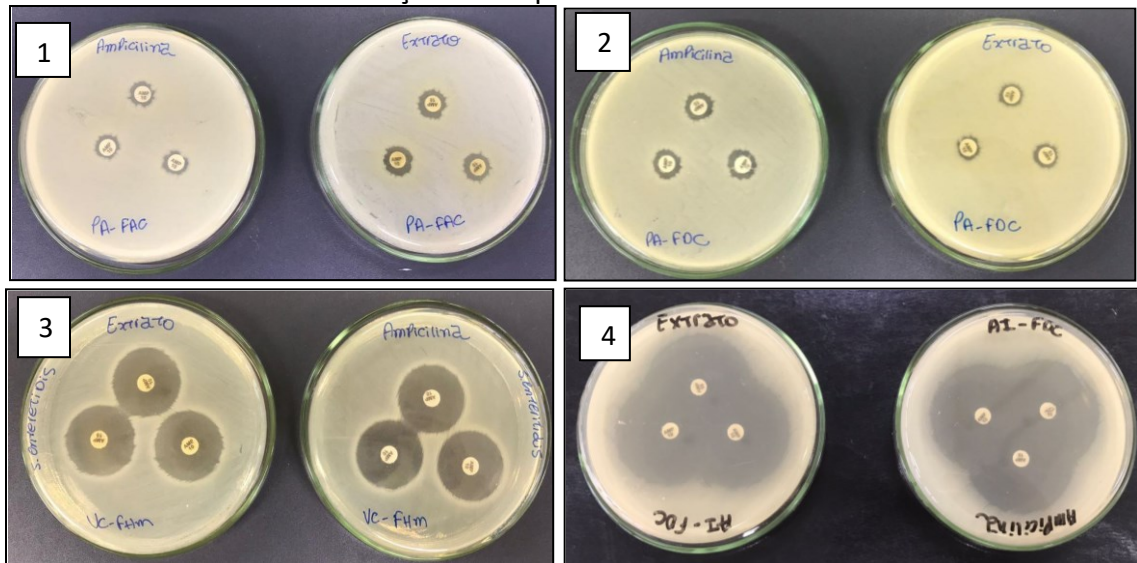
Extratos	Média do diâmetro dos halos de inibição (cm)		
	Ampicilina (10 µg)	Extrato + Ampicilina (10 µl+10 µg)	
VC-EB	4,20/4,20	-	-
VC-FDC	4,36/4,36	0,90/0,82	-
VC-FAC	3,20/3,60	-	-
VC-FHM	-	-	2,61/2,62
SL-FAC	3,77/4,25	0,88/0,90	-
AI-EB	3,89/3,92	-	-
AI-FDC	4,18/3,90	-	-
PA-EB	4,28/4,15	1,29/1,51	-
PA-FHX	-	1,28/1,35	-
PA-FDC	-	1,20/0,81	-
PA-FAC	4,26/3,93	0,87/1,38	-
PA-FHM	4,39/4,15	-	-

*Resultados (-) não foram avaliados.

Fonte: Autoria própria, (2022).

A combinação do antibiótico ampicilina e a PA-FAC contra o *B. cereus*, apresentou uma zona de inibição 1,4 vezes maior do que o disco da ampicilina isolado. Ainda para o mesmo patógeno, a combinação de PA-EB obteve o halo 0,4 vezes maior que a ampicilina e o extrato PA-FDC demonstrou um efeito contrário, diminuindo o halo de inibição 0,5 vezes. Para o *S. aureus*, as combinações de VC-FAC e SL-FAC aumentaram 0,3 vezes a zona de inibição e AI-FDC, PA-FAC e PA-FHM diminuíram 0,1 vezes seus halos. A Figura 13 mostra placas testadas em combinações.

Figura 13 – Placas após 24 horas testadas contra *B. cereus* (1 e 2), *Salmonella* (3), *S. aureus* (4) com discos de ampicilina para o controle comparativo a esquerda, e discos em combinação de ampicilina+extrato a direita.



Fonte: Autoria própria (2022).

Resultados antagônicos ocorrem quando os as combinações são menores que as respostas da substância isoladamente, um exemplo é a placa de PA-FDC mostrado na Figura 13 (2). Já os extratos que apresentaram sinergismo, possuem os diâmetros dos halos maiores na combinação de acordo com a Figura 13 (1) e (4). Foi considerada atividade indiferente, quando não houve diferença entre a ampicilina e a sua combinação com o extrato observada na Figura 13 (3).

