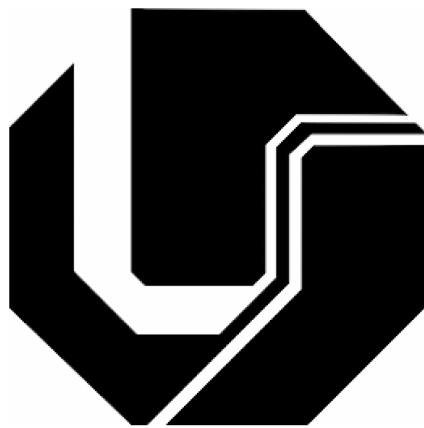


Alexandre Dias de Araújo Neto

Bidens sulphurea (Sch. Bip.): efeitos
fotodinâmico e antibiótico dos extratos
etanólicos de suas flores

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Uberlândia

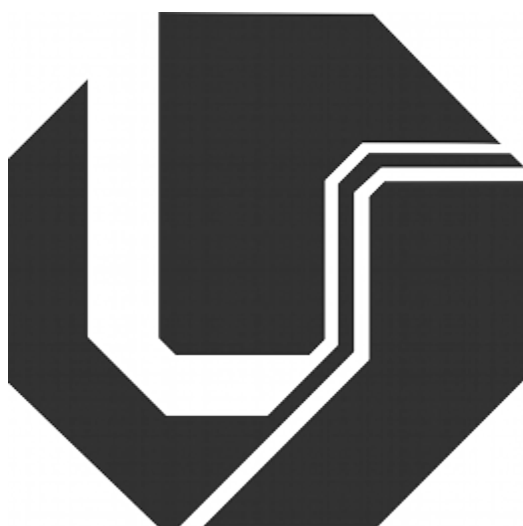
2011

Alexandre Dias de Araújo Neto

Bidens sulphurea (Sch. Bip.): efeitos
fotodinâmico e antibiótico dos extratos
etanólicos de suas flores

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Uberlândia como requisito parcial para a obtenção
do título de mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Uberlândia

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU – MG, Brasil

A663b Araújo Neto, Alexandre Dias de, 1980-
Bidens sulphurea (Sch. Bip.) : efeitos fotodinâmico e antibiótico dos
extratos etanólicos de suas flores / Alexandre Dias de Araújo Neto. -
2011.
79 f. : il.

Orientador: Carlos Alberto de Oliveira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Pro-
grama de Pós-Graduação em Química.
Inclui bibliografia.

1. Química - Teses. 2. Química farmacêutica - Teses. I. Oliveira,
Carlos Alberto de. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de
Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU: 54



ALUNO(A): ALEXANDRE DIAS DE ARAÚJO NETO

NÚMERO DE MATRÍCULA: 100302

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA: NÍVEL MESTRADO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

“Bidens sulphurea:

Efeitos biológicos de seu extrato etanólico”

ORIENTADOR(A):

PROF. DR. CARLOS ALBERTO DE OLIVEIRA

A Dissertação foi **APROVADA** em apresentação pública realizada no Auditório E do Bloco 5O, no Campus Santa Mônica, no dia 31 de agosto de 2011, às 14h30 horas, tendo como Banca Examinadora:

NOME:

ASSINATURA:

Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira

(IQUFU)

Prof. Dr. Domingos Sávio de Miranda

(IQUFU)

Profª Dra. Richele Priscila Severino

(UFG-Catalão)

Uberlândia, 31 de agosto de 2011.

Dedicatória:

Dedico este trabalho à todos os seres humanos que lutam e se esforçam para fazer ciência, e, fazendo, acabam tornando-se parte dela. Ainda que com *dificuldade extrema*, jamais se entregam, e nunca se cansam da eterna luta de sair do senso comum, lutando heroicamente com todas as suas forças, armados apenas com cinco sentidos e um cérebro, para simplesmente responder a pergunta: **“Por quê?”**

Agradecimentos:

Eu sinceramente gostaria de agradecer à todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente com a realização deste trabalho:

Ao meu orientador, professor Carlos Alberto de Oliveira (UFU), por suas orientações e pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, o qual sempre esteve aberto aos alunos que o procuraram com disposição para fazer ciência.

Ao professor Fernando Petacci (UFG-Catalão) pelo fornecimento do extrato de *Bidens sulphurea*, a banca pelo tempo cedido na apreciação do trabalho. Ao professor Domingos Sávio de Miranda (UFU), pelas idéias e sugestões e a professora Richele Priscila Severino (UFG-Catalão).

Aos colegas do laboratório de bioquímica e fotobiologia, LABIOFOT do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Erick França, Bruno Garçês, João Fernando, Lucas Ferreira de Paula, por cada coisa que fizeram para compor o ambiente de trabalho e o tornar agradável como tem sido.

Aos técnicos do Instituto de Química por sua dedicação, ajuda que facilitou e possibilitou este trabalho, pois sem esta, eu jamais teria conseguido devido às solicitações que o emprego de professor estadual designado me causa, e, assim com o curto tempo disponível que me sobra todas minhas idéias seriam natimortas.

Aos Institutos de Física, Medicina Veterinária e Microbiologia da UFU pela ajuda concedida. Aos meus pais e amigos pelo apoio. Aqueles que contribuem (ou contribuíram) com a comunidade do *Software* livre (*Open Source*), à *Free Software Foundation*, GNU/Linux, sistema de tipografia digital L^AT_EX, L^AT_EX 2_ε, vocês são os melhores, venceremos!

Epígrafe

“Aqueles que possuem uma excessiva fé em suas próprias teorias ou em suas próprias idéias, não são apenas pobremente dispostos a fazer novas descobertas, mas, fazem também observações pobres.”

Claude Bernard (1813-1878)

Resumo

Este trabalho teve por objetivo, avaliar alguns efeitos biológicos do extratos bruto (etanólico) das flores de *Bidens sulphurea* (Asteraceæ), os efeitos avaliados foram: citotoxicidade, efeito antibiótico e fototóxico. Deu-se ênfase aos efeitos fototóxicos, pois o objetivo primário era avaliar se os pigmentos desta planta poderiam ser utilizados como fotossensibilizadores para a terapia fotodinâmica, empregando-se luz emitida por LED, para o tratamento de um modo não invasivo de dermatoses, tais como a onicomicose. Concluiu-se que, das duas variedades da planta estudada (variedades laranja e amarela), a que apresenta maior fototoxicidade tanto quando irradiado por luz branca, e vermelha ($\lambda \geq 600$ nm), quanto efeito antibiótico (no escuro) foi a variedade laranja, a qual também mostrou uma grande toxicidade frente aos náuplios de *Artemia salina* quando irradiada com luz vermelha.

Palavras-chave: *Bidens sulphurea*, terapia fotodinâmica, polifenólicos

Abstract

This work had the aim to assess some biological effects of the *Bidens sulphurea* (Asteraceae) (also know as *Cosmos sulphureus*), assessed effects were: cytotoxicity, antibiotic and phototoxicity. The phototoxicity was ephasized, since the primary aim of this work was to evaluate if this plant's pigments could be used as photosensitizers in the photodynamic therapy, in a non invasive way, using light emitted by LED, for treatment of dermatosis, particularly, onicomycosis. The conclusion of this work is that, of the two *Bidens sulphurea* varieties studied, the one that bear the greater photodynamic activity, when irradiated with white light, or red light ($\lambda \geq 600$ nm) and did showed greater antibiotic effect (in the dark) was the orange variety. The orange variety did showed an increase in the toxicidy to the *Artemia salina* nauplii, when irradiated with red light.

Key Words: *Bidens sulphurea*, photodynamic therapy, polyphenolics

Lista de Figuras

1	Distribuição eletrônica do oxigênio	16
2	Diagrama de Perrin-Jablonski	17
3	<i>Bidens torta</i> , em destaque capítulo com várias flôres no centro do capítulo	19
4	<i>B. sulphurea</i> , variedade amarela	21
5	<i>B. sulphurea</i> , variedade listrada	21
6	<i>B. sulphurea</i> , variedade laranja	22
7	Cartamina - A aglicona corresponde a parte em negrito	30
8	Condensação de Claisen-Schmidt	30
9	Rota biosintética (genérica) para flavonóides	31
10	Diversos tipos de flavonóides	32
11	Sistema de numeração de alguns flavonóides	32
12	Síntese de um flavonol - Síntese de Auwers	33
13	Condensação aldólica	34
14	Síntese da flavona - método de Von Kostanecki	35
15	Síntese de uma flavona - Reação de Allan-Robinson	35
16	Rearranjo de Baker-Venkataraman	35
17	Reação de Algar-Flyn-Oyamada	36
18	Síntese de chalconas - método de Eddarir	37
19	Reação original de Suzuki-Miyaura	37
20	Exemplo de estrutura de uma procianidina	38
21	Aparelho utilizando 600 LED de alto brilho de 8mm	44
22	Lanterna de 10 LED de 1w	45

23	Espectro UV/VIS do extrato etanólico de <i>B. sulphurea</i> , variedade laranja, diluição (1/200)	53
24	Espectro UV/VIS do extrato etanólico de <i>B. sulphurea</i> variedade amarela, diluição (1/200)	54
25	Espectro UV/VIS do extrato de <i>B. sulphurea</i> variedade laranja, diluição (1/200)	54
26	Espectro UV/VIS do extrato de <i>B. sulphurea</i> variedade amarela, diluição (1/200)	55
27	Espectros sobrepostos em diferentes solventes de extratos de <i>B. sulphurea</i> variedade laranja	55
28	Espectro da lâmpada fluorescente de 20 watts	57
29	Espectro da lâmpada UV de 15 watts	58
30	Determinação do MIC para o extrato irradiado	61
31	Fluorescência revelando o crescimento de coliformes	61
32	Azul de metileno utilizado como fotosensibilizador	61
33	Azul de metileno inibe os coliformes até na diluição 1/16	62
34	Inativação fotodinâmica de <i>E. coli</i> com lâmpada halógena	63
35	<i>B. sulphurea</i> amarela: não irradiada e irradiada	64
36	<i>B. sulphurea</i> laranja: não irradiada e irradiada	64
37	Nenhum dos solventes inibiu o crescimento microbiano	65
38	Fotohemólise usando extrato de <i>B. sulphurea</i> laranja	67
39	PDA inoculado com 10 μ L de suspensão microbiana (McFarland = 4) . . .	69
40	PDA inoculado com 10 μ L de suspensão microbiana (McFarland = 4) . . .	70
41	PDA inoculado com 10 μ L de suspensão microbiana (McFarland = 4) . . .	70

Sumário

Introdução	13
1.1 Terapia fotodinâmica	13
1.2 Fotosensitizadores e fotoquímica	14
1.3 Sobre a família Asteraceae	18
1.3.1 Classificação botânica do espécimen	20
1.4 Ensaio de toxicidade com <i>Artemia salina</i>	22
1.4.1 Vantagens do emprego de <i>A. salina</i> como modelo	23
1.5 Desvantagens do emprego de <i>A. salina</i> como modelo	24
1.6 Ensaio com microrganismos e eritrócitos	24
1.6.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
1.6.2 <i>Escherichia coli</i> e coliformes fecais	25
1.6.3 Eritrócitos	26
1.7 Sistemas de irradiação luminosa	26
2.8 Sobre alguns pigmentos fenólicos e suas sínteses	29
2.8.1 Síntese de flavonóides	32
2.8.1.1 Síntese de Auwers	33
2.8.1.2 Síntese via condensação aldólica	33
2.8.1.3 Método de Von Kostanecki	34
2.8.1.4 Reação de Allan-Robinson	34
2.8.1.5 Rearranjo de Baker-Venkataraman	34
2.8.1.6 Reação de Algar-Flynn-Oyamada	35

2.8.1.7	Acoplamento de Suzuki-Miyaura	36
2.9	flavonóides: algumas atividades biológicas	37
Objetivos gerais e específicos		40
2.1	Objetivos gerais	40
2.2	Objetivos específicos	40
Materiais e métodos		41
3.1	Extrato bruto etanólico de <i>B. sulphurea</i> (laranja)	41
3.2	Obtenção de extrato bruto liofilizado de <i>B. sulphurea</i> (amarela e laranja): .	41
3.3	Obtenção dos espectros UV/VIS de <i>B. sulphurea</i> (amarela e laranja) . . .	42
3.4	Espectros das lâmpadas UV e fluorescente utilizadas	42
3.5	Sistemas de irradiação empregados	43
3.6	Metodologia experimental com <i>Artemia salina</i>	46
3.6.1	Eclosão dos cistos de <i>Artemia salina</i>	46
3.6.2	Solução de extrato bruto de <i>B. sulphurea</i> empregada em <i>Artemia salina</i>	46
3.6.3	Ensaio de toxicidade em <i>Artemia salina</i>	46
3.7	Experimento de fotohemólise em eritrócitos	47
3.8	Fotoinativação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	48
3.9	Fotoinativação de coliformes: LED 600	50
3.10	Efeito antibiótico de <i>B. sulphurea</i> em <i>E. coli</i>	50
3.11	Fotoinativação de coliformes com lâmpada halógena	51
Resultados experimentais e discussões		53
4.0.1	Espectros do extrato etanólico de <i>B. sulphurea</i>	53
4.1	Espectros das lâmpadas fluorescente e UV utilizadas	57
4.2	Ensaio biológicos	58

4.2.1	Mortalidade fotodinâmica de <i>Artemia salina</i>	59
4.2.1.1	Artemias irradiadas	59
4.2.1.2	Artemias não irradiadas	59
4.2.2	Fotoinativação de coliformes fecais com aparelho LED 600	60
4.2.3	Fotoinativação de coliformes com lâmpada halógena	62
4.2.4	Resultados da fotohemólise	66
4.2.5	Efeito antibiótico de <i>B. sulphurea</i> em <i>E. coli</i>	68
4.2.6	Resultados da fotoinativação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	69
	Conclusões	72
	Referências	74

Introdução

1.1 Terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma forma de tratamento de enfermidades em que são utilizados basicamente de três elementos⁽¹⁾:

1. **Fotosensitizador:** Geralmente é um corante orgânicoⁱ que quando iluminado por luz de determinados comprimentos de onda, têm os elétrons de um ou mais de seus grupos funcionais, promovidos a um estado excitado de energia.
2. **Uma fonte luminosa:** Que com a potência e comprimento de onda adequados é capaz excitar o fotosensitizador.
3. **Oxigênio:** O qual recebe a energia adquirida pelo fotosensitizador e é promovido de seu estado fundamental de energia (triplete) para um estado excitado (singleto).

