

NATHÁLIA LUÍZA ANDREAZZA

**PROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E
FITODERIVADOS BIOATIVOS EM *Guatteria blepharophylla*
(ANNONACEAE) E *Indigofera truxillensis* (FABACEAE) PARA
APLICAÇÃO EM TERAPIA FOTODINÂMICA E
DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS**

Campinas, 2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

NATHÁLIA LUÍZA ANDREAZZA

PROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E
FITODERIVADOS BIOATIVOS EM *Guatteria blepharophylla*
(ANNONACEAE) E *Indigofera truxillensis* (FABACEAE) PARA
APLICAÇÃO EM TERAPIA FOTODINÂMICA E
DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

Este exemplar corresponde à redação final
da Tese defendida pela candidata

Nathália Luíza Andreazza

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
UNICAMP para obtenção do Título de
Doutora em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Marcos José Salvador

CAMPINAS,
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

An25p Andreazza, Nathalia Luiza, 1984-
Prospecção de metabólitos secundários e fitoderivados bioativos em *Guatteria blepharophylla* (Annonaceae) e *Indigofera truxillensis* (Fabaceae) para aplicação em terapia fotodinâmica e desenvolvimento de procedimentos analíticos / Nathalia Luiza Andreazza. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Marcos José Salvador.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Guatteria*. 2. *Indigofera*. 3. Metabolismo secundário. 4. Compostos bioativos. I. Salvador, Marcos José, 1971-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Prospecting of secondary metabolites and phytoderivatives from *Guatteria blepharophylla* (Annonaceae) and *Indigofera truxillensis* (Fabaceae) for photodynamic therapy application and development of analytical procedures

Palavras-chave em inglês:

Guatteria

Indigofera

Secondary metabolism

Bioactive compounds

Área de concentração: Biologia Vegetal

Titulação: Doutora em Biologia Vegetal

Banca examinadora:

Marcos José Salvador [Orientador]

Elita Scio Fontes

Maria Silvana Alves

Paulo Cesar Pires Rosa

Claudia Regina Baptista Haddad

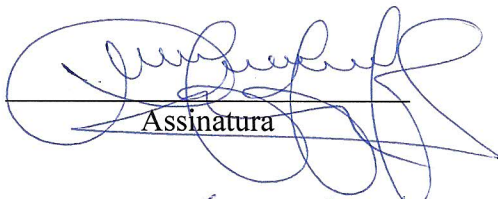
Data de defesa: 27-03-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal

Campinas, 27 de março de 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos José Salvador (orientador)



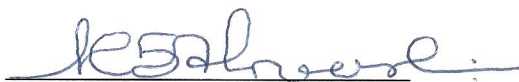
Assinatura

Profa. Dra. Elita Scio Fontes



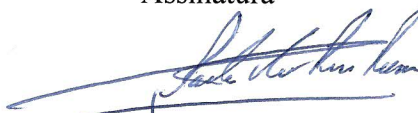
Assinatura

Profa. Dra. Maria Silvana Alves



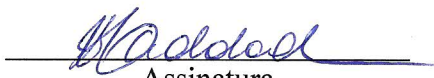
Assinatura

Prof. Dr. Paulo Cesar Pires Rosa



Assinatura

Profa. Dra. Claudia Regina Baptista Haddad



Assinatura

Profa. Dra. Elfriede Marianne Bacchi

Assinatura

Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz

Assinatura

Profa. Dra. Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya

Assinatura

RESUMO

Neste trabalho realizou-se estudo físico, químico e biológico para a prospecção de metabólitos secundários e fitoderivados em *Guatteria blepharophylla* (Annonaceae) e *Indigofera truxillensis* (Fabaceae) para aplicação em Terapia Fotodinâmica (PDT). A caracterização fitoquímica dos extratos metanólicos das espécies estudadas resultou no isolamento de cinco alcaloides isoquinolínicos de *G. blepharophylla* e um alcaloide bis-indólico de *I. truxillensis*. A investigação fotofísica dos extratos, frações e das substâncias isomoschatolina e índigo, revelou perfis de absorção na região entre 600 a 800 nm. Nas análises fotoquímicas, os extratos e fração alcaloídica de *G. blepharophylla* apresentaram resultados sugestivos quanto a produção de oxigênio singlete, assim como a substância isomoschatolina. Já em ensaio microbiológico *in vitro* com o emprego de substâncias supressoras de espécies reativas de oxigênio, observou-se a prevalência do mecanismo fotoquímico do tipo II para a isomoschatolina e do tipo I para o índigo. Nos ensaios biológicos de PDT antimicrobiana e antitumoral com os extratos, frações e as substâncias isoladas isomoschatolina e índigo observaram-se, para todas as estas amostras-teste, resultados efetivos na inativação de algumas das cepas indicadoras com redução do crescimento microbiano (UFC/ml) superior a 90%, assim como diminuição da sobrevivência celular para as linhagens humanas de fibroblasto (3T3) e melanoma (UACC-62), sendo observado efeito em menores concentrações somente para UACC-62 quando associado à irradiação *laser* (660nm). Em ensaio biológico na presença das substâncias CaCl_2 e MgCl_2 , a ação biocida dos alcaloides isomoschatolina e índigo, na fotoinativação da cepa *Escherichia coli* ATCC 10799 foi intensificada se comparado aos grupos controles. Portanto o conjunto de resultados observados sugerem que os extratos brutos e frações alcaloídicas das duas

plantas estudadas e os alcaloides isomoschatolina e índigo apresentaram fotoatividade frente a bactérias, leveduras e frente à cultura de células de melanoma em concentração subinibitória. Na análise da interação dos alcaloides fotossensibilizantes berberina e isomoschatolina com LDL em modelos celulares, a caracterização dos complexos alcaloide/LDL permitiu identificar uma primeira classe de fixação, denominada *classe P*, a partir de alterações na fluorescência da apoproteína B-100. Para berberina e isomoschatolina verificou-se que cerca de 250 e 135 moléculas se complexam a porção proteica da partícula de LDL e proximidades, apresentando constante de afinidade iguais a $1,05 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ e $5,06 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$, respectivamente. Uma segunda classe de fixação, chamada de *classe L*, determinada somente para a berberina, foi caracterizada a partir de alterações na fluorescência deste alcaloide e correspondeu a fixação de cerca de 80 moléculas de berberina na porção lipídica da partícula de LDL, com uma constante de afinidade de $7,10 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$. Estes valores revelam que o processo predominante de interação da berberina com o LDL é a fixação de classe P. Nos ensaios em nível celular, realizados com a berberina, verificou-se que a sua complexação com o LDL não prejudica o seu reconhecimento pelos receptores apoproteína B/E da superfície membranal das células U87MG e que a sua internalização pode ocorrer associada o LDL pela via de endocitose. No entanto, não foi verificado acúmulo de berberina nos lisossomos, mas apenas nas mitocôndrias, o que sugere que após a internalização, o alcaloide rapidamente sofre um processo de redistribuição intracelular. Para células cultivadas em Ultrosérum G, observou-se aumento da produção de produtos da peroxidação lipídica nas células tratadas com berberina complexada em relação àquelas tratadas com o alcaloide livre, nas doses de irradiação de 50 e 100 J/cm². Todas estas evidências revelam a possibilidade de complexação de ambos os alcaloides com o LDL como molécula carreadora para aplicação em PDT antitumoral, sendo

que para berberina a associação não só aumenta sua incorporação celular, assim como sua efetividade como agente fotoativo.

ABSTRACT

In this work it was carried out chemical and biological studies for secondary metabolites and phyto-derivatives prospecting from *Guatteria blepharophylla* (Annonaceae) and *Indigofera truxillensis* (Leguminosae) for antimicrobial and antitumor photodynamic therapy (PDT) application. The phytochemical characterization of the methanol extracts from both species resulted in the isolation of five isoquinoline alkaloids from *G. blepharophylla*, isomoschatoline, O-methylmoschatoline, liriodenine, subessiline and lysicamine, and one bis-indole alkaloid, indigo, from *I. truxillensis*. Photophysical characterization of crude extracts, fractions and the substances isomoschatoline and indigo showed absorption profiles in the region between 600 to 800 nm and fluorescence emission when excited at their absorption wavelength. In photochemical analysis, at 1,3-DPBF probe assay, crude extracts and alkaloidal fraction from *G. blepharophylla* showed positive results regarding singlet oxygen production, as well as isomoschatoline. At *in vitro* microbiological assay with reactive oxygen species suppressors, it was observed the prevalence of type II photochemical mechanism for isomoschatoline and type I for indigo, as also suggested by 1,3- DPBF assay results. In the antimicrobial and antitumor PDT biological assays, with crude extracts, fractions, isomoschatoline and indigo, effective results for microbial strains inactivation were found with microbial growth reduction (CFU/mL) superior to 90%, as well as decreased cell survival of human fibroblast (3T3) and melanoma (UACC-62) cell lines, in which this effect for the latter, was observed at lower concentrations when combined with *laser* irradiation. It was also found that both isomoschatoline and indigo exhibit enhanced photodynamic antimicrobial activity against Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* ATCC 10799 strain) in comparison to control groups, when CaCl₂ and MgCl₂ additives were employed. Therefore,

in light of all assays results it is suggested that crude extracts and alkaloid fractions from both plant species and the alkaloids isomoschatoline and indigo showed photoactivity against bacteria and yeasts strains and against melanoma human cell line at sub-inhibitory concentration when associated with *laser* irradiation at 660 nm. At interaction studies between photosensitizing alkaloids berberine and isomoschatoline with LDL and cellular models, changes in LDL's Apoprotein B-100 fluorescence allowed the identification of a first class of substances fixation in this particle called, *P fixation class*. For berberine and isomoschatoline it was found that about 250 and 135 molecules, respectively complexes to LDL's protein portion and its vicinity, leading to affinities constants equals to $1,05 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ and $5,06 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$, respectively. A second fixation class, the *L fixation class*, accessed only for berberine, was obtained by changes in the alkaloid fluorescence and correspond to 80 molecules attached to LDL's lipid portion, leading to affinity constant equal to $7,10 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$. These results reveal that the predominant process of berberine interaction with LDL is by *P fixation class*. At cellular level assays, performed only with berberine, it was found that the alkaloid complexation with LDL did not affect LDL recognition by apoprotein B/E membrane surface receptors of U87MG cells and that berberine internalization may occur associated with the particle via LDL endocytosis. However, there was no accumulation of berberine found in lysosomes. Mitochondria accumulation was observed suggesting that, after internalization, this alkaloid undergoes rapid intracellular redistribution process. At cells cultured with Ultroserum G and treated with complexed berberine it was also observed an increase in lipid peroxidation in comparison with cells incubated with free BBR, under irradiation doses of 50 to 100 J/cm^2 . All these evidences indicate the possibility of both alkaloids complexation with LDL as a carrier molecule for antitumor PDT application and, for berberine, this association not only increases its cellular uptake, as well as its effectiveness as photoactive agent.

SUMÁRIO

FICHA CATALOGRAFICA.....	iv
BANCA EXAMINADORA.....	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	xi
SUMÁRIO.....	xiii
DEDICATÓRIA.....	xix
AGRADECIMENTOS.....	xxi
LISTA DE FIGURAS.....	xxv
LISTA DE TABELAS.....	xxxv
LISTA DE EQUAÇÕES.....	xxxvii
LISTA DE ANEXOS.....	xxxix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xlvi
APRESENTAÇÃO DA TESE.....	1
INTRODUÇÃO GERAL.....	5
CAPÍTULO 1.....	11
1. Introdução.....	11
1.1. A família Annonaceae.....	11
1.1.1. <i>Guatteria blepharophylla</i>	14
1.2. A Família Fabaceae.....	16
1.2.1. <i>Indigofera truxillensis</i>	18
1.3. Considerações gerais sobre luz e <i>laser</i>	20
1.4. Considerações gerais sobre Terapia Fotodinâmica (PDT).....	23
1.4.1. Fotofísica e Fotoquímica da Terapia Fotodinâmica (PDT).....	25
1.4.2. Fotossensibilizadores.....	31
1.4.3. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana.....	34

1.4.4. Terapia Fotodinâmica Antitumoral.....	38
2. Objetivos	40
3. Material e Métodos	41
3.1. Estudo fitoquímico	41
3.1.1. Coleta, classificação e obtenção do Material Vegetal	41
3.1.2. Produtos, reagentes e solventes.....	41
3.1.3. Preparo dos extratos brutos.....	42
3.1.4. Fracionamento dos extratos brutos ativos e isolamento e purificação dos constituintes químicos.....	44
3.1.4.1. Extrato metanólico de <i>Guatteria blepharophylla</i> (GBCM).....	44
3.1.4.2. Extrato metanólico de <i>Indigofera truxillensis</i> (ITPM)	47
3.1.5. Identificação dos constituintes químicos.....	49
3.2. Estudo Fotofísico e Fotoquímico	50
3.2.1. Reagentes	50
3.2.2. Estudos espectroscópicos no estado estacionário: espectros de absorção e emissão de fluorescência.....	51
3.2.3. Avaliação da formação de Oxigênio Singlete (Ensaio 1,3-DPBF)	52
3.2.4. Avaliação da atividade fotodinâmica pelos mecanismos fotoquímicos do tipo I ou tipo II em modelo biológico <i>in vitro</i>	54
3.3. Estudos Biológicos.....	56
3.3.2. Atividade antimicrobiana.....	57
3.3.2.1. Determinação da atividade antimicrobiana e da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	57

3.3.2.2. Avaliação da atividade antimicrobiana na presença de irradiação	60
3.3.2.3. Avaliação da atividade antimicrobiana na presença de irradiação: variação da densidade de energia.....	62
3.3.2.4. Avaliação da atividade antimicrobiana na presença de irradiação: dose dupla da amostra-teste e de irradiação na mesma densidade de energia (28 J/cm ²).	63
3.3.2.5. Avaliação da atividade antimicrobiana na presença de irradiação e permeabilizantes	64
3.3.3. Avaliação da atividade antiproliferativa	65
3.3.3.1. Avaliação da atividade antiproliferativa em painel de células tumorais e determinação da concentração para inibição total do crescimento celular (TGI).....	65
3.3.3.2. Avaliação da atividade antitumoral na presença de irradiação	69
3.3.3.3. Avaliação do efeito antiproliferativo de cada substância isolada empregando-se diferentes densidades de energia da irradiação <i>laser</i>	71
4. Resultados e Discussão	72
4.1. Estudo fitoquímico.....	72
4.1.1. Substâncias isoladas de <i>G. blepharophylla</i>	73
4.1.2. Substância isolada de <i>Indigofera truxillensis</i>	90
4.2. Estudo fotofísico e fotoquímico.....	94
4.2.1. Estudos espectroscópicos no estado estacionário	94
4.2.1.1. Extratos, frações e substâncias isoladas de <i>Guatteria blepharophylla</i>	95
4.2.1.2. Extratos, frações e substâncias isoladas de <i>Indigofera truxillensis</i>	105
4.2.2. Avaliação da formação de Oxigênio Singlete (Ensaio 1,3 DPBF)	109

4.2.3. Avaliação da atividade fotodinâmica pelos mecanismos fotoquímicos do tipo I ou tipo II em modelo biológico in vitro	114
4.3. Estudos Biológicos.....	120
4.3.1. Atividade antimicrobiana.....	120
4.3.1.1. Avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	120
4.3.1.2. Avaliação da atividade antimicrobiana na presença de irradiação	124
4.3.1.3. Avaliação da atividade antimicrobiana na presença de irradiação: variação da densidade de energia.....	139
4.3.1.4. Avaliação da atividade antimicrobiana na presença de irradiação: dose dupla da amostra-teste e de irradiação na mesma densidade de energia (28 J/cm ²).	142
4.3.1.5. Avaliação da atividade antimicrobiana na presença de irradiação e permeabilizantes.	145
4.3.2 Atividade antiproliferativa.....	152
4.3.2.1. Avaliação da atividade antiproliferativa em painel de células tumorais e determinação na concentração para inibição total do crescimento celular (TGI).....	152
4.3.2.2. Avaliação da atividade antiproliferativa na presença de irradiação	160
4.3.2.3. Avaliação da atividade antiproliferativa de cada substância isolada empregando-se diferentes densidades de energia da irradiação <i>laser</i>	170
5. Conclusões	181
CAPÍTULO 2	183
1. Introdução	183
1.1. Berberina	187
1.2. Lipoproteínas de baixa densidade (LDL)	189