Potenciação é o termo para essa interação vantajosa que melhorou a eficácia de um composto bioativo. Quando medidos e quantificados experimentalmente, efeitos sinérgicos e aditivos podem ser observados. A junção de compostos bioativos com antibióticos que apresenta essa potenciação sinérgica acontece pelo bloqueio de um ou mais alvos do processo metabólico (GHENOV, 2014).

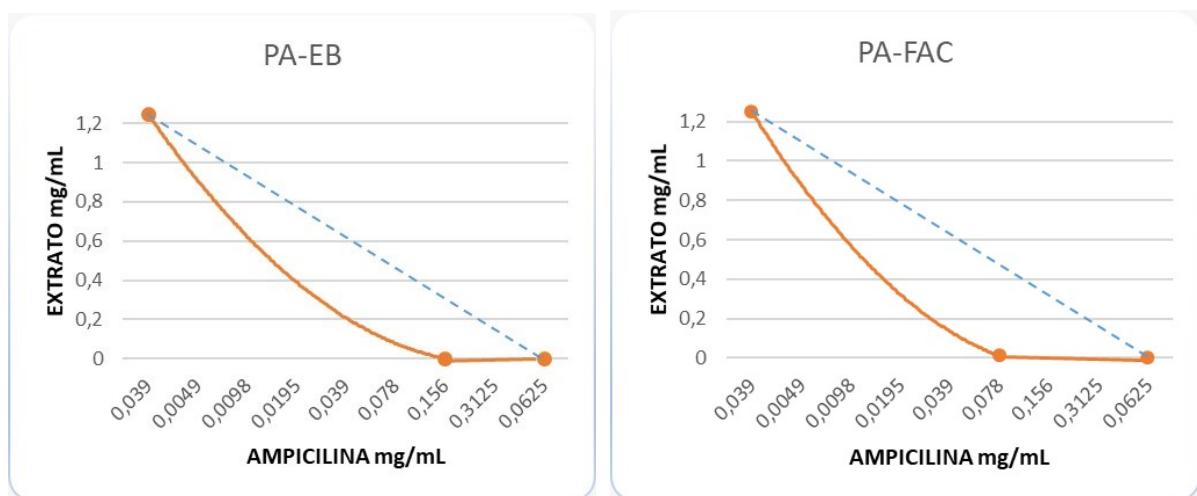
O estudo das interações entre moléculas é realizado ao longo dos anos. Testes *in vitro* que demonstram interações efetivas que impedem o crescimento dos microrganismos-alvo são frequentemente o primeiro passo na aplicação clínica de combinações de agentes inibitórios para medicamentos antibacterianos. Os estudos voltados para essa forma de terapia baseiam-se na estabilidade, nas características farmacocinéticas e farmacodinâmicas e nos mecanismos de ação, que combinam medicamentos com alvos de ação complementares, espectro de ação e estabilidade. Uma ampla gama de eficácia, maior

potência do que qualquer um dos medicamentos isoladamente, maior segurança e tolerabilidade e uma diminuição no número de organismos resistentes são apenas algumas das vantagens potenciais (MUKHERJEE et al., 2005).

Considerando estes resultados, o método “checkerboard” foi realizado, onde cada poço contém uma combinação única de concentrações diferentes da droga testada, na presença de diferentes concentrações dos extratos. Os isobogramas apresentados na Figura 14, representa a determinação das combinações antimicrobianas para PA-EB e PA-FAC contra *B. cereus*, onde podemos observar para os gráficos uma interferência sinérgica em sua interação com o antibiótico, caracterizada pela curva que se move para origem formando uma linha côncava. Existem vantagens potencialmente significativas associadas a essa interação apresentada, como por exemplo: redução de efeitos indesejáveis, aumento na estabilidade ou biodisponibilidade dos agentes livres, e tratamentos terapêuticos adequados com efeitos de doses relativamente pequenas, quando comparado com um medicamento sintético.

Uma matriz bidimensional de concentrações seriadas de compostos de teste é usada como base para o cálculo de uma concentração inibitória fracionada índice (FICI) para demonstrar que combinações pareadas de agentes podem exercer efeitos inibitórios que são mais do que a soma de seus efeitos isolados.

Figura 14- Isobogramas representando combinações do “checkerboard” entre ampicilina e extratos de PA-EB e PA-FAC contra *B.cereus*.



Fonte: Autoria própria, (2022).

