

Resultados experimentais e discussões

4.0.1 Espectros do extrato etanólico de *B. sulphurea*

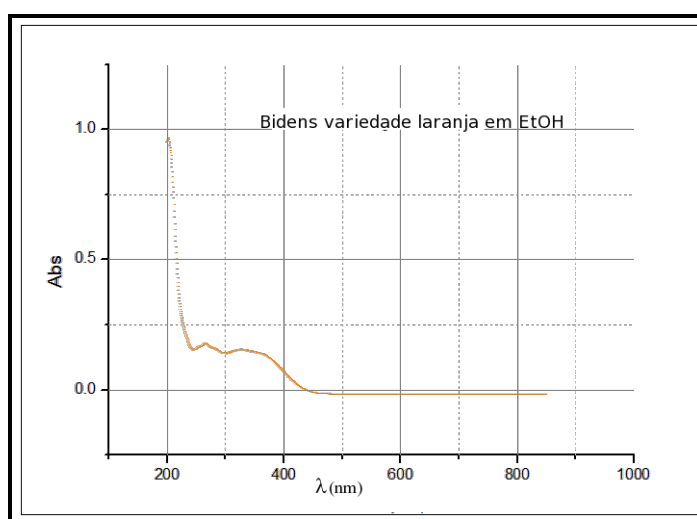


Figura 23: Espectro UV/VIS do extrato etanólico de *B. sulphurea*, variedade laranja, diluição (1/200)

A figura 23 mostra a grande absorbância na região que vai de cerca de 200 nm até aproximadamente 240 nm. Nota-se ainda duas bandas pouco separadas. Uma mais estreita que vai de cerca de 250 nm até 300 nm. Outra mais larga que se inicia em aproximadamente 300 nm e vai até cerca de 420 nm. A cor do extrato é devido a esta última banda. Como esta banda está compreendida na região do violeta, o extrato mostra coloração laranja amarelada.

Nota-se pela figura 24 basicamente as mesmas bandas com a mesma intensidade que na figura 23, apenas com pequenos deslocamentos. Nesta diluição (1/200) ambos extratos possuem coloração praticamente idêntica à olho nú: são ambos amarelados. A diferença de cor entre as variedades amarela e laranja evidenci-se somente em concentrações mais altas.

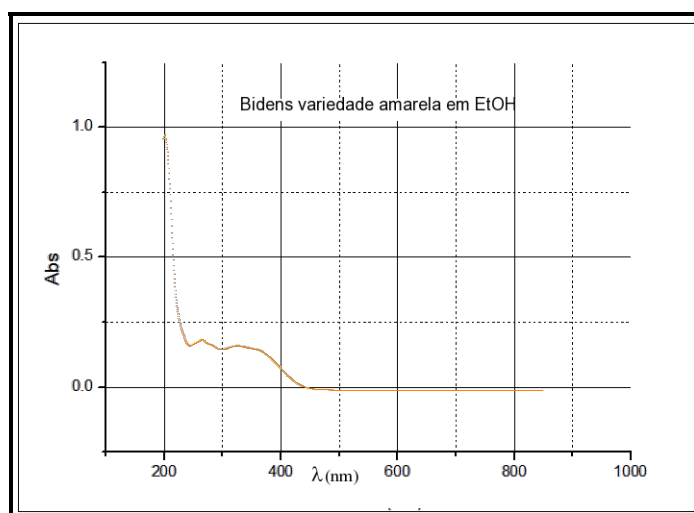


Figura 24: Espectro UV/VIS do extrato etanólico de *B. sulphurea* variedade amarela, diluição (1/200)

Pode-se notar pelas figuras 25 e 26 que o espectro UV/VIS do extrato etanólico liofilizado de *B. sulphurea* variedade amarela, dissolvido em solução salina absorve mais fortemente no ultravioleta (mais precisamente em cerca de 200 nm) do que os extratos liofilizados das variedades laranja (tanto dissolvido em etanol quanto em salina) e do que o extrato da variedade amarela dissolvida em etanol. O aumento na absorbância é de cerca de 50% maior: 1.5 no extrato da variedade amarela em salina contra 1.0 para todos os outros casos.

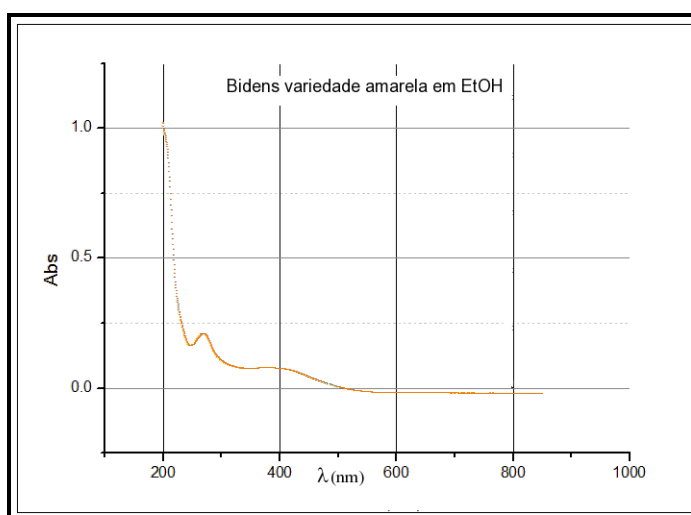


Figura 25: Espectro UV/VIS do extrato de *B. sulphurea* variedade laranja, diluição (1/200)

Além deste aumento na absorbância na região do ultravioleta, pode-se também notar que a banda na região de 250 nm até 300 nm é melhor definida nos espectros dos extratos

dissolvidos em solução salina. Além disto, a absorbância na região de 300 nm até cerca de 420 nm é menos intensa do que no extratos dissolvidos em etanol.

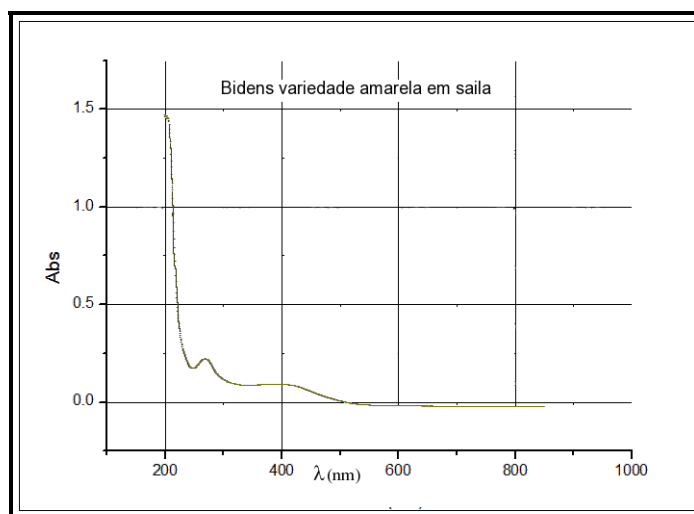


Figura 26: Espectro UV/VIS do extrato de *B. sulphurea* variedade amarela, diluição (1/200)

A figura 27, mostra espectros obtidos em diferentes solventes, todos sobrepostos em um único gráfico, utilizando-se extrato etanólico bruto extraído à quente de *B. sulphurea* variedade laranja.

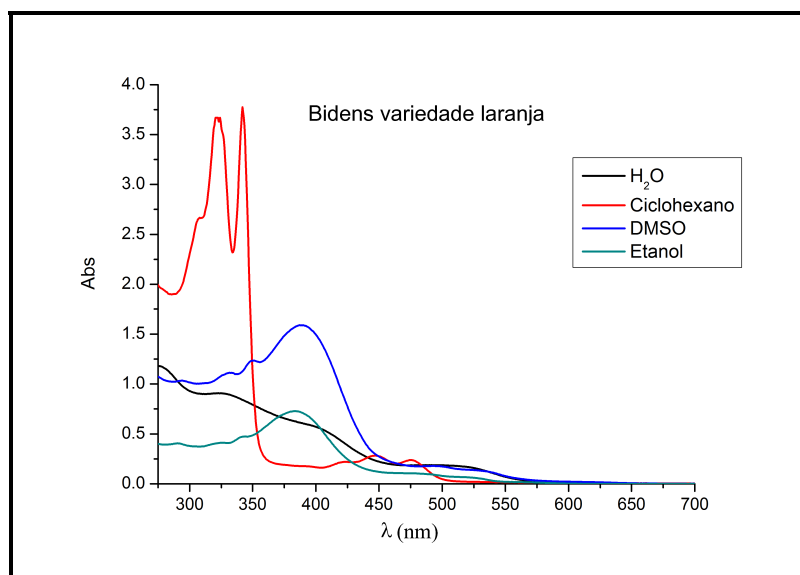


Figura 27: Espectros sobrepostos em diferentes solventes de extratos de *B. sulphurea* variedade laranja

Nota-se por estes espectros que, em todos os solventes utilizados (exceto o ciclohexano), o extrato de *B. sulphurea* absorve fortemente luz azul visível apenas na região do

violeta (450-475 nm).