2. Objetivos	194
3. Material e Métodos	196
3.1. Tampões, solventes, reagentes e substâncias	196
3.2. Medidas no estado estacionário	197
3.3. Estudo da interação entre os alcaloides e LDL	198
3.3.1. Extinção (<i>quenching</i>) de fluorescência do triptofano (fixação na ApoproteínaB-100 ou proximidades).	199
3.3.2. Mudança no perfil de fluorescência da berberina (esquema global de fixação)...200	
3.4. Irradiação luminosa.....	200
3.5. Células, meio de cultura e condições de incubação.....	202
3.5.1 Manutenção das culturas.....	203
3.6. Incorporação de berberina pelas células U87MG	203
3.7. Microscopia de fluorescência	205
3.8. Colocalização subcelular	207
3.9. Avaliação da Peroxidação lipídica.....	209
4. Resultados e Discussão	212
4.1. Berberina	212
4.1.1. Propriedades espectroscópicas de absorção e fluorescência da Berberina em diferentes meios de solubilização	212
4.1.2. Estudo de equilíbrio: quantificação da fixação da Berberina ao LDL.....	218
4.1.2.1. Extinção da fluorescência dos triptofanos (fixação na apoproteína B-100).	218

4.1.2.2. Mudança no perfil de fluorescência da berberina (esquema de fixação global).	224
4.1.3. Absorção de berberina pelas células U87MG associadas ou não ao LDL.	230
4.1.4. Microscopia de fluorescência	238
4.1.5. Localização subcelular da berberina	242
4.1.6. Peroxidação lipídica	247
4.2. Isomoschatolina	251
4.2.1. Propriedades espectroscópicas de absorção e fluorescência da Isomoschatolina em diferentes meios de solubilização	251
4.2.2. Estudo de equilíbrio: quantificação da fixação da Isomoschatolina ao LDL	256
4.2.2.1. Extinção (<i>quenching</i>) de fluorescência do triptofanos (fixação na Apoproteína B-100).	257
5. Conclusões	263
PERSPECTIVAS E TRABALHOS FUTUROS	265
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	267
ANEXOS	299

DEDICATÓRIA

**Ao meu pai querido,
que partiu muito cedo,
mas sempre estará presente em meu coração**

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pela oportunidade de formação e aperfeiçoamento profissional.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de doutorado, pela bolsa de pesquisa de estágio no exterior e pelo apoio financeiro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e à Extensão (FAEPEX) da UNICAMP, pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador, professor Doutor Marcos José Salvador, por ter aceitado o desafio de me orientar, mesmo frente ao despreparo de uma aluna vinda da Biologia, sem experiência na área da Química Orgânica e Analítica. Agradeço pela sua orientação, confiança e paciência que contribuíram para meu crescimento profissional.

À minha orientadora de estágio no exterior, professora Doutora Stephanie Bonneau do “Laboratoire Jean Perrin” (LJP) da “Université Pierre et Marie Curie” (UPMC) que me recebeu maravilhosamente e acreditou que eu era capaz, assim como aos professores Doutores Franck Sureau, Christine Vever-Bizet, Geneviève Bourg-Heckly, Sergei Kruglik, Marck Geze e Rachid Kerdous pela paciência e ensinamentos.

À professora Doutora Alexandra C.H.F. Sawaya, do Instituto de Biologia (IB)- UNICAMP, pela disponibilidade ilimitada para realização das análises no espectrômetro de massas, pelo esclarecimento das intermináveis dúvidas e pelos papos agradáveis nos corredores do departamento.

Ao Mestre Hector Henrique Ferreira Koolen, do Instituto de Química- UNICAMP, pela total disponibilidade para execução das análises no espectro de massas de alta resolução.

Ao professor Doutor Emmanoel Vilaça Costa, do Departamento de Química, Universidade Federal de Sergipe (UFS), que disponibilizou todos os seus dados e sempre esteve pronto a me ajudar.

Aos professores Doutores João Ernesto de Carvalho e Aná Lúcia Ruiz e da técnica Sirlene do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA)- UNICAMP, pela indispensável colaboração nos ensaios com as culturas celulares animais.

À professora Doutora Tereza Atvars do Instituto de Química (IQ), UNICAMP, por disponibilizar seus equipamentos e ajudar na realização dos ensaios espectroscópicos.

Aos professores Doutores Maria Elida Alves Stefanello e Andreson Barisson, ambos do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR), pela realização dos ensaios de Ressonância Magnética Nuclear.

Ao professor Doutor Antônio Carlos Webber, do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), pela coleta e identificação de *Guatteria blepharophylla*, e ao professor Doutor Jorge Yoshio Tamashiro (IB- UNICAMP) pela identificação botânica de *Indigofera truxillensis*.

A todos os professores do Departamento de Biologia Vegetal- IB- UNICAMP, pelos ensinamentos e aos funcionários, pelo apoio técnico e amizade.

Aos senhores membros da banca de qualificação e examinadora, pelo aceite e indispensáveis contribuições para este trabalho.

A todos os colegas e amigos do Departamento de Biologia Vegetal- IB- UNICAMP, pela ajuda, amizade e por tornarem os dias de trabalho mais agradáveis, em especial a Carolina Lourenço e Larissa Levy (e as nossas “amigas” inseparáveis, placas de petri) e a Adilson Pereira Jr. pela generosidade e ajuda com o programa GraphPad.

A toda minha família, em especial aos meus pais Antônio e Elisabeth e ao meu irmão Rodolfo, pelo apoio incondicional.

À minha segunda família Rodolfo, Thais e Mazé por tudo, mesmo!!

Ao meu amor, Saon, pelo incentivo e compreensão. Com você esta jornada foi mais fácil.

Ao meu tio Robson, por sempre me inspirar e à minha tia Deca, por estar sempre “lá” quando eu precisei.

Aos grandes amigos Maria Carol, Marcos Degrossoli e Lu Benatti pelos bons momentos.

Aos meus amigos, indispensáveis para meu bem estar durante estágio na França, Mariana, Paola, Caroline, Mariana T., Francine, Arina, Camila, Cris, Luiz, Alan, Lindsay, Elise e Natia.

Obrigada por me aguentarem e até mesmo gozarem de mim naqueles dias de fúria.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Muitíssimo obrigada!!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica dos registros de Annonaceae (Fonte: http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/orders/magnolialesweb.htm#Annonaceae , acessado em janeiro de 2014).	12
Figura 2. Fotografia da árvore (A) e das folhas e frutos (B) de <i>Guatteria blepharophylla</i> (Fonte: Costa, 2009).	16
Figura 3. Distribuição geográfica dos registros de Fabaceae (Fonte: http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/orders/magnolialesweb.htm#Fabaceae , acessado em janeiro de 2014).	17
Figura 4. Fotografia das partes aéreas de <i>Indigofera truxillensis</i> (FOTO: Cola-Miranda, 2009).	19
Figura 5. Representação esquemática dos níveis de energia de uma substância (Diagrama de Perrin- Jablonski) e a formação de espécies citotóxicas. Processos representados: Absorção; <i>C.I.</i> , Conversão Interna; <i>R.V.</i> , Relaxamento vibracional; Fluorescência; <i>C.I.S.</i> , Conversão intersistema; Fosforescência. Estados da molécula: <i>S</i> ₀ , estado fundamental; <i>S</i> ₁ , estado excitado singleto; <i>S</i> ₂ , estado excitado singleto superior, <i>T</i> ₁ , estado excitado tripleto.	27
Figura 6. Esquema de preparação dos extratos brutos extraídos em solventes orgânicos das duas espécies estudadas. GBCH e GBCM, extratos hexânico e metanólico de <i>G. blepharophylla</i> , respectivamente; ITPH e ITPM, extrato hexânico e metanólico de <i>I. truxillensis</i> , respectivamente.....	43
Figura 7. Fluxograma do fracionamento do extrato metanólico das cascas de <i>Guatteria blepharophylla</i>	46
Figura 8. Fluxograma do fracionamento do extrato metanólico das partes aéreas de <i>Indigofera truxillensis</i>	48
Figura 9. Equipamento <i>laser</i> Photon Lase®.....	52
Figura 10. Espectro de absorção da radiação <i>laser</i> durante 5 minutos de irradiação, avaliado por um espectrômetro/monocromador modelo Princeton instruments acton SP2300 e medidor de potência modelo fildmaster.	53
Figura 11. Fórmula estrutural da substância Isomoschatolina (GB1).	73
Figura 12. Principais correlações observadas no mapa de contorno gHMBC e medidas de NOE 1D de GB1.	76
Figura 13. Fórmula estrutural da substância O-metilmoschatolina (GB2).....	77
Figura 14. Principais correlações observadas no espectro de HMBC de GB2.....	78
Figura 15. Fórmula estrutural da substância Liriodenina (GB3).	79
Figura 16. Principais correlações observadas no espectro de HMBC de GB3.....	80
Figura 17. Fórmula estrutural da substância Subsessilina (GB4).	81

Figura 18. Principais correlações observadas no espectro de HMBC de GB4.....	82
Figura 19. Fórmula estrutural da substância Lysicamina (GB5).....	83
Figura 20. Principais correlações observadas no espectro de HMBC de GB5.....	85
Figura 21. Esqueletos químicos dos aporfinóides <i>lato sensu</i>	88
Figura 22. Estrutura química dos núcleos benzilisoquinolínicos típicos.....	89
Figura 23. Fórmula estrutural da substância Índigo (IT1).....	91
Figura 24. Espectros de absorção normalizados dos extratos e frações de <i>G. blepharophylla</i> , GBCH, 0,5 mg/mL (A), GBCM, 0,5 mg/mL (B), GBFA, 0,3 mg/mL (C) e GBFN, 0,3 mg/mL (D).....	96
Figura 25. Espectros de emissão de fluorescência normalizados dos extratos e frações de <i>G. blepharophylla</i> , GBCH, 0,5 mg/mL (A), GBCM, 0,5 mg/mL (B), GBFA, 0,3 mg/mL (C) e GBFN, 0,3 mg/mL (D). Excitação em 418 nm para GBCH, 470 nm para GBCM e 455 nm para GBFA e GBFN.	97
Figura 26. Espectros de absorção normalizados da substância GB1 (5 µM) na sua forma sodiada, coloração azul (A) e não sodiada, coloração vermelha (B).	98
Figura 27. Absorbância em função da concentração da substância GB1 sodiada (A) para os picos de absorção em 320 e 660nm (2-20 µM) e não sodiada (B), para picos de absorção em 281 e 470 nm (1-10 µM), ambas solubilizadas em DMSO.	99
Figura 28. Espectros de emissão de fluorescência normalizados da substância GB1 (20 µM) na sua forma sodiada (A) e na forma não sodiada (B). Excitação fixa em 470 nm.....	100
Figura 29. Espectro de absorção normalizado da substância GB2 (5 µM) (A) e absorbância em função da sua concentração para os picos de absorção em 272 e 435 nm (1-20 µM) (B).	101
Figura 30. Espectro de emissão de fluorescência normalizado da substância GB2 (20 µM). Excitação fixa em 435 nm.	101
Figura 31. Espectro de absorção normalizado da substância GB3 (5 µM) (A) e absorbância em função da sua concentração para os picos de absorção em 280 e 420nm (1-15 µM) (B).	102
Figura 32. Espectros de emissão de fluorescência normalizado da substância GB3 (20 µM). Excitação fixa em 420 nm.	102
Figura 33. Espectros de absorção normalizado da substância GB4 (5 µM) (A) e absorbância em função da sua concentração para os picos de absorção em 280 e 470 nm (1-15 µM) (B).	103
Figura 34. Espectros de emissão de fluorescência normalizado da substância GB4 (20 µM). Excitação fixa em 470 nm.	103
Figura 35. Espectros de absorção normalizado da substância GB5 (5 µM) (A) e absorbância em função da sua concentração para os picos de absorção em 282 e 525 nm (1-20 µM) (B).	104
Figura 36. Espectros de emissão de fluorescência normalizado da substância GB5 (20 µM). Excitação fixa em 470 nm.	104

- Figura 37.** Espectros de absorção normalizado dos extratos e frações de *I. truxillensis*, ITPH, 0,5 mg/mL (A), ITPM, 0,5 mg/mL (B), ITFA, 0,3 mg/mL (C) e ITFN, 0,3 mg/mL (D). 106
- Figura 38.** Espectros de emissão de fluorescência normalizado dos extratos e frações de *I. truxillensis*, ITPH, 0,5 mg/mL (A), ITPM, 0,5 mg/mL (B), ITFA, 0,3 mg/mL (C) e ITFN, 0,3 mg/mL (D). Excitação fixa em 418 nm. 107
- Figura 39.** Espectro de absorção normalizado da substância IT1 (5 μ M) (A) e absorbância em função da sua concentração para os picos de absorção em 290 e 620nm (2-10 μ M) (B). 108
- Figura 40. Espectros de emissão de fluorescência normalizado da substância IT1 (5 μ M). Excitação fixa em 620 nm. 108
- Figura 41.** Produção de oxigênio singlete de GBCH (A), GBCM (B), GBFA (C), GBFN (D) e GB1 (E), oriundos de *G. blepharophylla* na presença de 1,3-DPBF, (●) não irradiado e (■) irradiado. Os extratos foram avaliados a 0,5 mg/mL, frações a 0,3 mg/mL e GB1 a 20 μ M.112
- Figura 42.** Produção de oxigênio singlete de ITPH (A), ITPM (B), ITFA (C) e ITFN (D) e IT1 (E), oriundos de *I. truxillensis* na presença de 1,3-DPBF, (●) não irradiado e (■) irradiado. Os extratos foram avaliados a 0,5 mg/mL, frações a 0,3 mg/mL e IT1 a 5 μ M. 113
- Figura 43.** Efeito de supressores de espécies excitadas e antioxidantes para avaliação da prevalência dos mecanismos do tipo I ou II na inativação fotodinâmica de *S. epidermidis* ATCC 12228 pela substância GB1 a 50 μ M. A bactéria foi incubada com o alcalóide sozinho ou com o alcalóide e as seguintes substâncias: manitol (10 mM), ácido ascórbico (30 mM), histidina (10 mM), azida de sódio (1 mM) ou triptofano (10 mM) sob irradiação (■, 28 J/cm², laser diodo InGaAIP, λ = 660 nm) e ausência de irradiação (■). Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre a condição irradiada e não irradiada para uma mesma amostra- teste (teste t, p<0,05) e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre as diferentes amostras- teste na condição irradiada ou não irradiada (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, p<0,05). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão de oito repetições. 115
- Figura 44.** Efeito de supressores de espécies excitadas e antioxidantes para avaliação da prevalência dos mecanismos do tipo I ou II na inativação fotodinâmica de *S. epidermidis* ATCC 12228 pela substância IT1 a 120 μ M. A bactéria foi incubada com o alcalóide sozinho ou com o alcalóide e as seguintes substâncias: manitol (10 mM), ácido ascórbico (30 mM), histidina (10 mM), azida de sódio (1 mM) ou triptofano (10 mM) sob irradiação (■, 28 J/cm², laser diodo InGaAIP, λ = 660 nm) e ausência de irradiação (■). Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre a condição irradiada e não irradiada para uma mesma amostra- teste (teste t, p<0,05) e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre as diferentes amostras- teste na condição irradiada ou não irradiada (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, p<0,05). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão de oito repetições. 116
- Figura 45.** Número de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL), das cepas *S. aureus* ATCC 14458 (A), *S. epidermidis* ATCC 12228 (B), *E. coli* ATCC 10799 (C) e *P. vulgaris* Pv (D) tratadas com GBCH (1,25 mg/mL), GBCM (12,5 mg/mL), GBFA e GBFN (6,25 mg/mL) e GB1 (50 μ M) oriundas de *G. blepharophylla*, na ausência (■) e na presença (■) de irradiação com laser diodo InGaAIP (28J/ cm², λ = 660nm). MICRO= controle microbiológico. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre a condição

irradiada e não irradiada dentro de cada amostra-teste (teste t, $p < 0,05$) e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre as diferentes amostras-teste nas condições irradiada ou não irradiada (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão de oito repetições.....131