A CIM da ampicilina testada sozinha para *B. cereus*, foi de 0,0625 mg/ml, e reduziu para 0,015625 mg/mL na presença de 0,0003047 mg/mL de extrato PA-EB, reduzido também para 0,0078125 mg/mL de ampicilina, quando combinado com 0,0097656 mg/mL de PA-FAC. As plantas contêm uma grande diversidade de metabólitos secundários e essa diversidade pressupõe uma alta probabilidade de interações. Por meio de estudos de sinergia, é possível provar a validade desta afirmação (BIAVATTI, 2009).

Conforme Odds (2003), $FICI < 0,5$ é considerado sinergismo, $FICI > 4$ antagonismos e para valores entre 0,5 e 4 pode-se considerar que não há interação. Para PA-EB, extrato que apresentou curva de sinergismo no isoblograma, a concentração fracionaria inibitória é de $FICI = 0,025$, e para PA-FAC uma $FICI = 0,20$; também apresentando sinergismo nas combinações.

O interesse pela descoberta de extratos vegetais com diferentes atividades biológicas, tem crescido muito nos últimos anos. Neste contexto, plantas que apresentam atividade antimicrobiana são de grande interesse devido ao fato de muitos microrganismos apresentarem resistência, não somente aos antibióticos já pré-estabelecidos, como também aos de última geração, causando sérios problemas de saúde pública (PRATES, 2001).

O teste de toxicidade demonstrou letalidade no controle negativo com o DMSO na concentração de 10 %, portanto os testes com *Artemia salina* foram repetidos na concentração de 4 %, onde a triplicata resultou em todos os minis crustáceos vivos. Esta concentração também apresentou uma boa diluição dos extratos. Os resultados da toxicidade são apresentados na Tabela 3, onde se encontra cada triplicata do teste.

O resultado se deu pela contagem de vivos e mortos em um período de 24 horas. Todos os extratos testados demonstraram letalidade de 100% na concentração de 2mg/mL. O extrato de PA na fração diclorometano não demonstrou letalidade na concentração de 1 mg/mL, se destacando dos demais, que não apresentaram letalidade apenas a partir de 0,5 mg/mL.

Tabela 3 - Resultados do teste de Toxicidade com *Artemia salina*.

Extratos	2mg/mL		1mg/mL		0,5mg/mL		0,25mg/mL	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
PA-FDC	10M	0	10V	0	10V	0	10V	0
PA-FHM	10M	0	10M	0	10V	0	10V	0
VC-FAC	10M	0	10M	0	10M	0	5,333V/4,667M	0,577V/0,577M
AI-FDC	10M	0	10M	0	10V	0	10V	0
VC-EB	10M	0	10M	0	10M	0	5V/5M	0M/0M
PA-EB	10M	0	10M	0	10V	0	10V	0
PA-FAC	10M	0	10M	0	10M	0	10M	0

*V=vivos, M=mortos.

Fonte: A autoria própria, (2022).

O ensaio de *A. salina* pode ser usado no monitoramento do fracionamento de extratos, de acordo com Meyer et al. (1982), a letalidade a este microcrustáceo pode ser utilizada como um teste preliminar rápido e simples para o isolamento de produtos naturais. Meyer e seus colaboradores estabeleceram uma relação entre o grau de toxicidade e a dose letal média, DL50, apresentada por extratos de plantas sobre larvas de *Artemia salina*. Desde então, considera-se que quando são verificados valores acima de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, estas são consideradas atóxicas e quando menor que $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ são consideradas tóxicas.

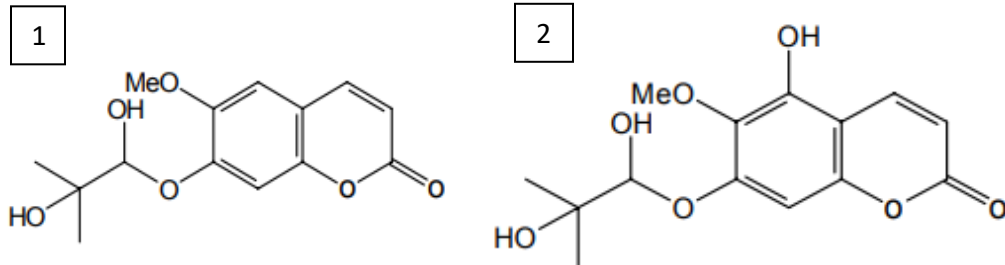
As concentrações dos extratos testados apresentaram atividade já em baixas concentrações o que levou ao teste de toxicidade concentrações que a maioria se intitula atóxicas, PA-FAC demonstrou letalidade de 100% em todas as concentrações testadas.

