

---

## Biological and Phytochemical Study of the Leaves of *Verbesina macrophylla* (Cass.) S.F. Blake (Asteraceae)

### Estudo Biológico e Fitoquímico das Folhas de *Verbesina macrophylla* (Cass.) SFBlake (Asteraceae)

Received: 2023-11-15 | Accepted: 2023-12-18 | Published: 2023-12-22

---

#### **Ericlicia Doralice Amancio Bispo Deiró**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2294-6601>  
Universidade do Estado da Bahia – UNEB, Brasil  
E-mail: [clicia\\_ab@hotmail.com](mailto:clicia_ab@hotmail.com)

#### **Vera Lucia Costa Vale**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4055-5049>  
Universidade do Estado da Bahia – UNEB, Brasil  
E-mail: [vvale@uneb.br](mailto:vvale@uneb.br)

#### **Heiter V.M. Boness**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3556-540>  
Universidade Federal da Bahia – UFBA, Brasil  
E-mail: [heiter@ufba.br](mailto:heiter@ufba.br)

#### **Edson de Jesus Marques**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8371-6706>  
Universidade do Estado da Bahia – UNEB, Brasil  
E-mail: [marquesdj@gmail.com](mailto:marquesdj@gmail.com)

---

### ABSTRACT

*Verbesina macrophylla* is used in folk medicine to treat infections, inflammation and fever. This work aimed to evaluate the biological activity and phytochemistry of the species. Extracts in hexane, ethyl acetate and ethanol from the leaves of *V. macrophylla* revealed, using the microdilution method, activity against Gram positive bacteria (*B. cereus*, *S. aureus*, *B. subtilis* and *M. luteus*), with Inhibitory Concentration Minimum (MIC) between 500 µg/mL and 7.81 µg/mL. Fractionation of the extract in ethyl acetate resulted in 51 samples, all inactive for Gram-negatives. Four fractions showed activity against *C. albicans* and two against *A. niger*, at a concentration of 1000 µg/mL. Analysis of NMR data from fraction 19-20 revealed the presence of two isomers: (6-O-b-E-p-coumaroyl-4a-hydroxyeudesmane and 6-O-b-Z-p-coumaroyl-4a-hydroxyeudesmane), active for all Gram positive bacteria, bactericidal for *B. cereus* and *S. aureus*, with MIC between 2.5 and 3.9 µg/mL. The cytotoxicity test on red blood cells of the extracts showed slight hemolysis only for the hexane extract. The kinetic study of microbial growth of the Vm F19-20 fraction using the time-kill method revealed a dose-dependent effect for the *B. subtilis* strain.

**Keywords:** *Verbesina macrophylla*; medicinal plant; sesquiterpenes; herbal medicine.

---

## RESUMO

A *Verbesina macrophylla* é utilizada na medicina popular para tratar infecções, inflamações e febre. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade biológica e a fitoquímica da espécie. Os extratos em hexano, acetato de etila e etanol das folhas de *V. macrophylla*, revelaram, pelo método de microdiluição, atividade contra bactérias Gram positivas (*B. cereus*, *S. aureus*, *B. subtilis* e *M. luteus*), com Concentração Inibitória Mínima (CIM) entre 500 µg/mL e 7,81 µg/mL. O fracionamento do extrato em acetato de etila resultou em 51 amostras, todas inativas para as Gram-negativas. Quatro frações mostraram atividade contra *C. albicans* e duas para *A. niger*, na concentração de 1000 µg/mL. A análise de dados de RMN da fração 19-20 revelou a presença de dois isômeros: (6-O-b-E-p-coumaroyl-4a-hydroxyeudesmane e 6-O-b-Z-p-coumaroyl-4a-hydroxyeudesmane), ativa para todas as Gram positivas, bactericida para *B. cereus* e *S. aureus*, com CIM entre 2,5 e 3,9 µg/mL. O ensaio de citotoxicidade em hemácias dos extratos apontou ligeira hemólise apenas para o extrato hexânico. O estudo de cinética do crescimento microbiano da fração Vm F19-20 utilizando o método time-kill revelou efeito dose-dependente, para a cepa *B. subtilis*.

**Palavras-chave:** [1-5] *Verbesina macrophylla*; planta medicinal; sesquiterpenos; fitoterápico.

---

## INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas continuam sendo a principal causa de morbidade e mortalidade no mundo. O uso indiscriminado, sem orientação médica ou farmacêutica, de antibióticos pela população tem contribuído para a seleção dos microrganismos mais resistentes que surgem na natureza (Maddila e Hemalatha 2017). Substâncias obtidas de espécies nativas do Brasil, que apresentem atividade antimicrobiana e baixa toxicidade, podem se tornar uma alternativa viável para a prospecção de componentes químicos que possam aumentar o arsenal disponível para o controle de infecções microbianas (Costa et al. 2005).

As propriedades curativas dos constituintes das plantas advêm do sistema de defesa das mesmas, que é capaz de gerar compostos com variadas estruturas moleculares (Praddepa et al. 2014). De forma que o reino vegetal é uma inspiração para o desenvolvimento de novas drogas (Newman e Cragg 2012), que podem fornecer substâncias com variados efeitos farmacológicos (Wang et al. 2011; Yang et al. 2017).

As plantas da família Asteraceae são conhecidas pela ação antimicrobiana, anti-inflamatória, antiprotozoário e analgésico (Lorenzi e Matos 2021; Martinez et al. 2020). O gênero *Verbesina* um dos maiores da família Asteraceae com cerca de 300 espécies (Karis e Ryding 1994), tem sido amplamente utilizado na medicina tradicional para o tratamento de diversas enfermidades (Mora et al. 2013). A espécie *Verbesina macrophylla* por exemplo possui indicação popular no tratamento de infecções,

problemas renais e febre (Bohlmann et al. 1980). Dessa espécie já foram isolados terpenos, monoterpenos e sesquiterpenos (Bohlmann et al. 1980; Maia et al. 2011; Bezerra et al. 2018; De Veras et al. 2021). Segundo Lorenzi e Matos (2021), os terpenos são os principais responsáveis pelos efeitos antisséptico, anti-inflamatório, antipirético.

Diante do exposto, pode-se afirmar que a investigação de compostos terapêuticos alternativos oriundos de plantas medicinais é uma necessidade. Assim, o presente estudo teve como objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana, a toxicidade e traçar perfil químico dos componentes ativos.

## **Material e métodos**

### **Coleta do material vegetal**

O material botânico, (folhas) de *Verbesina macrophylla* (Cass.) Blake foi coletado em agosto de 2021 no município de Alagoinhas – Bahia, em área da Universidade do Estado da Bahia (UNEB) – Campus II. A identificação foi realizada pela taxonomista professora Dra. Gracineide Selma Santos de Almeida. Uma exsicata da espécie coletada fora preparada e tombada no Herbário HUNEB da Universidade do Estado da Bahia sob o número de registro N° 14858.

### **Preparação do material vegetal**

As folhas foram desidratadas em estufa com ar circulante a uma temperatura média de 40°C durante cinco dias, após a completa secagem foram trituradas. O material vegetal foi submetido à extração a frio usando hexano, acetato de etila e etanol em ordem crescente de polaridade. As soluções extrativas foram filtradas e concentradas com o auxílio do evaporador rotativo a temperatura média de 45°C. Após a completa evaporação dos solventes foram obtidos os extratos brutos hexânico, acetato de etila e etanólico.