Neste estado excitado de energia, o oxigênio pode dar origem a várias espécies químicas diferentes, que normalmente são radicais livres: peróxila, superóxido, radical hidroxila etc. Estas espécies químicas são coletivamente chamadas de **ROS**, do inglês *Reactive Oxygen Species*, ou *Espécies Reativas de Oxigênio*.

São estas espécies que vão reagir com algum alvo biológico. Frequentemente, ao se empregar TFD, intenciona-se levar a célula alvo a um estado de *apoptose*, também conhecido como *morte celular programada*(2), de modo que a célula se autodestrua e seja absorvida pelo organismo.

Pode-se também utilizar a TFD para se inativar patógenos: bactérias, vírus, algas, esporos, etc, pois dada a natureza altamente reativa das ROS, estas normalmente reagem de maneira pouco seletiva, reagindo com vários grupos funcionais diferentes. Desta forma, não se espera que um patógeno desenvolva resistência à TFD, ao contrário do que vem ocorrendo com os antibióticos tradicionais (3)(4).

ⁱMas não necessariamente, p. ex: ácido silícico e dióxido de titânio (TiO₂).

Uma vantagem prática muito benéfica ao paciente sob tratamento com TFD, é a capacidade de se focar a luz irradiante em um ponto específico do corpo. Pois diferentemente do uso de radiações ionizantes, o tempo de vida das espécies reativas, é normalmente curto, e logo sua ação fica restrita a poucos milímetro de sua geração, não atingindo normalmente outros pontos do corpo.

Com o uso de *laser* irradiados via fibra ótica, na verdade é possível se focar em áreas de cerca de apenas 1 mm².

Motivo pelo qual esta técnica se apresenta muito promissora na atualidade e para o futuro, pois nos últimos anos têm-se notado um aumento expressivo no aparecimento de bactérias resistentes aos antibióticos tradicionais, e estas tem causado epidemias de infecções hospitalares (p. ex: *Acinetobacter baumannii*(5)).

1.2 Fotosensitizadores e fotoquímica

Sabe-se que as moléculas de certos pigmentos (*fotosensitizadores*), sob a ação de determinados comprimentos de onda, possuem a propriedade de ter os elétrons de alguns de seus grupos funcionais (*cromóforos*) promovidos de um estado de energia mínima ou não excitado (*singleto*), para um estado excitado de energia (*triplete*).

A configuração eletrônica do estado excitado (triplete) é instável e possui a tendência natural de relaxar para um estado de energia mais favorável (menos energético). Existem vários “caminhos” que o elétron pode tomar para liberar a diferença de energia entre o estado excitado *triplete* e o excitado não *singleto*: fluorescência, fosforescência, fosforescência tardia, vibrações, rotações moleculares, etc.

Existe a possibilidade da transferência de energia do grupo cromóforo do fotosensitizador para o oxigênio molecular. O qual, diferentemente da maioria dos pigmentos, no seu estado fundamental (ou não excitado) existe na configuração eletrônica *triplete*, por isso o oxigênio molecular é as vezes chamado de oxigênio triplete, 3O_2 , (assim chamado, devido a existência de três possibilidades de alinhamento dos dois elétrons desemparelhados da molécula de oxigênio) levando à promoção do oxigênio molecular à oxigênio singleto 1O_2 .

Existem duas “variedades” de oxigênio singleto e, usando a notação espectroscópica estas podem ser designadas por $^1\Delta_g O_2$ e $^1\Sigma_g^+ O_2$, respectivamente. O primeiro é o “oxigênio singleto” de que se fala sem maiores especificações. Em nome da simplicidade, frequente-

mente é grafado como $^1O_2(6)$. É uma espécie reativa de oxigênioⁱⁱ importante em sistemas biológicos, principalmente pela sua *meia vida* relativamente longa, que varia entre $4,2\mu s$ em H_2O , até $628\mu s$ em C_6D_6 .

Com estas características o $^1\Delta_g O_2$ portanto encontra condições tanto de ser formado, quanto de *reagir* em meio celular. Já o “outro” oxigênio singleto $^1\Sigma_g^+ O_2$, em sistemas biológicos é praticamente ignorável, devido à sua grande entalpia de formação de $158 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ tanto quanto pela sua curtíssima meia vida que, em solução aquosa, é menor que 10 ps.

A diferença entre as duas espécies de oxigênio singleto está no *spin* dos dois elétrons do orbital π_{2p}^* , que na espécie $^1\Delta_g O_2$ estão emparelhados, já na espécie $^1\Sigma_g^+ O_2$ estão desemparelhados em subníveis diferentes.

O oxigênio molecular, possuindo dois de seus elétrons desemparelhados (π_{2p}^*) é paramagnético assim como alguns os metais tais como o ferro e o níquel, p. ex.: Característica comprovada pelo fato de que, ao se derramar oxigênio líquido nos pólos de um imã, vemos o oxigênio ser atraído em por ambos os pólos, exatamente, como um metal paramagnético faria.

Já o oxigênio singleto é diamagnético, e é um tipo de ROS muito reativo, pois a maioria das moléculas orgânicas, em seu estado fundamental de energia, são singletos. Podemos também nos valer do princípio da conservação da paridade do *spin* eletrônico, o qual basicamente nos diz que as moléculas devem reagir com contrapartes de *mesma paridade*, ou seja, singleto com singleto, tripleto com tripleto. A distribuição eletrônica das várias formas do oxigênio, encontram-se sob a forma de diagrama, veja a figura 1.

Com o advento da mecânica quântica, estes fatos puderam ser explicados com maior profundidade. Por exemplo, a aplicação da teoria de grupo e do modelo **LCAO**ⁱⁱⁱ, possibilitaram a determinação (por questões de simetria de orbitais moleculares, níveis de energia etc.) das características espectroscópicas do oxigênio singleto, bem como a determinação dos vários tempos de vida deste em diferentes meios, (dependendo da fase ser aquosa, gasosa, etc.), até que decaia para o estado padrão, o de oxigênio tripleto.

Outra conquista importante da mecânica quântica, (com relação à fotoquímica desta espécie) foi o desenvolvimento do conceito e respectivo cálculo do chamado rendimento quântico (ou o número de moléculas de oxigênio singleto geradas para cada fóton absor-

ⁱⁱO oxigênio molecular (tripleto) é representado como $^3\Sigma_g^- O_2$

ⁱⁱⁱAcrônimo inglês para *Linear Combination of Atomic Orbitals*, ou *combinação linear de orbitais atômicos*, combinação esta que forma os orbitais moleculares

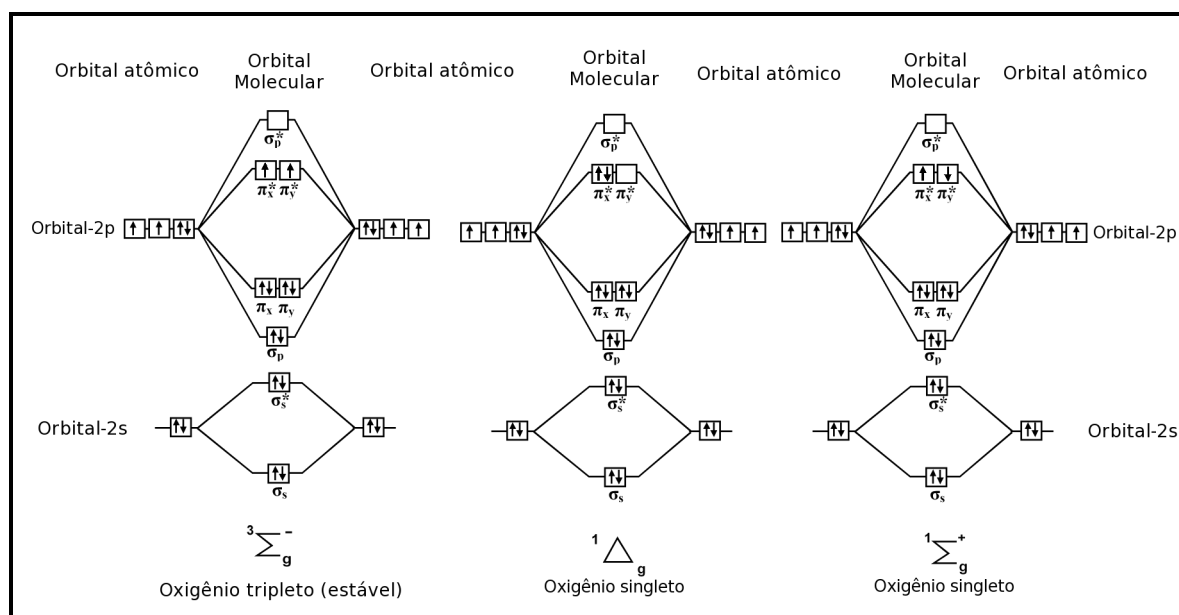


Figura 1: Distribuição eletrônica do oxigênio

vido) das reações de síntese de oxigênio singleto.

Em literatura especializada em fotoquímica, é costume se representar estas transições eletrônicas, por meio de um esquema gráfico denominado “Diagrama de Jablonski” (também conhecido como “Diagrama de Perrin-Jablonski”) devido ao seu criador, o físico ucraniano Aleksandr Jabłoński, que propôs tal diagrama, em 1935 para explicar processos de absorção e emissão de luz por moléculas, íons etc.

O diagrama de Jablonski^{iv} (figura 2) ilustra os estados eletrônicos de uma molécula e, as possíveis transições entre eles, bem como as posições relativas de energia entre os mesmos.

Em bioquímica, mais precisamente na área de *fotobiologia*, é costume se dividir os processos envolvendo oxigênio singleto em dois tipos:

- Tipo I: Radicais livres (R^\bullet) são formados, e a ação biológica resultante (fotosensibilização), é devida a estes radicais.
- Tipo II: Neste tipo de processo, a energia luminosa (ultravioleta, luz visível, etc.) é transferida para o oxigênio *triplete* 3O_2 e, este se transforma em oxigênio *singleto* 1O_2 . É este que age biologicamente,

Ao contrário do que se pensa o oxigênio *singleto* não é um *radical livre*. Pois este não possui elétrons desemparelhados em seus orbitais moleculares(6).

^{iv}Usaremos a grafia romanizada, “Jablonski” em detrimento da Polonesa “Jabłoński”.

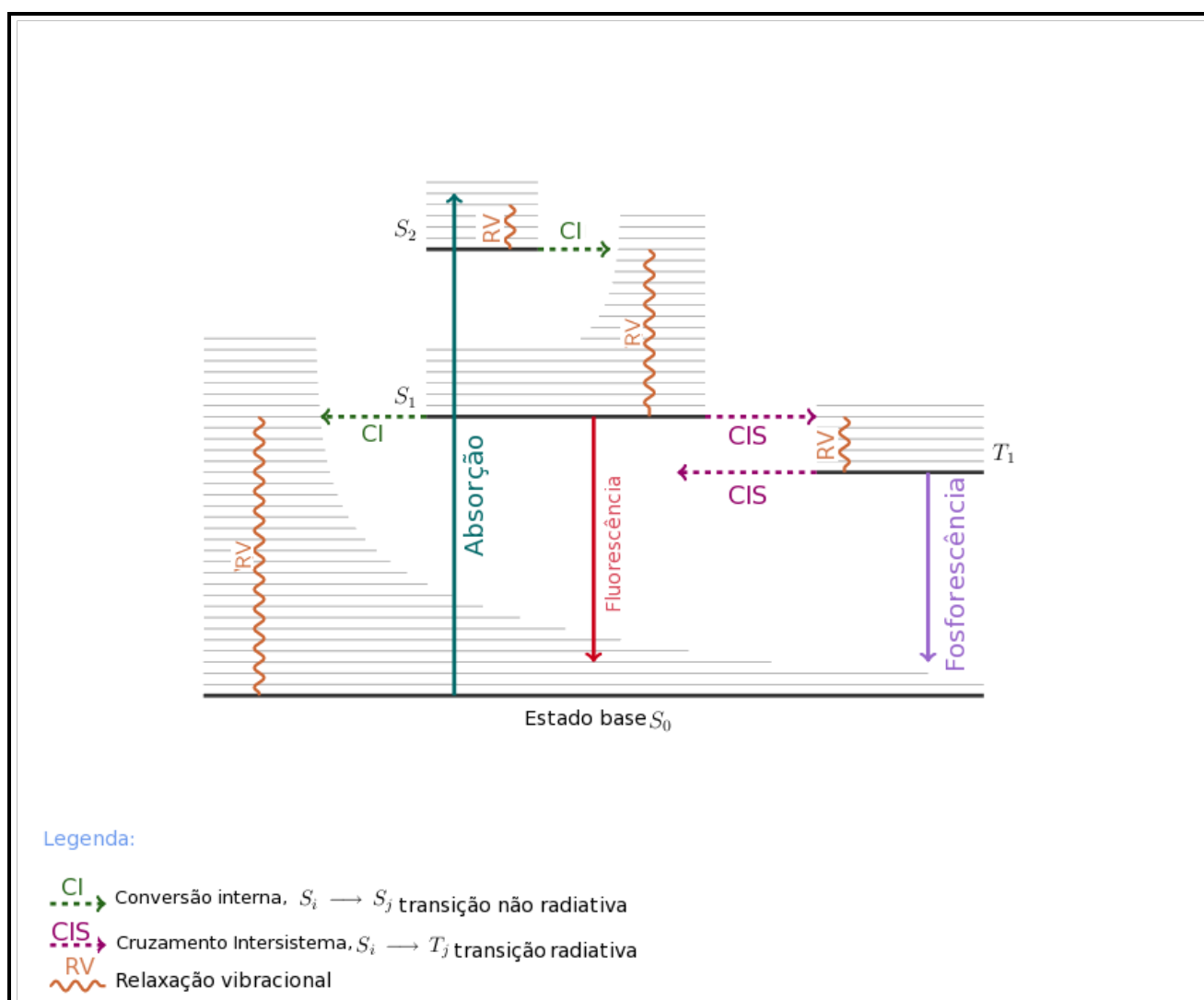


Figura 2: Diagrama de Perrin-Jablonski

As linhas onduladas pontilhadas (figura 2) (CI^v , CIS^{vi}) são transições não radiativas ou seja, não ocorre a emissão de fótons, neste caso a energia é dissipada sob a forma de calor.