Figura 46. Número de unidades formadoras de colônia por mililitros (UFC/mL), das cepas *C. albicans* ATCC 1023 (A), *C. albicans* ATCC 10231 (B), *C. dubliniensis* ATCC 777 (C) e *C. dubliniensis* ATCC 778157 (D) tratadas com GBCH (1,25 mg/mL), GBCM (12,5 mg/mL), GBFA e GBFN (6,25 mg/mL) e GB1 (50 μ M) oriundas de *G. blepharophylla*, na ausência (■) e na presença (■) de irradiação com *laser* diodo InGaAIP (28 J/cm², $\lambda = 660$ nm). MICRO= controle microbiológico. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre a condição irradiada e não irradiada dentro de cada amostra-teste (teste t, $p < 0,05$) e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre as diferentes amostras-teste nas condições irradiada ou não irradiada (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão de oito repetições.....133

Figura 47. Número de unidades formadoras de colônia por mililitros (UFC/mL), das cepas *S. aureus* ATCC 14458 (A), *S. epidermidis* ATCC 12228 (B), *E. coli* ATCC 10799 (C) e *P. vulgaris* Pv (D) tratadas com ITPH e ITPM (12,5 mg/mL), ITFA e ITFN (6,25 mg/mL) e IT1 (120 μ M) de *I. truxillensis*, na ausência (■) e na presença (■) de irradiação com *laser* diodo InGaAIP (28J/cm², $\lambda = 660$ nm.). MICRO= controle microbiológico. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre a condição irradiada e não irradiada dentro de cada amostra-teste (teste t, $p < 0,05$) e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre as diferentes amostras-teste nas condições irradiada ou não irradiada (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão de oito repetições. 137

Figura 48. Número de unidades formadoras de colônia por mililitros (UFC/mL), das cepas *C. albicans* ATCC 1023 (A), *C. albicans* ATCC 10231 (B), *C. dubliniensis* ATCC 777 (C) e *C. dubliniensis* ATCC 778157 (D), tratadas com ITPH e ITPM (12,5 mg/mL), ITFA e ITFN (6,25 mg/mL) e IT1 (120 μ M) de *I. truxillensis*, na ausência (■) e na presença (■) de irradiação com *laser* diodo InGaAIP (28J/cm², $\lambda = 660$ nm.). MICRO= controle microbiológico. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre a condição irradiada e não irradiada dentro de cada amostra-teste (teste t, $p < 0,05$) e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre as diferentes amostras-teste nas condições irradiada ou não irradiada (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão de oito repetições.....138

Figura 49. Número de unidades formadoras de colônia por mililitros (UFC/mL), da cepa de *S. epidermidis* ATCC 12228, tratada com GBCH e GBCM (12,5 mg/mL), GBFA (6,25 mg/mL) e GB1 (50 μ M) de *G. blepharophylla*, na ausência (■) e na presença de irradiação com *laser* diodo InGaAIP ($\lambda = 660$ nm) em diferentes densidades de energia, 28 (■), 56 (■), 84(■) e 112 J/cm2 (■). Letras distintas indicam diferenças estatísticas entre as diferentes densidades de energia dentro de cada amostra-teste (*one-way* ANOVA, seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão de oito repetições.....140

Figura 50. Número de unidades formadoras de colônia por mililitros (UFC/mL), da cepa de *C. albicans* ATCC 1023, tratada com GBCH e GBCM (12,5 mg/mL), GBFA (6,25 mg/mL) e GB1 (50 μ M) de *G. blepharophylla*, na ausência (■) e na presença de irradiação com *laser*

diodo InGaAIP ($\lambda = 660\text{nm}$) em diferentes densidades de energia, 28 (■), 56 (■), 84(■) e 112 J/cm² (■). Letras distintas indicam diferenças estatísticas entre as diferentes densidades de energia dentro de cada amostra-teste (one-way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$). Os valores representam a média±erro padrão de oito repetições. 141

Figura 51. Número de unidades formadoras de colônia por mililitros (UFC/mL), da cepa de *S. epidermidis* ATCC 12228, tratadas com GBCH e GBCM (12,5 mg/mL), GBFA (6,25 mg/mL) e GB1 (50 μM) de *G. blepharophylla*, com uma dose de administração da amostra-teste sem irradiação (■), com duas doses de administração da amostra-teste sem irradiação (■), com uma dose de administração da amostra-teste e uma dose de irradiação (■) e com duas doses de administração da amostra-teste e duas doses de irradiação (■) com *laser* diodo InGaAIP ($\lambda = 660\text{nm}$). Densidade de energia de cada dose igual a 28 J/cm². Letras distintas indicam diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos (dose de amostra e de irradiação) para cada amostra-teste (one-way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$). Os valores representam a média±erro padrão de oito repetições. 143

Figura 52. Número de unidades formadoras de colônia por mililitros (UFC/mL), da cepa de *C. albicans* ATCC 12228, tratadas com GBCH e GBCM (12,5 mg/mL), GBFA (6,25 mg/mL) e GB1 (50 μM) de *G. blepharophylla*, com uma dose de administração da amostra-teste sem irradiação (■), com duas doses de administração da amostra-teste sem irradiação (■), com uma dose de administração da amostra-teste e uma dose de irradiação (■) e com duas doses de administração da amostra-teste e duas doses de irradiação (■) com *laser* diodo InGaAIP ($\lambda = 660\text{nm}$). Letras distintas indicam diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos (dose de amostra e de irradiação) para cada amostra-teste (one-way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$). Os valores representam a média±erro padrão de oito repetições. 144

Figura 53. Efeito do CaCl₂ e MgCl₂ na fotoinativação da cepa *E. coli* ATCC 10799 pelas substância GB1, 50 μM (A) e IT1, 120 μM (B) na ausência (■) e na presença (■) de irradiação com *laser* diodo InGaAIP (28 J/cm², $\lambda = 660\text{nm}$). Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre a condição irradiada e não irradiada dentro de cada amostra-teste (teste t, $p < 0,05$) e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre as diferentes amostras-teste nas condições irradiada ou não irradiada (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Os valores representam a média±erro padrão de oito repetições. 147

Figura 54. Crescimento celular em função da concentração de doxorrubicina. Linhagens tumorais: 2 = U251 (glioma, SNC); u = UACC-62 (melanoma); m = MCF-7 (mama); a = NCI-ADR/RES (ovário, resistente a múltiplos fármacos); 7 = 786-0 (rim); 4 = NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); p= PC-3 (próstata); o = OVCAR-3 (ovário); h = HT-29 (colorretal); k = K562 (leucemia) e v = VERO (rim, célula normal, macaco verde). Amostras não irradiadas. 154

Figura 55. Crescimento celular em função da concentração das amostras-teste GBCH (A), GBCM (B), GBFA (C), GBFN (D) e GB1 (E) oriundas de *G. blepharophylla*. Linhagens tumorais: u = UACC-62 (melanoma); m = MCF-7 (mama); a = NCI-ADR/RES (ovário, resistente a múltiplos fármacos); 7 = 786-0 (rim); 4 = NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); p= PC-3 (próstata); h = HT-29 (colorretal); k = K562 (leucemia) e v = VERO (rim, célula normal, macaco verde). 156

Figura 56. Crescimento celular em função da concentração das amostras-teste ITPH (A), ITPM (B), ITFA (C), ITFN (D) e IT1 (E) oriundas de *I. truxillensis*. Linhagens tumorais: u =

UACC-62 (melanoma); m = MCF-7 (mama); a = NCI-ADR/RES (ovário, resistente a múltiplos fármacos); 7 = 786-0 (rim); 4 = NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); p= PC-3 (próstata); h = HT-29 (colorretal); k = K562 (leucemia) e v = VERO (rim, célula normal, macaco verde).....160

Figura 57. Crescimento celular (%) das linhagens celulares 3T3 de fibroblasto murino (A) e UACC-62 de melanoma humano, (B) em função da concentração das amostras-teste GBCH (56 µg/mL), GBCH* (11,2 µg/mL), GBCM (125 µg/mL), GBCM* (25 µg/mL), GBFA (48µg/mL), GBFA* (9,25 µg/mL) e GBFN (125 µg/mL) e GBFN (25 µg/mL) de *G. blepharophylla* na ausência (■) e na presença (■) de irradiação com *laser* diodo InGaAIP (28 J/cm², λ = 660nm). As células foram incubadas por 5 minutos com a amostra-teste antes da irradiação. Letras distintas indicam diferenças estatísticas entre a condição irradiada e não irradiada dentro de cada amostra-teste (teste t, p<0,05). Os valores representam a média±erro padrão de seis repetições.....163

Figura 58. Crescimento celular (%) das linhagens celulares 3T3 de fibroblasto murino (A) e UACC-62 melanoma humano (B) em função da concentração da amostras-teste ITPH (118 µg/mL), ITPH* (24 µg/mL), ITPM (125 µg/mL), ITPM* (25 µg/mL), ITFA (125 µg/mL), ITFA* (25 µg/mL), ITFN (68,5 µg/mL) e ITFN* (14 µg/mL) de *I. truxillensis* na ausência (■) e na presença (■) de irradiação com *laser* diodo InGaAIP (28 J/cm², λ = 660 nm). As células foram incubadas por 5 minutos com a amostra-teste antes da irradiação. Letras distintas indicam diferenças estatísticas entre a condição irradiada e não irradiada dentro de cada amostra-teste (teste t, p<0,05). Os valores representam a média±erro padrão de seis repetições. 165

Figura 59. Crescimento celular (%) das linhagens celulares 3T3 de fibroblasto murino (A) e UACC-62 de melanoma humano, (B) em função da concentração da amostra-teste GB1 de *G. blepharophylla* na ausência (■) e na presença (■) de irradiação com *laser* diodo InGaAIP (28 J/cm², λ = 660 nm). As células foram incubadas por 5 min e 4 h com a amostra-teste antes da irradiação. Letras distintas indicam diferenças estatísticas entre as diferentes condições de irradiação dentro de cada concentração (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, p<0,05). Os valores representam a média±erro padrão de seis repetições. 167

Figura 60. Crescimento celular (%) das linhagens celulares 3T3 de fibroblasto murino (A) e UACC-62 de melanoma humano, (B) em função da concentração da amostra-teste IT1 de *I. truxillensis* na ausência (■) e na presença (■) de irradiação com *laser* diodo InGaAIP (28 J/cm², λ= 660nm). As células foram incubadas por 5 min e 4 h com a amostra-teste antes da irradiação. Letras distintas indicam diferenças estatísticas entre as diferentes condições de irradiação dentro de cada concentração (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, p<0,05). Os valores representam a média±erro padrão de seis repetições. 169

Figura 61. Crescimento celular (%) das linhagens celulares 3T3 de fibroblasto murino (A) e UACC-62 de melanoma humano, tratadas com GB1 (3,13 µg/mL) de *G. blepharophylla* na ausência (■) e na presença de irradiação com *laser* diodo InGaAIP (λ= 660nm) em diferentes densidades de energia, 28 (■), 56 (■), 84(■) e 112 J/cm² (■). A amostra-teste foi incubada com as células por 5 min ou 4 h antes da irradiação. Letras distintas indicam diferenças estatísticas entre as diferentes condições de irradiação dentro de uma mesma densidade de energia (*one-way* ANOVA, seguida pelo teste de Tukey, p<0,05). Os valores representam a média±erro padrão de seis repetições. 172

Figura 62. Crescimento celular (%) das linhagens celulares 3T3 de fibroblasto murino (A) e UACC-62 de melanoma humano, tratadas com IT1 (6,25 µg/mL) de <i>I. truxillensis</i> na ausência (■) e na presença de irradiação com <i>laser</i> diodo InGaAIP ($\lambda = 660$ nm) em diferentes densidades de energia, 28 (■), 56 (■), 84(■) e 112 J/cm ² (■). A amostra-teste foi incubada com as células por 5 min ou 4 h antes da irradiação. Letras distintas indicam diferenças estatísticas entre as diferentes condições de irradiação dentro de uma mesma densidade de energia (one-way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$). Os valores representam a média±erro padrão de seis repetições.	174
Figura 63. Crescimento celular (%) das linhagens celulares 3T3 de fibroblasto murino em função da concentração do padrão de referência Berberina na ausência (■) e na presença (■) de irradiação com <i>laser</i> diodo InGaAIP (28 J/cm ² , $\lambda = 660$ nm). As células foram incubadas por 5 min e 4 h com o padrão antes da irradiação. Letras distintas indicam diferenças estatísticas entre as diferentes condições de irradiação dentro de cada concentração (<i>one way</i> ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Os valores representam a média±erro padrão de seis repetições.	176
Figura 64. Representação esquemática do LDL e de seus constituintes.	191
Figura 65. Espectro de emissão de fluorescência do LDL (2.10 ⁻⁸ M) quando excitado a 278nm.	193
Figura 66. Espectro de uma lâmpada de xenônio (Oriol instruments)	201
Figura 67. Transmitância do filtro 410FS10-50 para irradiação da BBR (A) e do filtro K65 (B) para irradiação da Clorina 6.	202
Figura 68. Esquema do protocolo experimental do ensaio de incorporação da BBR.	205
Figura 69. Esquema da câmara utilizada para encaixe das lamínulas de vidro contendo células para visualização no microscópio de fluorescência; seta aponta para lamela (A). Microscópio de fluorescência contendo câmara de visualização das lamínulas (B).	206
Figura 70. Esquema do protocolo de preparação das amostras para observação em microscópio de fluorescência.....	209
Figura 71. Espectro normalizado de absorção da BBR (1 µM) solubilizada em DMSO, ETOH e PBS:ETOH (99,5:0,5, v/v).	213
Figura 72. Absorbância dos picos em torno de 350 nm (A) e 420 nm (B) em função da concentração de BBR (1-20 µM) nos diferentes meios de solubilização.....	214
Figura 73. Espectros de fluorescência normalizados da BBR nos diferentes meios de solubilização. Concentração da BBR: 1µM, excitação: 350 nm (DMSO e ETOH) e 340 nm em PBS:ETOH.....	215
Figura 74. Intensidade de fluorescência da BBR normalizada (540nm) em função de sua concentração (logarítimo) nos três solventes estudados, DMSO (A), ETOH (B) e PBS:ETOH (C).	217
Figura 75. Extinção da fluorescência intrínseca do LDL ($\lambda_{exc} = 278$ nm) induzida pela fixação de BBR. Espectro de fluorescência do LDL, [LDL] = 2.10 ⁻⁸ M (A) e [LDL] = 6.10 ⁻⁸ M em função de quantidades crescentes de berberina adicionada, sendo a concentração total de BBR	

definida como P_T . $P_T/[LDL] = 0, 5, 25, 35, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000$ no sentido da flecha.....	219
Figura 76. Intensidade relativa da fluorescência (F/F_0 , %) à 330nm em função de P_T/LDL . ●: $[LDL] = 2.10^{-8}M$; □: $[LDL] = 6.10^{-8} M$. A intensidade de fluorescência para $P_T = 0$ esta normalizada a 100% (representação de Halfman & Nishida, 1972).....	220
Figura 77. Quantificação da associação da BBR ao LDL segundo as mudanças na fluorescência deste último a 330 nm, excitação a 278 nm. Os pontos foram calculados segundo o método definido por Hafman & Nishida (1972) e representados de acordo com o método clássico de Scatchard (1949 e 1950).....	223
Figura 78. Espectro de absorção do LDL na presença de BBR. Espectro de absorção do LDL sozinho (—); espectro de absorção da BBR sozinha (—); diferença no espectro de absorção entre BBR-LDL e BBR na mesma concentração (—). $[BBR]=3.10^{-6} M$ e $[LDL]= 6.10^{-8} M$. O espectro de absorção nos comprimentos de onda entre 250-350 nm estão representados no inserto.....	224
Figura 79. Espectros de fluorescência da berberina ($1\mu M$) em presença de diferentes quantidades de LDL. Comprimento de onda de excitação: 350 nm. Concentração em LDL : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, $10^{-9} M$ (sentido flecha vertical).A flecha horizontal indica a direção de mudança no perfil do espectro em função do aumento da quantidade em LDL.	225
Figura 80. Evolução da fluorescência da solução de BBR ($1 \mu M$) em função da concentração em LDL, calculados a partir dos espectros da Figura 79. A curva corresponde ao melhor ajuste (hiperbólico) dos valores experimentais pela equação (6). O valor de K_{LDL} obtido foi de $1,76.10^8 M^{-1}$	227
Figura 81. Determinação da constante de afinidade global da berberina ao LDL. As intensidades de fluorescência são derivadas dos espectros da Figura 79 e o ajuste linear corresponde à equação (7). A constante deduzida corresponde à $K_{LDL}\cong 1,76.10^{-8} M^{-1}$	228
Figura 82. Esquema de repartição das moléculas de BBR (círculos vazados) nas diferentes porções da partícula de LDL.....	230
Figura 83. Microscopia por contraste de fase de células da linhagem U87MG. Escala = $5\mu M$	233
Figura 84. Internalização da BBR livre ((B) SFB) ou complexada ao LDL ((B+L) SFB) pelas célula U87MG (cultivadas em meio suplementado com SFB a 10%) em função do tempo..	234
Figura 85. Internalização da BBR livre ((B) Ultroser) ou complexada ao LDL ((B+L) Utroser) pelas célula U87MG (cultivadas em meio suplementado com Ultroserum a 2%) em função do tempo.....	236
Figura 86. Internalização da BBR livre (B) ou complexada ao LDL (B+L) pelas células U87MG cultivadas em meio suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10% ou com Ultroserum a 2% (Ultroser), em função do tempo.....	237
Figura 87. Microscopia de fluorescência em células U87MG cultivadas em meio suplementado com SFB a 2%. Primeira coluna (a, d, g, j) representa a emissão de fluorescência da BBR, $[BBR]=1\mu M$; segunda coluna (b, e, h, k) representa a emissão de fluorescência da BBR complexada com LDL, $[BBR]=1\mu M$ e $[LDL]= 0,1\mu M$; terceira coluna	

representa emissão de fluorescência intrínseca das células U87MG. (a, b, c) células incubadas durante 15 min; (d, e, f) 30 min; (g, h, i) 1 h; (j, k, l) 2 h e (m, n, o) 3 h. Escala = 5 μ M. 239