### **Análises cromatográficas**

O fracionamento do extrato em acetato de etila se deu através de cromatografia em coluna empregando como fase estacionária Sílica Gel 60 (MACHEREY – NAGEL) (partículas com 0,063-0,2mm/ 70-230 mesh) e para a fase móvel os solventes hexano, acetato de etila e metanol de forma isolada ou em sistemas com gradiente crescente de polaridade.

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

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

### **Caracterização estrutural dos constituintes químicos**

Para a obtenção dos espectros de RMN foram utilizados espectrômetros VARIAN-NMR-SYSTEM 500 MHz. O solvente empregado para a dissolução das amostras foi o Clorofórmio Deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ).

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

### **Avaliação da atividade antimicrobiana**

Os extratos em hexano, acetato de etila, etanol e as frações oriundas do extrato em acetato de etila foram testados contra cepas de bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 1024, *Bacillus cereus* CCT 0096 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538) e bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 94863 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619). Cepas de isolados fúngicos clínicos de (*Aspergillus niger* ATCC 16404, *Candida glabrata* ATCC 00720 e *Candida albicans* ATCC 18804), obtidos da American Type Culture Collection e Coleção de Culturas Tropical. O meio de cultivo empregado para as bactérias foi o Nutriente Broth e para os fungos Caldo de levedura e Malte/Caldo de Malte. A suspensão microbiana foi preparada de acordo com a turbidez de uma solução de Sulfato de Bário ( $\text{BaSO}_4$ ), correspondente a 0,5 na escala de McFarland, e diluída em meio de cultivo.

O método utilizado para a realização dos ensaios de atividade antimicrobiana foi a técnica de microdiluição em caldo, em Placas de Elisa de 96 poços, seguindo as diretrizes do Clinical and laboratory standards institute (CLSI) (Cockerill et al. 2012). A solução estoque de cada extrato, foi preparada em uma concentração de 2000  $\mu\text{g/mL}$  em Dimetil Sulfóxido (DMSO) a 20% v/v. Todos os testes foram em triplicata, entre as concentrações de 500 e 3,9  $\mu\text{g/mL}$ . Como controle positivo foram utilizados o antibiótico Cloranfenicol para as bactérias e ciclopiroxolamina 500  $\mu\text{g/mL}$  para os fungos. O DMSO a 5 % v/v em água destilada foi utilizado como controle negativo.

As placas foram incubadas por 24/48 h a 37°C para as bactérias e fungos, respectivamente. A concentração inibitória mínima (MIC) foi interpretada como a menor

concentração do agente antimicrobiano que inibiu completamente o crescimento dos microrganismos nos poços, conforme detectado a olho nu, observando a turvação dos poços (Cockerill et al. 2012), bem como através do teste do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (Mosmann 1983).

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

A determinação da atividade hemolítica foi realizada conforme a metodologia da Farmacopeia Brasileira (2010). Os extratos em Hexano e Acetato de Etila foram testados nas concentrações de: 10, 100 e 1000 µg/mL, a uma suspensão a 2% com sangue de carneiro desfibrilado (Laborclin ®). O grau de hemólise foi qualitativamente avaliado pelo tom avermelhado no sobrenadante obtido após centrifugação. Foram atribuídos símbolos à intensidade de hemólise, onde uma cruz (+) indica ligeira hemólise, duas (++) significativa hemólise e três (+++) indica que houve hemólise intensa. Nesse ensaio foi utilizada água destilada como controle positivo enquanto solução salina e dimetilsulfóxido (DMSO) como controle negativo.

#### **Cinética do crescimento microbiano (time-kill).**

Os procedimentos realizados neste experimento, foram de acordo a metodologia descrita por Klepser et al. (1998). Os dados obtidos foram para *B. subtilis* com base nas unidades formadoras de colônias (UFC), para a fração Vm-F19-20, nas concentrações de 10, 100, e 1000 µg/ml/24 h. A curva de cinética de crescimento microbiana foi plotada pelo log<sub>10</sub> UFC/mL em função das concentrações. Os dados obtidos foram tratados no software GraphPadPrism 5.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Atividade antibacteriana**

A Tabela 1 mostra que os extratos em hexano e acetato de etila foram ativos contra as cepas de bactérias Gram positivas: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus* com concentrações inibitórias mínimas que variaram entre 500 µg/mL e 31,25 µg/mL. Quanto ao extrato etanólico, seu efeito pôde ser observado frente *B. cereus* e *B. subtilis* em uma concentração de 500 µg/mL, e contra a Gram-positiva *Micrococcus luteus*, com CIM de 7,81 µg/mL. Os microrganismos que apresentaram suscetibilidade a estes extratos são potencialmente patogênicos ao homem e tidos como agentes responsáveis por quadros infecciosos comuns. Segundo a classificação de Aligianis et al. (2001) os três extratos testados possuem uma forte inibição frente as bactérias que apresentaram sensibilidade aos mesmos.

Tabela 1. Atividade antibacteriana dos extratos em hexano, acetato de etila e etanol das folhas de *Verbesina macrophylla* (Vm).

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

(µg) Microgramas; (mL) mililitros; (>) maior que; (EtOAc) acetato de etila.

Os resultados encontrados neste trabalho, corroboram com os dados relatados por De Veras et al. (2021), para o óleo essencial das folhas de *V. macrophylla* frente a *S. aureus*, com CIM de 512 µg/mL, enquanto neste estudo os valores variaram entre 500 µg/mL para o extrato em etanol e 250 µg/mL em hexano. Em consonância a esses dados, outras espécies do gênero *Verbesina* também apresentaram atividade frente *S. aureus*: *V. negrensis* (Mora et al. 2015) e *V. encelioides* (Toribio et al. 2005; Toribio et al. 2012). A ausência de inibição do crescimento das bactérias *P. aeruginosa* e *E. coli* quando expostas aos extratos vegetais testados, pode ser explicada segundo Contrucci et al. (2019), pela menor susceptibilidade das bactérias Gram-negativas à ação dos antimicrobianos, o que evidencia um grande desafio para a saúde coletiva.

#### Atividade Antifúngica

Os extratos brutos em hexano, acetato de etila e etanol testados contra fungos oportunistas de importância clínica não apresentaram potencial antifúngico em concentrações até 500 µg/mL.

Não foram encontrados na literatura registros da atividade antifúngica de extratos brutos de *Verbesina macrophylla*, para que fossem comparados com o presente estudo. No entanto, De Veras et al. (2021), descrevem que o óleo essencial de *V. macrophylla* possui atividade antifúngica frente *Candida albicans*, relatando a presença de substâncias tais como germacreno D, biciclogermacreno e cariofileno constituindo o óleo essencial. Dados da literatura revelam uma variedade de extratos vegetais com ação anti-*Candida*, de plantas pertencentes à família Asteraceae (Guarim Neto e Moraes 2003).

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

O extrato acetato de etila (EtOAc) demonstrou consistente atividade antibacteriana no ensaio biológico preliminar, conforme pode ser ilustrado na Tabela 1, também apresentou o maior rendimento quando comparado aos demais extratos produzidos, rendeu 18,95 gramas, enquanto o hexânico pesou 8,41g e o etanólico 2,35 g. Esses dados fundamentaram a escolha do extrato EtOAc para que fosse realizado o fracionamento cromatográfico. O fracionamento resultou em 51 amostras, que foram analisadas através da técnica de cromatografia em camada delgada (CCD). As frações que apresentaram o mesmo deslocamento químico (RF) em CCD foram agrupadas (Tabela 2).