Já a linha ondulada marron, representa a dissipação de energia em movimentos moleculares. Podemos notar que para o elétron relaxar para um estado menor de energia por meio de certos fenômenos quânticos, o mesmo altera o seu *spin*, um exemplo é o fenômeno da fosforescência, no qual o elétron passa do estado singlete S_i para o estado tripleto T_j .

^vConversão Interna = quando um elétron em um orbital de baixa energia interage com um núcleo e é expelido por este

^{vi}Cruzamento Intersistema = quando um elétron passa de um estado singlete para um tripleto (e vice-versa) sem irradiar energia

1.3 Sobre a família Asteraceæ

Dentre todas as famílias das Angiospermas, a família Asteraceæ, é a que possui o maior número de espécies, e todas com características muito similares, apesar de existirem algumas variações dentro da família.

Nesta família, as plantas são geralmente ervas, mas também são conhecidos representantes sob a forma de arbustos, trepadeiras e até mesmo árvores. O tipo de flor mais comum, é a flor tubular que é geralmente bissexual, mas existem muitas plantas com flores *liguladas*. O capítulo floral mais comum é aquele em formato de disco, como as margaridas e girassóis(7).

Esta família vegetal surgiu durante o período eoceno, a aproximadamente cinquenta e cinco milhões de anos(8).

Suas inflorescências constituem a característica mais distintiva da família. São geralmente chamadas de *pseudantium*^{vii}.

Na família Asteraceæ as verdadeiras flores são frequentemente bem pequenas e encontram-se capituladas no centro da estrutura à qual geralmente atribui-se (errôneamente) o nome de “flor”. Nas Asteraceas em particular, o pseudantium recebe o nome de *calatidium* ou calátide que são brácteas modificadas.

A figura 3 mostra uma inflorescência de *Bidens torta*, a qual ilustra uma típica inflorescência das Asteraceas. Nota-se que na inflorescência de *Bidens torta*, as verdadeiras flores estão dispostas no capítulo (área dentro do círculo cheio), compostas por várias flores individuais (dentro do círculo tracejado).

A família Asteraceæ, possui um número tão grande de espécies (estimada entre 20.000 até 25.000 dependendo dos autores) que o seu estudo em particular, recebe um nome distinto dentro da botânica: *sinanterologia*(9).

Este nome tem origem no francês antigo *synantherées* (a etimologia da palavra, é na verdade uma descrição botânica da família, é um adjetivo que se diz de uma família de plantas onde os estames são fundidos)^{viii}.

A organização da família em tribos deveu-se principalmente ao trabalho pioneiro do botânico George Bentham, publicado em 1873. Várias plantas desta família possuem

^{vii} palavra de origem grega, composta a partir dos vocábulos gregos, ψευδής = pseudēs, “falso” + ανθή = antó, “flor” = falsa flor

^{viii} Dictionnaire de l’Académie française, 8^{ème} Edition (1932-5)



Figura 3: *Bidens torta*, em destaque capítulo com várias flôres no centro do capítulo

grande importância comercial, p. ex., o girassol (*Helianthus sp.*), como fonte de óleo comestível de alta qualidade, a cinerária (*Cyneraria sp.*), como planta ornamental, o alface (*Lactuca sativa*), o dente-de-leão (*Taraxacum sp.*), o absinto (*Artemisia absinthium*) utilizado na formulação da bebida absinto, e também a tão presente nos jardins e floriculturas, tagete ou cravo-francês (*Tagetes patula*) e ainda a camomila, muito utilizada em chás (*Matricaria sp.*(8)).

Neste gênero, (particularmente para a espécie *Bidens sulphurea*), vários compostos com atividades biológicas já foram descritos na literatura. Pode-se citar alguns exemplos, tais como vários tipos de sesquiterpenos (γ -elemene, α -copaene, γ -cadinene), vários compostos polifenólicos, (flavonas, flavonóis etc.), poliacetilenos (fenilhepta-1,3, 5-triino) ocorrendo em *Bidens pilosa*(10).

Muitos destes compostos possuem diversas atividades biológica. Dentro do grupo do compostos fenólicos (principalmente flavonóides) pode-se listar: fungicidas (p. ex., luteona isolada dos frutos de *Lupinus luteus*), antídoto contra pesticidas do grupo dos imidazóis (11), bactericida(12) dentre outras.

1.3.1 Classificação botânica do espécimen

B. sulphurea (sinonímia: *Cosmos sulphureus*), ou Cosmo-amarelo, Cosmo do México, Áster do México ou ainda Picão-amarelo, é uma representante da numerosa família Asteraceæ. Originária do México.

Apesar de ser, provavelmente um dos exemplares mais difundidos em boa parte do planeta, juntamente com o dente-de-leão (*Taraxacum sp.*), são consideradas como espécies invasivas, mas relativamente pouco estudada(13),(14). O gênero *Bidens* possui aproximadamente 200 espécies descritas na literatura(15).

No gênero *Bidens* (do latim *bi* (dois) + *dens* (dente) dois-dentes, uma alusão às duas protuberâncias aciculares de seu aquênio, que adere em pêlos, plumas, roupas etc. É possivelmente a espécie mais comum de seu gênero, sendo encontrada mais facilmente do que o exemplar mais conhecido do gênero, *Bidens pilosa*, ou picão-preto ou simplesmente picão. Curiosamente em *B. sulphurea*, o aquênio não apresenta estes dois dentes.

Neste gênero, duas características são ubíquas: a ocorrência de zoocoria (dispersão das sementes por animais), e a presença de capitulos, em raio e em disco (daí o sinônimo da família Asteraceæ: Compositæ).

A espécie é extremamente rústica, tolerando facilmente solos pobres, e longos períodos de seca, dispersando-se muito rapidamente, devido a sua característica de florescer o ano todo e, portanto, produzir seus aquênios que se dispersão facilmente por meio dos mecanismos supracitados.

As flores de *B. sulphurea* são geralmente de uma cor laranja bastante intensa, ocorrendo ocasionalmente, a cor amarela, (cultivares de várias outras cores já se encontram no mercado paisagístico, mas estes não são silvestres.). De acordo com a literatura(16), *B. sulphurea* é descrita como: Uma planta anual, herbácea, ereta, muito ramificada, atingindo de 80 cm a 120 cm de altura. Suas folhas são membranáceas e pilosas, são opostas com margens ásperas e pecíolos pilosos (17).

Suas flores frequentemente apresentam oito pétalas, ocorrendo às vezes, a presença de duas ou mais pétalas que quebram sua simetria octogonal, sendo este, provavelmente um traço genético, e não uma decorrência de luz, água nutrientes etc.

A figura 4 mostra *B. sulphurea* variedade amarela, a figura 5 a variedade listrada (possivelmente um híbrido entre as variedades amarelo e laranja) e, finalmente, a a variedade laranja (figura 6) que é mais comumente encontrada que a variedade amarela.



Figura 4: *B. sulphurea*, variedade amarela



Figura 5: *B. sulphurea*, variedade listrada

Uma vez que as flores são hermafroditas, agentes polinizadores (geralmente abelhas e borboletas) podem cruzar as variedades, pois coletam pólen indiscriminadamente de ambas (amarela e laranja), sendo possível a existência de outras. Nota-se que o androceu da variedade amarela é amarelo também, já o da variedade laranja é marrom escuro.

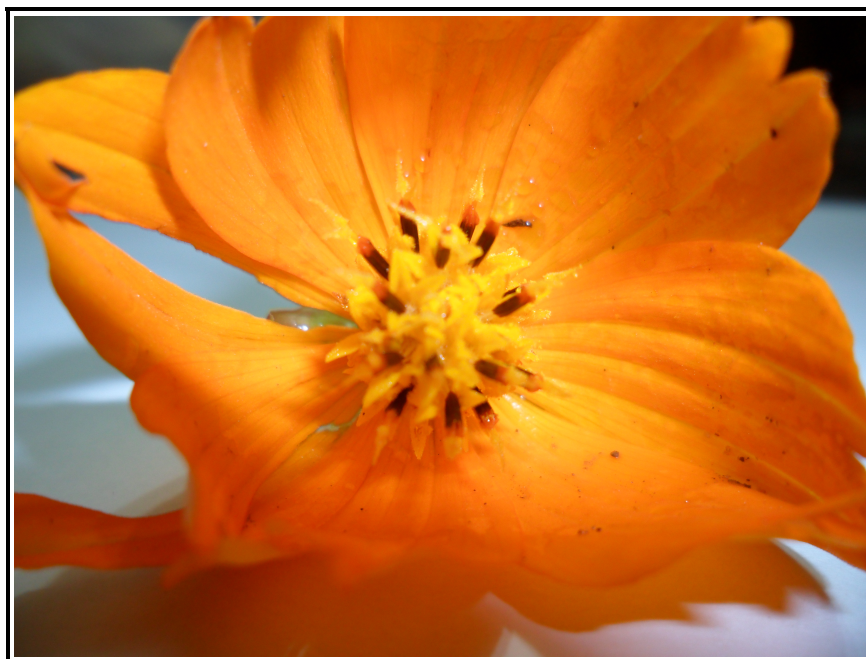


Figura 6: *B. sulphurea*, variedade laranja

1.4 Ensaios de toxicidade com *Artemia salina*

O organismo de nome científico *Artemia salina*, um crustáceo encontrado em lagos salobros, tem sido empregado como organismo modelo para o ensaio de citotoxicidade bem como fototoxicidade desde o início dos anos 1980(18), quando pesquisadores empregaram-no pela primeira vez em estudos relacionados à prospecção de novos compostos ativos de plantas.

Dada a sua relativa sensibilidade, *A. salina* é considerado um organismo de “alarme” para a poluição de águas marinhas(19) (ou salobras em geral, haja vista que habita lagos onde a salinidade pode variar amplamente).

Pois quando do evento de uma contaminação ambiental, é frequentemente o primeiro organismo a morrer, portanto é muito utilizado em controle de qualidade de efluentes industriais, sendo deste modo, muito importante para as ciências ambientais(20).

O teste de extratos vegetais em *A. salina* é portanto um ensaio preliminar muito barato, confiável e rápido para a averiguação de bioatividade em compostos naturais, sendo muito conhecido pela sigla inglesa **BST** (*Brine Shrimp Test*) ou ainda **BSLT** (*Brine Shrimp Lethality Test*).

1.4.1 Vantagens do emprego de *A. salina* como modelo

A fêmea deste crustáceo ao ser exposta à altas concentrações de sal (quando uma poça d'água salobra, ou um lago está evaporando, p. ex:) altera a fisiologia de seu aparelho ovipositor de modo a produzir cistos, ao invés dos ovos.

Estes cisto são os “ovos” que se adquire em lojas especializadas em aquarismo, com a casca muito dura, os quais são capazes de perdurar anos enquanto as condições necessárias ao seu desenvolvimento não forem favoráveis (temperatura, pH, salinidade etc.).

Entretanto, uma vez em condições adequadas, estes são capazes de se desenvolverem e eclodir dentro de 24 a 48 horas. Quando em água com oxigênio e dentro de uma ampla faixa de salinidade.

Uma vez eclodidos, nascem os chamados *náuplios*, os quais representam o estágio de vida deste organismo que de fato se utiliza em ensaios. *A. salina* apresenta várias vantagens importantes que, somadas ajudaram este crustáceo a se tornar um organismo modelo:

- Pode ser estocado na forma de cistos (pequenos ovos avermelhados) por longos períodos de tempo;
- Não necessita de alimentação especial;
- Ocupa pouco espaço;
- Crescimento rápido (24 a 48 horas para a eclosão dos cistos)
- Desenvolve-se em meio não estéril;
- Baixo custo e fácil aquisição;
- Pode viver bem dentro de uma ampla faixa de salinidade, logo não é necessário muito rigor na composição de seu meio de cultura (cerca de 20g de sal marinho por litro é o bastante, mas pode viver muito bem dentro da faixa de salinidade de cerca de 5g até quase uma solução saturada ou por volta de 52g de sal marinho por litro de água destilada);

1.5 Desvantagens do emprego de *A. salina* como modelo

As principais desvantagens do emprego de *A. salina* como organismo modelo são a considerável variação *interlaboratorial* dos resultados, que em alguns casos pode chegar a cerca de 25%, e *intralaboratorial* que pode chegar a cerca de 15% quando executados em condições próximas do ideal por operadores em treinados(21).