Figura 88. Microscopia de fluorescência em células U87MG cultivadas em meio suplementado com Ultroserum a 2%. Primeira coluna (a, d, g, j) representa a emissão de fluorescência da BBR, [BBR]=1 μ M; segunda coluna (b, e, h, k) representa a emissão de fluorescência da BBR complexada com LDL, [BBR]=1 μ M e [LDL]= 0,1 μ M; terceira coluna representa emissão de fluorescência intrínseca das células U87MG. (a, b, c) células incubadas durante 15 min; (d, e, f) 30 min; (g, h, i) 1 h; (j, k, l) 2 h e (m, n, o) 3 h. Escala = 5 μ M. 240

Figura 89. Microscopia de fluorescência em células U87MG. Primeira coluna (a, d, g, j) representa a emissão de fluorescência da BBR (verde, 1 μ M), segunda coluna (b, e, h, k) representa marcação do Mitotracker® red (vermelho, 50 nM) e a terceira coluna (c, f, i, l) representa a sobreposição de fluorescência da BBR e do Mitotracker® red. (a, b, c) células incubadas com BBR e cultivadas em meio DMEM complementado com SFB a 10%. (g, h, i) células incubadas com BBR e cultivadas em meio DMEM complementado com Ultroserum a 2%. Escala= 5 μ M.....244

Figura 90. Microscopia de fluorescência em células U87MG. Primeira coluna (a, d, g, j) representa a emissão de fluorescência da BBR (verde, 1 μ M), segunda coluna (b, e, h, k) representa a marcação do LysoTracker® red (vermelho, 200nM) e a terceira coluna (c, f, i, l) representa a sobreposição de fluorescência da BBR e do LysoTracker® red. (a, b, c) células incubadas com BBR e cultivadas em meio DMEM complementado com 10% de SFB. (g, h, i) células incubadas com BBR e cultivadas em meio DMEM complementado com 2% de Ultroserum. Escala= 5 μ M.....246

Figura 91. Reação de peroxidação em células cultivadas em SFB a 10%. Quantidade de MDA (em mol por grama de proteína) medido no extrato celular (A) e sobrenadante (B) de células incubadas com BBR livre (B) ou complexadas com LDL (B+L), clorina (Cl₆) ou somente com HBSS (M). Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos dentro de uma mesma dose de irradiação e letras maiúsculas, de um mesmo tratamento em cada dose de irradiação (ambas as análises foram realizadas por one-way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey, p<0,05). Os valores representam a média±erro padrão de seis repetições. 249

Figura 92. Reação de peroxidação em células cultivadas em Ultroserum 2%. Quantidade de MDA (em mol por grama de proteína) medido no extrato celular (A) e sobrenadante (B) de células incubadas com BBR livre (B) ou complexadas com LDL (B+L), clorina (Cl₆) ou somente com HBSS (M). Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos dentro de uma mesma dose de irradiação e letras maiúsculas, de um mesmo tratamento em cada dose de irradiação (ambas as análises foram realizadas por one-way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey, p<0,05). Os valores representam a média±erro padrão de seis repetições. 250

Figura 93. Espectro normalizado de absorção da GB1 (2 μ M) solubilizada em DMSO, ETOH e PBS. Absorbância 252

Figura 94. Absorbância em função da concentração da GB1 (2-20 μ M) em DMSO, 320 e 660nm (A), ETOH, 310 e 606 nm (B) e PBS, 307 e 593 nm (C). 253

- Figura 95.** Espectros de fluorescência normalizados da GB1 nos diferentes meios de solubilização. Concentração da GB1: 20 μ M, excitação: 320 nm em DMSO, 310 nm em Etanol e 307 nm em PBS. Emissão de fluorescência à 400 nm para DMSO e ETOH e 420 nm para PBS (A). Espectro de fluorescência normalizado de GB1 em etanol, excitação à 470 nm com emissão em 515 nm (B). 254
- Figura 96.** Intensidade de fluorescência de GB1 em função de sua concentração (logarítimo). Excitação: 320nm em DMSO (A), 310 em ETOH (B) e 307nm em PBS (C). Emissão de fluorescência à 400 nm para DMSO e ETOH e 420 nm para PBS. 256
- Figura 97.** Extinção da fluorescência intrínseca do LDL ($\lambda_{ex} = 2780\text{nm}$) induzida pela fixação de GB1. Espectro de fluorescência do LDL, $[\text{LDL}] = 2.10^{-8}$ M (A) e $[\text{LDL}] = 6.10^{-8}$ M em função de quantidades crescentes de isomoschatolina adicionada, isto é, a concentração total de isomoschatolina (P_T). $P_T/\text{LDL} = 0, 5, 25, 35, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000$ no sentido da flecha. 257
- Figura 98.** Intensidade relativa da fluorescência (F/F_0 , %) à 330nm em função de P_T/LDL . ●: $[\text{LDL}] = 2.10^{-8}\text{M}$; □: $[\text{LDL}] = 6 \times 10^{-8}$ M. A intensidade de fluorescência para $P_T = 0$ esta normalizada a 100% (representação de Halfman & Nishida, 1972). 259
- Figura 99.** Quantificação da associação da GB1 ao LDL segundo as mudanças na fluorescência deste último à 330nm, excitação a 278nm. Os pontos foram calculados segundo o método definido por Hafman & Nishida (1972) e representados de acordo com o método clássico de Scatchard. 259

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos de frações e substâncias isoladas a partir da fração alcaloídica (GBFA) de <i>Guatteria blepharophylla</i>	46
Tabela 2. Grupos de frações e substâncias isoladas a partir da fração alcaloídica de <i>I. truxillensis</i>	48
Tabela 3. Concentrações das amostras utilizadas nos ensaios de atividade antimicrobiana para determinação da CIM (técnica de poço em camada dupla)	58
Tabela 4. Linhagens celulares empregadas na avaliação de atividade antiproliferativa.....	66
Tabela 5. Esquema da aplicação das amostras, em quatro concentrações distintas, na placa teste.	68
Tabela 6. Rendimento em massa (g) dos extratos brutos e frações obtidos de <i>G. blepharophylla</i> e <i>I. truxillensis</i>	72
Tabela 7. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância GB1 ^a	77
Tabela 8. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância GB2 ^a	79
Tabela 9. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância GB3 ^a	81
Tabela 10. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para Gb4 ^a	83
Tabela 11. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância GB5 ^a	85
Tabela 12. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância IT1 ^a	92
Tabela 13. Atividade antimicrobiana expressa em Concentração Inibitória Mínima, CIM (mg/mL para os extratos e frações e substâncias isoladas). - : cepa não testada	123
Tabela 14. Atividade antimicrobiana das amostras controles, placas não-irradiadas , expressa como média do número de UFC/mL.....	126
Tabela 15. Atividade antimicrobiana das amostras controles, placas irradiadas , expressa como média do número de UFC/mL.	127
Tabela 16. Atividade antimicrobiana dos extratos brutos, frações e GB1 oriundos de <i>Guatteria blepharophylla</i> , placa não irradiada , expressa como média do número de UFC/mL.	129
Tabela 17. Atividade antimicrobiana dos extratos brutos, frações e GB1, oriundos de <i>Guatteria blepharophylla</i> , placa irradiada , expressa como média do número de UFC/mL.	130
Tabela 18. Atividade antimicrobiana dos extratos, frações e IT1, oriundos de <i>Indigofera truxillensis</i> , placa não-irradiada , expressa como média do número de UFC/mL.....	135
Tabela 19. Atividade antimicrobiana dos extratos, frações e substâncias IT1, oriundos de <i>I. truxillensis</i> , placa irradiada , expressa como média do número de UFC/mL.	136

Tabela 20. Valores de TGI ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos brutos, frações e substâncias puras avaliados contra o painel de células tumorais. Amostras não irradiadas.	153
Tabela 21. Coeficiente de extinção molar (ϵ) da berberina em diferentes meios de solubilização	214
Tabela 22. Comparação de intensidade de fluorescência nos diferentes meios de cultivos e tempo de incubação, obtidos por microscopia (□) e extração (■)	242
Tabela 23. Coeficiente de extinção molar (ϵ) da GB1 em diferentes meios de solubilização.	253

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. $P_F = LDL \times \left(\frac{P_T}{LDL} - v \right) \dots\dots\dots 221$

Equação 2.
$$v = \frac{\frac{P_{T_a}}{LDL_a} - \frac{LDL_b}{LDL_a} \left(\frac{P_{T_b}}{LDL_b} \right)}{1 - \frac{LDL_b}{LDL_a}} \dots\dots\dots 221$$

Equação 3. $P_F = \frac{LDL_a \times LDL_b}{LDL_a - LDL_b} \left[\left(\frac{P_{T_b}}{LDL_b} \right) - \left(\frac{P_{T_a}}{LDL_a} \right) \right] \dots\dots\dots 222$

Equação 4. $K_{LDL} = \frac{P_B}{P_F \times LDL} \dots\dots\dots 226$

Equação 5. $K_{LDL} = \frac{(F - F_0)}{(F_\infty - F)LDL} \dots\dots\dots 226$

Equação 6. $\frac{1}{F_0 - F} = \frac{1}{F_0 - F_\infty} + \frac{1}{K_{LDL} \cdot [LDL] \cdot (F_0 - F_\infty)} \dots\dots\dots 227$

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Espectro de massa ESI-MS, modo positivo, 15 eV da amostra GBCM . Presença dos picos de massas corresponde às massas das substâncias isoladas.....	299
Anexo 2. Espectro de massa ESI-MS, modo positivo (A) e modo negativo (B), 15 eV da amostra GBFA . Presença dos picos de massas corresponde às massas das substâncias isoladas.....	300
Anexo 3. Espectro de absorção na região do IV (KBr) de GB1.....	300
Anexo 4. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) da amostra GB1.....	301
Anexo 5. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) da amostra GB1 – ampliação.	302
Anexo 6. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) da amostra GB1 – ampliação.	303
Anexo 7. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) da amostra GB1 – ampliação.	303
Anexo 8. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) da amostra GB1 – ampliação.	304
Anexo 9. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) da amostra GB1 – ampliação.	304
Anexo 10. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) da amostra GB1 – ampliação.	305
Anexo 11. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) da amostra GB1 – ampliação.	306
Anexo 12. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) da amostra GB1.....	307
Anexo 13. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) da amostra GB1 – ampliação.	308
Anexo 14. Espectro HSQC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CD_3OD) da amostra GB1.....	309
Anexo 15. Espectro HSQC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CD_3OD) da amostra GB1 – ampliação.	310
Anexo 16. Espectro HSQC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CD_3OD) da amostra GB1 – ampliação.	311
Anexo 17. Espectro HMBC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CD_3OD) da amostra GB1.....	312
Anexo 18. Espectro HMBC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CD_3OD) da amostra GB1 – ampliação.	313
Anexo 19. Espectro HMBC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CD_3OD) da amostra GB1 – ampliação.	314
Anexo 20. Espectro HMBC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CD_3OD) da amostra GB1 – ampliação.	315
Anexo 21. Espectro HMBC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CD_3OD) da amostra GB1 – ampliação.	316
Anexo 22. Espectro HMBC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CD_3OD) da amostra GB1 – ampliação.	317

Anexo 23. Experimentos NOE 1D (400 MHz, CD ₃ OD) de GB1.	318
Anexo 24. Espectro HMBC (400 MHz para ¹ H e 100 MHz para ¹³ C, CD ₃ OD) da amostra GB1 – ampliação.	319
Anexo 25. Espectro de massa ESI-MS, modo positivo (A) e negativo (B) 15 eV da amostra GB1 em metanol. Espectro MS/MS do <i>m/z</i> 308,2 em modo positivo, 15 eV em metanol (C).	320
Anexo 26. Espectro de absorção na região do IV (Filme, CHCl ₃) de GB2.....	320
Anexo 27. Espectro de RMN ¹ H (400MHz, CDCl ₃) da amostra GB2.....	321
Anexo 28. Espectro de RMN ¹ H (400MHz, CDCl ₃) da amostra GB2 – ampliação.	322
Anexo 29. Espectro de RMN ¹ H (400MHz, CDCl ₃) da amostra GB2 – ampliação.	323
Anexo 30. Espectro de RMN ¹ H (400MHz, CDCl ₃) da amostra GB2 – ampliação.	323
Anexo 31. Espectro de RMN ¹ H (400MHz, CDCl ₃) da amostra GB2 – ampliação.	324
Anexo 32. Espectro de RMN ¹ H (400MHz, CDCl ₃) da amostra GB2 – ampliação.	324
Anexo 33. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) da amostra GB2.....	325
Anexo 34. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃)da amostra GB2– ampliação.	326
Anexo 35. Espectro HSQC (400 MHz para H ¹ e 100 MHz para C ¹³ , CDCl ₃) da amostra GB2.	327
Anexo 36. Espectro HSQC (400 MHz para ¹ H e 100 MHz para ¹³ C, CDCl ₃) da amostra GB2– ampliação.	328
Anexo 37. Espectro HSQC (400 MHz para ¹ H e 100 MHz para ¹³ C, CDCl ₃)da amostra GB2– ampliação.	328
Anexo 38. Espectro HSQC (400 MHz para ¹ H e 100 MHz para ¹³ C, CDCl ₃) da amostra GB2– ampliação.	329
Anexo 39. Espectro HMBC (400 MHz para ¹ H e 100 MHz para ¹³ C, CDCl ₃) da amostra GB2.	330
Anexo 40. Espectro HMBC (400 MHz para ¹ H e 100 MHz para ¹³ C, CDCl ₃) da amostra GB2 – ampliação.	331
Anexo 41. Espectro HMBC (400 MHz para ¹ H e 100 MHz para ¹³ C, CDCl ₃) da amostra GB2 – ampliação.	332
Anexo 42. Espectro HMBC (400 MHz para ¹ H e 100 MHz para ¹³ C, CDCl ₃) da amostra GB2 – ampliação.	333
Anexo 43. Espectro HMBC (400 MHz para ¹ H e 100 MHz para ¹³ C, CDCl ₃) da amostra GB2 – ampliação.	334
Anexo 44. Espectro HMBC (400 MHz para ¹ H e 100 MHz para ¹³ C, CDCl ₃) da amostra GB2 – ampliação.	335
Anexo 45. Espectro HMBC (400 MHz para ¹ H e 100 MHz para ¹³ C, CDCl ₃) da amostra GB2 – ampliação.	336