Tabela 2: Dados do fracionamento cromatográfico do extrato acetato de etila obtido de *Verbesina macrophylla*.

Fração (Vm)	mg	Fração	Mg
<b>F1</b>	72,7	<b>F33</b>	16,3
<b>F2 - 6</b>	196	<b>F34</b>	10,2
<b>F7 - 9</b>	2034	<b>F35</b>	8,5
<b>F10</b>	230	<b>F36</b>	9,0
<b>F11 - 12</b>	1328	<b>F37</b>	8,9
<b>F13 - 14</b>	453,2	<b>F38</b>	8,4
<b>F15 - 16</b>	376	<b>F39</b>	11,0
<b>F17 - 18</b>	1744,1	<b>F40</b>	10,6
<b>F19 - 20</b>	1841	<b>F41</b>	12,2
<b>F21 - 22</b>	736,4	<b>F42</b>	10,8
<b>F23 - 24</b>	698,6	<b>F43</b>	127,2
<b>F25</b>	356,4	<b>F44</b>	1914,8
<b>F26</b>	1325,7	<b>F45</b>	237,8
<b>F27</b>	534	<b>F46</b>	24,9
<b>F28</b>	137,1	<b>F47</b>	8
<b>F29</b>	36,4	<b>F48</b>	3,9
<b>F30</b>	21,4	<b>F49</b>	3,5
<b>F31</b>	21,3	<b>F50</b>	2,3
<b>F32</b>	14,8	<b>F51</b>	1,6

(VM) *Verbesina macrophylla*; (F) Fração; (mg) miligrama.

### Atividade antibacteriana das frações

Assim como no extrato bruto a ação antimicrobiana das frações (Tabela 3) se manifesta somente contra as bactérias Gram-positivas. Sendo *M. luteus* a bactéria mais suscetível, pois 17 frações inibiram seu crescimento. Os microrganismos *B. cereus* e *B. subtilis* foram sensíveis à 11 frações, enquanto *S. aureus* apenas a três. Seguindo o critério de classificação de CIM proposto por Webster et al. (2008), esse valor é considerado satisfatório.

Tabela 3: Atividade antibacteriana das frações do extrato acetato de etila, da *Verbesina macrophylla* (1000 µg/mL).

Fração (Vm)	Gram-positivas			
	<i>B.cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>
<b>F1</b>	-	-	-	+
<b>F2 - 6</b>	+	+	+	+
<b>F7 - 9</b>	-	-	-	+
<b>F10</b>	+	-	+	+
<b>F11 - 12</b>	+	-	+	+
<b>F13 - 14</b>	+	-	+	+
<b>F15 - 16</b>	+	-	+	+
<b>F17 - 18</b>	+	+	+	+
<b>F19 - 20</b>	+	+	+	+
<b>F21 - 22</b>	+	-	+	+
<b>F23 - 24</b>	+	-	+	+
<b>F25</b>	+	-	+	+
<b>F26</b>	+	-	-	+
<b>F27</b>	-	-	-	+
<b>F28</b>	-	-	-	-
<b>F29</b>	-	-	-	+
<b>F30</b>	-	-	-	-
<b>F31</b>	-	-	-	+
<b>F32</b>	-	-	+	-
<b>F33</b>	-	-	-	+

(Vm)*Verbesina macrophylla*; (µg) Microgramas; (mL) mililitros;(F) fração;(+) presença de atividade; (-) ausência de atividade.

Como mostra a Tabela 3, as primeiras frações foram as mais ativas, esse fato indica que os componentes responsáveis pela ação antimicrobiana podem ser extraídos em baixa polaridade. As frações mais polares, a partir de F34, não apresentaram atividade. Todas testadas para 1000 µg/mL.

De acordo Bresciana et al. (2004), e Carvalho et al. (2001), solventes apolares como o hexano possibilitam a extração de grupos esteróides (estigmastero, sistosterol), cumarínicos, ésteres do ácido oleanóico, lactonas sesquiterpênicas e terpenóides (ácidos caurânicos). Nesse sentido vale ressaltar que alguns desses grupos já foram relatados em estudos fitoquímicos da espécie *Verbesina macrophylla*. Além disso, a literatura científica menciona, que diversos microrganismos são inibidos pela atuação de terpenos, cujo mecanismo de ação dessa atividade não está completamente elucidado, no entanto acredita-se que a ruptura da membrana celular por compostos lipofílicos pode estar envolvida nesse processo (Cowan1999; Dorman e Deans 2000; Wilkens 2002).

Não foi observada ação antimicrobiana contra as bactérias *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Esse fato pode ser justificado em virtude da membrana externa

das bactérias Gram-negativas apresentarem uma barreira à penetração de muitas moléculas de antibióticos, e o espaço periplasmático englobar enzimas, que tem capacidade de lisar moléculas estranhas inseridas neste espaço (Duffy e Power 2001; Sartori et al. 2003).

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

A Tabela 4 demonstra os resultados da Concentração Inibitória Mínima encontrada para as frações Vm-F17-18 e Vm-F19-20 de *Verbesina macrophylla*, frente cepas bacterianas Gram-positivas. Essas frações apresentam nos espectros de RMN de  $H^1$  um padrão semelhante, com maior grau de pureza para F19-20 e mesmo grau de inibição da atividade antimicrobiana, para as Gram positivas, com CIM variando entre 2,5 e 3,9  $\mu\text{g/mL}$ . Para *S. aureus* e *B. cereus*, o resultado superou a atividade do antibiótico padrão utilizado no teste.

Tabela 4: Concentração inibitória mínima (CIM) em  $\mu\text{g/mL}$  das frações ativas Vm-F17-18 e Vm-F19-20, obtidas do extrato acetato de etila, oriundo de *Verbesina macrophylla* frente a bactérias Gram-positivas.

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

( $\mu\text{g}$ ) Microgramas; (mL) mililitros; (>) maior que; (Clr) Cloranfenicol.

Estes resultados corroboram com dados de estudos realizados anteriormente para outras espécies da família Asteraceae, onde as frações mais apolares mostraram atividade contra bactérias Gram positivas (De Abreu e Onofre 2010; De Matos 2001; Da Silva et al. 2002).

Através da análise dos dados de RMN das frações Vm-F17-18 e Vm-F19-20 (Tabela 6) foi possível sugerir que 70% da composição, de cada uma das frações, é do terpeno 6-O-b-E-p-coumaroyl-4a-hydroxyeudesmane (Vm A), anteriormente relatado por Bohlmann et al. (1980), e depois por Maia (2011), e 25 % pelo composto 6-O-b-Z-p-coumaroyl-4a-hydroxyeudesmane (Vm B) (Figura 16), descrito antes apenas por Maia (2011). Assim, esse é o segundo relato dessa substância na espécie *Verbesina*

*macrophylla* e o terceiro de seu isolamento na literatura. Anteriormente o composto havia sido isolado apenas da espécie *Verbesina virginica* (Xu et al. 2010).

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

Avaliações da atividade antimicrobiana como bactericida ou bacteriostática (Walsh 2003), feitas a partir de alíquotas de poços que apresentaram inibição inoculadas em placas com agar Muller, mostram que as frações foram bactericidas para *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* e bacteriostática para *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus*.