1.6 Ensaios com microrganismos e eritrócitos

1.6.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Considera-se que, ao testar-se uma substância, ou uma mistura (como um extrato de fontes naturais, por exemplo) com relação ao seu potencial antibiótico, seja útil realizar-se ensaios com os mais variados tipos de microrganismos: algas, bactérias, protozoários, leveduras, etc.

Cada grupo de microrganismos, possui suas particularidades metabólicas que os tornam suscetíveis às drogas com diferentes mecanismos de ação. Apesar de, é claro, existirem casos muito bem documentados na literatura, onde uma mesma substância possui atividade iguais (p. ex.: antibiótica) em espécies tão distintas quanto protozoários e bactérias. O que sugere que, às vezes, uma mesma droga pode agir de modo semelhante em espécies dissimilares(22),(23).

Por outro lado, talvez a situação mais recorrente seja a de uma substância possuir efeitos distintos em espécies diferentes, devido às diferenças metabólicas entre as espécies. Um bom exemplo é a droga *metronidazol*, que possui atividade antibiótica contra bactérias (anaeróbias principalmente) e protozoários (p. ex.: *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Gardnerella vaginalis* etc.)(24).

O fungo microscópico *Saccharomyces cerevisiae*, tem sido muito empregado como modelo para células eucarióticas em pesquisas tanto de citologia, biologia molecular quanto genética, desde, o final da década de 1930, com o trabalho pioneiro de Leland H. Hartwell, envolvendo estudo de divisão celular(25).

Até o presente, o *Saccharomyces sp.* tem sido empregado como modelo para o estudo de células cancerosas, dado que vários genes que regulam o crescimento desta levedura, são também os mesmos envolvidos no desenvolvimento de tumores(26).

É esperado que o efeito de um extrato vegetal que apresente atividade bactericida seja diferente em leveduras. Leveduras são microrganismos mais complexos (Eucariotos), possuem membrana celular em geral mais grossa e resistente, utilizam ergosterol ao invés de colesterol como fazem as células dos animais por exemplo^{ix}, são células muito maiores do que a grande maioria das bactérias dentre outras diferenças importantes(27).

Muitos tipos de fungos são notórios causadores de infecções cutâneas, (em cabelo, pele e unhas). As infecções nas unhas, causadas por alguns destes, são conhecidas como *onicomicoses*. São particularmente difíceis de serem tratadas, sendo que o uso de medicação tópica associada à sistêmica é, muitas vezes, necessário(28).

Com relação às onicomicoses, o uso de *Saccharomyces sp.* como modelo é interessante pois é um fungo de crescimento rápido (24-48 horas) e, ainda assim conserva inúmeras semelhanças estruturais e metabólicas com o gênero de fungos que é o principal causador de onicomicoses, *Trichophyton sp.* Neste gênero talvez o mais frequentemente isolado de dermatoses e onicomicoses seja a espécie *Trichophyton rubrum*, que é um fungo com crescimento *in vitro* muito lento, chegando por vezes a demorar cerca de 15 dias para se obter um resultado positivo em meio de cultura adequado(29).

Neste trabalho, elegeu-se esta levedura como organismo modelo para o estudo de fungos, devido ao seu baixo custo, e pelo fácil cultivo *in vitro*.

1.6.2 *Escherichia coli* e coliformes fecais

O grupo de bactérias conhecido coletivamente como *coliformes*, deve seu nome à semelhança que, em geral, suas células possuem com a bactéria, que é certamente a mais estudada do grupo, *Escherichia coli*. Coliformes são definidos como bactérias em formato de bastonetes, Gram(-), não esporulantes, capazes de fermentar a lactose, quando encubadas à uma temperatura entre 35 °C-37 °C produzindo ácidos e gás carbônico. A bactéria *E. coli* se distingue das demais do grupo, por ser exclusivamente de origem fecal, por fermentar lactose a 44°C e por apresentar certas reações de coloração características em meios de cultura específicos(30).

Por exemplo, neste trabalho foi utilizado o meio de cultura conhecido como FLUOR-CULT (LMX Broth)©, que fluoresce intensamente (azul, sob luz ultravioleta de comprimento de onda adequado), quando a bactéria se prolifera. A *E. coli* possui a enzima *glucoronidase*, que é capaz de quebrar ésteres de ácido glucurônico. Este meio possui

^{ix}A membrana das bactérias clinicamente relevantes normalmente é composta apenas por lipídios, proteínas e eventualmente, polisacarídeos nas Gram (-)

um derivado glucuronidado da cumarina (conhecido como MUG: 4-metilumbeliferil-beta-D-glucoronidopiranosídeo), o qual ao ser quebrado pela enzima, libera o composto que fluoresce. Este teste é extremamente seletivo porque a *E. coli* é uma raridade dentre os procariotos por apresentar tal enzima.

Esta bactéria é muito usada como um protótipo de bactéria Gram(-) e conquanto algumas cepas da mesma sejam organismos patogênicos perigosos, a *E. coli* é normalmente utilizada como um organismo indicador de contaminação por matéria fecal em água. Sua presença é portanto indesejada, uma vez que se presente em grande quantidade pode indicar a presença de organismos muito mais perigosos (p. ex: bactérias tais como *Vibrio cholerae*^x, etc).(31).

1.6.3 Eritrócitos

Eritrócitos são as principais células responsáveis pela oxigenação dos tecidos dos vertebrados. Por meio da captação do oxigênio do ar, através da complexação deste com o ferro presente nos grupos *heme* da hemoglobina.

São também conhecidos por glóbulos vermelhos, em artigos escritos na língua inglesa, são frequentemente designados pelo acrônimo **RBC**, ou *Red Blood Cells*^{xi}. São células em forma de disco, côncavas, sem núcleo (nos mamíferos)(32).

Neste trabalho, eritrócitos foram usados por causa de sua capacidade de armazenar oxigênio na hemoglobina, a qual também contém ferro, que serve como um catalizador para várias reações fotoquímicas (exemplo: fotofenton), e por suas membranas celulares conterem ácidos graxos insaturados, portanto sensíveis ao dano oxidativo(33).

Por estas características morfofisiológicas, os eritrócitos são alvos particularmente suscetíveis à efeitos de fotoxidação.

1.7 Sistemas de irradiação luminosa

Como visto na seção 1.1, a TFD só pode ser aplicada eficazmente, se todos os seus três elementos^{xii} estiverem disponíveis e forem aplicados de maneira efetiva.

Uma vez que o oxigênio encontra-se plenamente disponível na maioria dos tecidos em

^xBactéria causadora da cólera

^{xi}Células Vermelhas Sanguíneas

^{xii}Fonte luminosa com potência e comprimentos de onda adequados, fotosensibilizador e oxigênio

que se aplica a TFD, e existe uma série de fotosensibilizadores adequados disponíveis (azul de metileno, rosa de bengala, alaranjado de acridina, porfirinas, cumarinas, psoralenos, TiO_2 , etc.), cada um com suas respectivas seletividades por diferentes tecidos biológicos, o fator limitante de grande parte das reações fotoquímicas envolvidas na TFD passa a ser a fonte luminosa.

A fonte luminosa deve, obrigatoriamente emitir luz de um comprimento de onda (λ) específico para ser efetiva, devido à chamada lei de *Stark-Einstein*, que diz que, com relação aos processos fotoquímicos, para cada molécula que reage, um *quanta* de energia deve ser absorvido pelo sistema. Esta lei pode ser descrita matematicamente como:

$$\Delta E_{mol} = N_A \cdot \hbar \cdot \nu$$

Nesta equação ΔE_{mol} é a variação de energia molar envolvida na reação fotoquímica, onde N_A é o número de Avogadro^{xiii}(34), \hbar é a constante de Planck^{xiv}(35) e ν é a frequência do fóton incidente.

Ou seja, para cada mol de moléculas que reage, um mol de quanta de energia ($\hbar\nu$) deve ser absorvido. Portanto, como esta equação é quantizada, a despeito (idealmente) da potência da fonte luminosa, se esta não emitir energia na frequência correta, seus quanta de energia não serão absorvidos e conseqüentemente não teremos reações fotoquímicas.

Esta lei se restringe aos chamados processos fotoquímicos *primários* ou seja, a reação direta que o sistema sofre após a absorção de um mol de fóton para cada mol de moléculas. Se a reação apresentar um processo *secundário* ou interações entre os reagentes que não dependam de energia luminosa, então a equação não se aplica.

Outro caso em que a lei de Stark-Einstein não se aplica, é quando a fonte luminosa é extremamente potente (como em *flash fotólise*, irradiação com laser, etc.) pois neste caso, passa a serem possíveis processos bifotônicos^{xv}.

Deve-se lembrar que como o processo de absorção de fótons é quantizado, e portanto o mesmo é probabilístico. Fótons com energia $\hbar\nu$ inadequadas, ainda possuem uma *probabilidade não nula de reagirem* (efeito de quântico de tunelamento), fato explorado nas técnicas fotoquímicas de *laser pulsado*(36).

Deste modo, como se encontram disponíveis várias fontes luminosas diferentes, (lâmpadas de vapores metálicos, lâmpadas halógenas, diodos emissores de luz (**LED**), lasers, etc.)

^{xiii} $6.02214179(30) \cdot 10^{23} \cdot \text{mol}^{-1}$

^{xiv} $6.62606957(29) \cdot 10^{34} \text{ J} \cdot \text{s}$

^{xv} Processos nos quais dois fótons são absorvidos simultaneamente por uma molécula

cada uma com uma faixa de comprimentos de onda específicos, eficiência luminosa (quantidade de energia que se transforma em fótons versus quantidade de energia perdida sob a forma de calor), preços, dimensões físicas etc.

Conquanto o comprimento de onda seja um fator determinante na escolha de uma fonte de irradiação, para uma reação fotoquímica, se esta não tem a potência adequada o rendimento será negligenciável portanto, na escolha de uma fonte de irradiação muito raramente a mais adequada é óbvia.

2.8 Sobre alguns pigmentos fenólicos e suas sínteses

A família Asteraceæ possui várias espécies que produzem pigmentos usados pelo homem há milhares de anos. Se considerado um número arbitrariamente grande de Asteraceas, nota-se que a cor mais abundante presente nesta família é o amarelo, devido principalmente à certos pigmentos tais como chalconas (1,3-difenilpropenona), auronas (2-benzilideno-1-benzofurano-3-ona) e flavonóides. A flavona conhecida como luteolina, (de cor é amarela) por exemplo, já foi isolada de várias dezenas espécies de Asteraceas(37). Estes pigmentos são em sua grande maioria resultado do metabolismo secundário das plantas, e são formados por unidades $C_6 : C_3 : C_6$, considerados como derivados do 1,3-difenilpropano(38).

Outras cores como lilás, violeta, azul e vermelho, são causadas principalmente por outros flavonóides como as antocianinas e antocianidinas, bem como a presença de certos cátions metálicos (sob a forma de quelatos(39)), em diferentes faixas de pH (antocianinas são vermelhas em pH ácido e azul em pH básico). Com a notável diferença de que estes dois grupos de moléculas (antocianinas e antocianidinas) são catiônicas (cátion *flavílio*).

Têm-se vários exemplos de flores amarelas, de Asteraceas muito conhecidas: A calêndula (*Calendula arvensis*), o crisântemo (*Chrysantemum sp.*), o dente-de-leão (*Taraxacum sp.*), etc.

Na verdade o fato destes pigmentos serem tão comuns nas Asteraceas, muitas vezes dificulta bastante a identificação exata da espécie, em questão. Alguns autores, chegam a aludir este fato referindo-se a qualquer Asteraceæ amarela de modo genérico como (sigla o acrônimo inglês) D.Y.C ou “*damn yellow composite*” ou em uma tradução livre “praga de composta amarela”(40),(41).

O cártamo por exemplo, (*Carthamus tinctorius*) produz um pigmento (na forma de um glicosídeo) (figura 7)^{xvi} a cartamina que, historicamente foi muito utilizado para tingir seda nos países asiáticos como o Japão. Existem evidências arqueológicas de que esta planta é uma das plantas mais antigas cultivadas pelo homem(42).Este pigmento pode ser considerado como um dímero de unidades $C_6 : C_3 : C_6$, onde a unidade $C_6 : C_3$ é derivada do ácido cinâmico enquanto que a unidade C_6 é derivado do ácido chiquímico por meio dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano(38).

^{xvi}Na verdade, a infinita maioria dos pigmentos do grupo dos flavonóides, encontram-se sob a forma de glicosídeos, somente em raríssimos casos encontramos o pigmento sob a forma de sua aglicona - ou seja, o flavonóides sem açúcar algum.

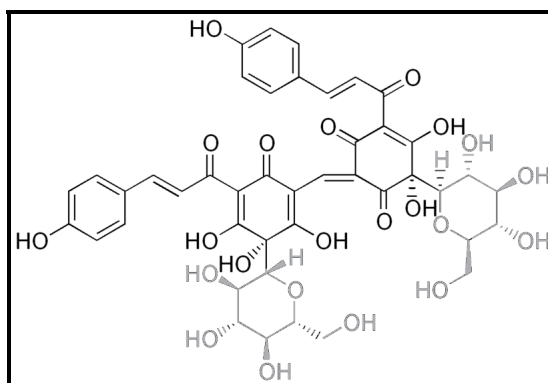


Figura 7: Cartamina - A aglicona corresponde a parte em negrito

Estes compostos, respondem por mais de novecentos de todos os flavonóides^{xvii} relatados na literatura, até o ano de 2003(43).

Uma característica marcante destes pigmentos é o fato de que a cor de suas soluções aquosas (ou alcoólicas) torna-se intensamente vermelha em pH alcalino (o simples contato de uma tira de papel impregnada com o pigmento, com vapores de amônia é o bastante para se observar esta coloração), e torna-se amarelo claro em pH ácido.