Anexo 46. Espectro de massa ESI-MS, modo positivo, 30eV da amostra GB2 em metanol (A) e espectro do MS/MS do <i>m/z</i> 322,2, modo positivo, 30 eV, em metanol.....	337
Anexo 47. Espectro de absorção na região do IV (Filme, CHCl ₃) de GB3.....	337
Anexo 48. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da amostra GB3.....	338
Anexo 49. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da amostra GB3 – ampliação.	339
Anexo 50. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da amostra GB3 – ampliação.	340
Anexo 51. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da amostra GB3 – ampliação.	341
Anexo 52. Espectro HSQC (¹ H- ¹³ C, H 400; C 100 MHz, CDCl ₃) da amostra GB3.....	341
Anexo 53. Espectro HSQC (¹ H- ¹³ C, H 400; C 100 MHz, CDCl ₃) da amostra GB3– ampliação.	342
Anexo 54. Espectro HSQC (¹ H- ¹³ C, H 400; C 100 MHz, CDCl ₃) da amostra GB3– ampliação.	343
Anexo 55. Espectro HSQC (¹ H- ¹³ C, H 400; C 100 MHz, CDCl ₃) da amostra GB3– ampliação.	344
Anexo 56. Espectro HSQC (¹ H- ¹³ C, H 400; C 100 MHz, CDCl ₃) da amostra GB3– ampliação.	345
Anexo 57. Espectro HMBC (¹ H- ¹³ C, H 400 e C 100 MHz, CDCl ₃) da amostra GB3.	346
Anexo 58. Espectro HMBC (¹ H- ¹³ C, H 400 e C 100 MHz, CDCl ₃) da amostra GB3 – ampliação.	347
Anexo 59. Espectro HMBC (¹ H- ¹³ C, H 400 e C 100 MHz, CDCl ₃) da amostra GB3 – ampliação.	348
Anexo 60. Espectro HMBC (¹ H- ¹³ C, H 400 e C 100 MHz, CDCl ₃) da amostra GB3 – ampliação.	349
Anexo 61. Espectro HMBC (¹ H- ¹³ C, H 400 e C 100 MHz, CDCl ₃) da amostra GB3 – ampliação.	350
Anexo 62. Espectro HMBC (¹ H- ¹³ C, H 400 e C 100 MHz, CDCl ₃) da amostra GB3 – ampliação.	351
Anexo 63. Espectro de massa ESI-MS, modo positivo, 15eV da amostra GB3 em metanol (A) e espectro do MS/MS do <i>m/z</i> 276,1, modo positivo, 15eV, em metanol.....	352
Anexo 64. Espectro de absorção na região do IV (KBr) da amostra GB4.	352
Anexo 65. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da amostra GB4.....	353
Anexo 66. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da amostra GB4– ampliação.	354
Anexo 67. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da amostra GB4 – ampliação.	355
Anexo 68. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da amostra GB4– ampliação.	355
Anexo 69. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da amostra GB4- ampliação.	356
Anexo 70. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da amostra GB4– ampliação.	356

Anexo 71. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da amostra GB4.....	357
Anexo 72. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da amostra GB4– ampliação.	358
Anexo 73. Espectro HSQC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CDCl_3) da amostra GB4.	359
Anexo 74. Espectro HSQC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CDCl_3) da amostra GB4.	360
Anexo 75. Espectro HSQC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CDCl_3) da amostra GB4 – ampliação.	361
Anexo 76. Espectro HMBC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CDCl_3) da amostra GB4.	362
Anexo 77. Espectro HMBC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CDCl_3) da amostra GB4 – ampliação.	363
Anexo 78. Espectro HMBC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CDCl_3) da amostra GB4 – ampliação.	364
Anexo 79. Espectro de massa ESI-MS, modo positivo (A) e negativo (B), 15 eV da amostra GB4 em metanol e espectro do MS/MS do m/z 338,1, modo positivo, 15 eV, em metanol (C).	365
Anexo 80. Espectro de absorção na região do IV (KBr) da amostra GB4.	366
Anexo 81. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de GB5.....	367
Anexo 82. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de GB5- ampliação	368
Anexo 83. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de GB5.....	369
Anexo 84. Mapa de contorno gHSQC (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl_3) de GB5.	370
Anexo 85. Mapa de contorno gHMBC (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl_3) de GB5.....	371
Anexo 86. Espectro de massa ESI-MS, modo positivo (A) e modo negativo (B), 25 eV da amostra IT1 em metanol.	372
Anexo 87. Espectro de massa ESI-MS, modo positivo, 25 eV (A) de alta resolução da amostra IT1 em metanol.	372
Anexo 88. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de IT1.....	373
Anexo 89. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de IT1- ampliação	374
Anexo 90. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de IT1- ampliação região aromática.....	375
Anexo 91. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de IT1- ampliação região alifática	375
Anexo 92. Espectro de HSQC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , $\text{DMSO}-d_6$) de IT1.	376
Anexo 93. Espectro de HMBC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , $\text{DMSO}-d_6$) de IT1.	377

Anexo 94. Curva padrão para quantificação da BBR: Intensidade de fluorescência da berberina em função da sua concentração em Triton X-100 0,3%.....	378
Anexo 95. Curva padrão para dosagem de proteínas: absorbância da mistura de reação à 750nm em função da concentração da albumina em NaOH 0,1 N.....	380

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ	Deslocamento químico
E	Coeficiente de extinção molar
1,3-DPBF	1,3- difenilisobezofunano
Å	Angstrom
A	Absorbância real
ASD	Ágar Sabraud Dextrose
AM	Azul de Metileno
CC	Cromatografia em Coluna
C	Concentração
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CCV	do inglês <i>Clathrin Coated Vesicle</i>
CI	Conversão Interna
CIS	Conversão Intersistema
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CM	do inglês <i>Chylomicron</i> - Quilomicrones
cm ²	Centímetro quadrado
°C	Graus Celsius
D	Dubleto
Dd	Dubleto dubleto
Ddd	Duplo duplo dubleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	do inglês Ethylenediaminetetraacetic Acid- Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ESI- MS	do inglês <i>Electrospray Ionisation-Mass spectrometry</i> -espectometria de massas com ionização por eletrospray
ESI- MS/MS	do inglês <i>Electrospray Ionisation-Mass spectrometry</i> -espectometria de massas sequencial com ionização por eletrospray
eV	Eletron Volt
FDA	do inglês <i>Food Drug Administration</i>
G	Gramas
H	Horas
HO●	Radical hidroxila
-HO	Ion hidroxila
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HDL	do inglês <i>High Density Lipoprotein</i> - Lipoproteína de Alta Densidade
HMBC	do inglês <i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HPD	<i>Haematoporphyrin Derivatives</i> - HPD
HSQC	do inglês <i>heteronuclear single quantum coherence</i>
IDL	do inglês <i>Intermediate-Density Lipoprotein</i> - Lipoproteína de densidade intermediária
IV	Infravermelho

Hz	Hertz
<i>Laser InGaAlP</i>	<i>Laser</i> de Fosfeto de Índio-Gálio-Alumínio
J	Joules
<i>J</i>	Constante de acoplamento
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
LDL	do inglês <i>Low-Density Lipoprotein</i>
ℓ	Caminho óptico
λ_{abs}	Comprimento de onda de Absorção
λ_{emi}	Comprimento de onda de Emissão
λ_{exi}	Comprimento de onda de Excitação
M	Mol
MDA	Malondialdeído
Mg	Miligramas
mg/mL	Miligramas por mililitros
MH	Muller Hilton
MHz	MegaHertz
Min	Minutos
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
NOE	Do inglês <i>Nuclear Overhauser Effect</i>
μg	Microgramas
$\mu\text{g/mL}$	Microgramas por mililitros
μL	Microlitros
mL	Mililitros
Mm	Milímetros
mM	Milimolar
m/v	Massa/Volume
mW	Miliwatts
mW/cm ²	Miliwatts por centímetro quadrado
NCI	do inglês <i>National Cancer Institute</i>
Nm	Nanômetros
NO [•]	Óxido nitroso
O ₂ ^{•-}	Anion radical superóxido
¹ O ₂	Oxigênio singleto
OONO ⁻	Peroxinitrato
PDT	do inglês <i>Photodynamic therapy</i> -Terapia fotodinâmica
OS	do inglês <i>Photosensitizer</i> - Fotossensibilizador
pH	Potencial hidrogeniônico
Ppm	Parte por milhão
Rfs	Fator de retenção
RMN 1D	Ressonância magnética nuclear em uma dimensão
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN 2D	Ressonância magnética nuclear em duas dimensões
ROO●	Radical peroxil
RV	Relaxamento Vibracional
S	Segundos
S ₁	Estado singleto
S ₂	Estado excitado singleto superior

S ₀	Estado fundamental
Sdbroth	Saboraud dextrosebroth
SFB	Soro Fetal Bovino
SRD	Sulforrodamina B
TB	Trizma Base
TBARS	do inglês <i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i> -Substâncias Reativas ao Ácido Barbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TGI	Do inglês <i>total growth inhibition</i> - Concentração para inibir o crescimento celular em 50%
TSA	do inglês <i>Tryptone Soy Agar</i> - ágar de triptona de soja
TSB	do inglês <i>Tryptone Soy Broth</i> - caldo de triptona de soja
T ₁	Estado excitado triplete
T ₀	Absorção do controle de células da placa T ₀
T _A	Média da absorção da célula tratada
T _B	Absorção da suspensão celular em tratamento
TMS	Tetrametilsilano
UFC	Unidades formadoras de colônias
UFC/mL	Unidades formadoras de colônias por mililitros
UI/mL	Unidades por mililitros
UV	Ultravioleta
VLDL	do inglês <i>Very Low-Density Lipoprotein</i> - Lipoproteína de Densidade Muito Baixa
V	Volts
v/v	Volume em volume
W	Watts
W/cm ²	Watts por centímetro quadrado

APRESENTAÇÃO DA TESE

No presente estudo de Doutorado buscou-se a combinação multidisciplinar de diferentes áreas do conhecimento da pesquisa científica com a aplicação e desenvolvimento de diversos protocolos e ensaios experimentais, que abrangem desde técnicas de isolamento, identificação e caracterização estrutural de substâncias orgânicas, de fotoquímica, fotofísica, fotobiologia e nanotecnologia, visando à prospecção químico-farmacológica de fotossensibilizadores naturais para aplicação em Terapia Fotodinâmica (Photodynamic therapy- PDT), a partir de duas matrizes vegetais, *Guatteria blepharophylla* (Annonaceae) e *Indigofera truxillensis* (Fabaceae), tanto no que se refere à descoberta de novas substâncias fotossensibilizantes, como na compreensão de alguns processos envolvidos na atuação de fitoderivados em células animais. Para tanto, o conteúdo da Tese foi dividido didaticamente em Capítulos.

O Capítulo 1 reportou o estudo fitoquímico guiado pela avaliação das atividades antimicrobiana e antitumoral na presença e ausência de irradiação com *laser* diodo InGaAlP ($\lambda = 660$ nm) dos extratos obtidos destas matrizes vegetais e diferentes protocolos de fracionamento e isolamento de alguns constituintes químicos. Para as substâncias isoladas e purificadas realizou-se a identificação estrutural utilizando-se métodos espectroscópicos de análise (RMN 1D e 2D) e espectrometria de massas. Em seguida procedeu-se com a caracterização fotofísica e fotoquímica dos extratos, frações e substâncias isoladas para se levantar evidências quanto aos seus potenciais fotossensibilizantes. Na caracterização fotofísica obteve-se espectros de absorção UV-visível, que permitiram verificar se tais amostras absorviam na região de interesse para aplicação em PDT (entre 600 a 800 nm),

denominada janela terapêutica e, a partir da obtenção de espectros de fluorescência, verificou-se a possibilidade de formação de estados excitados tripletes essenciais para as formações de radicais livres e oxigênio singlete responsáveis pelos efeitos biológicos fotoinduzidos em PDT. Já a caracterização fotoquímica foi realizada através de ensaios de fotodecomposição *in vitro* do 1,3-difenilisobenzofurano (1,3 DPBF) para determinação da produção de oxigênio singlete e em modelo biológico *in vitro* com o emprego de substâncias que são supressoras de espécies excitadas e antioxidantes que neutralizam a progressão de reações radiculares, visando a avaliação da atividade fotodinâmica e a prevalência dos possíveis mecanismos fotoquímicos do tipo I ou II em modelo biológico *in vitro* das substâncias isoladas.

Procedeu-se à avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* com os extratos brutos, frações e substâncias isoladas, na ausência de irradiação *laser*, determinando-se os valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das amostras bioativas e foram estimados os valores da concentração subinibitória que seriam usados na PDT antimicrobiana (estudos fotobiológicos). Também foram estabelecidos os procedimentos para a padronização do protocolo experimental de PDT antimicrobiana frente a bactérias (Gram positivas e Gram negativas) e fungos (*Candida* spp.) que possibilitam maior incorporação celular de agentes fotossensibilizantes com uso dos aditivos permeabilizantes CaCl_2 e MgCl_2 . Adequou-se metodologia para a avaliação *in vitro* da atividade antiproliferativa, frente às linhagens de células humanas tumorais e de controle não tumoral, na ausência e presença de irradiação *laser*.

No capítulo 2, por meio do emprego de técnicas de biofotônica, foi descrito o estudo para o estabelecimento de sistemas nanoparticulados de alcaloides isoquinolínicos com Lipoproteínas de Baixa Densidade (*Low-Density Lipoprotein*= LDL) em modelo celular, para aplicação em PDT antitumoral. A escolha da LDL como nanopartícula foi justificada pela sua

possibilidade de atuação enquanto carreadora de moléculas bioativas para o interior de células alvo. Isto ocorre devido à aceleração do metabolismo das células tumorais e necessidades crescentes por colesterol, que se traduzem em um aumento de expressão dos receptores membranares apo"B/E", responsáveis pela incorporação celular de partículas de LDL que, se complexadas a uma outra molécula, resultam na sua maior incorporação e absorção dessa molécula com possível otimização dos efeitos farmacológicos. Assim, inicialmente realizou-se a caracterização espectroscópica de absorção UV-visível e fluorescência dos alcaloides fotossensibilizantes berberina e isomoschatolina e, em seguida, a interação dessas substâncias com LDL foi examinada em condições de equilíbrio químico. Estudou-se também a internalização celular da berberina livre e complexada com LDL em modelo celular, células tumorais de glioma humano (U87MG) e a localização intracelular desse alcaloide por meio de ensaios de co-localização com sondas fluorescentes. Avaliou-se ainda a peroxidação lipídica (fundamental para desestabilização celular e consequente morte) sofrida pelas células em ensaios de *TBARS*. Em todos os experimentos realizados, as células U87MG foram cultivadas em meios de cultura suplementados com Soro fetal bovino (SFB a 10%, v/v) ou com Ultroserum (a 2%, v/v), sendo que este último suplemento resulta em um aumento de expressão dos receptores "B/E".

Por fim, discorreu-se sobre as perspectivas e trabalhos futuros e finalmente foram apresentadas as referências bibliográficas e os anexos.

INTRODUÇÃO GERAL

O emprego de espécies vegetais pelo homem ocorre desde tempos remotos, seja como fonte de alimentos, matéria prima para construção de habitação, elaboração de meios de transporte, vestuário, utensílios domésticos, como também insumos para a saúde, sendo fonte de fármacos e medicamentos. As informações obtidas do conhecimento popular de espécies vegetais contribuíram e continuam auxiliando no desenvolvimento de novas tecnologias para a obtenção e planejamento de fármacos, além de possibilitar sua aplicação como fitoterápicos, cosméticos, alimentos nutracêuticos e agroquímicos (Mares, 1992; Gottlieb *et al.*, 1996; Robbers *et al.*, 1997; Cechinel & Yunes, 1998; Joly, 1998; Maciel *et al.*, 2002; Pinto *et al.*, 2002; Simões *et al.*, 2004; Benko-Iseppon & Crovella, 2011).

Historicamente, a química de produtos naturais tem auxiliado na descoberta de novas moléculas, por fornecer um universo químico diverso. Muitos metabólitos secundários, principalmente oriundos do reino vegetal, apresentam potente atividade biológica e/ou constituem importantes protótipos para o planejamento de novos fármacos e o desenvolvimento de medicamentos (Ojima, 2007; Villas-Boas & Gadelha, 2007; Newman, 2008;). Treze novas moléculas com base em produtos naturais foram aprovadas entre 2005 e 2007 (Butler, 2008), sendo que cinco dessas são os primeiros membros de novas classes de fármacos (Chin *et al.*, 2006; Lam *et al.*, 2007; Ganesan *et al.*, 2008; Newman, 2008). No entanto, a descoberta de novos fármacos passou a ser um grande desafio para a indústria farmacêutica e tem se observado uma diminuição no lançamento e veiculação de novos agentes terapêuticos a cada ano. Altíssimos investimentos em pesquisa e desenvolvimento estão em contraste com o número de novos medicamentos que tem chegado ao mercado (Ferreira *et al.*, 2011).