De acordo com a literatura, o ensaio de toxicidade em *Artemia salina* está sendo utilizado em várias outras atividades biológicas confirmando assim a sua sensibilidade e versatilidade em estudos de toxicidade, sendo um teste inicial eficiente para direcionar futuras pesquisas.

Mesmo apresentando toxicidade na fração PA-FAC, a planta *Pterocaulon alopecuroides* apresenta atividades antibacterianas e bactericida nas outras combinações testadas contra *S. aureus* e *B. cereus*, Dentre os compostos encontrados nas espécies do gênero *Pterocaulon*, há relatos de isolamento de monoterpenos, sesquiterpenos, flavonóides, poliacetilenos (VILEGAS et al., 1995), ácido caféico, ácido clorogênico, ácido isoclorogênico e ácido 3,4-dicafeoilquínico (DEBENEDETTI et al., 1999). A ampla maioria dos trabalhos se refere ao

isolamento de cumarinas. A Figura 15 apresenta as estruturas das cumarinas que já foram encontradas para as espécies deste gênero.

Figura 15- Estruturas das cumarinas citadas para o gênero *Pterocaulon aloopecuroides*



*1: 7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina; 2: 7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-5-hidroxi-6-metoxicumarina
Fonte: Stein, 2005.

As cumarinas localizam-se em grande maioria na superfície de folhas e caules, onde poderiam estar atuando como fitoalexinas, protegendo a planta especialmente do ataque de microrganismos. Dentre os constituintes químicos presentes nas espécies de *Pterocaulon*, as cumarinas parecem ser os compostos majoritários encontrados para o gênero.

A composição química complexa dos extratos favorece a atuação conjunta sobre múltiplos alvos celulares e moleculares, conduzindo a efeitos biológicos mensuráveis. Esses efeitos, que podem ser observados tanto entre componentes de extratos vegetais quanto entre produtos naturais e fármacos sintéticos, podem ser explorados no desenvolvimento de medicamentos e/ou estratégias terapêuticas mais seguras e eficazes para o tratamento de patologias, sobretudo aquelas de caráter multifatorial.

Substâncias de origem natural podem atuar de forma sinérgica com fármacos já utilizados clinicamente, permitindo a redução das doses necessárias para produzir o efeito desejado e, conseqüentemente, minimizando os efeitos adversos (CASTRO, 2010). Os efeitos sinérgicos são a base para a compreensão da atuação da maioria dos extratos vegetais sobre sistemas biológicos.

Entretanto, para que tais efeitos sejam compreendidos, é necessário que métodos de estudos apropriados sejam empregados, dessa forma, esse trabalho pode destacar possíveis conexões entre aditivos naturais e sintéticos, abrindo caminho para seu potencial uso no futuro.

7. CONCLUSÃO

Nos experimentos reproduzidos em repetições, a proximidade dos resultados para as triplicatas das amostras dos extratos testados assegura que o método realizado foi capaz de extrair os compostos que apresentam a atividade antibacteriana nas amostras. Para a maioria dos extratos brutos e frações, as bactérias gram-positivas se mostraram mais suscetíveis aos compostos presentes. Os melhores resultados do teste de determinação da CIM encontrados foram para PA-FAC e PA-FHM contra *S. aureus* e VC-FHM contra *Salmonella*. Na determinação da CBM, PA-EB apresentou a atividade que se destacou contra *S. aureus*.

Pterocaulon alopecuroides se destacou entre as demais em sua forma bruta e nas diferentes frações por apresentar baixas concentrações inibitórias. No teste de combinação destacou-se PA-FAC e PA-EB com zonas de inibição respectivamente de 1,4 e 0,4 vezes maior que o controle, apresentaram sinergismo quando combinado com o antibiótico ampicilina representado pelas suas curvas nos isobogramas e seu valor de FICI de 0,20 e 0,025 respectivamente, avaliado no "Checkerboard" quando as concentrações da ampicilina é diminuída e apresentou mais ou mesmo efeito antibacteriano em combinação com os extratos. Essa potenciação do sinergismo pode ser vantajosa em futuras aplicações de extratos de plantas da família *Asteraceae*.

Com destaque novamente a PA na sua fração diclorometano, que não apresentou letalidade dos minis crustáceos a partir de 1 mg/mL, configurado como método de triagem de potenciais produtos químicos para testes futuros na aplicação dos extratos.

Assim, plantas da família *Asteraceae* devem ser melhor exploradas, pela significativa ação antimicrobiana que podem apresentar. Considerando a possibilidade de suas combinações com antibióticos e aplicação em produtos.