Os flavonóides apresentam ainda, duas bandas no espectro UV-VIS muito característicos um em, aproximadamente 250 nm e outro em 350 nm. As chalconas podem ser imaginadas retrosinteticamente, como o produto de uma reação de condensação de Claisen-Schmidt (figura: 8):

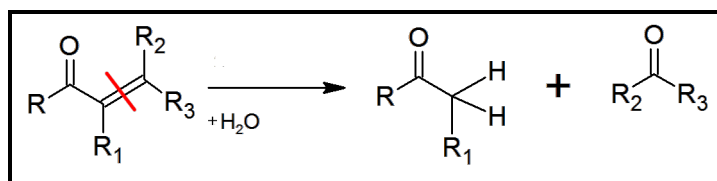


Figura 8: Condensação de Claisen-Schmidt

Na síntese das chalconas, R é frequentemente um grupo fenólico. Apesar de que, nas células das plantas, a rota biosintética das chalconas é bem mais complexa, envolvendo vários tipos de moléculas. A figura 9 mostra um esquema que ilustra o processo biosintético(44):

^{xvii}Os nomes aurona e flavonoide, parecem possuir sua etimologia nos adjetivos latinos *aurum* - dourado e *flavus* - amarelo, respectivamente

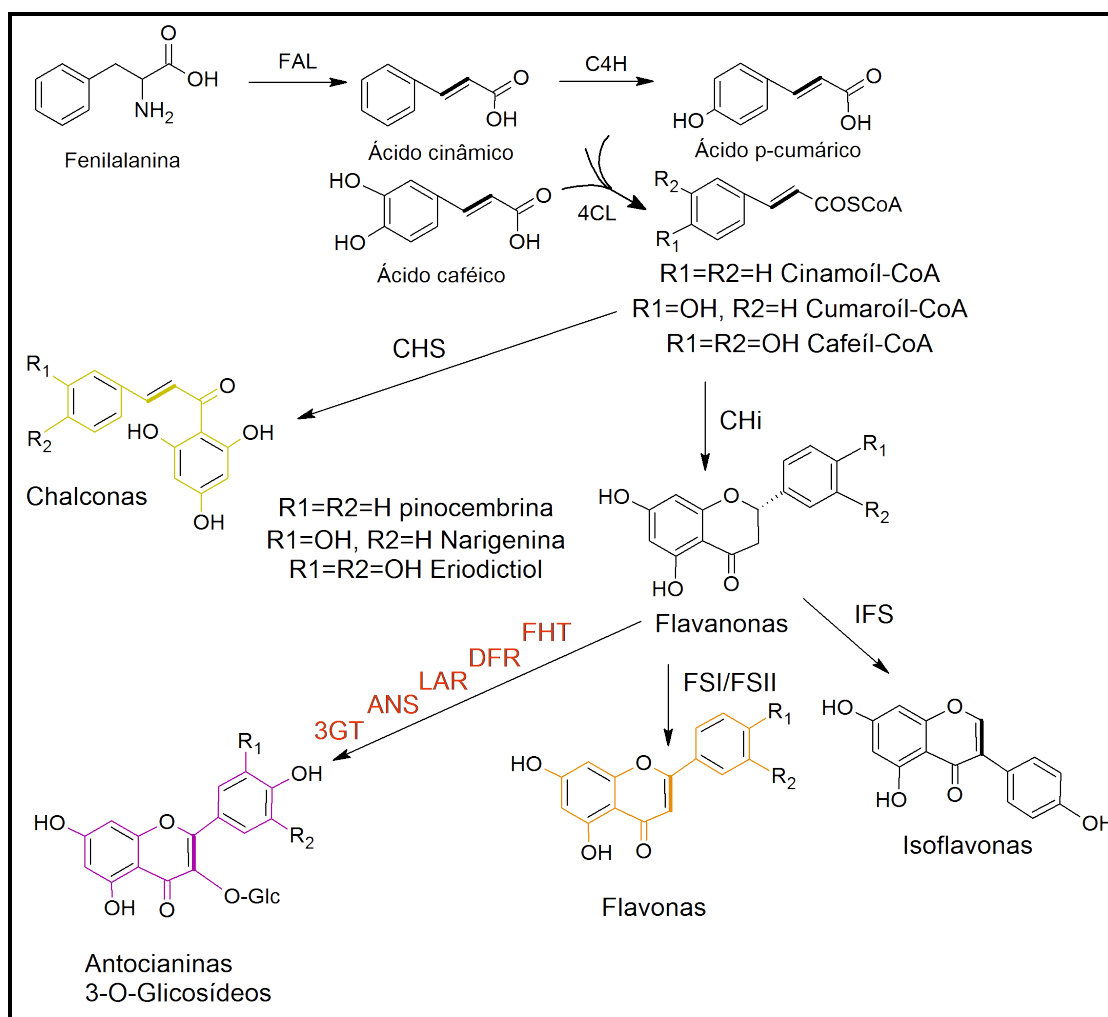


Figura 9: Rota biosintética (genérica) para flavonóides

Legenda com respeito à figura 9:

“FAL: Fenilalanina amônia-liase; C4H: cinamato-4-hidroxilase; 4CL: 4-coumaroil:CoA-ligase; CHS: chalcona sintase; CHI: chalcona isomerase; FSI: flavona sintase; FSII: citocromo P450 flavona sintase; IFS: citocromo P450 isoflavona sintase; FHT: flavanona 3- β -hidroxilase; DFR: dihidroflavonol 4-redutase; LAR: leucoantocianidina sintase; ANS: antocianidina sintase; 3GT: UDPG-flavonóide 3-O-glucosil transferase. As siglas em vermelho indica as enzimas do citocromo P450.”

Estes pigmentos (figura 10) representam uma classe muito complexa, porque frequentemente existe a possibilidade de formação de glicosídeos com inúmeros de açúcares diferentes, oligômeros, dímeros, trímeros(45) etc. Na figura 11 pode-se ver o esquema de numeração de alguns tipos de flavonóides segundo Veitch e Gray(43).

Nota-se que a principal característica que distingue as chalconas e diidrochalconas dos

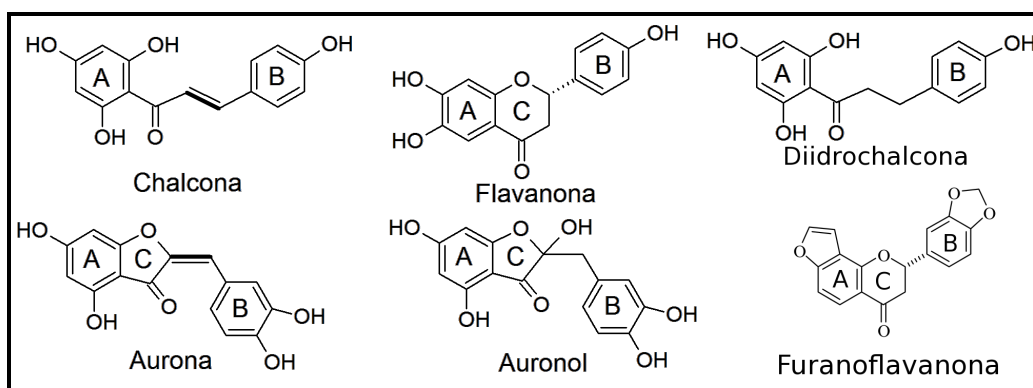


Figura 10: Diversos tipos de flavonóides

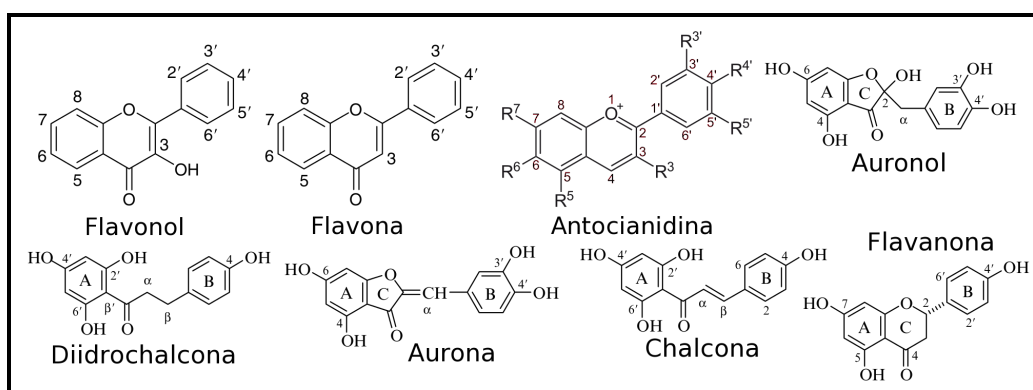


Figura 11: Sistema de numeração de alguns flavonóides

flavonóides é a ausência de ciclização (anel C) entre os anéis A e B.

2.8.1 Síntese de flavonóides

Encontram-se na literatura, diversas metodologias para a síntese orgânica destes compostos, já a muito estabelecidas. Certamente, alguns métodos são mais explorados do que outros. Para a síntese de chalconas por exemplo, a metodologia mais explorada é via condensação aldólica dada a sua simplicidade e, por ser uma reação clássica da química orgânica, (desenvolvida ainda no século XIX)(46).

Convém, destacar alguns métodos clássicos de síntese de flavonóides, bem como alguns menos conhecidos. Neste texto, considerou-se o termo flavonóide como um termo genérico para se designar as flavonas, dihidroflavonas, isoflavonas, auronas, chalconas, antocianidinas, bem como seus glicosídeos e polímeros (taninos).

2.8.1.1 Síntese de Auwers

Trata-se de uma reação de síntese de flavonol, descrita em 1908 pelo químico alemão Karl Von Auwers. Consiste em uma condensação aldólica entre uma cumarona e o benzaldeído, catalizada por ácido, formando uma chalcona. Esta em seguida reage com bromo, e posteriormente o produto é desalogenado em meio básico resultando em um 3-hidroxi-4-cloroflavonol (figura 12):(47)

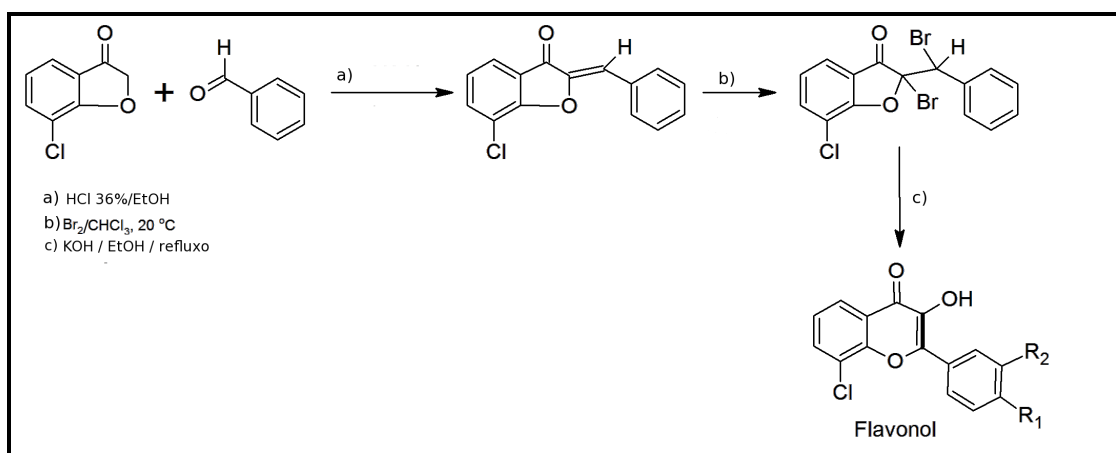


Figura 12: Síntese de um flavonol - Síntese de Auwers

2.8.1.2 Síntese via condensação aldólica

A condensação aldólica pode ser descrita genericamente, como a adição de um enolato de um aldeído ou cetona ao grupo carbonila de um segundo aldeído ou cetona. Os produtos iniciais desta condensação, 2-hidroxi-3-oxoalcano (aldol) ou 2-hidroxi-3-oxocetona (cetol), podem a seguir, desidratam-se e formarem um composto carbonílico α,β -insaturado.(47) Um caso particular desta reação, é quando o enolato de uma cetona, adiciona-se ao grupo carbonila de um aldeído não enolizável ou vice-versa e é conhecida como condensação de Claisen-Schmidt.

Uma reação clássica da química orgânica que, apesar de conceitualmente simples, ainda que com modificações segue sendo extremamente importante para a síntese orgânica destes compostos, devido a sua versatilidade na formação de ligações carbono-carbono.

Esta reação foi realizada em 1880-81(48, 49), consistiu na reação do benzaldeído com a acetofenona, conforme fig. 13:

Atualmente, a denominação de reação aldólica é empregada para as reação de qualquer enolato, não importando a sua origem (aldeído, cetona, amida etc.) e um composto

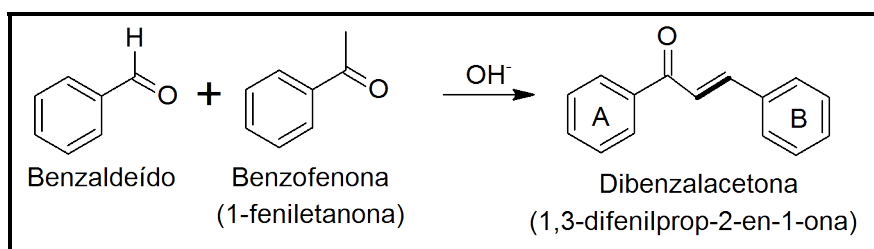


Figura 13: Condensação aldólica

carbonílico. Utilizando-se hidroxiacetofenonas e hidroxibenzaldeídos é possível obter as várias agliconas dos flavonóides naturais.