Nota-se ainda que, a pesar do extrato em ciclohexano ser apenas ligeiramente amarelado (fraca coloração devido à absorção muito pequena na região do visível) o mesmo absorve várias ordens de grandeza a mais do que nos outros solventes. Pela figura 27, nota-se ainda que a despeito da absorbância na região do visível ocorrer em região próxima a observada nos espectros obtidos com o extrato liofilizado, ela é mais intensa no extrato obtido com etanol à quente. Sendo a absorbância obtida em DMSO particularmente intensa.

Assim, é interessante que o extrato tenha mostrado atividade fotodinâmica quando irradiado com os LEDs ($\lambda > 600$ nm), pois a absorção na região de emissão destes é muito baixa.

Por outro lado, sabe-se que os tecidos biológicos, são em geral muito permeáveis à luz de comprimentos de onda longos (região do vermelho para o infravermelho, ou cerca de 620 nm até 750 nm), assim talvez a baixa absorção de luz neste comprimento de onda tenha sido ao menos em parte compensada pela grande penetração nas células estudadas.

4.1 Espectros das lâmpadas fluorescente e UV utilizadas

A figura 28 mostra o espectro de emissão (em unidades arbitrárias) da lâmpada de 20 watts empregada no experimento de fotohemólise. Os picos agudos são devidos à emissão atômica dos diferentes elementos químicos presentes nas lâmpadas: Hg, Th, Yb, Eu etc.

Comparando-se este espectro, com os espectros de absorção dos vários extratos de *B. sulphurea*, vemos que nenhuma das duas fontes luminosas (lâmpada fluorescente e UV) cobrem efetivamente o espectro de absorção dos extratos.

A lâmpada UV é a que mais emite dentro da faixa de absorção máxima dos extratos, fato verificado experimentalmente pela grande fluorescência que o extrato apresenta quando irradiado com esta lâmpada.

Um arranjo que melhor emitiria dentro do espectro de absorção dos extratos de *B. sulphurea* seria uma junção das duas lâmpadas.

Como o aparelho utilizado no experimento de fotohemólise possui 4 bocais para lâmpadas fluorescentes, pode-se pensar em combinar lâmpadas UV e fluorescentes brancas 2 a 2, de modo a se expandir a banda de emissão, no sentido de cobrir ao máximo o espectro de absorção dos extratos de *B. sulphurea*.

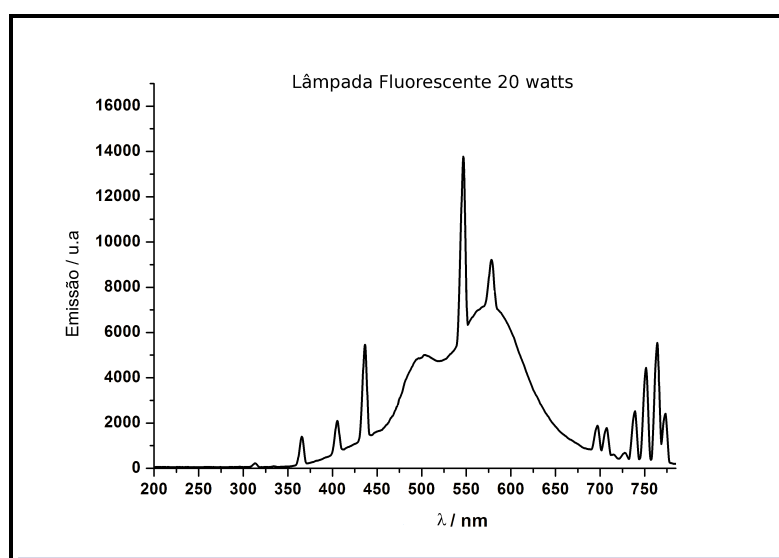


Figura 28: Espectro da lâmpada fluorescente de 20 watts

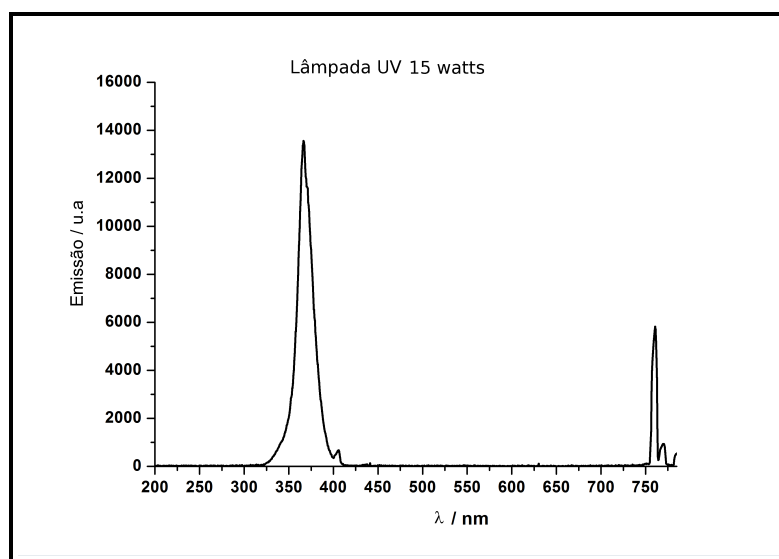


Figura 29: Espectro da lâmpada UV de 15 watts

4.2 Ensaios biológicos

Com relação as tabelas 1 e 2, nota-se que a despeito do espectro de emissão dos LED do aparelho “LED 600” estar pouco sobreposto com o de absorção do extrato etanólico de *B. sulphurea* empregado, ainda assim obteve-se um efeito fototóxico bastante mensurável em relação à toxicidade do extrato no escuro (não irradiado).

4.2.1 Mortalidade fotodinâmica de *Artemia salina*

Abaixo, encontram-se dispostas as tabelas onde se resume os resultados dos experimentos empregando *A. salina*. Conforme descrito na seção “Materiais e métodos empregados” (§3.6, pág. 46).

4.2.1.1 Artemias irradiadas

Tabela 1: Artemias irradiadas, diluição: 100-140 μL

	100 μL			120 μL			140 μL		
n	-	Vivas	Mortas	-	Vivas	Mortas	-	Vivas	Mortas
1	Branco	11	1	Branco	12	0	Branco	11	2
2	Tubo 1	5	5	Tubo 1	2	6	Tubo 1	1	13
3	Tubo 2	3	6	Tubo 2	3	7	Tubo 2	0	12
4	Tubo 3	1	9	Tubo 3	0	11	Tubo 3	0	9
5	% \bar{x}	31,03%	68,97%	% \bar{x}	17,24%	82,76%	% \bar{x}	2,86%	97,14%

4.2.1.2 Artemias não irradiadas

Tabela 2: Artemias não irradiadas, diluição: 100-140 μL

	100 μL			120 μL			140 μL		
n	-	Vivas	Mortas	-	Vivas	Mortas	-	Vivas	Mortas
1	Branco	12	0	Branco	11	1	Branco	11	0
2	Tubo 1	10	1	Tubo 1	11	0	Tubo 1	6	4
3	Tubo 2	8	0	Tubo 2	9	1	Tubo 2	7	4
4	Tubo 3	9	0	Tubo 3	9	0	Tubo 3	8	4
5	% \bar{x}	94,43%	3,57%	% \bar{x}	96,67%	3,33%	% \bar{x}	63,64%	36,36%

Pode-se notar um salto na toxicidade do extrato (tabela 2) entre os volumes adicionados de extrato de 120 μL e 140 μL . Para um aumento de apenas 20 μL de volume de extrato adicionado (16,67% a mais) a porcentagem de mortalidade aumentou mais de dez vezes. Passando de 3,36% para 36,36%. Este aumento não pode ser atribuído ao etanol utilizado no extrato pois em todos os “brancos” (controle) apenas uma *Artemia* morreu (tabela 2, volume adicionado de 120 μ). Nota-se ainda (tabela 1) que o aumento na taxa de mortalidade para as artemias irradiadas foi mais linear do que no caso onde a toxicidade foi avaliada no escuro (tabela 2).