REFERÊNCIAS

- AFSHARI A, BARATPOUR A, KHANZADE S, JAMSHIDI A. **Salmonella Enteritidis and Salmonella Typhimorium identification in poultry carcasses.** Iran J Microbiol, 2018.
- AKINMOLADUN, A. C.; OBUOTOR, E. M.; FAROMBI, E. O. **Evaluation of Antioxidant and Free Radical Scavenging Capacities of Some Nigerian Indigenous Medicinal Plants.** Journal of Medicinal Food, v. 13, n. 2, p. 444-451, 2010
- ALIGIANNIS, N; KALPOUTZAKIS, E; MITAKU, S; CHINOUE, I.B. **Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two Origanum species.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 40, n. 9, p. 4168-4170, 2001.
- ALMEIDA, A, A, P. **Atividade antimicrobiana de extratos e compostos fenólicos e nitrogenados do café: Avaliação in vitro e em modelo alimentar,** Tese ao programa de pós-graduação, 2007.
- ALMEIDA, G.S.S.; GROSSI, M.A. **Austroeupeatorium in Flora e Funga do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB26850>>. Acesso em: 02 jun. 2022
- ALVES, F. C. B; **Ação antibacteriana de associações de antimicrobianos: nisina, óleos essenciais e compostos majoritários,** Dissertação do instituto de biociências de boiacatu, 2014.
- ANDERSON V. G. RAMOS, JULIANA L. B. PEIXOTO, MÁRCIA R. P. CABRAL, ANA MARIA AMREIN, TATIANA S. TIUMAN, SOLANGE M. COTTICA, ILZA M. O. SOUZA, ANA LUCIA T. G. RUIZ, MARY ANN FOGGIO, MARTA R. B. CARMO, MARIA HELENA SARRAGIOTTO AND DEBORA C. BALDOQUI, **Chemical constituents, antiproliferative and antioxidante activities of vernonanthura nudiflora(less.) h. rob. aerial parts.** J. Braz. Chem. Soc. V.30. n.8. 2019.
- AYO RG, AMUPITAN JO, ZHAO Y. **Cytotoxicity and antimicrobial studies of 1,6,8-trihydroxy-3-methyl-anthraquinone (emodin) isolated from the leaves of Cassia nigricans Vahl.** AJB.; 6(11):1276-79, 2007.
- BARREIRO, ELIEZER; BOLZANI, VANDERLAN, **Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos.** Quím. Nova v.32 n.3 São Paulo 2009.
- BARROS, D., ET AL., **Potencial Utilização de Sistemas Antimicrobianos Naturais como Conservantes Alimentares.** Braz. J. of Develop., Curitiba, v. 6, n.6, p.40476-4049, jun de 2017.
- BARROS, D.M, et al. **Potencial Utilização de Sistemas Antimicrobianos Naturais como Conservantes Alimentares.** Brazilian journal of development, v. 6, n.6, p.40476-40491 jun. 2020.

BERNADI, L. M. **Caracterização da disponibilidade de mudas e partes secas de plantas medicinais, aromáticas, condimentares nas feiras livres do município de Chapecó-SC.** Trabalho de conclusão de curso, Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó, 2016.

BESSADA, Sílvia M.F.; BARREIRA, João C.M.; OLIVEIRA, M. Beatriz P.P. **Asteraceae species with most prominent bioactivity and their potential applications: A review.** *Industrial Crops and Products*, [s. l.], v. 76, p. 604–615, 2015.

BERTOTTO, C., BILCK, A. P., YAMASHITA, F., ANJOS, O., SIDDIQUE, M. A. B., HARRISON, S. M., BRUNTON, N. P., CARPES, S. T; **development of a biodegradable plastic film extruded with the addition of a brazilian propolis by-product**, *LWT*, Volume 157, 2022.

CÁRDENAS, A; MEJÍA, G; CÁRDENAS, J, **Vegetal species studied by their antimicrobial, immunomodulatory and hypoglycemic properties in caldas-colombia, south america**, *Biosalud* vol.12 no.1 Manizales jan/June 2013.

CASANOVA, L. M.; COSTA, S. **Interações Sinérgicas em Produtos Naturais: Potencial Terapêutico e Desafios.** *Rev. Virtual Quim.*, 2017, 9 (2), 575-595, março de 2017

CASTAÑEDA, D; RODRIGUE, J; OCAMPO, G, **Species richness estimation of the asteraceae family in four areas for conservation from central mexico using non-parametric methods to measure biodiversity.** *Botanical Sciences*, v.98 n.2 maio- junho de 2020.