2.8.1.3 Método de Von Kostanecki

Este método, também chamado de método de Emilewicz-Kostanecki (devido ao químico polonês Stanisław Von Kostanecki)^{xviii}, é provavelmente um dos primeiros métodos empregados para a síntese de flavonas, descrito inicialmente em 1898. A reação consiste na halogenação (em geral a bromação), de 2'-hidroxi, ou 2'-acetoxi chalconas, e a posterior desalogenação empregando-se solução aquosa alcalina, à quente. Uma reação competitiva desta reação, a qual, por muito tempo a impediu de ser largamente empregada é a ciclização da dialochalcona inicial, em uma aurona.

Posteriormente, Von Auwers e Anshütz (1921) mostraram que 4'-alcoxiflavonas poderiam ser obtidas com excelentes rendimentos, apenas empregando-se uma solução alcóolica à frio. Assim, contornando a α -halo- β -alcoxiketona a qual cicliza para aurona, uma reação característica de dihaletos de chalcona contendo grupos doadores de elétrons nas posições *orto* e *para* do anel **B**(50) (figura 14).

2.8.1.4 Reação de Allan-Robinson

A chamada reação de Allan-Robinson, consiste na síntese de flavonas e isoflavonas pela condensação de O-hidroxiarilcetonas com anidridos de ácidos aromáticos e seus sais sódicos(51): (figura 15)

2.8.1.5 Rearranjo de Baker-Venkataraman

O chamado rearranjo de Baker-Venkataraman consiste em um rearranjo catalizado por base de O-aciloxicetonas em β -dicetonas, as quais são intermediários fundamentais

^{xviii}Myszków, Polônia, 1860-1910

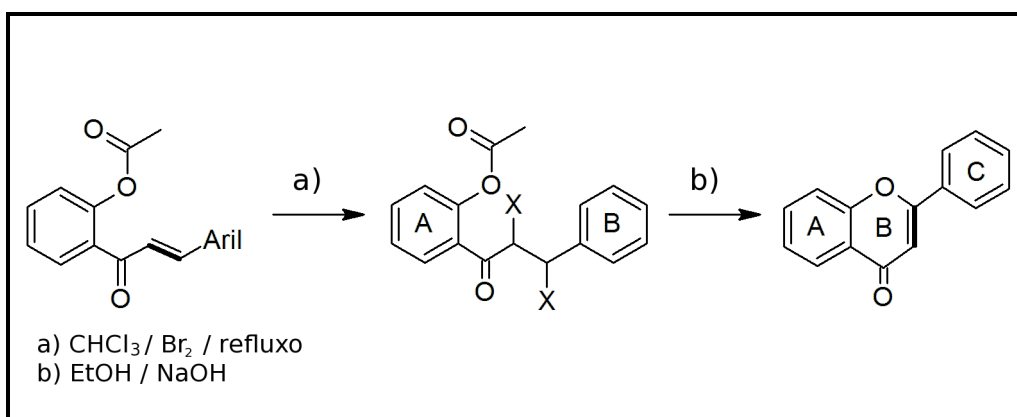


Figura 14: Síntese da flavona - método de Von Kostanecki

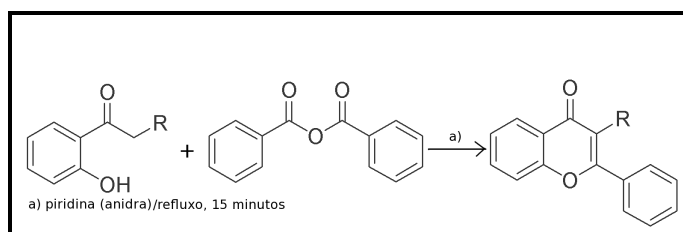


Figura 15: Síntese de uma flavona - Reação de Allan-Robinson

na síntese de flavonas(52): (figura 16)

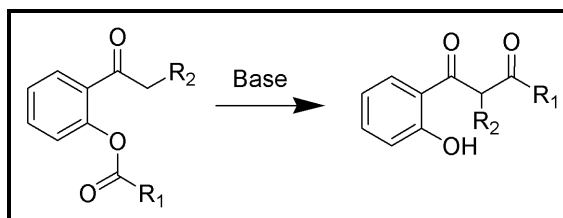


Figura 16: Rearranjo de Baker-Venkataraman

2.8.1.6 Reação de Algar-Flynn-Oyamada

Uma reação muito simples e prática para a síntese de flavonóis é a oxidação de chalconas empregando-se apenas o peróxido de hidrogênio, esta reação ocorre através de um intermediário dihidroflavonol: (figura 17)(53)

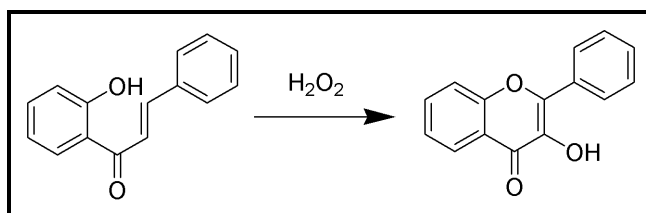


Figura 17: Reação de Algar-Flyn-Oyamada

2.8.1.7 Acoplamento de Suzuki-Miyaura

A reação de Suzuki-Miyaura (frequentemente chamada apenas de acoplamento de Suzuki) foi publicada inicialmente em 1979 e, envolve o acoplamento catalisado por complexos de paládio entre ácidos organoborônicos. A reação originalmente (figura 18) visava apenas o acoplamento de compostos arílicos, com o desenvolvimento de novos catalisadores o método, passou a ter uma aplicação maior.(54)

A reação atualmente inclui como reagentes além dos compostos arílicos, alcanos, alcenos e alcinos, e além dos ácidos borônicos utiliza-se também trifluoroboratos (triflatos), organoboranos e boronatos (figura 19).

Em 2003, Said Eddarir e colaboradores publicaram a síntese de chalconas baseando-se no acoplamento de Suzuki-Miyaura. A reação consiste na reação de Suzuki entre cloretos de cinamoíla e ácidos fenilborônicos ou entre cloretos de benzoíla e ácidos fenilvinilborônicos (figura 18).(55)

O ácido fenilvinilborônico foi preparado pela borilação do parametoxiestireno, pelo pinacolborano catalisado pelo complexo de Ródio $[RhCl(cod)_2]$, resultando no éster pinacólico do ácido parametoxifeniletilborônico, este, foi clivado usando-se periodato em THF/água, produzindo o ácido parametoxifeniletilborônico, necessário para o acoplamento de Suzuki-Miyaura (figura 18):

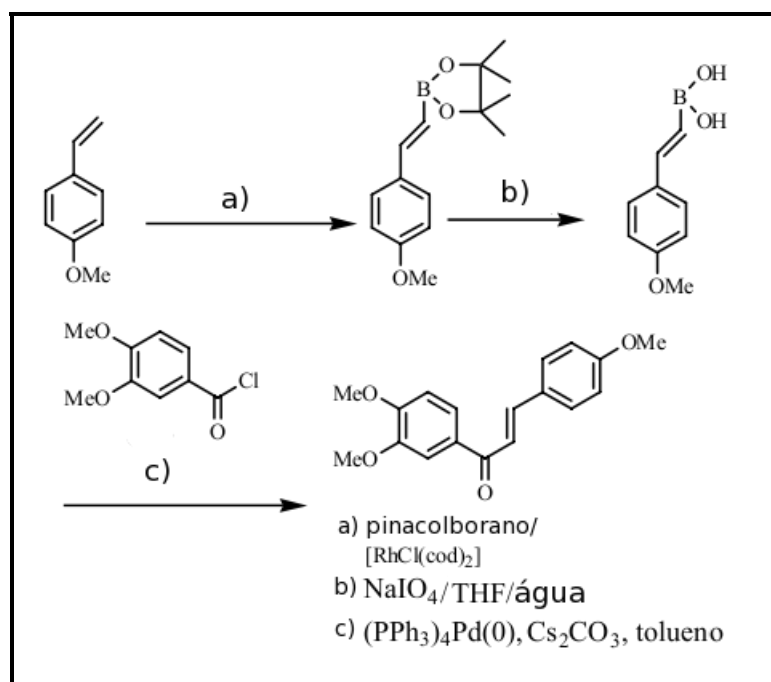


Figura 18: Síntese de chalconas - método de Eddarir

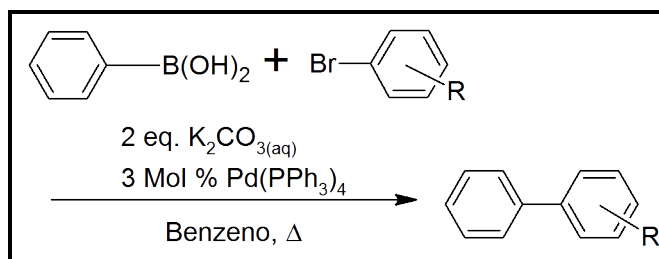


Figura 19: Reação original de Suzuki-Miyaura

2.9 flavonóides: algumas atividades biológicas

Os flavonóides de um modo geral apresentam efeitos: antioxidantes⁽⁵⁶⁾⁽⁵⁷⁾ (capacidade de reagir com ROS,^{xix} muito envolvidas nos processos inflamatórios⁽⁵⁸⁾⁽⁵⁹⁾ e de envelhecimento celular), fungicidas⁽⁶⁰⁾, quelantes⁽⁶¹⁾⁽⁶²⁾, bactericidas, bacteriostáticos, retardadores do envelhecimento celular, moduladores da permeabilidade de eritrócitos humanos⁽⁶³⁾, radioprotetores⁽⁶⁴⁾ e filtro solar⁽⁶⁵⁾ (devido ao fato de seus picos de absorção se encontrarem nas bandas de UV-B (320-280 nm) e UV-C (280-100 nm)).

Uma vez que estes compostos apresentam frequentemente dois ou mais grupos hidroxila ligados ao anel benzênico, estes compostos são muito suscetíveis a oxidação, eles encontram-se quase sempre na forma de glicosídeos, pois os açúcares estabilizam o anel

^{xix}vide seção *capítulo 1: Introdução*

aromático.(66)

Nos flavonóides o tipo de açúcar (glicose, frutose etc.) que esterifica o oxigênio do grupo fenol é característico de uma espécie vegetal, e por vezes, dentro de uma mesma espécie, açúcares diferentes ligados a um mesmo flavonóide caracterizam uma linhagem genética distinta da planta produtora. Ou seja, é possível a existência em uma determinada espécie vegetal, de duas plantas ou mais plantas que são morfologicamente idênticas, mas que ao serem analisadas quimicamente, chega-se a conclusão de que ambas produzem um mesmo flavonóide ligados a açúcares diferentes. Assim as plantas podem ser classificadas em quimiotipos diferentes.(67)(68)

Atualmente os flavonóides são considerados marcadores químicos, usados na classificação filogenética das plantas(69).

Como exemplos de efeitos antifúngicos, pode-se citar uma chalcona extraída do cerne da madeira de *Platymiscium yucatanum* (Leguminosae) popularmente conhecida no México como *granadillo*, ativa contra os fungos *Coriolus versicolor* e *Lenzites trabea*(70).

Segundo alguns autores, uma dieta rica em flavonóides, têm sido associada a uma melhor resistência dos eritrócitos de mamíferos aos danos causados por radicais livres oxigenados (peróxido, superóxido, peroxila, hidroxila, etc.), e ainda com uma chance reduzida de desenvolvimento de doenças cardíacas.(71)

Em particular, as procianidinas (figura 20), tem demonstrado efeitos positivos sobre a estimulação do sistema imune e diminuição do estresse oxidativo(72).

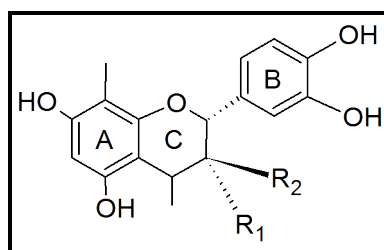


Figura 20: Exemplo de estrutura de uma procianidina

O fato de os flavonóides, de um modo geral, aumentarem a resistência dos eritrócitos ao dano oxidativo, é particularmente útil, uma vez que estas células possuem uma susceptibilidade ímpar a este tipo de dano, devido a uma confluência de fatores (ver seção 1.6.3):

Quanto aos seus efeitos anti-inflamatórios, experimentos com flavonóides têm apresentado uma série de evidências que demonstram a inibição de uma ampla gama de citocinas

pró-inflamatórias. Apesar de até o presente momento não ter sido estabelecido ainda um mecanismo que explique as bases moleculares deste efeito antiinflamatório, vários artigos demonstram esta ação terapêutica na clínica médica(73).

Existem ainda, estudos que indicam que um possível mecanismo, seria um decréscimo da produção de NO (óxido nítrico). A respeito dos efeitos antibióticos dos flavonóides, pode-se citar o uso do glicosídeo *florizin* no tratamento da malária. Este mostrou baixa toxicidade aos eritrócitos e um bom IC₅₀ (concentração na qual 50% dos parasitas morreram).(74)

Objetivos gerais e específicos

2.1 Objetivos gerais

Este trabalho teve por objetivo a averiguação qualitativa da existência de efeitos antibiótico e fotodinâmico empregando-se os extratos etanólicos brutos das flores de *B. sulphurea*, uma representante da família Asteraceæ.

2.2 Objetivos específicos

Procurou-se encontrar alguma aplicação prática para o referido efeito, por meio de experimentos envolvendo inativação fotodinâmica de microrganismos patogênicos (coliformes fecais), citotoxicidade em *Artemia salina*, fotohemólise de eritrócitos de carneiro e fotoinativação de levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae*.