#### **Atividade antifúngica das frações**

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados obtidos para a atividade antifúngica das frações de *V. macrophylla*. É notável que o fungo leveduriforme *Candida glabrata* foi a única cepa fúngica não suscetível a nenhuma das frações testadas. Vm-F1 e Vm-F2-6 apresentaram atividade frente *C.albicans* e *A. niger*, enquanto Vm-F7-9 e Vm-F10 foram ativas apenas para *C. albicans*. A inibição das frações é considerada satisfatória (Webster et al. 2008). As demais (Vm-F11... Vm-F47) não inibiram o crescimento dos fungos em uma concentração de 1000 µg/mL

Tabela 5: Atividade antifúngica das frações do extrato acetato de etila da *Verbesina macrophylla* (1000 µg/mL)

Fração	Leveduriformes		Filamentoso
	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<b>F1</b>	+	-	+
<b>F2 - 6</b>	+	-	+
<b>F7 - 9</b>	+	-	-
<b>F10</b>	+	-	-

(F) fração; (+) presença de atividade; (-) ausência de atividade.

O aparente contraste entre a atividade antifúngica das frações, em relação ao extrato bruto está em consonância com o raciocínio de Cechinel Filho et al. (2001), e Malheiros et al. (2001), no extrato bruto, uma mistura complexa, componentes ativos podem estar em menor proporção ou sofrerem ação de antagonistas no meio.

Outra importante observação a ser feita é que dentre todas as frações testadas, apenas quatro frações apresentaram atividade antifúngica, enquanto 12, demonstraram ação antibacteriana. Ao comparar esses resultados, constata-se que o número de frações ativas para as bactérias é três vezes maior que para os fungos. Essa discrepância pode ser observada também no caso de drogas antimicrobianas já disponíveis no mercado (Silva 2016; Góes 2009).

Os dados de RMN de  $H^1$  dessas frações ativas contra os fungos são sugestivos para componentes do tipo ácido graxo. Diversos ácidos graxos são conhecidos por apresentar propriedades antimicrobianas (Kabara 2008). No entanto, esse estudo relata pela primeira vez a atividade antifúngica de ácidos graxos presentes em *Verbesina macrophylla*.

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

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

A toxicidade dos extratos sobre as hemácias, hemólise (+) foi observada apenas para o extrato hexânico, em sua maior concentração (1000 µg/mL). Não foram encontrados na literatura, dados sobre a atividade citotóxica em extratos vegetais de *Verbesina macrophylla*, no entanto, o estudo do óleo essencial desta espécie realizado por De Veras et al. (2021), demonstrou que em todas as concentrações testadas houve segurança para seu uso como droga, sendo a hemólise inferior a 5%.

Outros achados em relação a extratos de espécies com propriedades terapêuticas pertencentes à família Asteraceae demonstraram não serem tóxicos nos modelos utilizados: *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) (Paula et al. 2014); *Praxelis clematidea* (Pereira 2022); *Baccharis dracunculifolia* (Da Silva Filho et al. 2009) *Arctiumlappa*, *Mikaniaglomerata* (De Haro Moreno 2018).

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

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

A avaliação da cinética de morte de F19-20 sobre a cepa do *Bacillus subtilis* mostra uma relação dose dependente (Gráfico 1). Apresentando IC50 de 9,9 mg /mL, para um período de 24h.

Não foram encontrados na literatura estudos que avaliaram parâmetros de crescimento microbiano relacionado à eficiência antimicrobiana de um extrato bruto ou fração extraída de *Verbesina macrophylla*. Apesar da escassez de dados para a esse tipo de estudo, o resultado do teste mostra-se promissor, uma vez que existe a possibilidade de em associação com um antibiótico padrão a atividade antibacteriana ser potencializada.

Nesse contexto, é relatado por Stefanovic et al. (2012), que substâncias diferentes combinadas aumentam as chances de conter uma infecção, e que a utilização de extratos de espécies vegetais bioativas, derivados semissintéticos e substâncias puras isoladas

ampliam a eficácia *in vitro* de antimicrobianos empregados contra uma diversidade de microrganismos.

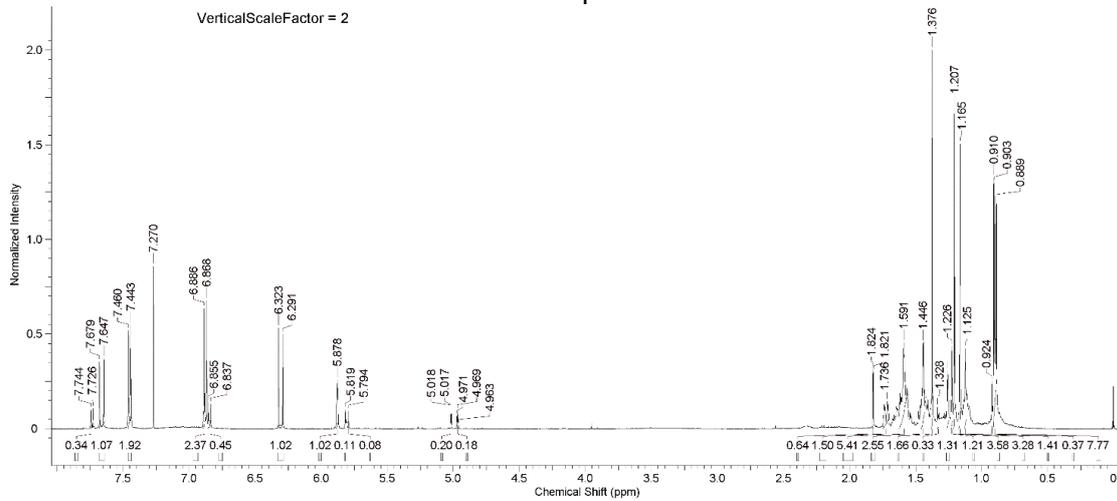
Dutra (2016), demonstrou em seus estudos que combinações dos extratos metanólicos de *P. granatum*, *P. guajava* e *A. occidentale* associados a antibióticos padronizados apresentaram uma potencialização do efeito antimicrobiano contra a bactérias Gram-positivas, sugerindo uma ação sinérgica entre eles.

Diante dessa possibilidade, e dos resultados promissores obtidos no teste pode-se sugerir que novos estudos da fração Vm-F19-20 de *Verbesina macrophylla*, devem ser realizados.