CASTRO, M.S.; MONGE, M.; SOARES, P.N.; RIVERA, V.L.; DEMATTEIS, M.; SEMIR, J. (in memoriam) *Vernonanthura* in **Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB104490>>. Acesso em: 02 jun. 2022.

CNCFLORA. ***Stevia leptophylla* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2** Centro Nacional de Conservação da Flora.

DARLON IRINEU BERNARDI; RODOLFO BENTO BALBINOT; ERICA BENASSI ZANQUETA; TANIA UEDA NAKAMURA; MARTA REGINA BARROTT DO CARMO; MARIA HELENA SARRAGIOTTO; DEBORA CRISTINA BALDOQUI, **Estudo químico e biológico de *Stevia leptophylla* sch.bip. ex baker (asteraceae), xxv eaic**, 2016.

DAVIDSON, P. M.; CEKMER, H. B.; MONU, E. A.; TECHATHUVANAN, C. **The use of natural antimicrobials in food: no overview** - 1. In: *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*. Ed.: Taylor, T. M. Woodhead Publishing Series in Food Science Technology and Nutrition, n. 269, p. 1-27, Elsevier, 2015.

DRASAR, Bohumil S.; HILL, Michael J. **Human intestinal flora**. Academic Press, 1974.
ENDO, H, E, **Efeito antifúngico de extrato bruto e frações de punica granatum contra candida albicans e sinergismo com fluconazol**, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, MARINGÁ 2007.

DEBENEDETTI, S. L.; TEHRANI, K. A.; PUYVELDE, L. V.; DE KIMPE, N. **Isopurpurazol, a cumarin from Pterocaulon virgatum**. *Phytochemistry*, v.51, p. 701-703, 1999.

ENDO, H, E, **Efeito antifúngico de extrato bruto e frações de punica granatum contra *candida albicans* e sinergismo com fluconazol**, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, MARINGÁ 2007.

FABRI, R.L.; NOGUEIRA, M.S.; DUTRA, L.B.; BOUZADA, M.L.M.; SCIO, E, **Antioxidante and antimicrobial potential of *asteraceae* species**. Rev. bras. plantas med. vol.13 no.2 Botucatu 2011.

FERNANDES, A.P; RIBEIRO, G.E; RUFINO, L.R.A; SILVA, L.M; BORIOLLO, M.F.G; OLIVEIRA, N.M.S; FIORINI, J.E. **Efeito do extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta* na mutagênese “in vivo”, e avaliação antimicrobiana, e interferência no crescimento e diferenciação celular “in vitro”**. Revista Médica de Minas Gerais, v. 21, n. 3, p. 272-279, 2011.

FREDERICO, A; RUAS, P; MORALES, M; RUAS, C; NAKAJIMA, J, **Estudos cromossômicos em alguns *stevia. cav. (compositae)* espécies do sul do brasil**. Braz. J. Genet. vol.19 no.4 Ribeirão Preto 1996.

GHENOV, F. **Avaliação in vitro das atividades antioxidante e antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de chá preto (*Camellia sinensis*) e dos cogumelos Shitake (*Pleurotus ostreatus*) e Shimeji (*Lentinula edodes*)**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

GRZYBOWSKI, C. R. DE S., SILVA, R. C. DA, VIEIRA, E. S. N., & PANOBIANCO, M. **Processing and physical and physiological quality of the native forest seeds of *Vernonanthura discolor***. Acta Scientiarum. Agronomy, 41(1), e39574, 2018.

GRZYBOWSKI, C; SILVA, R; VIEIRA, E; PANOBIANCO, M, **Maturation and germination of *vernonanthura discolor* seeds**, Ciênc. Agrotec. V.40. n.2. 2016.

HARADA, N. T.; **Correlação entre os ensaios de citotoxicidade em *artemia salina leach* e atividade antineoplásica sobre linhagens de células tumorais para algumas classes de produtos naturais**. Dissertação apresentada ao Programa de PósGraduação, Campo grande, 2009.

HASSOUN, A.; ÇOBAN, Ö. E. **Essential oils for antimicrobial and antioxidante applications in fish and other seafood products**. Trends in Food Science & Technology, v. 68, p. 26-36, 2017.

HENNEKINNE, J.-A.; BUYSER, M.-L.; DRAGACCI, S. ***Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation**. FEMS Microbiology Reviews.v.36, n.4, p.815-836, 2012.