No Brasil, a diversidade dos biomas ainda é muito pouco explorada como fonte de novas substâncias de interesse farmacêutico. No entanto, apesar destas considerações, pesquisas para descoberta de protótipos de fármacos e também para a busca de fitoderivados padronizados para emprego como insumos farmacêuticos propiciam, além do avanço da pesquisa, o desenvolvimento tecnológico do país (PNPIC, 2014).

As plantas produzem uma variedade de substâncias provenientes de seu metabolismo primário e que participam ativamente nos processos de crescimento e desenvolvimento dos indivíduos e que são comuns a todas as espécies. No entanto, há também uma gama de substâncias resultantes do metabolismo secundário, e que estão distribuídas diferentemente entre os grupos taxonômicos do reino vegetal. A função da maioria dos metabólitos secundários já descritos ainda permanece desconhecida, mas o número de estudos com objetivo de elucidá-las cresce diariamente (Firn & Jones, 2009). Dentre as funções mais descritas destacam-se a defesa química contra herbívoros e parasitas, a proteção contra os raios UV, a atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes (Pichersky & Lewinsohn, 2011), e efeitos alelopáticos (Harborne, 1998). Logo, estas substâncias bioativas são os alvos em investigações que almejam identificar novos agentes com atividade farmacológica, como por exemplo taninos, terpenoides, alcaloides e flavonoides, por possuírem estruturas químicas complexas, com vários centros esterogênicos e que podem também ser empregados como substâncias protótipos para síntese de novos fármacos (Pinto *et al.*, 2002).

Por outro lado, nos países em desenvolvimento, cerca de dois terços da população faz uso de plantas como fonte de fármacos, sem nenhum ou pouco embasamento científico, prática essa que pode resultar em intoxicações agudas ou crônicas. No Brasil, isto também é uma realidade acrescida de um agravante em virtude de se ter, em abundância, espécies

vegetais desconhecidas tanto química quanto taxonomicamente. No entanto, o potencial do país para bioprospecção destas plantas é grande devido a sua fantástica diversidade biológica e dado o valor intrínseco de seus recursos naturais. Sob o ponto de vista científico, somente cerca de 5%, dentre 250 a 500 mil espécies vegetais nativas nacionais têm sido estudada (Cechinel & Yunes, 1998; Pinto *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2003) e muito pouco tem sido realizado para transformar o potencial brasileiro em vantagem competitiva, em produtos patentes, principalmente se considerarmos o desenvolvimento como forma de inserção social e de proteção e manutenção desses ecossistemas (Mares, 1992; Gottlieb *et al.*, 1996; Robbers *et al.*, 1997; Joly, 1998; Simões *et al.*, 2004).

Associada à descoberta de novos princípios ativos, a medicina tem avançado para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas que se mostrem mais efetivas e com menores efeitos adversos. Neste contexto, a Terapia Fotodinâmica (PDT, do inglês *Photodynamic Therapy*) configura-se como um sistema terapêutico promissor para este fim. Esta técnica envolve a administração de uma substância fotoativa, denominada fotossensibilizador (PS), que é ativada na presença de luz em um determinado comprimento de onda (janela terapêutica entre 600 e 800 nm), por um determinado período de tempo e na presença de oxigênio. A transferência de energia do PS ativado para o oxigênio disponível, resulta na formação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), tais como o oxigênio singlete e radicais livres (Fuchs & Thiele, 1998; Castanho *et al.*, 2004; Ribeiro & Groth, 2005; Perussi, 2007; Konapka & Goslinski, 2007). Estas espécies químicas, altamente reativas, podem reagir danificando proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e outros componentes celulares, sendo assim citotóxicas e vasculotóxicas, causando, portanto, dano tecidual (Dougherty *et al.*, 1998; Ackroyd *et al.*, 2001; Bliss *et al.*, 2004) e morte das células alvo.

A aplicação racional e terapêutica da PDT demonstrou, em diversos estudos, grande eficácia frente ao tratamento de diferentes quadros patológicos tais como câncer de cabeça, pescoço e pele (Hopper, 1996, 2000; Allison *et al.*, 2004, 2005, 2006), de lesões e de biofilmes orais (fibrose cística e periodontite) (Bhatti *et al.*, 1998; Wood *et al.*, 1999; Sharwani *et al.*, 2006) e de dermatoses (Szeimes *et al.*, 1996; Maish *et al.*, 2004). A PDT antimicrobiana também tem sido eficaz contra um amplo espectro de infecções bacterianas, fúngicas, parasíticas e virais (Wainwright, 1998; Wainwright & Crossley, 2004; Gad *et al.*, 2004; Hamblin & Hasan, 2004; Meisel & Kocher, 2005; O’Riordan *et al.*, 2005; Smith, 2005; Kömerick & MacRobert, 2006; Wood *et al.*, 2006; Donnelly *et al.*, 2007). Além disso, progressos têm sido alcançados na ciência básica e na fotodinâmica clínica, quando se unem forças para o desenvolvimento de novos PSs, realização de investigações clínicas e aplicação das técnicas de PDT no tratamento curativo ou paliativo de doenças malignas e não-malignas (Huang, 2005).

A maioria dos PSs utilizados atualmente é derivada da hematoporfirina (Photofrin), verteporfirina (Visudyne), ácido aminolevulínico (Levulan) e aminolevulinato de metila (Metvix) (Simplicio, Maionchi, Hiota, 2002; Dickson-Goyan & Pottier, 2003; Nyman & Hynninen, 2004). Apesar de bastante efetivos, outras substâncias vêm sendo testadas a fim de eliminar completamente os efeitos tóxicos, otimizar a incorporação em formulações farmacêuticas e a biodisponibilidade destes compostos nas células alvos (Allison, Bagnato, Sibata, 2010; Nowak-Stepniowska, Pergoł, Padzik-Graczyk, 2012; Mielczarek-Badora & Szulc, 2013).

Estes fatos encorajam estudos para a busca de novas moléculas em espécies vegetais que apresentem efeitos biológicos fotoinduzidos, e que sejam menos tóxicas e mais efetivas, uma vez que muitas das substâncias sintetizadas pelas plantas absorvem luz na região de

interesse da PDT (entre 600 e 800 nm), tais como os pigmentos naturais fotossintéticos clorofilas a e b, carotenoides, entre outros, que já têm sido empregados como substâncias protótipos de PSs obtidos por síntese em laboratório ou ainda outras substâncias oriundas do metabolismo secundário que apresentam potencial fotossensibilizante, tais como os PSs da hipericina (*Hypericin- type photosensitizers*), hipocrelina e antraquinonas (Wainwright, 2009).

Além disto, o mecanismo de absorção e a distribuição intracelular do PS são os principais determinantes de sua eficácia na PDT, visto que, devido ao curto tempo de vida das ERO's, como também à baixa difusão dessas espécies nos tecidos, é desejável que os PSs se acumulem em organelas que, quando danificadas, levem à morte celular. Estes fatos têm encorajado a realização de diversos estudos que se propõem a elucidar a via de internalização de PSs assim como seu local de acúmulo dentro das células (Kaskakova *et al.* 2005 e 2008; Huntusova *et al.*, 2010).

As proteínas do soro sanguíneo são predominantemente responsáveis pelo transporte de PSs por todo o corpo (Jori *et al.*, 1984; Reyftmann *et al.*, 1984; Kessel, 1986). No caso do câncer, a aceleração do metabolismo das células tumorais e a necessidade por colesterol se traduz em um aumento de expressão dos receptores apo B/E que absorvem lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que apresentam na sua composição o colesterol. Estudos prévios demonstraram a capacidade de partículas de LDL se associarem a agentes terapêuticos, como os PSs, e atuarem como transportadores-alvo podendo melhorar a sua eficácia farmacológica (Bonneau *et al.*, 2002 e 2004; Huntsova *et al.*, 2010).

Neste contexto, o presente estudo foi desenhado para atingir dois propósitos, cada um deles abordados em Capítulos diferentes, mas ambos relacionados à prospecção químico-farmacológica de PSs naturais para aplicação em PDT, tanto no que se refere à descoberta de

novas substâncias quanto na compreensão de alguns processos envolvidos na atuação das mesmas em células animais.

Devido à presença de picos de absorção na região da janela terapêutica (entre 600 e 800 nm) observados em ensaios preliminares pelo nosso grupo de pesquisa, os extratos brutos de *Guatteria blepharophylla* (Annonaceae) e *Indigofera truxillensis* (Fabaceae) mostraram-se atraentes para aplicação como agentes fotoativáveis, assim como matrizes na busca de novos PSs naturais. A exploração fotofísica, fitoquímica e fotobiológica destas espécies foram abordadas no Capítulo 1. No Capítulo 2 foram discutidos aspectos da química de ligação dos alcaloides berberina (BBR) e isomoschatolina (GB1) com LDL e algumas das consequências dessas interações nas suas atuações como agentes fotossensibilizantes.

CAPÍTULO 1

Estudo químico e avaliação de atividades biológicas para aplicação em Terapia Fotodinâmica de extratos, frações e substâncias isoladas de *Guatteria blepharophylla* (Annonaceae) e *Indigofera truxillensis* (Fabaceae).

1. Introdução

1.1. A família Annonaceae

A família Annonaceae pertence ao grupo das Eudicotiledôneas, clado das Magnoliídeas, ordem Magnoliales (APG, 2009). Trata-se de uma família bastante diversa, representada por espécies com hábitos arbóreos, arbustivos, subarbustivos e raramente na forma de lianas. Possui cerca de 135 gêneros e mais de 2500 espécies (Chatrou *et al.*, 2004), distribuídos ao longo de toda América central, até o sul do México e norte da América do Sul, além da região costeira brasileira (nordeste, sudeste e norte do Paraná) e por toda a Indonésia. Já foram descritos 26 gêneros no território brasileiro, sendo os principais *Annona*, *Xylopia* e *Guatteria*, compreendendo cerca de 260 espécies, algumas delas presentes em áreas abertas e a maioria concentrada em florestas (Maas *et al.*, 2001 e 2007). A abundância relativa de Annonaceae é alta em áreas designadas como *hotspots* de biodiversidade por Myers *et al.* (2000), tais como o oeste do Equador, o Andes tropical e as florestas Atlântica e Amazônica brasileiras (Figura 1).

As características botânicas mais relevantes para identificação são o odor forte do corte do tronco e ramos, presença de fibras longas e resistentes na casca do caule, folhas dísticas, alternas, simples, sem estípulas e margem inteira (exceto em *Tetrameranthus*). As

flores são isoladas ou reunidas em inflorescências hemicíclicas, hermafroditas, diclamídeas, com perianto diferenciado no cálice e corola, trímeras e carnosas; estames numerosos em espiral, ovário súpero com carpelos apocárpicos com um a muitos ovúlos (Joly, 2002).



Figura 1. Distribuição geográfica dos registros de Annonaceae (Fonte: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/orders/magnolialesweb.htm#Annonaceae>, acessado em janeiro de 2014).

Os membros desta família são conhecidos por suas frutas comestíveis, especialmente espécies do gênero *Annona*, tais como: *Annona squamosa* (fruta do conde ou pinha), *Annona montana* (graviola da montanha), *Annona muricata* (guanabana, graviola) e *Annona reticulata* (condessa) (Kessler, 1993; Joly 2002). Algumas espécies são exploradas pela qualidade de sua madeira como, por exemplo, *Bocageopsis* spp., *Guatteria megalophylla*, *Guatteria stipitata*, *Oxandra polyanthia*, *Oxandra lanceolata*, *Xylopia aethiopia* e *Xylopia villosa* (Kessler, 1993; Sánchez, 1997; Murilo & Restrepo, 2000). Outras se destacam ainda pelo uso dos óleos das sementes para a produção de óleos comestíveis e sabão e pelo emprego da madeira para obtenção de álcool e papel (Lebouef *et al.*, 1982).

A família Annonaceae também é conhecida por suas propriedades medicinais. Investigações químicas e farmacológicas prévias de algumas espécies revelaram a presença de compostos bioativos que exibem um imenso rol de atividades farmacológicas, dentre as quais pode-se citar: citotoxicidade contra linhagens de células tumorais humanas (Muhammad *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2009), atividades antimicrobiana (Zhang *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2008 e 2009b), anticonvulsiva (González-Trujano *et al.*, 2001) e antiparasitária contra *Leishmania* ssp. (Costa *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2009), *Plasmodium falciparum* (Muhammad *et al.*, 2001, Boyon *et al.*, 2003) e *Trypanosoma* ssp. (Waechter *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2009). Apesar de sua importância na medicina popular, o número de espécies que foram quimicamente investigadas ainda é muito pequeno (Erkens *et al.*, 2008).

Entre as classes de metabólitos secundários já descritos pode-se citar: compostos aromáticos, terpenos (mono, di, tri e sesquiterpenos) e esteroides. Os principais tipos de flavonoides encontrados são flavonas (luteolina), flavonoides (canferol, quercetina e rutina) e tetrahidroxiflavonas (quenferol). Há também amidas, lactonas (Akendengue *et al.*, 2002) e cetonas (González-Trujano *et al.*, 2001). Por fim, a classe de substâncias mais recentemente descoberta foi das acetogeninas (acetogeninas de anonáceas), nas quais já foram detectadas propriedades citotóxica, antiparasitária, pesticida, imunossupressora e inibidora da respiração celular (Rupprecht *et al.*, 1990; Alali *et al.*, 1999; Bermejo *et al.*, 2005; Costa, 2009).

Além disso, a família Annonaceae constitui uma rica fonte de alcaloides isoquinolínicos, principalmente da classe dos alcaloides aporfínicos, embora outras classes sejam encontradas, tais como os alcaloides protoberberínicos e tetraidroprotoberberínicos (Queiroz *et al.*, 1996; Wijeratne *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2009a), sendo que a abundância de cada classe de alcaloide varia dependendo da espécie.

Para os alcaloides aporfínicos, diversas atividades biológicas já foram detectadas tais como: antiparasitária *in vitro*, antiagregação plaquetária, vasodilatadora, antioxidante, antiviral (Paulo *et al.*, 1992), antimicrobiana (Khan *et al.*, 2002; Lopez *et al.*, 2002; Rahman *et al.*, 2005), leishmanicida *in vitro* (Queiroz *et al.*, 1996; Montenegro *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2006) e antitumoral (Wu *et al.*, 1993; Stévigny *et al.*, 2005). Estudo mais recente aponta para a capacidade do aporfinoide oxoisoaporfina em produzir oxigênio singlete e a possibilidade de aplicação como PS (Sobarzo-Sánchez *et al.*, 2012).

Entre os alcaloides protoberberínicos, podem ser citadas as atividades anti-inflamatória, antitumoral, antimicrobiana e antiparasitária (Küpeli *et al.*, 2002; Martínez-Vázquez *et al.*, 2005; Gricová *et al.*, 2007), além de anti-hipertensiva, antidiarreica, antiaterosclerótica, antiarrítmica e, finalmente, a ação contra dislipidemias e doença de Alzheimer (Küpeli *et al.*, 2002; Kuo *et al.*, 2004; Zhu & Qian, 2006; Megyesi & Biczók, 2007; Yin, Xing, Ye, 2008; Wang., 2009; Sarna *et al.*, 2010; Gu *et al.*, 2010, Wu, Wang, Liu, 2010).

1.1.1. *Guatteria blepharophylla*

O gênero *Guatteria* foi descrito por Ruiz & Pavon em 1974, sem indicação de espécie-tipo. Atualmente contém cerca de 300 espécies, sendo o maior gênero dentro da família Annonaceae (Erkens *et al.*, 2008). Este nome foi dado em homenagem ao botânico italiano G.B. Guatteri, antigo professor da Universidade de Parma, Parma, Itália (<http://plants.jstor.org/flora/floc000030>, acessado em novembro de 2013).