4.2.2 Fotoinativação de coliformes fecais com aparelho LED 600

A figura 30 mostra, o extrato etanólico de *B. sulphurea* após 48 horas de incubação em estufa à 37 °C, diluído com o meio de cultura FLUORCULT e incubado com água contaminada com coliformes fecais.

Analisando a figura 30 percebe-se que até na diluição de 1/4 o extrato etanólico de *B. sulphurea* (laranja) inibe o crescimento dos coliformes completamente (após a irradiação por 10 minutos com o arranjo de LED descrito), pois o meio de cultura é amarelo e quando ocorre crescimento das bactérias, o meio de cultura libera um cromóforo azulⁱ, assim o meio de cultura fica esverdeado (resultado da mistura das cores amarelo e azul).

Desta forma, (veja na figura 30), poderia-se supor que na diluição 1/8 (extrato/caldo de cultura) as bactérias já se proliferaram em grande número. Mas, apesar da cor à luz branca se mostrar esverdeada, ela não é uma confirmação de crescimento massivo de bactérias. A figura 31 mostra o porquê: apenas a partir do tubo “1/16” percebe-se a fluorescência do caldo, indicando crescimento de coliformes em grande número.

As figuras 32 e 33, mostram o grande valor prático da fluorescência do meio de cultura: Como tanto o azul de metileno quanto o meio de cultura “positivo” para coliformes são azuis, não é possível detectar-se (a olho nú em luz branca) em qual concentração o efeito inibidor do azul de metileno passou a findar. Mas sob uma luz UV ($\lambda \approx 360nm$), podemos notar facilmente, veja a figura 33 que apenas na diluição de 1/32 os coliformes proliferam-se em abundância.

Por estas imagens pode-se comprovar o efeito fotodinâmico do extrato etanólico de *B. sulphurea*. O efeito do extrato, que é uma complexa mistura de muitos compostos, é comparável ao do Azul de metileno que é uma substância pura e considerado um fotossensibilizador clássico.

A Asteracea *B. sulphurea*, jamais havia sido descrita na literatura como possuindo qualquer atividade fotodinâmica, tampouco antibiótica. Já seu uso *folclórico* como anti-malárico, havia sido descrito ainda em 1915 pelo médico carioca Dr. José Monteiro da Silva(79) em sua *Flora Medicinal*.

ⁱPortanto caso o crescimento tenha sido massivo, o meio se tornará completamente azul.

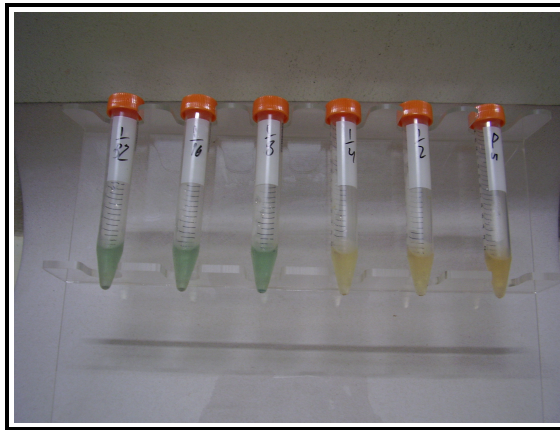


Figura 30: Determinação do MIC para o extrato irradiado

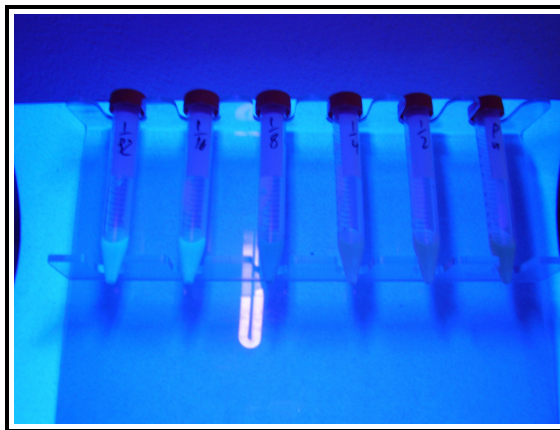


Figura 31: Fluorescência revelando o crescimento de coliformes

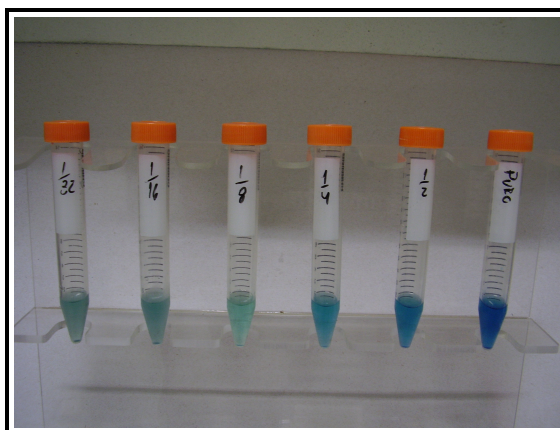


Figura 32: Azul de metileno utilizado como fotosensibilizador

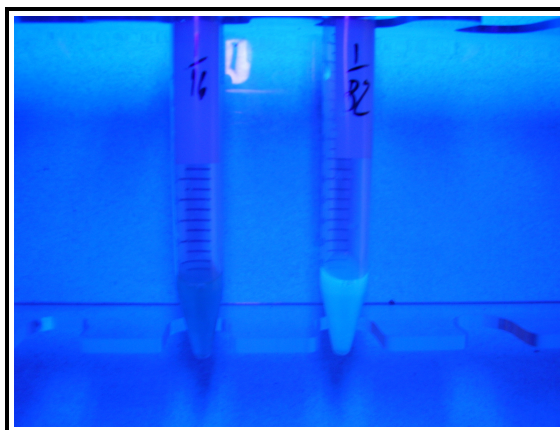


Figura 33: Azul de metileno inibe os coliformes até na diluição 1/16

4.2.3 Fotoinativação de coliformes com lâmpada halógena

Foi observada fotoinativação significativa para diluições de até 1/400, dependendo da concentração do inóculo e variedade da planta utilizada no extrato. A variedade laranja demonstrou atividade fotodinâmica cerca de duas vezes superior a variedade amarela.

A incubação no escuroⁱⁱ mostrou atividade do extrato até a diluição de 1/200. Os solventes etanol e dimetilsulfóxido não mostraram atividade nem no escuro nem ao serem irradiados, quando testados nas mesmas proporções do extrato de *B. sulphurea*.

Pode-se atribuir o enorme aumento da atividade do extrato neste experimento, em relação ao experimento empregando-se o sistema LED 600, devido principalmente a dois fatores:

Preparação do extrato: O extrato utilizado no experimento do aparelho LED 600, foi preparado usando-se cerca de 50g de flores frescas e extraído com etanol à quente, (o que aumenta o poder de solubilidade do extrato). Mas o tempo de contato entre as flores e o solvente foi curto. Já o extrato utilizado no experimento com lâmpada halógena foi o extrato liofilizado, preparado a partir de cerca de 20g de flores *desidratadas*, portanto muito mais concentrado.

Comprimento de onda da fonte luminosa: A fonte de irradiação empregada no experimento do LED 600, foram diodos emissores de luz que emitem luz praticamente *monocromática*. Comparando-se com os espectros obtidos para os extratos de *B. sulphurea*ⁱⁱⁱ (ambas variedades), vemos que o extrato absorve muito pouco na região

ⁱⁱQuando não houve irradiação da placa.

ⁱⁱⁱVeja a seção 4.0.1, página 53

de emissão dos LED.

Assim, a lâmpada halógena que é uma fonte *policromática* e muito mais potente do que os 600 LED, além de cobrir todo o espectro de absorção do extrato etanólico, ainda o fez com uma potência muito maior, mesmo na estreita região do espectro coberta pelos LED.

A figura 34 mostra um resumo numérico dos resultados das figuras 35 e 36^{iv}. Pode-se perceber por esta tabela que o extrato etanólico liofilizado de *B. sulphurea* de ambas variedades apresenta claramente tanto efeito antibiótico, ou seja, toxidade no escuro, quanto efeito fototóxico (ou fotodinâmico). Nota-se claramente que existe um grande aumento da toxidade no extrato quando irradiado pela lâmpada halógena. Pois quando uma suspensão concentrada de coliformes (água contaminada não diluída) foi testada frente ao extrato, o mesmo causou inibição do crescimento bacteriano na diluição (média) de apenas 1/200 no escuro chegando a inibir o crescimento dos coliformes até na diluição de 1/800 (experimento A₃) quando irradiado.