JORGE CARLOS RUIZ-RUIZ, YOLANDA BEATRIZ MOGUEL-ORDOÑEZ & MAIRA RUBI SEGURACAMPOS, **Biological activity of *stevia rebaudiana bertonii* and their relationship to *hattori*, *eric*, *asteraceae* da estação ecológica do panga, uberlandia, minas gerais**. Dissertação, 2009.

JORGE CARLOS RUIZ-RUIZ, YOLANDA BEATRIZ MOGUEL-ORDOÑEZ E MAIRA RUBI SEGURACAMPOS, **Atividade biológica de *Stevia rebaudiana* Bertoni e sua relação com a saúde, Avaliações críticas em ciência alimentar e nutrição**, 57:12, 2680- 2690, 2017.

KONG, M.; CHEN; V.G.; XING, K.; PARK, H.Y. **Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state-of-the-art review**. International Journal of Food microbiology, v.144, p. 51-63, 2010.

LIMA, L; MATZENBACHER, N, **O gênero *pterocaulom* ell. (asteraceaeplucheeae) no estado do rio grande do Sul, brasil**. Dissertação de mestrado, 2008.

LUNA, JOSIANE, **Estudo de plantas bioativas**. Tese de Doutorado, Recife março 2006.

MAÇANEIRO, JOÃO; VITORINO, MARCELO. **How to select potential species for ecological restoration of rain forest – SOUTHERN BRAZIL**. Applied Ecology and Environmental Research, junho 2017.

MACIEL, M; PINTO, A; VEIGA, V; GRYNBERG, N; ECHEVARRIA A, **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares**. Quím.Nova v.25 n.3 São Paulo maio 2002.

MAIQUE WEBER BIAVATTI, **Synergy: an old wisdom, a new paradigm for pharmacotherapy**, Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 45, n. 3, jul./sep., 2009 Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 45, n. 3, jul./sep., 2009.

MALVEZZI, C, K. **Atividade antimicrobiana de produtos naturais para obtenção de novos biofarmácos: estudo dos extratos brutos e suas associações**, Tese a escola de engenharia de Lorena, 2010.

MARCHETTI, O., MOREILLON, P., GLAUSER, M. P., BILLE, J., SANGLARD, D. **Potent synergism of the combination of fluconazole and cyclosporine in *Candida albicans*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 44, n. 9, p. 2373-2381, 2000.

MARTELLI, E, C; CAMARGO, M, C, G, D; VIEIRA, J; GANDRA, R, F, **Uso de substâncias bioativas como conservantes naturais em formas farmacêuticas: uma revisão**, Brazilian Journal of Health Review, Curitiba, v.4, n.2, p. 8120-8133 mar./apr. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE-MS, A. N. DE V. S.-A. **Farmacopeia Brasileira**, 6a edição. Farmacopeia Brasileira, 6a edição, v. 1, p. 60–69, 72–85, 2019.

MIRANDA. G.S; SANTANA, G.S; MACHADO, B.B; COELHO, F.P; CARVALHO, C.A, **Atividade antibacteriana in vitro de quatro espécies vegetais em diferentes graduações alcoólicas**. Rev. Bras. Plantas med. V.15 n. 1 Botucatu 2013.

MONGE, M.; SEMIR, J. (in memoriam) ***Pterocaulon* in Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB16278>>. Acesso em: 02 jun. 2022.

MOSTAFA, N. F., ELKENANY, R. M. AND YOUNIS, G. **Characterization of *Bacillus cereus* isolated from contaminated foods with sequencing of virulence genes in Egypt.** Brazilian Journal of Biology [online], v. 84, 2024.

MOTA, E. B. F. **Performance of natural extracts with antimicrobial affect on the conservation of whole-grain breads.** Dissertation, Mastes in nutrition and public health – Faculty off public healthy, USP, São Paulo, 2018.

MOURA, É. P., SCOTTI, L., **Estudo in silico de flavonoides e compostos análogos pertencentes à família Asteraceae contra a doença de Alzheimer,** dissertação universidade federal da Paraíba, 2021.

MUKHERJEE, P. K., SHEEHAN, D. J., HITCHCOCK, C. A., GHANNOUM, M. A. **Combination treatment of invasive fungal infections.** *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 18, n. 1, p. 163-194, 2005.

NAKAJIMA, J.; GUTIÉRREZ, D.G. *Stevia in Flora e Funga do Brasil.* Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB27400>>. Acesso em: 02 jun. 2022

NATARO JAMES P; KAPER JAMES B. **Diarrheogenic *Escherichia coli*,** *Clinical Microbiology Reviews*, American Society for Microbiology, Vol. 11, No. 1, 01 January 1998.