Procurou-se testar o extrato de *B. sulphurea* em um ensaio que pudesse demonstrar tanto a existência de efeitos *pró* como *anti* oxidantes, uma vez que na literatura existem relatos da existência de flavonóides em *B. sulphurea*(13),(14),(75) e estes são notórios antioxidantes(76) e fotoprotetores(77). Logo, o objetivo específico foi a observação de ambos os efeitos em um único experimento por meio da variação dos parâmetros experimentaisⁱ.

ⁱVeja o experimento de fotohemólise, na pág. 66, no qual ambos efeitos, *oxidante* e *antioxidante* foram observados.

Materiais e métodos

3.1 Extrato bruto etanólico de *B. sulphurea* (laranja)

Separou-se as brácteas (desprezando-se os capítulos) de cerca de 300 flores (aproximadamente 50g) de *B. sulphurea* variedade laranja. As brácteas foram trituradas na potência máxima por 1 minuto e meio em um liquidificador contendo 200 mL de álcool etílico comercial hidratado 96 °Gl. Separou-se de seu sobrenadante, uma pasta composta pelas brácteas moídas. Aqueceu-se a solução em uma jarra de vidro de 500 mL, em um forno de microondas com potência de 900 Watts, e frequência de trabalho de 2450 MHz), até a ebulição (o que demorou aproximadamente 40 segundos). Logo após, com a solução ainda quente, filtrou-se em papel de filtro (marca Wattman), e a solução final armazenada em recipiente plástico opaco e bem vedado sob refrigeração, a -20 °C.

3.2 Obtenção de extrato bruto liofilizado de *B. sulphurea* (amarela e laranja):

Preparou-se um extrato bruto concentrado das flores de *B. sulphurea* variedade laranja e amarela, para que fosse utilizado nos experimentos de “fotohemólise” e de “Inativação fotodinâmica de coliformes fecais”, procedendo-se da seguinte maneira:

Coletou-se flores de *B. sulphurea* no período da manhã, em Uberlândia, no Bairro Cidade Jardim (Latitude: -18.95019 e Longitude: -48.29129). As flores foram secas no escuro, ficando 5 dias à temperatura ambiente e 5 dias à 37°C.

As flores foram maceradas e, 20g do pó das flores secas receberam 200 mL de solução de etanol 80% (160 mL de etanol absoluto e 40 mL de água destilada), e ficaram no escuro por 5 dias, com agitação ocasional.

50 mL do material extraído foram liofilizados, até a obtenção de um sólido escuro. 500 mg deste material foi dissolvido em 1000µL etanol absoluto (*solução estoque EtOH*), outros 500 mg foram dissolvidos em 1000µL de solução salina (*solução estoque salina*) ambas soluções foram armazenadas em refrigerador a -20°C em tubos tipo Eppendorf.

3.3 Obtenção dos espectros UV/VIS de *B. sulphurea* (amarela e laranja)

Leu-se os espectro UV/VIS do extrato etanólico bruto de *B. sulphurea* preparado tanto pelo método da seção 3.1 quanto pelo método da seção 3.2. Utilizou-se um espectrofotômetro marca HACH, modelo DR/4000 U (faixa de operação: 190 nm-1100 nm), com uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 cm.

Procedeu-se da seguinte forma: para o extrato obtido pelo método da seção 3.1 retirou-se a linha base (190 nm-1000, passos de 2 nm) com 5 μ L de etanol hidratado comercial 96 °Gl diluído em 2000 μ L de água destilada. Em seguida efetuou-se a varredura na faixa de 190 nm-1000 nm (passos de 2 nm).

Para o extrato obtido pelo método da seção 3.2, tirou-se a linha base usando-se 2000 μ L de solução salina e na varredura do extrato foi usado 10 μ L de solução estoque EtOH (para ambas as variedades) em 2000 μ L de solução salina.

Em um segundo momento, tirou-se a linha base usando-se 2000 μ L de solução salina mas a varredura foi feita usando 10 μ L de solução estoque salina.

Na figura 27 (seção de resultados) os espectros foram obtidos dissolvendo-se cerca de 100 μ L do extrato etanólico bruto de *B. sulphurea* variedade laranja, obtido pelo método da seção 3.1 em 2000 μ L dos solventes: água destilada, ciclohexano, dimetilsulfóxido (DMSO) e etanol absoluto, respectivamente.

Para este espectro tirou-se a linha base utilizando-se 2000 μ L dos solventes puros (Merck) grau espectroscópicoⁱ, usando-se uma cubeta de quartzo com 1cm de caminho ótico.

3.4 Espectros das lâmpadas UV e fluorescente utilizadas

Visando-se comparar o espectro de absorção dos extratos empregados com os espectros de emissão das lâmpadas utilizadas nos experimentos, decidiu-se registrar os espectros de duas fontes luminosas diferentes: A lâmpada fluorescente de 20 watts empregada no experimento de fotohemólise e a lâmpada UV compacta empregada na visualização das placas cromatográficas, ambas da marca OSRAM.

ⁱAssim como o grau de todos os demais solventes utilizados na leitura dos espectros.

Para tanto, empregou-se o espectrógrafo de alta resolução (0.02 nm) HR 4000 (marca Ocean Optics) acoplado ao sensor (tipo CCD) TCD1304AP (marca Toshiba). Registrou-se os espectros de ambas as lâmpadas conforme orientação do fabricante do equipamento. Os dados encontram-se descritos na seção de resultados experimentais (figuras 28 e 29).

3.5 Sistemas de irradiação empregados

Neste trabalho foram confeccionados e testados 4 sistemas de irradiação em que se utilizaram fontes luminosas bastante distintas:

- **Lâmpada halógena:** Lâmpada halógena de 250 watt ($2,1 J \cdot cm^{-2}$)

O aparelho consistiu em uma lâmpada de retroprojeto (dicróica) montada dentro da carcaça metálica de uma fonte de alimentação elétrica e, acima desta, um retângulo de vidro transparente, com cerca de 10x20x6cm, ôco, dentro do qual se fazia circular água. A água entrava por um tubo lateral conectado a uma mangueira de látex e era retirada pela ação gravitacional por outro lado à semelhança de um condensador de Liebig.

- **LED:** Seiscentos diodos de iluminação de 8 mm de alto brilho (8000 mcd), $\lambda_{max} \approx 630nm$

O sistema foi composto por seiscentos LED de 8 mm com ângulo de abertura de 120° (marca ZX) (ver figura 21), soldados lado a lado, de modo que suas extremidades retas se tocassem, em uma placa de fenolite. Estes foram ligados à uma fonte de alimentação do tipo simétrica e alimentados com 12 volts a 20 mA, conforme orientação do fabricante. Este sistema doravante será denominado “LED 600”.

- **Lâmpadas fluorescentes:** Aparelho constituído por quatro lâmpadas fluorescentes de 20 watts cada.

Aparelho composto por 4 lâmpadas fluorescentes tubulares de 38 cm (marca OSRAM), montadas dentro de uma caixa retangular (60x40x75cm) de aço, pintada por dentro e por fora com tinta epóxi na cor branca. As lâmpadas foram espaçadas de cerca de 5 cm uma da outra.

- **LED:** LED de 1 watt da marca Cree, ângulo de abertura de 120°, $\lambda_{max} \approx 630nm$

O sistema (ver figura 22) foi confeccionado usando-se o corpo de uma lanterna emborrachada (impermeável), onde instalou-se os LED, no total de dez, no local original da lâmpada, uma placa de circuito impresso circular (ocupando toda a área

da parte frontal da lanterna). O sistema foi conectado a uma fonte de alimentação apropriada de 12 volts. Cada LED consome cerca de 1 watt.

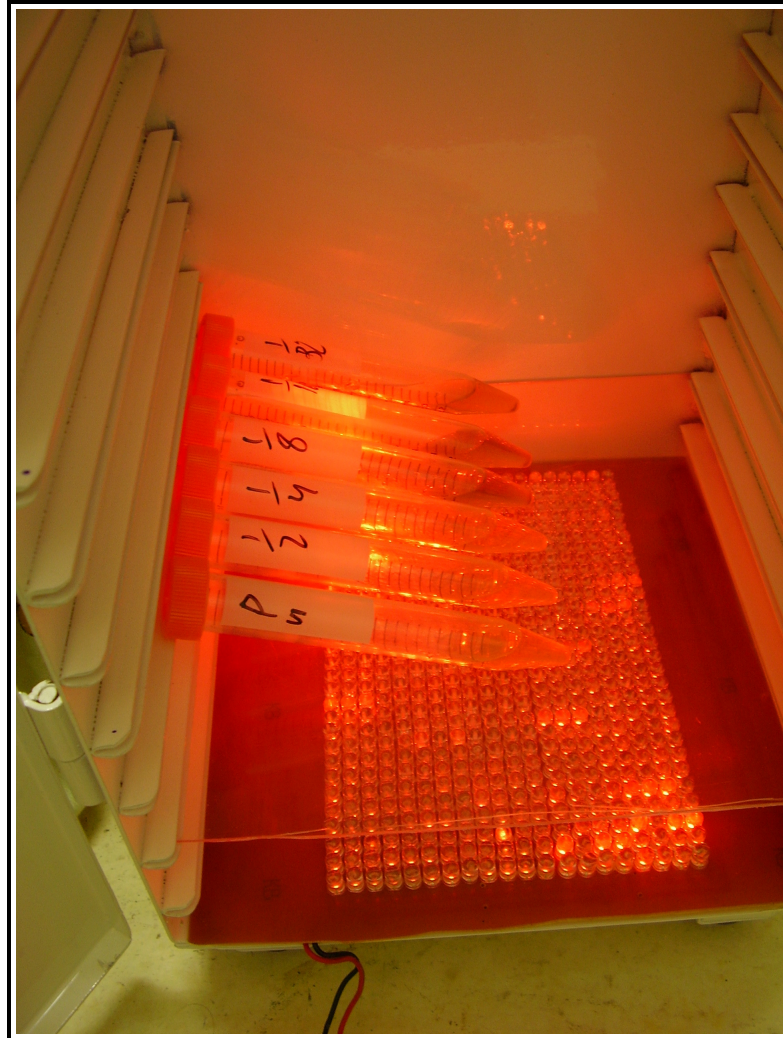


Figura 21: Aparelho utilizando 600 LED de alto brilho de 8mm

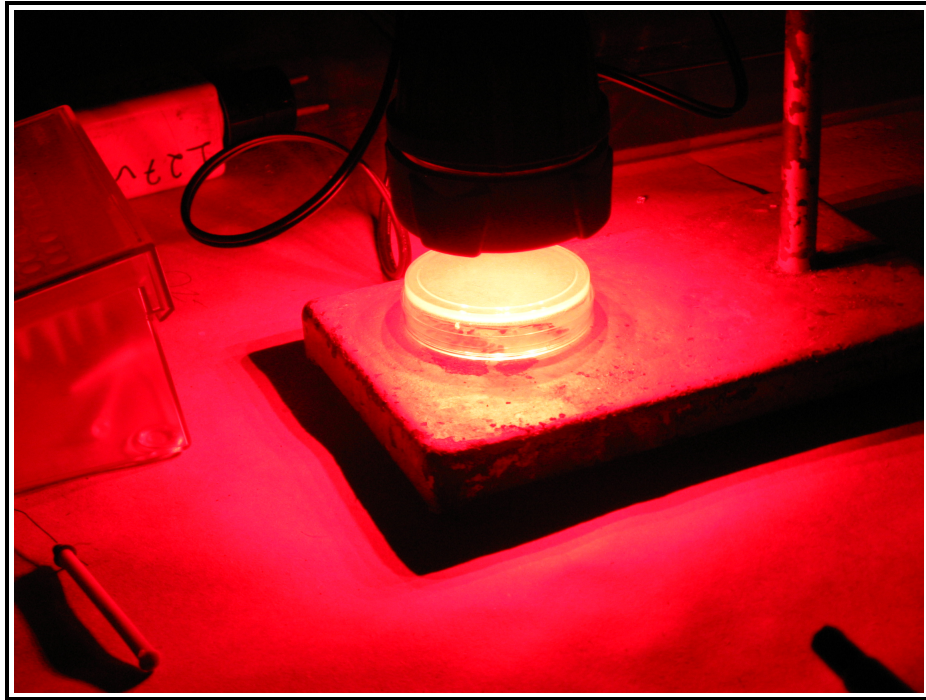


Figura 22: Lanterna de 10 LED de 1w

3.6 Metodologia experimental com *Artemia salina*

3.6.1 Eclosão dos cistos de *Artemia salina*

Colocou-se cerca de 300 mg de cistos em um béquer de 2 L com solução composta por 20g de sal marinho por litro de água destilada. Sobre o béquer instalou-se uma lâmpada halógena de 10 watts e manteve-se o béquer sob agitação por 24 horas, com o auxílio do ar comprimido de uma bomba comum de aquário.

3.6.2 Solução de extrato bruto de *B. sulphurea* empregada em *Artemia salina*

Para os ensaios empregando-se o crustáceo *Artemia salina*, utilizou-se a solução resultante do procedimento descrito na seção 3.1, diluída no próprio meio de cultura no qual os cistos do crustáceo eclodiram. Foram feitas diluições (em triplicata) usando-se entre 50 μ L a 200 μ L do extrato etanólico bruto (descrito na referida seção). Anotou-se os resultados, os quais encontram-se descritos na seção “Resultados experimentais”.

3.6.3 Ensaio de toxicidade em *Artemia salina*

Antes de seu emprego, retirou-se a solução estoque (extrato preparado na seção 3.1) da geladeira e aguardou-se a mesma atingir a temperatura ambiente. Com o auxílio de micropipetas, retirou-se alíquotas da solução estoque e diluiu-se nas soluções salinas contendo em média 10 artemiasⁱⁱ por tubo.