Amostras (diluição)		Extrato etanólico bruto (Diluição máxima onde os coliformes proliferaram-se)			
S.D = Sem Diluição N.D = não determinado		Variedade laranja		Variedade amarela	
		Não irradiado	Irradiado	Não irradiado	Irradiado
	S.D	1/100; 1/200	1/800; 1/400; 1/400	1/100; 1/100	1/200; 1/200
	1/5	S.D	1/800; 1/800; 1/800	N.D	N.D
A ₁	1/10	1/200; 1/200	1/1600; 1/1600; 1/1600	1/200	1/100
	1/100	1/200; 1/200	1/1600; 1/1600; 1/1600	1/200; 1/200	N.D
	S.D	1/200; 1/200	1/400; 1/400	1/100	1/200
A ₂	1/10	1/200; 1/200	1/400; 1/800	1/100	1/400
	1/100	1/200	1/800; 1/1600	1/100	1/800
	S.D	1/200	1/800	1/100	1/400
A ₃	1/10	1/200	1/1600	1/200	1/800
	1/100	1/200	1/1600	1/200	1/800

Figura 34: Inativação fotodinâmica de *E. coli* com lâmpada halógena

Percebe-se que o extrato etanólico da variedade laranja de *B. sulphurea* é cerca de 100% mais inibidor ao crescimento de coliformes fecais quando irradiado com lâmpada halógena do que o extrato da variedade amarela. O extrato etanólico da variedade laranja

^{iv}Legenda para estas figuras: N.I não irradiado e Irrad = irradiado)

chegou a inibir o crescimento bacteriano quando diluído até 1/1600, (inóculo diluído de 1/100) enquanto que a variedade amarela chegou a atingir 1/800. Nota-se ainda que a toxicidade no escuro (efeito antibiótico) do extrato etanólico de ambas variedade de *B. sulphurea* foram muito semelhantes (média de 1/200) e fracamente dependente da concentração inicial do inóculo. Estes testes mostram claramente a correlação entre a fototoxicidade e os pigmentos que conferem a cor laranja.

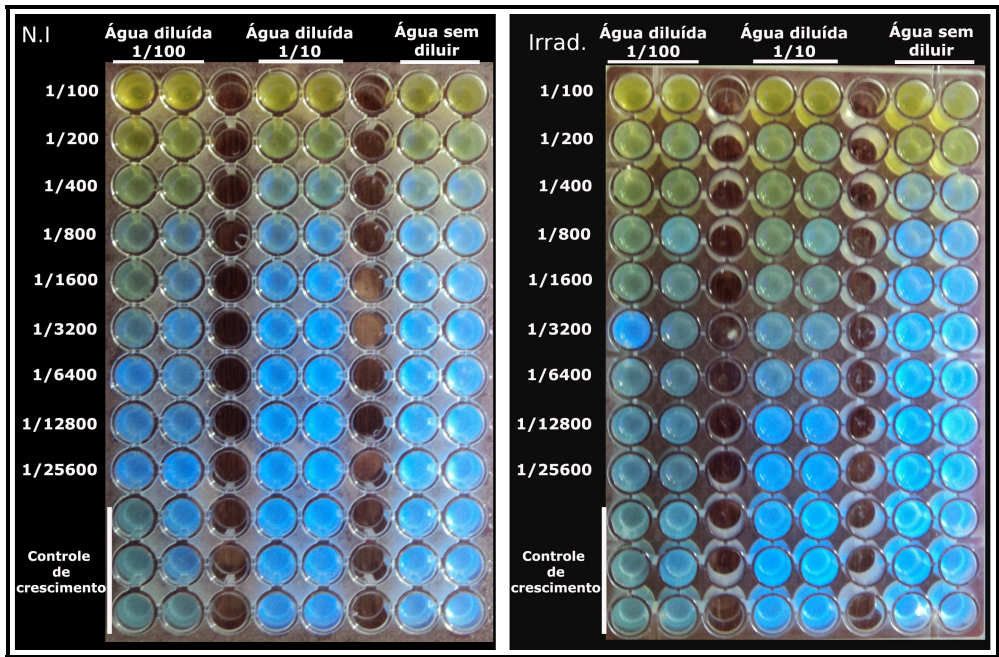


Figura 35: *B. sulphurea* amarela: não irradiada e irradiada

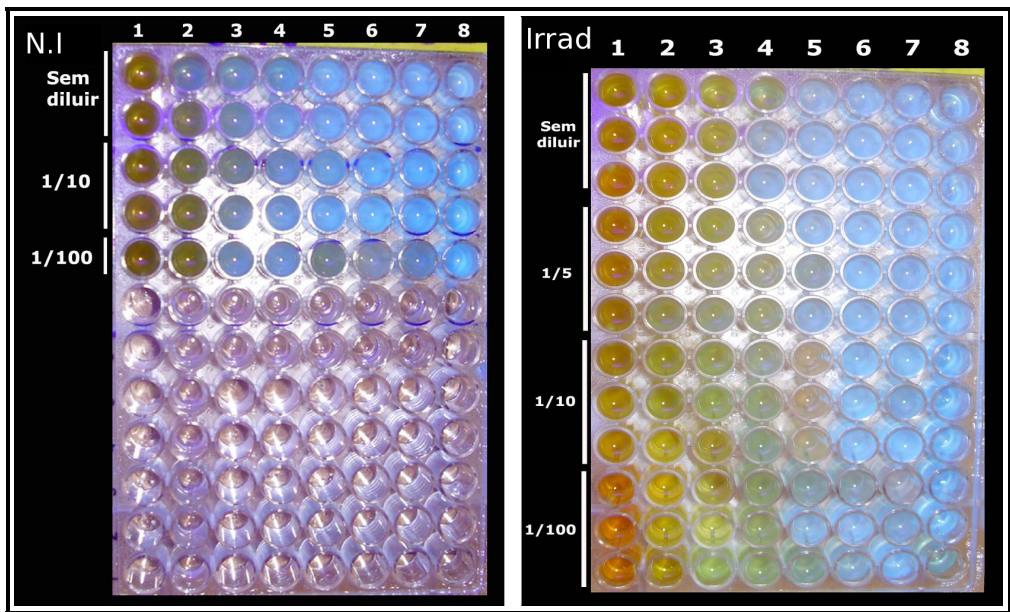


Figura 36: *B. sulphurea* laranja: não irradiada e irradiada

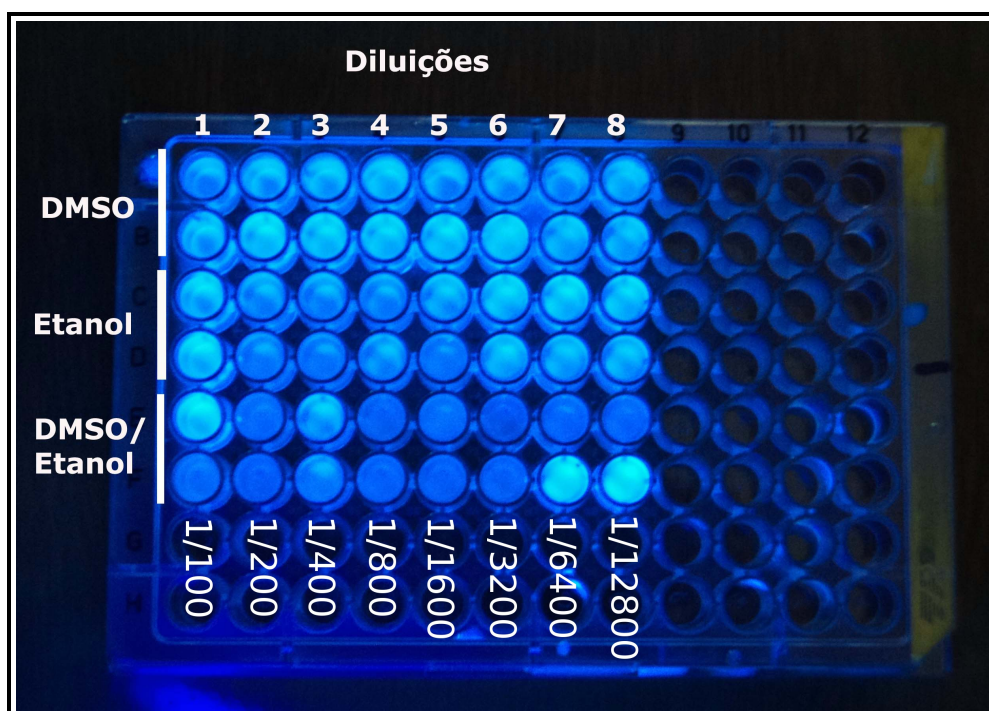


Figura 37: Nenhum dos solventes inibiu o crescimento microbiano

A figura 37 mostra o resultado da incubação dos coliformes fecais com diferentes solventes, sob as mesmas condições empregadas para os extratos de *B. sulphurea*. Nota-se que nenhum dos solventes empregados, nas concentrações testadas foi capaz de inibir o crescimento de coliformes, evidenciado pela forte fluorescência do meio de cultura em todos os poços. Portanto, pode-se descartar a possibilidade de os coliformes terem sido inibidos devido aos solventes utilizados na preparação dos extratos de *B. sulphurea* de ambas variedades.