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically;** Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests;** Approved Standard— Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NIALL A. LOGAN, MARINA RODRÍGUEZ-DÍAZ. ***Bacillus spp. and Related Genera,*** January 2006.

NOGUEIRA, A, N; RENATA MACEDO, R, C, B DA S; RABELO, J, L, G; MENDONÇA, L, P, **Substâncias bioativas como conservantes naturais em alimentos,** 2019.

NOSTRO, A. et al. **Preservative properties of *Calamintha officinalis* essential oil with and without EDTA.** *Letters in Applied Microbiology*, v. 35, n. 5, p. 385–389, 2002.

OLIVEIRA, R. R.; LAGE, M. E.; NETO, O. J. C.; SALES, M. C. **Antioxidantes naturais em produtos cárneos.** *PUBVET*, v. 6, n. 10, 2012.

OSTROSKY, E. A. et al. ***Rubus rosaefolius* extract as a natural preservative candidate in topical formulations.** *AAPS PharmSciTech*, v. 12, n. 2, p. 732–737, 2011.

OWUSU-KWARTENG, J., WUNI, A., AKABANDA, F. ET AL. **Prevalence, virulence factor genes and antibiotic resistance of *Bacillus cereus sensu lato* isolated from dairy farms and traditional dairy products.** *BMC Microbiol* 17, 65; 2017.

- PEREIRA, F; SOUZA, L; GUILHERME, F; FREIRE, J; TELES, A, **Diversidade de Asteraceae em um campo de murundus no sudoeste de Goiás, Brasil.** Rodriguésia vol.70 Rio de Janeiro 2019.
- PORTILLO, A; VILA, R; FREIXA, B; FERRO, B; PARELLA, T; CASANOVA, J; CANIGUERAL, S, **Antifungal sesquiterpene from the root of *vernonanthura tweedieana*.** Journal of ethnopharmacology, v. 97, fevereiro de 2005.
- PRATES, M.V.; BLOCH-JÚNIOR, C. **Peptídeos antimicrobianos.** Biotecnology, v.23, p.30-36, 2001.
- ROQUE, NÁDIA; BAUTISTA, HORTENSIA, **Asteraceae caracterização e morfologia floral,** Salvador 2008.
- SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; ARAGON-ALEGRO, L.C.; MENDONÇA, M.B.O.C. **Estafilococos em alimentos.** Arquivos do Instituto Biológico. 77, n.3, p.545–554, 2010.
- SANTOS, ANDRÉ LUIS DOS ET AL. ***Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar.** Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial [online], v. 43, n. 6, pp. 413-423, 2007.
- SCOTT, E. M., TARIQ, V. N., McCRORY, R. M. **Demonstration of synergy with fluconazole and either ibuprofen, sodium salicylate, or propylparaben against *Candida albicans* in vitro.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Bethesda, v. 39, n. 12, p. 2610- 2614, 1995.
- SILVA, EN E DUARTE, **A *Salmonella Enteritidis* em Aves: Retrospectiva no Brasil.** Brazilian Journal of Poultry Science [online], v. 4, n. 2, pp. 85-100, 2002.
- SILVA, J. F. M.; FEITOSA, A. C.; RODRIGUES, R. M. ***Staphylococcus aureus* em alimentos. desafios - revista interdisciplinar da universidade federal do tocantins,** v. 4, n. 4, p. 15-31, 3 out. 2017.
- SOUSA, A; DIAZ, M; SALVATORE, A; BARDON, A; BORKOSKY, S; VERA, N, **Insecticidal affects of *vernonanthura nebularum* againts two economically important pest insects.** Saudi journal of biological sciences, v.26 julho 2019.
- TELES, D.G.; COSTA, M.M. **Estudo da ação antimicrobiana conjunta de extratos aquosos de Tansagem (*Plantago major* L., *Plantaginaceae*) e Romã (*Punica granatum* L., *Punicaceae*) e interferência dos mesmos na ação da amoxicilina in vitro,** 2014.
- VILEGAS, W.; BORALLE, N.; CABRERA, A.; BERNARDI, A. C.; POZETTI, G. L.; ARANTES, S. F. **Coumarins and a flavonoid from *Pterocaulon alopecuroides*.** Phytochemistry, v.38, p.1017-1019, 1995.
- WILLIAMSON, E. M. **Synergy and other interactions in phytomedicines.** Phytomedicine PubMed, 8, 401, 2001.