Com base em caracteres morfológicos, *Guatteria* pertencia ao grupo Fries "*Guatteria*" (*Guatteria-group*) no qual também se inseriam *Guatteriella*, *Guatteriosis* e *Heteropetalum*

(Fries, 1959; Kesler, 1993). Nos últimos dez anos, trabalhos filogenéticos da família fundamentados em características morfológicas e estudos moleculares adicionais revelaram uma espécie monofilética (Richardson *et al.*, 2004; Pirie *et al.*, 2005, Erkens *et al.*, 2007). Assim, tomando como base a filogenia, sustentada por dados moleculares de trabalhos anteriores, Erkens e Maas (2008) propuseram a união das espécies dos gêneros *Guatterella*, *Guatteropsis* e *Heteropetalum* no novo gênero *Guatteria*. Esta união foi oficializada em 2010, apesar desse gênero ainda apresentar problemas taxonômicos complexos pela dificuldade de delimitações de espécies e seu agrupamento em seções (Lobão & Mello-Silva, 2007).

Quanto a sua distribuição, espécies de *Guatteria* são frequentes nas florestas de planície Neotropical (Morawetz & Waha, 1985; Erkens *et al.* 2007) e encontram-se amplamente disseminadas por toda a Mesoamérica, Caribe e América do Sul tropical. *Guatteria blepharophylla* (Mart.) R.E. Fries distribui-se na Amazônia brasileira, peruana, guianense, equatoriana e venezuelana (Ribeiro *et al.*, 1999; Erkens *et al.*, 2007; Maas *et al.*, 2007). Trata-se de uma árvoreta do sub-bosque variando de 3 a 6 m de altura e cerca de 5 cm de diâmetro, conhecida popularmente como envieira (Figura 2). Apresenta ramos jovens e pecíolos densamente cobertos com pêlos adpressos e castanhos que se tornam glabros com o tempo. A face inferior da folha apresenta o mesmo indumento. A base é aguda, decurrente. Apresenta 16 a 23 nervuras secundárias. Possui hábito de platô e vertente (Figura 2). Quanto a sua composição química, os principais constituintes são alcaloides aporfinóides (aporfinos e oxoaporfinos) e protoberberínicos (Erkens *et al.*, 2007; Erkens & Maas *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2009a). Já foi também descrita a presença de terpenos tais como óxido de cariofileno e espatulenol (constituintes do óleo essencial da espécie) (Costa *et al.*, 2008).



Figura 2. Fotografia da árvore (A) e das folhas e frutos (B) de *Guatteria blepharophylla* (Fonte: Costa, 2009).

1.2. A Família Fabaceae

Fabaceae ou Leguminosae é a terceira maior família de plantas, atrás somente de Orchidaceae e Asteraceae (APG III, 2009). Compreende cerca de 730 gêneros e mais de 19400 espécies, distribuídas por todo o planeta exceto na Antártida e no Ártico (Figura 3). As árvores e trepadeiras são frequentemente encontradas em regiões tropicais, enquanto as plantas herbáceas e arbustos são predominantes em regiões extratropicais (Lewis *et al.*, 2005). No Brasil ocorrem cerca de 220 gêneros e 2736 espécies, distribuídas ao longo de todo o território nacional (Azevedo-Tozzi, 1997).

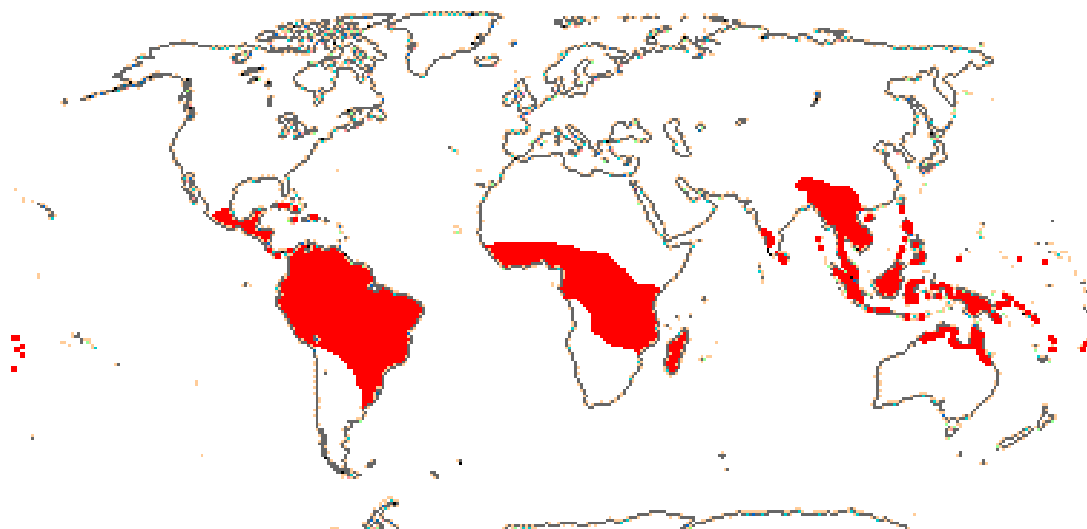


Figura 3. Distribuição geográfica dos registros de Fabaceae (Fonte: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/orders/magnolialesweb.htm#Fabaceae> acessado em janeiro de 2014).

É Subdividida em três subfamílias com características morfológicas muito distintas: Faboideae (ou Papilionoideae), Caesalpinioideae e Mimosoideae e por conta disso, houve por certo tempo, pesquisadores que defendiam a sua divisão em três famílias distintas. No entanto, evidências morfológicas e moleculares (estudos filogenéticos) recentes suportam o fato de que Fabaceae é uma família monofilética (Kajita *et al.*, 2001; Wojciechowski, Lavin, Sanderson, 2004)

As espécies desta família são facilmente identificadas pelo seu fruto na forma de legume e suas folhas com estípulas. Além disso, as folhas podem ser pinadas, bipinadas, trifolioladas e digitadas. Suas flores são andróginas, zigomórfas ou actinomorfas, heteroclamídeas. O cálice gamossépalo ou raramente dialissépalo, com prefloração aberta, valvar ou imbricada. O androceu geralmente tem 10 estames, o gineceu apresenta ovário súpero, unicarpelar e unilocular e, às vezes, divididos por falsos

séptos, em geral, multiovulado, com placentação parietal. Os frutos também podem ser do tipo monocarpelar, seco e deiscente ou ainda carnosos e indeiscentes (Polhill & Raven, 1981).

Muitos representantes desta família têm importância alimentar, incluindo as dos gêneros *Phaseolus* ssp. (feijão), *Pisum* ssp. (ervilha) e as espécies *Glycine max* (soja), *Medicago sativa* (alfafa) e *Cicer arietinum* (grão de bico). Outras são utilizadas para extração de colas naturais (*Astragalus gummifer* e *Acacia senegal*) e de corantes (*Indigofera* ssp.) ou ainda como plantas ornamentais (*Caesalpinia spinosa*) (Graham & Vance, 2003).

1.2.1. *Indigofera truxillensis*

O gênero *Indigofera* constitui-se entre os seis maiores de Fabaceae (Azevedo-Tozzi, 1997), compreendendo cerca de 700 espécies, das quais 45 estão disseminadas em regiões Neotropicais (Lewis, 1987; Schrire, 2005), 11 delas podendo ser encontradas no Brasil, sendo típicas do cerrado (Bentham, 1859) e representadas por plantas herbáceas e subarbustivas (Lewis *et al.*, 2005). Além disso, a este gênero pertence a espécie *Indigofera tinctoria* popularmente conhecida como "Índigo", cuja tintura apresenta grande valor na indústria têxtil (Kamal & Mangla, 1993). Outras espécies, como a *Indigofera arrecata*, *Indigofera articulata* e *Indigofera suffruticosa* são comumente utilizadas como corantes, protetoras do solo contra erosão, como húmus verde, para sombrear plantações e como plantas ornamentais.

Quanto às propriedades medicinais apresentadas pelo gênero *Indigofera*, já foram reportadas atividades antipirética, purgativa, diurética, tônica, curativa de abscessos e ativas contra picadas de cobras, abelhas e insetos variados (Eisinger, 1987), além de ação antimicrobiana, antiespasmódica, sedativa, contra epilepsia, doenças urinárias, úlceras, febre intermitente e hepatite. Estas atividades são atribuídas à presença de flavonoides

(glicosilados), alcaloides (bis-indólicos) e esteroides (Hastings, 1990; Leite *et al.*, 2006; Vieira *et al.*, 2007).

No Brasil, a espécie *Indigofera truxillensis* encontra-se distribuída nos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul. Trata-se de um arbusto ou subarbusto ereto, ramificado até 1,5 metros de altura, indumento composto por tricomas bifurcados, 11 a 17 folhas folioladas opostas e pecioladas, legumes retos, cilíndricos, glabros ou com tricomas esparsos, com 5 a 9 sementes (Figura 4). *I. truxillensis* distingue-se das demais espécies do gênero devido a seu hábito arbustivo e folhas com folíolos numerosos.



Figura 4. Fotografia das partes aéreas de *Indigofera truxillensis* (FOTO: Cola-Miranda, 2009).

Na medicina popular, *I. truxillensis* tem sido utilizada para tratar desordens e dores gastrointestinais (Barros & Teixeira, 2008). Cola-Miranda *et al.* (2006) verificaram que o extrato bruto desta espécie mostrou efeito antiulcerogênico em lesões induzidas por ligação pilórica e etanol, devido à presença de substâncias antioxidantes, tais como terpenoides, flavonoides e alcaloides, sendo o alcaloide índigo o principal componente do extrato alcaloídico. Em 2007, Faria-Silva e colaboradores verificaram a atividade antioxidativa desse

alcaloide e seu efeito preventivo contra o dano de DNA causado pelo excesso de álcool na mucosa gástrica de ratos. Há também evidências de efeito antinociceptivo deste composto em modelos de dor (comunicação pessoal realizada por Dr. Ricardo José Dunder) e, por fim, já foi relatada atividade mutagênica do extrato metanólico e das frações alcaloídicas e de flavonoides de *I. truxillensis* (Calvo *et al.*, 2009).

Tanto para *I. truxillensis* como para *G. blepharophylla*, objetos do presente estudo, não existem relatos na literatura quanto a sua aplicação em PDT, seja como fitoderivado ou de substância procedente. Estudos preliminares do grupo de pesquisa liderado pelo professor Doutor Marcos José Salvador, dos extratos brutos de espécies de Annonaceae e Fabaceae, incluindo as espécies citadas, revelaram perfil absortivo útil para aplicação em PDT, indicando a possibilidade de seu emprego como substrato fotoativável, além de sugerir a presença de substâncias responsáveis por este perfil e que podem apresentar características fotofísicas e fotoquímicas compatíveis para sua aplicação enquanto fotossensibilizadores naturais.

1.3. Considerações gerais sobre luz e *laser*

O uso da luz no tratamento de doenças data de mais de 3000 anos, onde na China, Índia e Egito ela era usada contra psoríase, vitiligo e câncer (Spikes, 1985). Os franceses faziam uso da radiação solar para tratar certas patologias como tuberculose, escorbuto, reumatismo e edemas. O pesquisador dinamarquês Niels Ryberg Finsen foi precursor no uso da luz na prática clínica, utilizando pela primeira vez, lâmpada de carbono com filtro para radiação infravermelha no tratamento de tuberculose cutânea (Finsen, 1901). Atualmente a aplicação da luz visível ou próxima do infravermelho como agente terapêutico é denominada

fototerapia que se utiliza de fontes específicas e bem controladas de radiação eletromagnética (Juzeniene, Nielsen, Moan, 2006).

Desenvolvido na década de 60 pelo cientista Theodore Mainman, o *laser* é um dispositivo que emite luz através de um processo de amplificação óptica baseado na emissão estimulada de radiação eletromagnética coerente. O termo *laser* originou-se como um acrônimo do inglês *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (Paschotta, 2008).

Lasers diferem de outras fontes de luz uma vez que os feixes de radiação emitidos possuem características de monocromaticidade (pureza espectral), coerência espacial (direcionalidade) e coerência temporal (amplificação de intensidade) únicos (Brugnera Jr. & Pinheiro, 1998). Sua coerência espacial, também denominada coerência espectral, resulta em um feixe de luz colimado (todas as ondas dos fótons que compõem o feixe estão em fase e assim propaga-se praticamente em paralelo, com divergência angular muito pequena). Isso permite focalizá-lo em uma área pequena, alcançando uma alta irradiância e perfeita direcionalidade. Já a elevada coerência temporal dos *lasers* resulta em um espectro de emissão bastante estreito, podendo ser composto por apenas um único comprimento de onda (monocromaticidade), além de permitir a emissão de pulsos de luz com duração de apenas um femtosegundo (Karman *et al.*, 1999).

Todas estas características conferem ao *laser* diferentes aplicabilidades que vão desde dispositivos de consumo comuns, tais como leitores de DVD, impressoras à *laser* e *scanners* de código de barras, até na indústria onde são usados para corte e soldagem de materiais, equipamentos militares e policiais, para marcação de alvos e medidas de alcance e velocidade e na pesquisa científica. No que concerne à área médica, existem dois tipos de *laser*: de alta potência e de baixa potência (Oliaei *et al.*, 2011; Liebert, Bicknell, Adams, 2013)

O *laser* de alta potência (também denominado de *laser* cirúrgico ou *laser* ablativo) possui alta intensidade de energia, que lhe confere propriedades de corte, coagulação, vaporização do conteúdo hídrico celular e carbonização do tecido e, por isso, é utilizado em diferentes procedimentos cirúrgicos (*laser* terapia de alta potência). Contudo, devido ao considerável aumento da temperatura no local de ação, ele pode causar desnaturação proteica e dano tecidual (Schwesinger & Hunter, 1992).

O *laser* de baixa potência (também denominado *laser* clínico, não-ablativo, terapêutico, frio ou *soft laser*) é usado para estimular processos de cicatrização e regeneração tecidual, no controle de processos inflamatórios com reabsorção do edema e inativação de catabólitos intermediários, no tratamento de doenças de pele e pequenos tumores, no estímulo da proliferação de fibroblastos e neovascularização e na regeneração óssea (Saito & Shimizu, 1997). Nestes casos, o *laser* promove ativação ou inativação de processos metabólicos sem envolver suas propriedades térmicas. Ainda, os efeitos do *laser* terapêutico podem alcançar sítios anatômicos distantes pela ação de mediadores químicos que se espalham pela circulação sanguínea (Brugnera Jr. & Pinheiro, 1998).

Quanto à associação com um agente fotossensibilizante, o *laser* pode contribuir para a formação de produtos reativos, caracterizando a Terapia Fotodinâmica (Robertson, Evans, Abrahams, 2009). A utilização do *laser* em cada uma das terapias acima descritas vai depender de certas variáveis como Potência (W ou J/s), Irradiância (W/s^2) e Densidade de Energia (J/cm^2).

Energia é uma grandeza física que, no caso da *laser* terapia, representa a quantidade de luz *laser* que está sendo depositada no tecido e é definida em Joule (J).

Potência, expressa em Watts (W), é a capacidade do *laser* em fornecer energia e provocar maior ou menor reação fotobiológica, ou seja, relaciona o trabalho realizado por uma força com o tempo (s) gasto para realizá-lo (Genovese, 2000).

O termo Irradiância é utilizado pelos fotobiologistas como sinônimo para densidade de potência definida por sua vez como a Potência óptica útil do *laser*, dividida pela área irradiada, expressa em centímetros quadrados (cm²). Por meio do controle desta variável é possível cortar, vaporizar, coagular ou soldar o tecido quando se utiliza os *lasers* cirúrgicos. Já uma densidade de potência mais amena pode resultar em fotoativação a partir de *lasers* terapêuticos (baixa intensidade de energia).

Por fim, densidade de energia, fluência ou dosimetria é a energia total transmitida por um feixe de luz por unidade de área (J/cm²) e, portanto, representa a relação entre energia administrada por um emissor de luz e a superfície de irradiação (tecido biológico) do raio *laser* (Brugnera, 2003). O termo refere-se à unidade de superfície irradiada e não à totalidade de energia emitida (Almeida-Lopes & Massini, 2002), sendo o critério de verificação da eficácia e referência para a reprodutibilidade da terapia. Assim, a dosimetria está diretamente relacionada ao sucesso ou não do tratamento e/ou diagnóstico (Brugnera, 2003). Variações na densidade de potência, do tempo de irradiação, ou ambos, podem resultar em uma mesma dose de luz (Wainwright, 1998).