### **Caracterização dos constituintes químicos da *Verbesina macrophylla* (F19-20)**

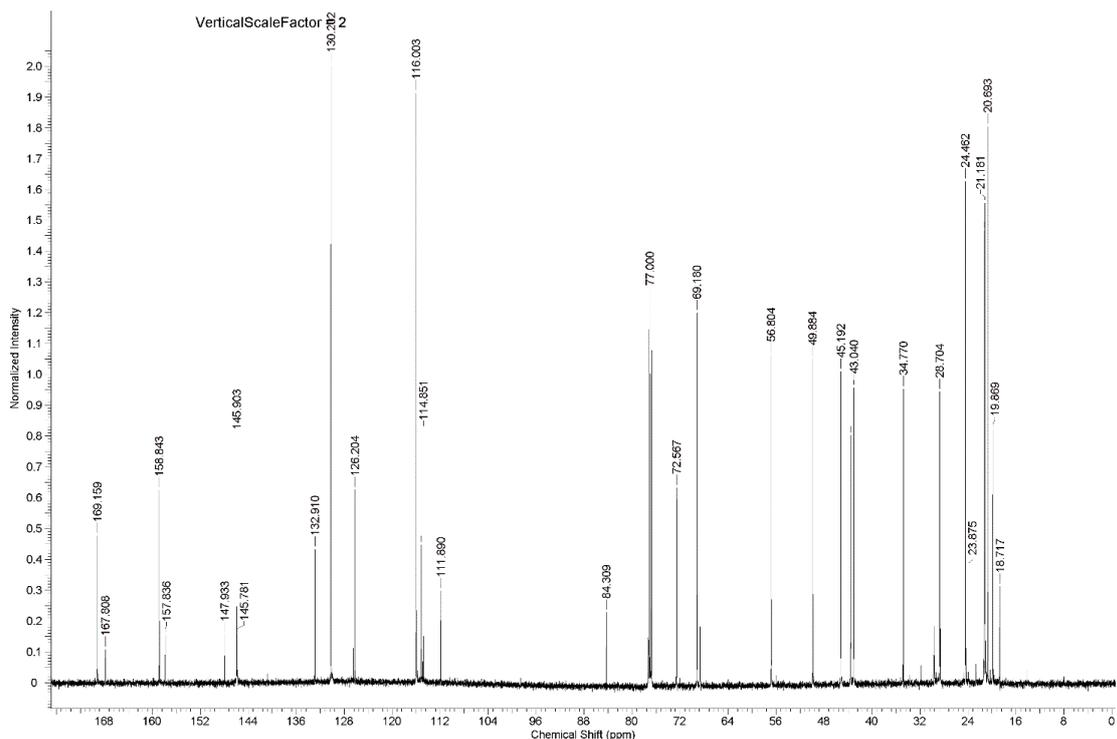
O espectro de RMN H1 (Fig.1) da fração Vm-19-20 apresenta um conjunto de sinais, característicos da presença de componente aromático e de dupla olefínica como parte estrutural dos constituintes moleculares, localizados entre  $\delta$  5, 80 e 7, 65 ppm. Entre eles observa-se que há uma diferença de intensidade. A integração dos sinais revelou que o componente majoritário corresponde a aproximadamente 70% da amostra, caracterizada pelos seguintes sinais: 7,65 (d) integrando para 1H( 16,0 Hz); 7,45 (d), integrando para dois H (8,5 Hz); 6,87d (8,5Hz, 1H); 6,32 d (16,0 Hz); 5,87 sl e o de menor proporção, próximo de 30%, pelos sinais: 7,73 d, integrando para 1H(12,0 Hz); 6,88 (d), integrando para dois H (8,5 Hz); 6,84d (8,5Hz, 1H); 5,80 d (12,0 Hz); 5,81 sl. Na região de menor proteção entre  $\delta$  0,88 e 1,82 um conjunto de sinais característicos de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos que sugerem a presença de um grupamento com esqueleto terpênico.

**Fig.1** Espectro de RMN de  $H^1$  da fração (Vm-F19-20) do extrato em acetato de etila de *Verbesina macrophylla* (Vm). Os dados espectrais foram adquiridos em espectrômetro Varian INOVA 500, operando a 500 MHz para o  $H^1$  e a 125 MHz para o  $C^{13}$ .

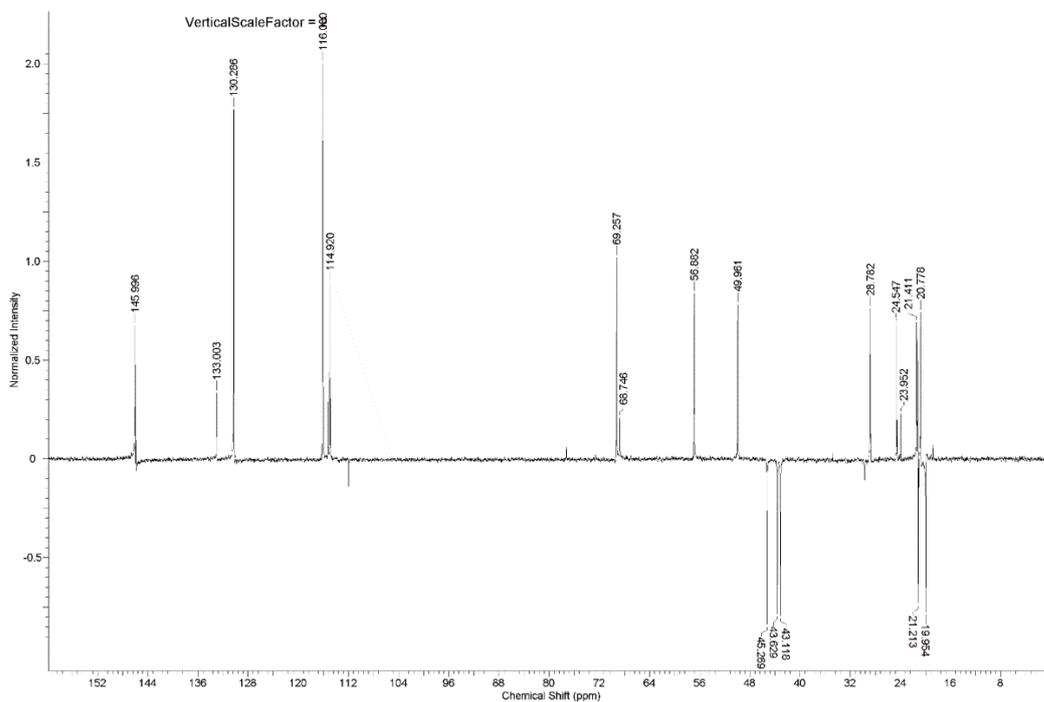


No espectro de RMN  $C^{13}$  (125 MHz,  $CDCl_3$ ) (Fig. 2), verificou-se a presença de 56 sinais. Os quais, em comparação com espectro de DEPT (Fig.3), permitiram determinar a presença de 11 sinais referentes a carbonos não hidrogenados, 11 de carbonos metínicos, 13 metilênicos e 07 metílicos.

**Fig.2** Espectro de RMN de  $C^{13}$  da fração (Vm-F19-20) do extrato em acetato de etila de *Verbesina macrophylla* (Vm). Os dados espectrais foram adquiridos em espectrômetro Varian INOVA 500. Operando a 125 MHz.

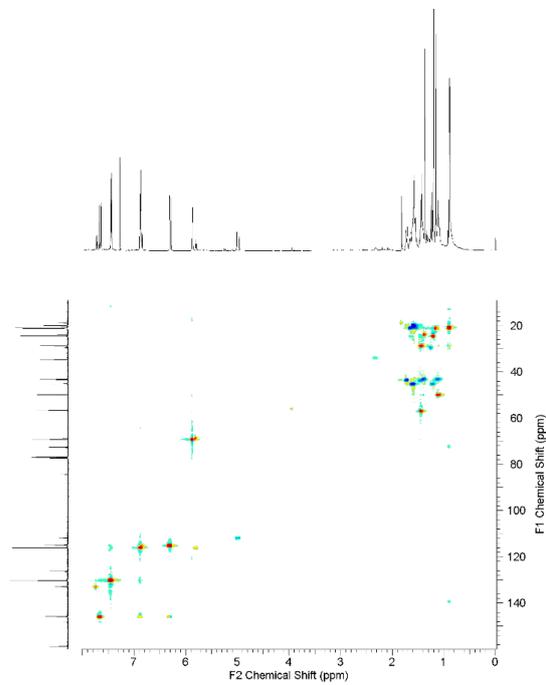


**Fig.3** Espectro de RMN de DEPT da fração (Vm-F19-20) do extrato em acetato de etila de *Verbesina macrophylla* (Vm). Os dados espectrais foram adquiridos em espectrômetro Varian INOVA 500. Operando a 125 MHz.