4.2.4 Resultados da fotohemólise

Verificou-se que, somente ocorreu hemólise dos eritrócitos após 180 minutos, com irradiação ou no escuro. Após 30 minutos, não foi verificada hemólise significativa, tanto para os eritrócitos irradiados quanto para os que permaneceram no escuro.

Eritrócitos totalmente hemolisados (controle positivo, ou 100% de hemólise) com água destilada produziram uma leitura (em unidades arbitrárias de absorbância = u.a) em 540 nm, de 0,0208. A hemólise basal (controle negativo, ou 0% de hemólise) produziu uma leitura (em unidades arbitrárias de absorbância) de 0,0050.

- **Legenda para o gráfico da fotohemólise (figura 38):**

- *NIrrad/30min:*

Não irradiado (permaneceu no escuro) incubado por 30 minutos

- *NIrrad/180min:*

Não irradiado (permaneceu no escuro) incubado por 180 minutos

- *Irrad/30min:*

Irradiado (luz branca, 4 lâmpadas fluorescentes de 20 watts, à 8 cm) incubado por 30 minutos

- *Irrad/180min:*

Irradiado (luz branca, 4 lâmpadas fluorescentes de 20 watts, à 8 cm) incubado por 180 minutos

- *0.005:*

Hemólise basal, ou 0% de hemólise (em solução fisiológica)

- *0.0208:*

Hemólise 100%, em água destilada

Pode-se notar seguindo-se a linha de hemólise basal (linha azul claro, Abs: 0.0050 u.a) que, para as diluições 1/1600 e 1/3200 (ambas irradiadas por 180 minutos) a fotohemólise sofrida pelos eritrócitos foi na verdade menor do que a hemólise basal, ou seja, nestas condições os eritrócitos foram protegidos do dano fotooxidativo pelo extrato de *B. sulphurea*.

Já se olharmos para as diluições 1/200, no casos irradiado ou não por 180 minutos, veremos a absorbância foi significativamente maior do que a apresentada pelo controle positivo (100% de hemólise).

Logo, a absorbância nestes dois casos, foi maior do que a apresentada por toda a hemoglobina presente nos eritrócitos após ser liberada em solução por hemólise total com água destilada.

Por conseguinte, o extrato de *B. sulphurea* apresentou neste caso, um fenômeno de *hipercromismo*, pois a absorbância da solução aumentou bastante, sem que a massa de soluto tenha aumentado, o que indica que alguma espécie química em solução teve sua estrutura molecular alterada, talvez por alguma reação fotoquímica.

Como a hemoglobina contém ferro e o extrato de *B. sulphurea* mostrou grande facilidade em complexar com este e, a absorvidade molar do produto desta complexação parece ser ordens de grandeza maior do que a do extrato isoladamente, convém investigar-se este fenômeno em maior detalhe, em um trabalho posterior.

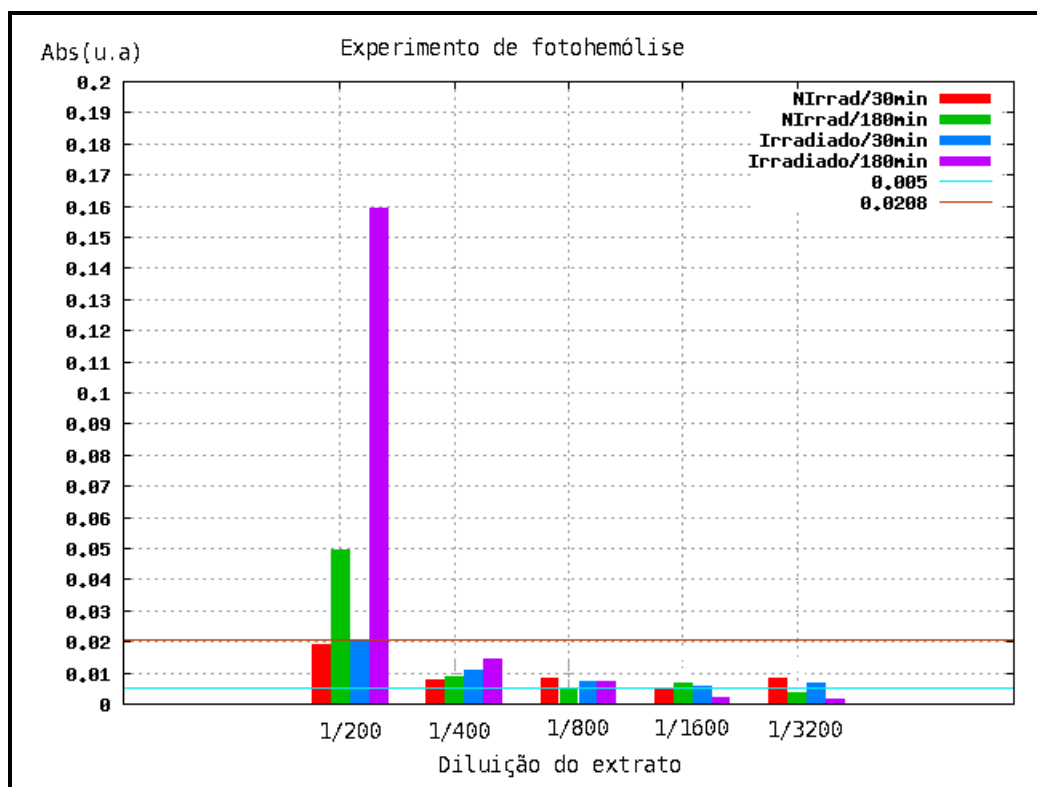


Figura 38: Fotohemólise usando extrato de *B. sulphurea* laranja

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

Para ambas as variedades de *B. sulphurea*, notou-se o efeito antibiótico até a diluição de 1/8, a partir da qual a *E. coli* passou a se proliferar.

Em todos os casos onde houve a proliferação bacteriana, a contagem das unidades formadoras de colônias revelaram concentrações UFC = $2,5 \cdot 10^7$ para *B. sulphurea* variedade laranja, e para a variedade amarela UFC = $5,0 \cdot 10^7$ enquanto que o *controle* (suspensão bacteriana em solução salina) revelou UFC da ordem de 10^8 e o *Branco* (solução salina estéril) não revelou UFCs.

Usando-se o etanol como branco, já na concentração de 1/4, a contagem bacteriana do tubo contendo apenas etanol (e inoculado com *E. coli*) foi virtualmente idêntica a do tubo contendo a suspensão bacteriana em solução salina, ou seja, pode-se descartar a hipótese de que o efeito antibiótico observado com o extrato etanólico de *B. sulphurea* seja devido ao etanol, usado como solvente.

É interessante notar que, como a contagem de bactérias no tubo contendo o extrato de *B. sulphurea* variedade amarela, foi cerca de 100% *maior* do que a do tubo contendo o extrato da variedade laranja, a presença de efeito antibiótico está relacionada com a presença de pigmentos que conferem a cor laranja. Pode-se ao menos em parte atribuir o efeito antibiótico aos flavonóides que conferem esta cor ao extrato, tais como a aurona *sulfuretin*⁽⁸⁰⁾⁽⁸¹⁾.

Como o fenótipo “amarelo” é bem menos comum do que o “laranja”, a presença dos pigmentos que conferem a planta o fenótipo “laranja” pode estar relacionada de alguma forma a algum tipo de adaptação evolutiva contra, doenças causadas por bactérias.

4.2.6 Resultados da fotoinativação de *Saccharomyces cerevisiae*

As figuras 39, 40 e 41 mostram o experimento da fotoinativação da levedura *S. cerevisiae*. Nota-se que, para uma inoculação de 10 μ L de uma suspensão com concentração de células de *S. cerevisiae* de aproximadamente 4 na escala de McFarland (número de células em suspensão aproximadamente igual a 1×10^8 UFC) o número de colônias é “incontável” (maior do que cerca de 300 UFC)^v em ambos os casos: no primeiro caso apenas com o inóculo e no segundo com 1 mL de etanol hidratado.