Marcou-se os tubos à caneta informando a quantidade de extrato adicionado (em triplicata): 50 μ L, 80 μ L etc. Ajustou-se o volume final dos tubos para 3 mL, nos quais diluiu-se o extrato bruto de *B. sulphurea* (preparado como na seção 3.1).

Dispôs-se os tubos em fileiras, em um suporte para tubos de ensaio, cada fileira era acompanhado de um “branco”. Ou seja, uma solução salina com artemias sem extrato mas com o mesmo volume de etanol contido em cada diluição adicionado. O qual serviu para avaliar-se a taxa de mortalidade “normal” (devido à manipulação, irradiação etc.) após as 24 horas de absorção, dividiu-se os tubos em dois grupos:

No grupo “A” irradiou-se as artemias (no aparelho de LED 600 descrito neste texto)

ⁱⁱÉ difícil garantir-se pegar sempre dez artemias porque as mesmas ao nascerem, são muito parecidas com as cascas de seus ovos, cascas estas que, as vezes, são coletas acreditando-se serem náuplios de artemias.

por 30 minutos e no dia posterior contou-se a quantidade de *Artemia* mortas (entre 8-24 horas de absorção) no grupo “B”, as artemias não foram irradiadas ficando no escuro por mais 24 horas.

O tempo de irradiação foi sempre o mesmo: 30 minutos, a altura desde o arranjo de 600 LED até os tubos também era sempre a mesma, cerca de 8 cm.

O tempo de incubação foi sempre de 24 horas. Ou seja, o período durante o qual o crustáceo foi exposto ao extrato etanólico (extraído à quente) de *B. sulphurea* variedade laranja, antes da irradiação por 30 minutos no aparelho “LED 600” quando a irradiação ocorreu, ou seja na tabela 1. A contagem de artemias ocorreu 48 horas após a adição do extrato.

Passadas 48 horas, derramou-se a solução de cada tubo em uma placa de Petri sob contador de colônias microbiológicas, com o auxílio de uma lupa, contou-se os crustáceos vivos e mortos. Considerou-se o espécime como morto quando este não apresentava movimento por 30 segundos. Anotou-se os resultados, os quais encontram-se na seção “Resultados experimentais”.

3.7 Experimento de fotohemólise em eritrócitos

A fim de se avaliar a existência de efeitos fotodinâmicos com relação ao extrato das pétalas de *B. sulphurea*, empregou-se eritrócitos de carneiro (gentilmente cedidos pelo Instituto de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia), os quais encubou-se com soluções do extrato bruto de *B. sulphurea* em solução fisiológica (0,9 % NaCl), tanto mantidos no escuro (avaliação do componente citotóxico), quanto irradiados no aparelho de lâmpadas fluorescentes (seção 3.5).

Dispôs-se as lâmpadas a uma distância de cerca de 8cm das placas de 24 poços utilizadas no experimento, o qual desenvolveu-se, segundo o seguinte protocolo:

- **Eritrócitos de carneiro:**

Obteve-se sangue de carneiro com heparina (anticoagulante) e centrifugou-se este à 1500 rpm por 10 minutos, coletou-se o corpo de fundo (eritrócitos) e desprezou-se o sobrenadante (soro). Os eritrócitos foram lavados com um volume de solução salina (0,9 %) dez vezes maior do que o volume ocupado por estes no tubo de centrífuga, repetiu-se este procedimento foi repetido por três vezes.

- **Suspensão de eritrócitos:**

Preparou-se uma suspensão de eritrócitos obtidos no ítem anterior anterior, com a concentração de 0,8% (v/v), em solução salina

- **Diluições sucessivas:**

Em placas de 24 poços, diluiu-se o extrato bruto liofilizado de *B. sulphurea* (laranja e amarela, ver seção 3.2) sucessivamente nas concentrações de 1/200 (1 μ L de extrato bruto para 200 μ L de solução salina) até 1/3200, todas as diluições foram feitas em triplicata e o volume final em cada poço foi de 100 μ L.

- **Adição de eritrócitos de carneiro:**

Após o passo anterior, adicionou-se a cada poço igual volume de suspensão de eritrócitos de carneiro à 0,8%, logo a concentração de eritrócitos final foi de 0,4%, pois o volume final passou a ser de 200 μ L.

- **Incubação e irradiação:**

Incubou-se a placa de 24 poços com o arranjo acima descrito, no claro e no escuro por 30 minutos e 180 minutos, ou seja, uma placa permaneceu no escuro por 30 minutos outra por 180, outra placa foi irradiada por 30 minutos outra por 180 minutos. As placas foram irradiadas por 4 lâmpadas fluorescentes de 20 watts (marca OSRAM) a uma distância de 8 cm.

- **Controles positivo e negativo:**

Em todo o experimento, manteve-se (para a hemólise dos eritrócitos) controles positivos e negativo, respectivamente. O controle positivo, (100% de hemólise) foi feito com água destilada e o negativo (0% de hemólise) em solução salina à 0,9%

- **Centrifugação:**

Após o período de incubação, o material foi removido de cada um dos poços e centrifugado à 14000, rpm por 2 minutos, à temperatura ambiente.

- **Coleta do material:**

Coletou-se os sobrenadantes e lêu-se em espectrofotômetro a absorbância da solução em 540 nm (pico de absorção da hemoglobina).

3.8 Fotoinativação de *Saccharomyces cerevisiae*

Visando-se avaliar o potencial fototóxico contra fungos, o extrato etanólico bruto (seção 3.1) de *B. sulphurea* (laranja), foi testado contra a levedura *S. cerevisiae* (empregou-se como fonte destas leveduras o fermento para pães marca Itaiquara).

Como procedimento experimental para avaliação quanto aos possíveis efeitos foto-dinâmicos do extrato etanólico adotou-se a seguinte técnica (todos os procedimentos foram também realizados no escuro, ou seja, sem irradiação):

1. Preparou-se uma suspensão estoque de células de *S. cerevisiae* na concentração de 4 na escala de McFarland, partindo-se de cultura de *S. cerevisiae* feita em ágar PDA (Potato Dextrose Agar, ou Ágar Dextrose Batata).
2. Retirou-se uma alíquota de 10 μL da suspensão preparada no item anterior e inoculou-se esta suspensão em placas de Petri, contendo 20 mL de ágar PDA pelo método *Pour plate*
3. Volumes de extrato etanólico bruto (seção 3.1) de 250 μL , 500 μL , 850 μL e 1000 μL (em triplicata) foram diluídas diretamente em placas de Petri com 20 mL de ágar PDA. Esta diluição foi realizada em seguida ao item anterior, ou seja, adicionou-se o inóculo juntamente com o extrato etanólico de *B. sulphurea*.
4. Irradiou-se estas placas por 15 minutos com o auxílio da lanterna de LEDⁱⁱⁱ, colocou-se a extremidade luminosa a uma distância de cerca de 8 cm da placa de Petri.
5. Como **BRANCO** adotou-se o seguinte critério:
 - placas de Petri apenas com ágar (para se testar uma possível contaminação, denominado de “CONTROLE”)
 - placas inoculadas e irradiadas (para se testar o efeito somente da luz)
 - placas inoculadas e não irradiadas (para se estimar o crescimento normal das colônias)
 - placas com ágar, somente com o extrato (para se testar uma possível contaminação do extrato).
 - placas inoculadas contendo apenas o solvente (etanol hidratado) eram irradiadas (para se avaliar algum efeito do etanol quando irradiado)
6. As placas eram postas em estufa, e mantidas à 37 °C por 24 horas.
7. Após 24 horas de incubação as placas de Petri foram postas em contador de colônias e contou-se o número destas.
8. As placas eram fotografadas e algumas destas fotos consideradas mais relevantes, encontram-se em *Resultados experimentais*.

ⁱⁱⁱVeja a figura 22

3.9 Fotoinativação de coliformes: LED 600

O extrato etanólicos bruto de *B. sulphurea*, preparado conforme 3.1 foi avaliado quanto a sua potencial atividade fotodinâmica, com relação aos coliformes presentes em uma água contaminada (coletada de vasos sanitários). Utilizou-se o meio de cultura comercial FLUORCULT (LMX Broth)©(como caldo) para a cultura. Todos os tubos foram inoculados com 100 μ L da água contaminada, a qual no momento da coleta apresentava-se límpida e sem detergentes, desinfetantes etc.

Diluiu-se sucessivamente o extrato etanólico no caldo de cultura (1/2 = 1000 μ L de extrato etanólico para 1000 μ L de caldo, 1/4 = 500 μ L de extrato etanólico para 1500 μ L de caldo etc.). Irradiou-se os tubos por 10 minutos a uma distância de 8 cm de suas bases no aparelho LED 600, então, encubou-se os tubos por 48 horas em estufa mantida a 37 °C.

O etanol utilizado no preparo do referido extrato, foi diluído nas mesmas proporções do extrato de modo que servisse como controle, para se avaliar se uma possível inibição do crescimento da bactéria era devido ao etanol.

Os tubos nos quais se efetuaram as diluições do extrato foram então fotografados após o período de irradiação (figura 21). Procedeu-se então, partindo-se do extrato etanólico, à determinação do MIC(78)^{iv}, para se determinar qual a concentração mínima do extrato etanólico que efetivamente inibe o crescimento de *E. coli* no caldo.

Considerou-se o MIC atingido quando encontrou-se uma concentração em que após a irradiação dos tubos, não mais se observasse efeito fotodinâmico.

O MIC obtido foi comparado com o que se obteve utilizando uma solução de 0,1 Mol · L⁻¹ de azul de metileno (Merck) irradiado nas mesmas condições descritas para o extrato etanólico de *B. sulphurea*.

A fotos com os resultados encontram-se na seção 4.2.2.

3.10 Efeito antibiótico de *B. sulphurea* em *E. coli*

Visando-se encontrar-se o MIC do o extrato etanólico de *B. sulphurea* (tanto da variedade laranja quanto da amarela, diluiu-se o extrato etanólico em caldo de cultura (FLUORCULT©) inoculado com 50 μ L de suspensão de *Escherichia coli* ATCC 25922,

^{iv}Do inglês *Minimum Inhibitory Concentration* ou *Concentração Inibitória Mínima*

grau 2 na escala de McFarland, (aproximadamente $6 \cdot 10^8$ UFC^v).

Diluiu-se o extrato etanólico conforme preparado na seção 3.1 nas proporções: 1/1, ou seja 1000 μ L de extrato etanólico para 1000 μ L de caldo de cultura inoculado, e deste modo proporcionalmente para todas as diluições subsequentes: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 e 1/32, o volume final era aproximadamente 2000 μ L.

Os tubos foram incubados por 48 horas em estufa mantida a 37 °C (no escuro, para tentar-se isolar qualquer atividade fotodinâmica), todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Após este período, procedeu-se a avaliação da inibição do crescimento bacteriano pela inspeção visual^{vi}, bem como pela cultura em placas de Petri e avaliação do número de UFC.

Para realizar-se a contagem, transferiu-se 10 μ L de suspensão do tubo para a placa de Petri contendo ágar PCA (*Plate Count Agar*) e espalhados pelo método “*Pour plate*”.

Estas placas foram colocadas em estufa a 37°C por 24h. Ao fim das quais, realizou-se a contagem dos microorganismos que sobreviveram ao extrato etanólico com o auxílio de um contador de colônias tradicional. Anotou-se os resultados.

3.11 Fotoinativação de coliformes com lâmpada halógena

Utilizou-se o aparelho de irradiação que utiliza-se de uma lâmpada halógena dicróica (ver seção 3.5) como fonte luminosa para se testar a capacidade do extrato etanólico de *B. sulphurea* (variedades amarela e laranja), de inativar fotoquimicamente coliformes fecais presentes em água contaminada, coletada de vasos sanitários.

O extrato de *B. sulphurea* utilizado, foi o preparado na seção 3.2 (liofilizado). Utilizou-se uma placa com 96 poços na qual efetuou-se diluições sucessivas da água contaminada juntamente com os extratos etanólicos, em várias proporções, segundo o protocolo:

Água contaminada por coliformes fecais, foi utilizada pura, e diluída com água destilada nas proporções de 1/5, 1/10 e 1/100. Ou seja, as proporções de água contaminada para água destilada foram respectivamente: 10 μ L para 50 μ L, 10 μ L para 100 μ L e 10 μ L para 1000 μ L.

^vUnidades Formadoras de Colônias

^{vi}Neste caso, foi utilizada uma lâmpada ultravioleta fluorescente compacta com comprimento de onda de 365 nm

O extrato etanólico de *B. sulphurea* foi diluído com água destilada nas proporções de 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200 e 1/6400 de extrato para água destilada respectivamente. Água contaminada foi então adicionada (100 μ L) aos poços da placa, contendo as diluições seriais do extrato etanólico.

Logo após, a placa foi incubada no escuro por 10 minutos e, em seguida, irradiada por 10 minutos, pela lâmpada halógena do aparelho descrito (2,1J \cdot cm²). 100 μ L de caldo FLUORCULT foi então adicionado a cada poço da placa, e a mesma foi incubada em estufa a 37°C por 48 horas em câmara húmida. Anotou-se os resultados, os quais encontram-se dispostos na tabela 34 juntamente com as fotos do experimento, na seção “Resultados experimentais”.

Para a variedade amarela, nem todas as cocentrções foram ensaiadas, devido à falta de material (flores amarelas), deste modo indicou-se este fato pela sigla “ND” ou não determinado. Os ensaios foram realizados em triplicatas para a figura 36 e em duplicata para todas as demais figuras. Quando não indicado na própria figura, o controle de crescimento foi realizado na última coluna da placa (coluna 8), na qual não foi adicionado extrato de *B. sulphurea*. Nesta coluna de controle adicionou-se apenas o caldo de cultura e o inóculo.