A análise dos dados da Tabela 6, juntamente com as correlações observadas nos espectros de HSQC / HMBC (Fig. 4 e 5, respectivamente) e pela comparação com a literatura (Tabela 6), (Bohlman et al. 1980; Xu et al. 2010) permitiram sugerir que a fração Vm-F9-20 se trata de uma mistura dos isômeros 6-O- $\beta$ -E-p-cumorail-4 $\alpha$ -hidroxieudesmano (Vm-A), com aproximadamente 70% e do 6-O- $\beta$ -Z-p-cumorail-4 $\alpha$ -hidroxieudesmano (Vm-B) com aproximadamente 30% (F. 6).

**Fig.4** Espectro de RMN de HSQC da fração (Vm-F19-20) do extrato em acetato de etila de *Verbesina macrophylla* (Vm). Os dados espectrais foram adquiridos em espectrômetro Varian INOVA 500. Operando a 125 MHz.



**Fig.5:** Espectro de RMN de HMBC da fração (F19-20) do extrato em acetato de etila de *Verbesina macrophylla* (Vm). Os dados espectrais foram adquiridos em espectrômetro Varian INOVA 500. Operando a 125 MHz.

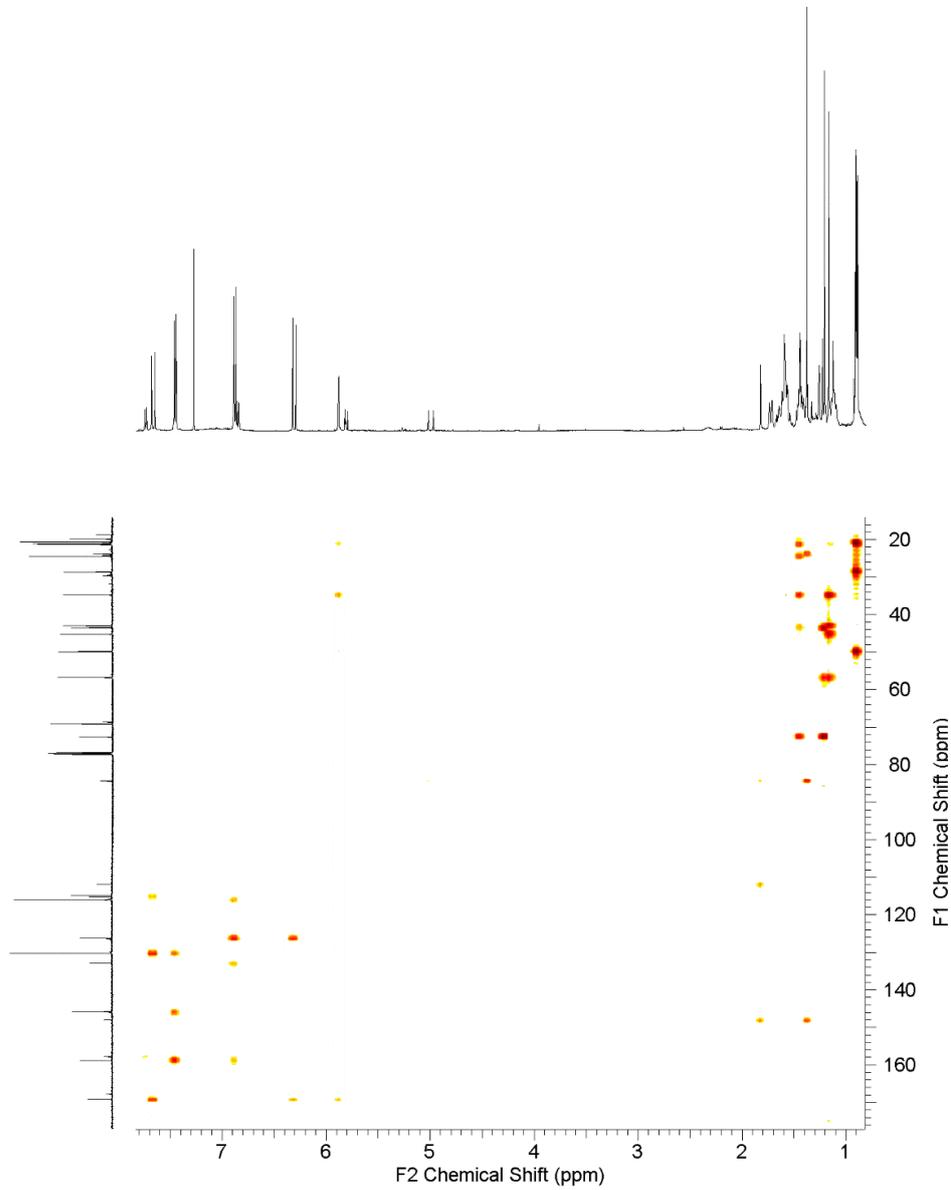
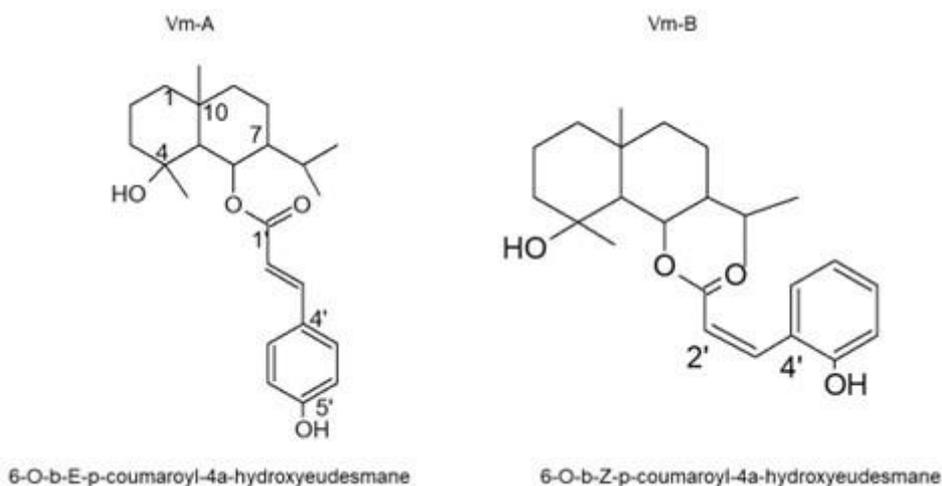


Tabela 6: Dados espectrais de RMN de H<sup>1</sup>, C<sup>13</sup> e HMBC dos componentes da fração (Vm-F19-20) do extrato em acetato de etila de *Verbesina macrophylla* (Vm) em comparação com dados da literatura