Todavia nota-se que a densidade de colônias na placa de Petri onde se adicionou o etanol é menor (figura 40), indicando que nesta concentração (1 mL de etanol 96 °GL para 20 mL de agar PDA) de etanol, o mesmo por si só é tóxico para as leveduras. Pela figura

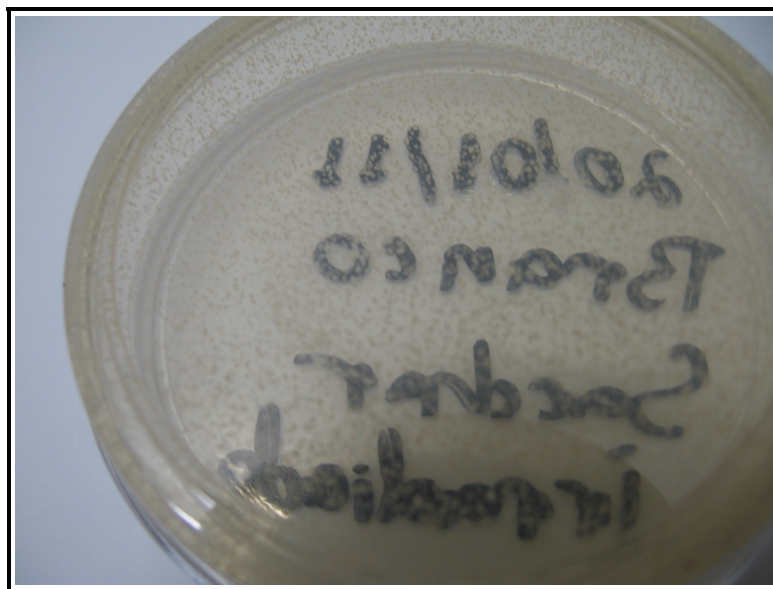


Figura 39: PDA inoculado com 10 μ L de suspensão microbiana (McFarland = 4)

41 nota-se que a despeito de a concentração final de colônias ser “incontável” percebe-se que o número de colônias é bem menor do que no “branco” (figura 39) e menor do que no caso do etanol apenas (figura 40).

^vNormalmente aceita-se que o número de UFC para ser significativo, deve estar compreendido entre 20 e 300 UFC aproximadamente.

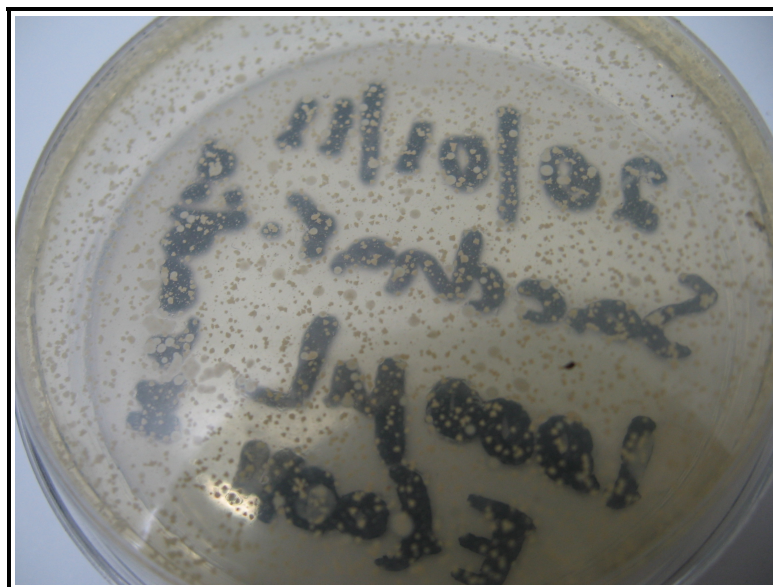


Figura 40: PDA inoculado com 10 μ L de suspensão microbiana (McFarland = 4)

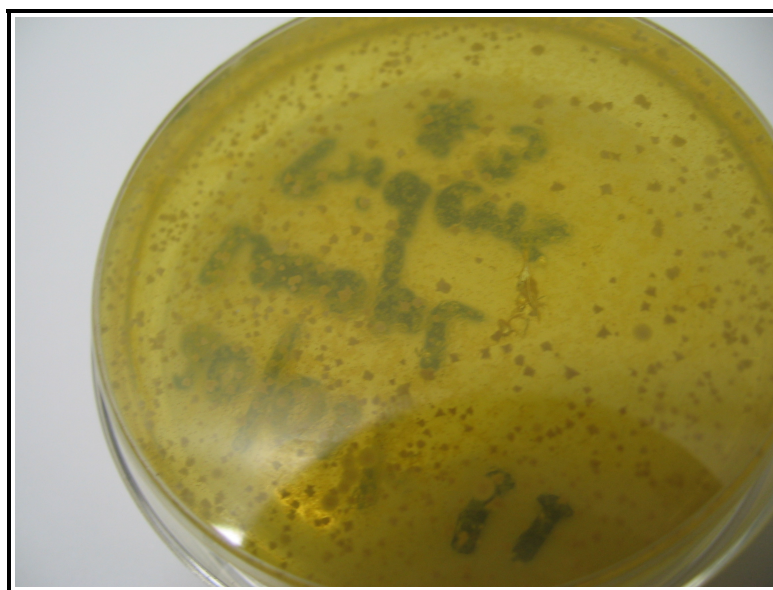


Figura 41: PDA inoculado com 10 μ L de suspensão microbiana (McFarland = 4)

É necessário observar que, a irradiação foi feita com a lanterna de led (figura 22, página 45), simplesmente irradiando-se a luz da lanterna a cerca de 8 cm de altura da placa de Petri, em ambiente aberto. Ou seja, pela foto, nota-se que boa parte da luz é espalhada no ambiente, tornando a irradiação muito menos eficiente do que poderia, caso fosse feita em uma câmara fechada, onde toda a luz fosse revertida à placa de Petri. E, mesmo assim, obteve-se resultados mensuráveis. Outro ponto possível de melhoria, seria o uso ou de LED com um ângulo de abertura menor, para que haja um menor

espalhamente de luz, ou um arranjo de lentes convergentes, de modo a se focar melhor a energia luminosa na área de aplicação.

A atividade antimicótica do extrato etanólico não irradiado, até a diluição de 500 μL para 20 mL de ágar, é negligenciável. Em concentrações maiores, cerca de 1 mL de extrato etanólico para 20 mL de agar PDA, os efeitos passam a ser melhor percebidos, mas os efeitos tóxicos do etanol passam a ser preponderantes, como mostra a figura 40, onde nota-se uma menor concentração de colônias de *S. cerevisiae*.

Conclusões

Notou-se que o desempenho do extrato de *Bidens sulphurea* como fotosensibilizador, além de depender da sua concentração no meio, contagem bacteriana inicial do inóculo, tipo de célula empregada (levedura, coliforme, eritrócito, etc.) é fortemente dependente da fonte de irradiação luminosa empregada. O comprimento de onda desta, além de sua potência, influenciam sobremaneira os resultados.

Experimentos com coliformes fecais demonstraram que a atividade do extrato pode aumentar em *ordens de grandeza* dependendo da maior ou menor sobreposição da banda de emissão da fonte luminosa empregada (LED 600, lâmpada halógena etc) com a banda de absorção dos extratos.

O sistema constituído de lâmpada halógena e empregando o extrato liofilizado, mostrou-se o mais promissor por causa da melhor sobreposição de seu espectro de emissão com o espectro de absorção dos extratos para a aplicação na terapia fotodinâmica. Entretanto uma melhoria futura interessante seria utilizar-se LED de potência (> 1 watt) que emitam no comprimento de onda onde ocorre a maior absorção dos extratos, cerca de 450-475 nm. Pois os LED possuem a interessante vantagem da melhor *eficiência luminosa*, ou seja, produzem mais fótons de luz consumindo menos corrente elétrica e conseqüentemente gerando menores quantidades de calor e gastos econômicos com energia elétrica, radiadores de calor etc.

Conclui-se que a variedade laranja de *B. sulphurea* apresenta maior atividade fotodinâmica (em relação à todas as fontes luminosas empregadas) e antibiótica do que a variedade amarela.

Mesmo tendo-se utilizado fontes luminosas que emitem muito pouco dentro da faixa de absorção dos extratos de *B. sulphurea* (O LED 600 emite numa região em que os extratos absorvem muito pouco, cerca de $\lambda \approx 630nm$), ainda se observaram efeitos fotodinâmicos bastante significativos, sendo comparáveis aos obtidos com o azul de metileno, que absorve fortemente na região do vermelho.