Sample data					(Bohlmann 1980) / (Xu et al. 2010).		
A			B		A		B
C	C <sup>13</sup>	H <sup>1</sup>	C <sup>13</sup>	H <sup>1</sup>	C <sup>13</sup>	H <sup>1</sup>	C <sup>13</sup>
1	45.19	1.57	45.19		45.5		45.5
2	19.86	1.86	19.84		20.1		20.1
3	43.04	1.72	43.04		43.9	1.69	43.9
4	72.56	----	72.75	-----	72.7	-----	72.7
5	56.80	1.44 m	56.74	1.37	57.1	1.43 m	57.1
6	69.18	5.86 br	68.66		68.9	5.86 br	68.9
7	49.88	1.11	49.85		50.1		50.1
8	21.12	1.48	21.01		21.2		21.2
9	43.56	1.44	43.56		43.3		43.3
10	34.77	---	34.83	-----	35.0	-----	35.0
11	28.90	1.44 m	28.63		28.8	1.43 m	28.8
12	21.33	0.90 d	21.23		21.5	0.92 d	21.5
13	21.18	0.89 d	21.12		21.4	0.90 d	21.4
14	20.69	1.15 s	20.65		20.8	1.16 s	20.8
15	24.46	1.20 s	24.37		24.5	1.19 s	24.5
1'	169.15	----	167.80	-----	168.0	-----	168.0
2'	114.85	6.30 d [16.0Hz]	115.16	5.78 d [12.0Hz]	115.4	6.31 d	115.4
3'	145.90	7.65 d [16.0Hz]	145.70	6.86 d [12.0Hz]	146.1	7.65 d	146.1
4'	126.20	---	126.49	-----	126.5	-----	126.5
5'	116.02	7.44 d [8.5Hz]	115.16	7.72 [8.5Hz]	115.9	7.46 d	115.9
6'	130.20	6.88 d [8.5Hz]	132.91	6.85 [8.5Hz]	133.2	6.85 d	133.2
7'	158.84	----	157.83	-----	157.8	-----	157.8
8'	130.20	6.88 d [8.5Hz]	132.91	6.85 [8.5Hz]	133.2	6.85 d	133.2
9'	116.02	7.44 d [8.5Hz]	115.16	7.72 [8.5Hz]	115.9	7.46 d	115.9

Fig. 6: Componentes majoritários da fração (F19-20) do extrato em acetato de etila de *Verbesina macrophylla* (Vm).



## CONCLUSÃO

Os extratos da *Verbesina macrophylla* apresentaram atividade apenas contra bactérias Gram-positivas. O Fracionamento do extrato em acetato de etila permitiu revelar a presença de constituintes com atividade antifúngica nas frações de menor polaridade e a separação de um mistura dos isômeros, já descritas na literatura, a (6-O-b-E-p-coumaroyl-4a-hydroxyeudesmane e 6-O-b-Z-p-coumaroyl-4a-hydroxyeudesmane), que se revelaram com um bom potencial bactericida para *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* com dose de inibição inferior ao do clorofenicol, e bacteriostático para *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus*. O potencial antimicrobiano revelado pelos extratos e sua baixa toxicidade justificam a continuidade dos estudos com essa espécie.

## REFERÊNCIAS

Al-Dabbas MM, Hashinaga F, Abdelgaleil SA, Suganum T, Akiyama K, Hayashi H (2005). Antibacterial activity of an eudesmane sesquiterpene isolated from common Varthemia, *Varthemia iphionoides*. *Journal of ethnopharmacology*, 97(2), 237-240. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.11.007>

Aliogiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(9), 4168-4170. <https://doi.org/10.1021/jf001494m>

Bezerra LDA, Mangabeira PAO, de Oliveira RA, Costa LCDB, Da Cunha M (2018). Leaf blade structure of *Verbesina macrophylla* (Cass.) FS Blake (Asteraceae): ontogeny, duct secretion mechanism and essential oil composition. *Plant Biology*, 20(3), 433-443. <https://doi.org/10.1111/plb.12700>

Bohlmann F, Grenz M, Gupta RK, Dhar AK, Ahmed M, King RM, Robinson H (1980). Eudesmane derivatives from *Verbesina* species. *Phytochemistry*, 19(11), 2391-2397. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)91034-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)91034-3)

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

Bresciana LFV, Yunes RA, Bürger C, De Oliveira LE, Bóf KL, Cechinel-Filho V (2004). Seasonal variation of kaurenoic acid, a hypoglycemic diterpene present in *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae). *Zeitschrift für Naturforschung C*, 59(3-4), 229-232. <https://doi.org/10.1515/znc-2004-3-419>

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

Carvalho GJAD, Carvalho MGD, Ferreira DT, Faria TDJ, Braz-Filho R (2001). Diterpenos, triterpenos e esteróides das flores de *Wedelia paludosa*. *Química Nova*, 24, 24-26. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422001000100006>

Cechinel V, Yunes RA (2001). Estudo químico de plantas medicinais orientado para análise biológica. *Obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos*. Chapecó: Argos Editora Universitária. 523p.

Cockerill FR, Wikler MA, Alder J, Dudley MN, Eliopoulos GM, Ferraro MJ, Hardy DJ, Hecht DW, Hindler JA, Patel JB, Powell M, Swenson JM, Thomson RB, Traczewski MM, Turnidge JD, Weinstein, MP, Zimmer BL (2012). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard — ninth Edition. In: *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard- Ninth Edition*, vol. 32. Issue 2

Contrucci BA, Silva R, Junior RA, Kozusny-Andreani DI (2019). Efeito de óleos essenciais sobre bactérias gram-negativas isoladas de alimentos. *Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde*, 23(3), 180-184. <https://doi.org/10.17921/1415-6938.2019v23n3p180-184>

Costa JGM, Rodrigues, FFG, Angélico EC, Silva MR, Mota ML, Santos NKA, Lemos, TLG (2005). Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzygium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15, 304-309. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2005000400008>

Cowan MM (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582. <https://doi.org/10.1128/cmr.12.4.564>

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

Da Silva Filho AA, Resende DO, Fukui MJ, Santos FF, Pauletti PM, Cunha WR, Nanayakkara NPD (2009). In vitro antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). *Fitoterapia*, 80(8), 478-482. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.06.007>

Da Silva RZ, Da Silva MZ, Leal LDF, YUNES R, MIGUEL O, CECHINEL FILHO V (2002). Investigação fitoquímica e avaliação da atividade antibacteriana da *Mikania lanuginosa* DC (Asteraceae). *Visão acadêmica*, 3(2).

De Abreu PAP, Onofre SB (2010). Atividade antimicrobiana dos extratos de *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). *Sabios-Revista de Saúde e Biologia*, 5(2).

De Haro Moreno A, Possebon L, Sant'ana M, Souza HR, Pilon MMI, Girol AP (2018). Avaliação da atividade antimicrobiana e citotoxicidade hemolítica em diferentes extratos vegetais. *Arquivos de Ciências Da Saúde*, 25(1), 11-12. <https://doi.org/10.17696/2318-3691.25.1.2018.1172>

De Matos Volpato AM, De Moura Rios E, Miguel MD, Sander PC, Miguel OG (2001). Investigação da atividade antibacteriana de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). *Visão Acadêmica*, 2(1).

de Veras BO, de Oliveira JRS, de Menezes Lima VL, Navarro DMDAF, de Oliveira Farias JCR, de Medeiros Moura GM, de Souza Lopes AC (2021). The essential oil of the leaves of *Verbesina macrophylla* (Cass.) SF Blake has antimicrobial, anti-inflammatory and antipyretic activities and is toxicologically safe. *Journal of Ethnopharmacology*, 265, 113248. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113248>

Dorman HD, Deans SG (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88(2), 308-316. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x>

Duffy CF, Power RF (2001). Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. *International journal of antimicrobial agents*, 17(6), 527-530.

Dutra FSG, de Almeida Carlos L, da Motta OV, Vianna AP, Pereira SMF (2016). Atividade antimicrobiana de extratos vegetais frente à bactérias de importância médica. *Biológicas & Saúde*, 6(20).

Goes VFF (2009). 141p. *Ação de extratos, óleos essenciais e frações isoladas de plantas Mediciniais sobre a formação do biofilme em Candida ssp* (Doctoral dissertation, tese de doutorado]. São Paulo (SP): Unicamp).

Guarim Neto G, Morais RGD (2003). Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. *Acta Botanica Brasilica*, 17, 561-584. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062003000400009>

Kabara, JJ (2008). *Fats are good for you and other secrets: how saturated fat and cholesterol actually benefit the body*. North Atlantic Books. p.16.

Karis PO, Ryding O (1994). Tribe heliantheae.. In: BREMER, K. (ed.) Asteraceae. Cladistics and Classification. Portland: Timber Press. p. 559-625.

Kato T, Frei B, Heinrich M, Sticher O (1996). Sesquiterpenes with antibacterial activity from *Epaltes mexicana*. *Planta medica*, 62(01), 66-67. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957803>

Kim MK, Choi GJ, Lee HS (2003). Fungicidal property of *Curcuma longa* L. rhizome-derived curcumin against phytopathogenic fungi in a greenhouse. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(6), 1578-1581. <https://doi.org/10.1021/jf0210369>

Klepser ME, Ernst EJ, Lewis RE, Ernst ME, Pfaller MA (1998). Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 42(5), 1207-1212. <https://doi.org/10.1128/aac.42.5.1207>

Lorenzi H, Matos FJDA (2021). Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, São Paulo, p. 544

Maddila S, Hemalatha KPJ (2017). Phytochemical screening and in vitro antimicrobial properties of crude leaf extracts of *Wrightia tinctoria* R. Br. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(1), 707-720.

Maia GLDA, Sousa FHT, Costa VCDO, Tavares JF, Barbosa Filho JM (2011). p-Coumarate of borneol isolated of *verbessina macrophylla*; p-Ccumaratos de borneol isolados de *Verbesina macrophylla*. Sociedade Brasileira de Química (SBQ)

Malheiro A, Peres MTLP (2001). Alelopatia: interações químicas entre espécies. *Yunes RA, Calixto JB. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Argos*, 503-523.

Martinez LN, Rodrigues SFL, Silva NB, Santos EV, Costa JDAN (2020). Avaliação etnobotânica das espécies das famílias Asteraceae e Lamiaceae utilizadas com potencial medicinal na região de Porto Velho–Rondônia. *Interfaces Científicas-Saúde e Ambiente*, 8(2), 431-445. <https://doi.org/10.17564/2316-3798.2020v8n2p431-445>

Mora FD, Alpan L, McCracken VJ, Nieto M (2013). Chemical and biological aspects of the genus *Verbesina*. *The natural products journal*, 3(2), 140-150. <https://doi.org/10.2174/2210315511303020009>

Mora FD, Rojas YL, González V, Velasco J, Díaz T, Ríos N, Nieto M (2015). Chemical Composition and in vitro Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Verbesina negrensis* from the Venezuelan Andes. *Natural product communications*, 10(7). <https://doi.org/10.1177/1934578X1501000743>.

Moreno RBDSP (2013). 87p. Caracterização do potencial biotecnológico do *Crambe abyssinica* na alimentação de ruminante. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourado.

Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

Newman DJ, Cragg GM (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products*, 75(3), 311-335. <https://doi.org/10.1021/np200906s>

Paula CS, Canteli VCD, Verdam MCS, Kalegari M, Campos R, Hirota BCK, Miguel MD (2014). Atividade antioxidante e toxicidade preliminar do extrato e frações obtidas das folhas e cascas do caule de *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 16, 189-195. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722014000200004>

Pereira MET, Pereira CT, Medeiros CIS, Barbosa-Filho JM, de Azevedo Maia GL, de Sousa AP, de Oliveira Filho AA (2022). Avaliação da citotoxicidade em hemácias de humanos do extrato etanólico de *Praxelis clematidea* (Griseb.). *Revista Colombiana de Ciências Químico-Farmacéuticas*, 51(2). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v51n2.98326>

Pradeepa S, Subramanian S, Kaviyarasan V (2014). Evaluation of antimicrobial activity of *Pithecellobium dulce* pod pulp extract. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 7(1), 32-37.

Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M, Bruni R (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food chemistry*, 91(4), 621-632. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.031>

Saroglou V, Karioti A, Demetzos C, Dimas K, Skaltsa H (2005). Sesquiterpene Lactones from *Centaurea spinosa* and their antibacterial and cytotoxic activities. *Journal of natural products*, 68(9), 1404-1407. <https://doi.org/10.1021/np058042u>

Sartori MR, Pretto JB, Cruz AB, Bresciani LFV, Yunes RA, Sortino M, Cechinel Filho V. (2003). Antifungal activity of fractions and two pure compounds of flowers from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae). *Pharmazie*, 58(8), 567-569.

Silva DDF (2016). Avaliação da atividade biológica de  $\beta$ -Citronelol sobre *Candida albicans*. 62f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos – Farmacologia) – Universidade Federal da Paraíba.

Singh S, Sobel JD, Bhargava P, Boikov D, Vazquez JA (2002). Vaginitis due to *Candida krusei*: epidemiology, clinical aspects, and therapy. *Clinical infectious diseases*, 35(9), 1066-1070. <https://doi.org/10.1086/343826>

Stefanovic OD, Stanojevic DD, Comic LR (2012). Synergistic antibacterial activity of *Salvia officinalis* and *Cichorium intybus* extracts and antibiotics. *Acta Pol Pharm*, 69(3), 457-463.

Toribio MS, Oriani DS, Fernández JG, Skliar MI (2005). Actividad antimicrobiana de *Verbesina encelioides*. *InVet*, 7(1), 41-45.

Toribio MS, Riesco S, Oriani DS, Tortone C, Fernández JG (2012). Actividad biológica de los extractos metanólicos de *Verbesina encelioides* frente a aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 53(2), 45-47. <https://doi.org/10.30827/ars>

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

Wang B, Deng J, Gao Y, Zhu L, He R, Xu Y (2011). The screening toolbox of bioactive substances from natural products: A review. *Fitoterapia*, 82(8), 1141-1151. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.08.007>

Webster D, Taschereau P, Belland, RJ, Sand, C, Rennie RP (2008). Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. *Journal of ethnopharmacology*, 115(1), 140-146. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.09.014>

Wilkens M, Alarcón C, Urzúa A, Mendoza L (2002). Characterization of the bactericidal activity of the natural diterpene kaurenoic acid. *Planta medica*, 68(05), 452-454. <https://doi.org/10.1055/s-2002-32086>

Xu WH, Liang Q, Liang ZS, Li XC (2010). Two new eudesmane derivatives from *Verbesina virginica*. *Chinese Chemical Letters*, 21(6), 693-695. <https://doi.org/10.1016/j.cclet.2010.01.009>

Yang R, Yuan BC, Ma YS, Zhou S, Liu Y (2017). The anti-inflammatory activity of licorice, a widely used Chinese herb. *Pharmaceutical biology*, 55(1), 5-18. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1225775>