Com base em relatos da literatura, e em alguns testes químicos simples (espectro UV/VIS), nota-se grande concentração de compostos fenólicos nos extratos de *B. sulphu-*

rea, os quais deveriam proteger do dano fotodinâmico, agindo como *antioxidantes* por exemplo. Entretanto, o que se observou experimentalmente foi que em pelo menos um experimento (fotohemólise), dependendo da concentração de extrato no meio de cultura, o extrato pode ser tanto *fototóxico* quanto *fotoprotetor*.

Os diferentes extratos mostraram atividade fotodiâmica frente a células tão diferentes quanto eritrócitos, bactéria Gram(-)ⁱ, uma levedura e contra *textit*A. salina.

Este fato sugere que em todos os casos possivelmente exista um mecanismo de ação genérico, como a geração de oxigênio singleto, o que torna o desenvolvimento de resistência frente aos extratos por parte de patógenos pouco provável.

ⁱOs coliformes fecais estudados.

Referências

- 1 MACHADO, A. E. da H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Química Nova*, v. 23, n. 2, p. 237–243, 2000.
- 2 SCHWARTZ, L. M. et al. Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *PNAS*, v. 90, n. 3, p. 980–984, 1993.
- 3 BERGSTROM, C. T.; LO, M.; LIPSITCH, M. Ecological theory suggests that antimicrobial cycling will not reduce antimicrobial resistance in hospitals. *PNAS*, v. 101, n. 36, p. 13285–13290, 2004.
- 4 SMITH, D. L.; LEVIN, S. A.; LAXMINARAYAN, R. Strategic interactions in multi-institutional epidemics of antibiotic resistance. *PNAS*, v. 102, n. 8, p. 3153–3158, 2005.
- 5 CHAN, P. et al. Control of an outbreak of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* colonization and infection in a neonatal intensive care unit. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v. 28, n. 4, p. 423–429, 2007.
- 6 LAING, M. The three forms of molecular oxygen. *Journal of Chemical education*, v. 66, n. 6, p. 453, 1989.
- 7 SELL, P.; MURREL, G. *Flora of Great Britain and Ireland - vol 4*. Cambridge University Press The Edinburgh Building, Cambridge CB2 2RU, UK: Cambridge University Press, 2006. 652 p.
- 8 SCOTT, L.; CADMAN, A.; MCMILLAN, I. Early history of cainozoic Asteraceae along the southern african west coast. *Review of Palaeobotany and Palynology*, Science Direct, v. 142, n. 1, 2006.
- 9 KING, R. M.; ROBINSON, H. The new synantherology. *Taxon*, v. 19, n. 1, p. 6–11, 1970.
- 10 GROMBONE-GUARATANI, M. T. et al. Sesquiterpene and polyacetylene profile of the *Bidens pilosa* complex (Asteraceae: Heliantheae) from southeast of Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 33, n. 1, p. 479–486, 2005.
- 11 SATOSHI, T. A journey of twenty-five years through the ecological biochemistry of flavonoids. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 71, 2007.
- 12 JOHANN, S. et al. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 102, p. 681–685, 2007.
- 13 SILVA, D. B. da et al. Análise comparativa dos constituintes voláteis de *Bidens sulphurea* (Asteraceae) obtidos por hidrodestilação e SPME. *30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, 2007.

- 14 SILVA, D. B. da et al. Flavonóides antialérgicos de *Bidens sulphurea*(cav.) sch.bip. (Asteraceae). *31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, 2008.
- 15 GANDERS, F. R.; BERBEE, M.; PIRSEYEDI, M. ITS base sequence phylogeny in *Bidens* (Asteraceae): Evidence for the continental relatives of hawaiian and marquesan *Bidens*. *Systematic Botany*, v. 25, n. 1, p. 122–133, 2000.
- 16 LORENZI, H. *Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais*, 4ª. Nova Odessa, São Paulo: Plantarum, 2008. 678 p.
- 17 CORRÊA, M. P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*, vol 1. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. 4200 p.
- 18 MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, v. 45, n. 1, p. 31–34, 1982.
- 19 NUNES, B. S. et al. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environmental Pollution*, v. 144, n. 2, p. 543–462, 2006.
- 20 LHULLIER, C.; HORTA, P. A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, n. 2, p. 158–163, 2006.
- 21 VANHAECKE, P.; PERSOONE, G. Report on an intercalibration exercise on a short-term standard toxicity test with *Artemia* nauplii (arc-test). *INSERM*, v. 106, n. 1, p. 359–376, 1981.
- 22 GABRIELSKA, J. et al. Binding of antibiotic amphotericin B to lipid membranes: A ¹H NMR study. *FEBS Letters*, v. 580, n. 1, p. 2677–2685, 2006.
- 23 SAU, K. et al. The antifungal drug amphotericin B promotes inflammatory cytokine release by a toll-like receptor and CD14-dependent mechanism. *The journal of biological chemistry*, v. 278, n. 39, p. 37561–37568, 2003.
- 24 LÖFMARK, S.; EDLUND, C.; NORD, C. E. Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. *Clinical Infectious Diseases*, v. 50, n. 1, p. 16–23, 2010.
- 25 HARTWELL, L. H.; CULLOTI, J.; REID, B. Genetic control of the cell-division cycle in yeast, i. detection of mutants. *Proceedings of National Academy of Sciences*, v. 66, n. 2, p. 352–359, 1970.
- 26 BUSCHINI, A.; POLI, P.; ROSSI, C. *Saccharomyces cerevisiae* as an eukaryotic cell model to assess cytotoxicity and genotoxicity of three anticancer anthraquinones. *Mutagenesis*, v. 18, n. 1, p. 25–36, 2003.
- 27 BHATTA, H.; GOLDYS, E. M.; LEARMONTH, R. P. Use of fluorescence spectroscopy to differentiate yeast and bacterial cells. *Microbiology and Biotechnology*, v. 71, n. 1, p. 121–126, 2006.
- 28 BARAN, R.; FAERGEMANN, J.; HAY, R. J. Superficial white onychomycosis - a syndrome with different fungal causes and paths of infection. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 57, n. 5, p. 879–882, 2007.

- 29 SUMMERBELL, R. C.; ROSENTHAL, S. A.; KANE, J. Rapid method for differentiation of *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, and related dermatophyte species. *Journal of clinical microbiology*, v. 26, n. 11, p. 2279–2282, 1988.
- 30 WATKINS, W. D. et al. Novel compound for identifying *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, v. 54, n. 7, p. 1874–1875, 1988.
- 31 MARA, D.; HORAN, N. *Handbook of Water and Wastewater Microbiology*. 525 B Street Suite 1900 San Diego California 92101-4495 USA: Academic Press, 2003. 832 p. ISBN 0-12-470100-0.
- 32 DEAN, L. *Blood Groups and Red Cell Antigens*. National Library of Medicine Building 38A Bethesda, MD 20894: National Center for Biotechnology Information (NCBI), 2005.
- 33 CHRISTODOULOU, S. et al. Comparative study of UV and visible light induced degradation of lipids in non-axenic senescent cells of *Emiliania huxleyi*. *Marine Chemistry*, v. 119, n. 1-4, p. 139–152.
- 34 BIÈVRE, P. D.; PEISER, H. S. ‘atomic weight’-the name, it’s history, definition, and units. *Pure & Appl. Chem.*, v. 64, n. 10, p. 1535–1543, 1992.
- 35 MOHR, P. J.; TAYLOR, B. N.; NEWELL, D. B. Codata recommended values of the fundamental physical constants: 2006. *Reviews of modern physics, volume 80*, v. 80, n. 1, p. 633–730, 2008.
- 36 BASS, M.; BARRETT, H. Avalanche breakdown and the probabilistic nature of laser-induced damage. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, v. 8, n. 3, p. 338–343, 1972.
- 37 LÓPEZ-LÁZARO, M. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, Bentham Science Publishers Ltd, v. 9, p. 31–59, 2009.
- 38 DEWIK, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach 3rd Edition*. The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, PO19 8SQ, United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd, 2009. 550 p. ISBN 978-0-470-74168-9.
- 39 MALESEV, D.; KUNTIC, V. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of Serbian chemical society*, v. 72, n. 10, p. 921–939, 2007.
- 40 DARK, R. *The American Woodland Garden: Capturing the Spirit of the Deciduous Forest*. 33 SW 2nd Avenue, 450, Portland, Oregon: Timber Press Incorporated, 2002. 378 p. ISBN 978-0881925456.
- 41 NICHOLLS, G. *Alpine Plants of North America: An Encyclopedia of Mountain Flowers from the Rockies to Alaska*. 33 SW 2nd Avenue, 450, Portland, Oregon: Timber Press Incorporated, 2002. 344 p. ISBN 978-0881925487.
- 42 VANKAR, P. S. et al. *Carthamus tinctorius* (safflower), a commercially viable dye for textiles. *Asian Dyer*, v. 4, n. 1, p. 25–27, 2004.

- 43 VEITCH, C. N.; GRAYER, R. J. *Flavonoids: Chemistry, biochemistry & applications*. Boca Raton, Florida: Taylor & Francis Group, 2006. 1256 p. ISBN 978-0849320217.
- 44 CHEMLER, J. A.; YAN, Y.; KOFFAS, M. A. Biosynthesis of isoprenoids, polyunsaturated fatty acids and flavonoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, v. 5, n. 20, 2006.
- 45 ZHAO, J.; PANG, Y.; DIXON, R. A. The mysteries of proanthocyanidin transport and polymerization. *Plant Physiology*, v. 153, n. 1, p. 437–443, 2010.
- 46 SAINATH, Z. et al. An efficient and operationally simple synthesis of some new chalcones by using grinding technique. *Chemical Sciences Journal*, v. 2011, n. 13, p. 1–6, 2011.
- 47 LAUE, T.; PLAGENS, A. *Named Organic Reactions, 2nd Edition*. The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England: John Wiley & Sons Ltd, 2005. 400 p. ISBN 9780470010402.
- 48 CLAISEN, L.; CLAPAREDE, A. Condensationen von ketonen mit aldehyden. *Berichte der Deutschen chemischen Gesellschaft*, v. 14, n. 1, p. 2460–2468, 1881. Disponível em: <<http://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k906939/f871.chemindefer>>.
- 49 SCHMIDT, J. G. Ueber die einwirkung von aceton auf furfurol und auf bittermandelöl in gegenwart von alkalilauge. *Berichte der Deutschen chemischen Gesellschaft*, v. 14, n. 1, p. 1459–1461, 1881. Disponível em: <<http://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k90692z/f1461.chemindefer>>.
- 50 DONELLY, J. A. et al. Steric and electronic effects in the Emilewicz-Von Kostanecki cyclization of chalcones dihalides. *Proceedings of Royal Irish Academy*, v. 83B, p. 49–56, 1983.
- 51 LI, J. J. *Name Reactions*. Springer-Verlag, GmbH, Heidelberger Platz 3, 14197, Berlin, Germany: Springer Berlin Heidelberg, 2006. 621 p. ISBN 978-3-540-30031-1.
- 52 WANG, Z. *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*. John Wiley & Sons, Inc., 2010. 3824 p. ISBN 9780470638859. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/9780470638859.conrr040>>.
- 53 ALGAR, J.; FLYNN, J. P. A new method for the synthesis of flavonols. *Proceedings of the Royal Irish Academy*, v. 42, n. B1, p. 1–8, 1935.
- 54 MIYAURA, N.; YAMADA, K.; SUZUKI, A. A new stereospecific cross-coupling by the palladium-catalyzed reaction of 1-alkenylboranes with 1-alkenyl or 1-alkynyl halides. *Tetrahedron Letters*, Elsevier, Amsterdam, Holanda, v. 20, n. 30, p. 3437–3440, 1979.
- 55 EDDARIR, S. et al. An efficient synthesis of chalcones based on the Suzuki reaction. *Tetrahedron Letters*, v. 44, n. 28, p. 5359–5363, 2003.
- 56 KUSKOSKI, E. M. et al. Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. *Ciência e tecnologia de alimentos*, Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 24, n. 4, p. 691–693, 2004.

- 57 CHUN, O. K.; KIM, D.; LEE, C. Y. Superoxide radical scavenging activity of the major polyphenols in fresh plums. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v. 27, n. 51, p. 8067–8072, 2003.
- 58 RATHEE, P. et al. Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: A review. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*, v. 8, p. 229–235, 2009.
- 59 GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; TUNON, M. J. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutrición Hospitalaria*, v. 3, n. 22, p. 287–293, 2007.
- 60 COTORAS, M. et al. Fungitoxicity against *Botrytis cinerea* of a flavonoid isolated from *Pseudognaphalium robustum*. *Molecules*, n. 16, p. 3885–3895, 2011.
- 61 EBRAHIMZADEH, M. A.; POURMORAD, F.; BEKHRADNIA, A. R. Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. *African Journal of Biotechnology*, v. 7, n. 18, p. 3188–3192, 2008.
- 62 KOSTYUK, V. A.; POTAPOVICH, A. I. Antiradical and chelating effects in flavonoid protection against silica-induced cell injury. *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 1, n. 355, p. 43–48, 1998.
- 63 FIORANI, M.; ACCORSI, A. Dietary flavonoids as intracellular substrates for an erythrocyte trans-plasma membrane oxidoreductase activity. *British Journal of Nutrition*, n. 94, p. 338–345, 2005.
- 64 KUMARCHANDRA, R. et al. Effect of ocimum flavonoids as a radioprotector on the erythrocyte antioxidants in oral cancer. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, v. 1, n. 20, p. 160–164, 2005.
- 65 GROTEWOLD, E. *The science of flavonoids*. 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA: Springer Science+Business Media, Inc., 2006. 280 p. ISBN 978-0387-28821-5.
- 66 HOPIA, A.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of flavonol aglycones and their glycosides in methyl linoleate. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 76, p. 139–144, 1999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11746-999-0060-0>>.
- 67 CRAWFORD, D. J.; GIANNASI, D. E. Plant chemosystematics. *Plant Chemosystematics*, v. 32, n. 2, p. 114–124, 1982.
- 68 ZIDORN, C.; SCHUBERT, B.; STUPPNER, H. Phenolics as chemosystematic markers in and for the genus *Crepis* (Asteraceae, Cichorieae). *Scintia Pharmaceutica*, v. 76, n. 1, p. 743–750, 2008.
- 69 EMERENCIANO, V. P. et al. Self-organizing maps in chemotaxonomic studies of Asteraceae: a classification of tribes using flavonoid data. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 18, n. 5, p. 891–899, 2007.
- 70 ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. *FLAVONOIDS - Chemistry, Biochemistry and Applications*. 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300 Boca Raton, FL 33487-2742: CRC Press - Taylor & Francis Group, LLC, 2006. 1212 p. ISBN 0-8493-2021-6.

- 71 HODGSON, J. M. Tea flavonoids and cardiovascular disease. *Asia pacific Journal of clinical nutrition*, v. 17, n. 1, p. 288–290, 2008.
- 72 LI, W. et al. Procyanidins produce significant attenuation of doxorubicin-induced cardiotoxicity via suppression of oxidative stress. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v. 1, n. 104, p. 192–197, 2009.
- 73 ZHU, Q. Y. et al. Influence of cocoa flavanols and procyanidins on free radical-induced human erythrocyte hemolysis. *Clinical & Developmental Immunology*, v. 12, n. 1, p. 27–34, 2005.
- 74 JR, E. M.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, v. 52, n. 4, p. 673–751, 2000. Disponível em: <<http://www.pharmrev.org>>.
- 75 RODRIGUES, E. D. et al. DOSY-NMR applied to analysis of flavonoid glycosides from *Bidens sulphurea*. *Magnetic resonance in chemistry*, v. 47, n. 12, p. 1095–1100, 2009.
- 76 HEINRICH, U. et al. Long-term ingestion of high flavanol cocoa provides photoprotection against uv-induced erythema and improves skin condition in women. *Journal of nutrition*, v. 136, n. 6, p. 1565–1569, 2006.
- 77 NICHOLS, J. A.; KATIYAR, S. K. Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-inflammatory, anti-oxidant and DNA repair mechanisms. *Archives of Dermatological Research*, v. 302, n. 2, p. 71–83, 2010.
- 78 ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 48, n. 1, p. 5–16, 2001.
- 79 BOTSARIS, A. S. Plants used traditionally to treat malaria in brazil: the archives of flora medicinal. *Journal of Ethnobiology Ethnomedicine*, v. 3, n. 18, 2007. Disponível em: <<http://www.ethnobiomed.com/content/3/1/18>>.
- 80 GEISSMAN, T. A. Anthochlor pigments iii: the pigments of *Cosmos sulphureus*. *Journal of American Chemical Society*, v. 1, n. 64, p. 1704–1717, 1942.
- 81 TOMAS-BARBERAN, F. A. *The Handbook of Natural Flavonoids, volume 2*. 989 Market Street San Francisco, CA 94103-1741: John Wiley & Sons, Ltd., 2001. 1800 p. ISBN 978-0471958932.