1.4. Considerações gerais sobre Terapia Fotodinâmica (PDT)

A PDT ou fotoquimioterapia é uma técnica terapêutica que se baseia na associação da luz com medicamentos fotoativáveis e vem se mostrando bastante versátil para o tratamento de diferentes quadros patológicos tais como, doenças da pele e boca, câncer, doenças

infecciosas, parasitárias, psoríases e contra a degeneração macular (Eduardo *et al.*, 2010; Karrer *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2012; Velez-Montoya *et al.*, 2012; Darlenski & Fluhr, 2013). Além da aplicação médica também é empregada em sínteses químicas (Esse, Pohlmann, Scharf, 1994; Gerdes *et al.*, 2001), na esterilização de sangue (Sharman, Allen, Lier, 1999), na exterminação de pragas agrícolas (Bem & Jori, 2000) e no tratamento de efluentes (Clennan & Sram, 2000).

Esta técnica faz uso de um fármaco fotossensível que, uma vez ativado pela luz visível (comprimento de onda específico) e na presença de oxigênio, induz a produção de espécies citotóxicas tais como, o oxigênio singleto e radicais livres que atuam diretamente sobre sistemas biológicos induzindo à morte da célula alvo (Castanho, Demidova, Hamblin, 2004; Robertson, Evans, Abrahamse, 2009).

A PDT remonta ao início do século XX, quando pesquisadores usaram corantes juntamente com a luz em aplicações médicas. Destaca-se o trabalho de von Tappeiner e Jesionek (1903), que observaram a ação da eosina e luz em carcinoma basocelular. Em 1904 foi cunhado o termo “reação fotodinâmica” (von Tappeiner & Jodlbauer, 1904) e a primeira definição de PDT surgiu em 1907, na qual von Tappeiner e Jodlbauer postularam que se tratava da interação entre luz, um agente fotossensibilizante e oxigênio que levavam à destruição de tecidos (von Tappeiner & Jodlbauer, 1907). Outros trabalhos vieram com a avaliação fotossensível da hematoporfirina em ratos (Hausmann, 1911) e em humanos (Meyer-Betz, 1913), da fluorescência da porfirina em sarcomas de ratos (Policard, 1924) e carcinoma de mama humano (Korbler, 1931).

O interesse moderno pela PDT data da descoberta de derivados da hematoporfirina (do inglês *Haematoporphyrin Derivatives*- HPD) por Lipson e Baldes (1960) e da sua utilização na detecção de câncer cervical (Lipson *et al.*, 1964). Descobriu-se, em seguida, que a

associação deste composto com a luz vermelha inibia completamente o crescimento de tumores em ratos (Dougherty *et al.*, 1975) e a purificação da HPD levou à produção do primeiro fotossensibilizador comercial, o Photofrin II[®] (Schaffer *et al.*, 2005).

Depois de se verificar a possibilidade da condução do tratamento de tumores com HPD-PDT, percebeu-se que essa opção terapêutica apresentava diversas desvantagens, tais como sensibilidade prolongada pela pele, (Baas *et al.*, 1995), baixa seletividade tumoral (Orenstein *et al.*, 1996), pequena penetração da luz no tumor devido ao baixo comprimento de onda utilizado para ativação da HPD (Spikes, 1990) e a impureza do composto, por se tratar de uma mistura complexa de estruturas químicas com propriedades fotofísicas distintas (Kessel & Thompson, 1987). Estas desvantagens estimularam um grande esforço entre os químicos orgânicos para o desenvolvimento de novos PSs que mediassem a PDT.

1.4.1. Fotofísica e Fotoquímica da Terapia Fotodinâmica (PDT)

O mecanismo de ação da PDT é tradicionalmente descrito utilizando o diagrama de Perrin-Jablonsky (Figura 5), o qual mostra, esquematicamente, os níveis de energia principais do fotossensibilizador e os processos através dos quais ele pode passar de um nível para o outro quando em interação com a radiação eletromagnética, no caso, fornecida pela luz monocromática do *laser*. Elétrons ocupam níveis de energia estratificados nas moléculas e podem ser promovidos a níveis mais altos pela absorção da quantidade correta de energia. Esta abordagem quantitativa explica como a excitação de elétrons corresponde especificamente com a radiação de um determinado comprimento de onda (Wainwright, 2009).

O PS em seu estado fundamental (S_0), também denominado estado singlete fundamental, tem seus elétrons emparelhados e dispostos de modo a minimizar a energia. Estes elétrons existem aos pares em orbitais específicos. Cada par de elétrons apresenta *spins* opostos. Quando irradiado, a absorção de um fóton de energia faz com que um dos elétrons do par passe para um orbital de energia mais excitado, sem alterar seu spin, atingindo assim estados excitados singlete (S_1 , S_2). Frequentemente, os estados excitados singlete superiores a S_1 são muito instáveis. Em virtude desta instabilidade, a molécula, volta para seu estado excitado singlete S_1 por conversão interna (CI). A partir deste estado o fotossensibilizador pode sofrer vários processos, dois particularmente importantes no contexto da PDT: (1) o elétron retorna a seu estado fundamental por emissão de um fóton. Este processo é chamado de fluorescência; (2) A inversão do spin do elétron excitado por conversão intersistema (CIS) resulta na transição do estado eletrônico singlete excitado (S_1) para o estado tripleto excitado (T_1), que se trata de um estado excitado da substância mais estável e com maior tempo de vida que o estado singlete excitado, em razão da transição $T_1 \rightarrow S_0$ ser proibida por *spin* (Sharman, Allen & vanLier, 2000). O decaimento para o estado fundamental a partir dos estados tripletos excitados, também é possível e, se radiativo, é denominado fosforescência ou fosforescência atrasada.

Os mecanismos precisos da PDT ainda não são inteiramente compreendidos. No entanto, sendo o estado tripleto excitado a origem da fototoxicidade do fotossensibilizador, dois tipos de mecanismos moleculares, tipo I e tipo II, podem estar envolvidos (Bonnet, 2000). Ambos podem ocorrer simultaneamente e a razão entre eles depende do tipo de PS, concentração de substrato e de oxigênio.

No mecanismo do tipo I, por transferência de elétrons e/ou extração de átomos de hidrogênio envolvendo um substrato (biológico, solvente ou outro fotossensibilizador), o

estado tripleto pode dar origem a diferentes espécies de radicais livres e/ou íons radicais. Estes radicais podem reagir com outras moléculas e, gradualmente, induzir uma cadeia de reações redox. O oxigênio está frequentemente envolvido nestes fenômenos que podem, por exemplo, levar à peroxidação lipídica da membrana e provocar a formação do ânion superóxido, $O_2^{\cdot-}$ ou radical hidroxila, os quais também são citotóxicos (Castano, Demidova, Hamblin, 2004).

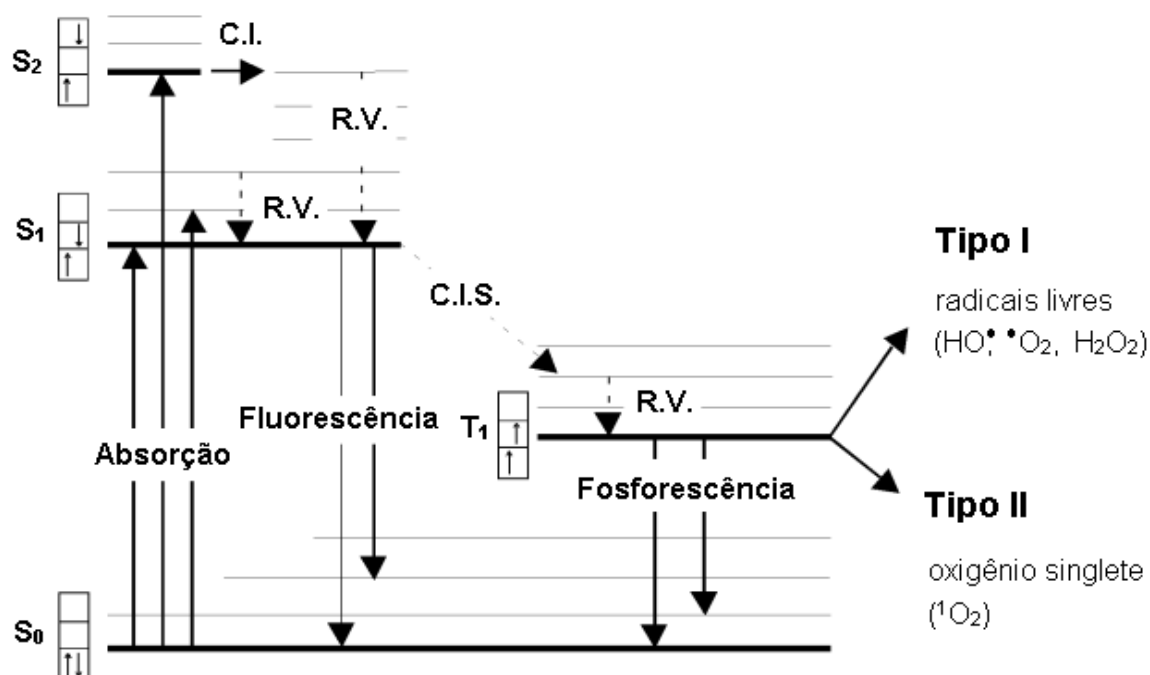


Figura 5. Representação esquemática dos níveis de energia de uma substância (Diagrama de Perrin- Jablonski) e a formação de espécies citotóxicas. Processos representados: Absorção; C.I., Conversão Interna; R.V., Relaxamento vibracional; Fluorescência; C.I.S., Conversão intersistema; Fosforescência. Estados da molécula: S_0 , estado fundamental; S_1 , estado excitado singleto; S_2 , estado excitado singleto superior, T_1 , estado excitado tripleto.

No mecanismo do tipo II, o fotossensibilizador no estado tripleto excitado pode transferir a sua energia para o oxigênio molecular, o que tem a particularidade de ter um estado fundamental tripleto. O fotossensibilizador, em seguida, retorna ao seu estado fundamental S_0 , já o oxigênio passa para em um estado singleto, $^1O_2$, o qual possui um efeito

oxidante muito poderoso e letal para as células ao reagir rapidamente com vários materiais biológicos eletrolíticos como lipídeos insaturados, proteínas e ácidos nucleicos (Robertson, Evans, Abrahamse, 2009).

As reações fotofísicas e fotoquímicas por si só, podem ser caracterizadas, em nível molecular, como sistemas homogêneos, nos quais parâmetros como concentração e difusão dos reagentes e produtos podem ser controlados. Na fotobiologia, os sistemas biológicos são complexos uma vez que possuem um grande rol de substratos possibilitando a ocorrência de uma vasta gama de reações em competitividade ou não, o que torna difícil a compreensão dos processos fotoquímicos em nível molecular (Halliwell, 1989). Ainda assim, é de fundamental importância a caracterização destes processos nos sistemas biológicos uma vez que eles não só contribuem para a compreensão de certas patologias como também auxiliam no aprimoramento de procedimentos terapêuticos (Dougherty, 1998).

Assim, no mecanismo do tipo I, por redução monovalente, frequentemente ocorre uma produção inicial de ânion superóxido (O_2^-) por transferência de elétron do PS no estado tripleto para o oxigênio molecular. Este ânion não é exatamente reativo em sistemas biológicos e não causa por si só muito dano oxidativo. Contudo, por meio de diversos tipos de reação é responsável pela formação direta ou indireta de vários outros radicais com altíssimo poder de oxidação. Uma delas é a reação denominada dismutação, na qual ele pode reagir consigo mesmo produzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2). O H_2O_2 consegue atravessar livremente a membrana da célula, a qual não consegue eliminá-lo por transporte reverso, mas somente por catálise por meio da ação da enzima peróxido dismutase. Em concentrações controladas, o O_2^- é necessário para o funcionamento de algumas outras enzimas. No entanto, em excesso reage com componentes intracelulares e gera dano oxidativo (Bilski *et al.*, 1993; Ma *et al.*, 2001, Castano, Demidova, Hamblin, 2004).

O O_2^- participa também da produção do radical hidroxila ($HO\bullet$) por meio de uma reação denominada Reação de Fenton. Neste processo ele doa um elétron para reduzir íons metálicos (como íon férrico, Fe^{+2} ou íon ferroso, Fe^{+3}) que atuam como catalisadores para converter H_2O_2 em $HO\bullet$ e íon hidroxila ($-HO$). O $HO\bullet$ também atravessa a membrana celular e não pode ser eliminado. Altamente reativo, ele pode se ligar a um substrato orgânico e oxidá-lo. O substrato oxidado passa a atuar como um radical e reage com outras moléculas iniciando uma reação de oxidação em cadeia. Por exemplo, ele pode reagir com o oxigênio molecular produzindo o radical peroxil ($ROO\bullet$) que por sua vez também é bastante reativo e oxida outro substrato dando continuidade à reação em cadeia e agravando o dano oxidativo celular total. Este tipo de reação em cadeia é muito comum no dano oxidativo de ácidos graxos e outros lipídeos e por isso afeta integridade da membrana plasmática e homeostase celular (Castano, Demidova, Hamblin, 2004). Ainda, O_2^- pode reagir com o radical hidroxil para formar oxigênio singlete ($^1O_2$), ou reagir com óxido nitroso (NO^-) para produzir peroxinitrato ($OONO^-$), outra molécula altamente oxidativa (Castano, Demidova, Hamblin, 2004; Robertson, Evans, Abrahamse, 2009).

No mecanismo do tipo II, o oxigênio fundamental tripleto apresenta dois elétrons desemparelhados, cada um localizado num orbital π^* anti- ligante distinto (bi radical). Assim, se o oxigênio tenta oxidar uma molécula por meio do sequestro de um par de elétrons, ambos os elétrons devem ser de *spin* antiparalelos para se ajustarem aos espaços vazios nos orbitais π^* . Um par de elétrons num orbital molecular não obedeceria este critério uma vez que eles possuem *spins* opostos. Isso impõe uma restrição de transferência de elétrons a qual tende a fazer com que o oxigênio aceite um elétron de cada vez. Essa restrição de *spin* é a razão pela qual o oxigênio molecular reage lentamente com muitas moléculas não radicalares. Os

radicais livres, por sua vez, possuem elétrons desemparelhados e assim são mais acessíveis ao oxigênio molecular (Halliwell, 2000).

A transferência de energia do PS em estado tripleto excitado culmina na excitação eletrônica do oxigênio tripleto fundamental, com formação de seus estados singletos $1\Delta_g$ e $1\Sigma_g^+$. Esta segunda espécie possui tempo de vida muito curto e decai para formar a primeira espécie, $1\Delta_g$. A espécie $1\Delta_g$ não possui elétrons desemparelhados e a restrição de *spin* é, portanto, removida e assim a eficiência oxidante do oxigênio é fortemente aumentada, podendo reagir livremente com proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (Turro, 1985).

Devido a sua alta reatividade, os principais aminoácidos atacados são a cisteína, metionina, tirosina, histidina e triptofano (Midden & Dahl, 1992; Grune *et al.*, 2001) e esses eventos envolvem reações complexas que resultam na formação de um grande número de produtos finais. A cisteína e a metionina são oxidados à sulfóxidos, a oxidação da histidina resulta na formação de endoperóxidos, o triptofano é convertido à N-formil-quinurenina e a tirosina sofre acoplamento fenólico oxidativo. Todas estas mudanças alteram a conformação e a funcionalidade das proteínas formadas por eles, comprometendo a viabilidade celular (Castano, Demidova, Hablim, 2004).

Os lipídeos insaturados da membrana plasmática (tanto de fosfolipídios como do colesterol) também são alvos de oxidação e após passarem por uma série de reações são convertidos a hidroperóxidos, o que gera uma desestabilidade membranar e aumento de permeabilidade, quando não à sua completa destruição (Girotti, 1985; Bachowski, Korytowski, Girotti, 1994; Epe, 1993; Haupt, S.; Malik, Z.; Ehrenberg., 2014). Já o DNA pode ser oxidado por reação com as bases nucleicas e açúcares que os compõem ou proteínas ligadas a ele. A guanina é a base mais susceptível à ação do oxigênio singlete e quando é

oxidada gera 8-oxo-1,8dihidroguanosina, o que pode comprometer a estrutura e funcionamento do DNA (Buchko *et al.*, 1995; Ravanat & Cadete, 1995; Ronsein, 2006).

Cabe ressaltar que devido à alta reatividade e meia vida muito curta do oxigênio singlete e dos radicais hidroxila, somente moléculas e estruturas que estiverem próximas da área de produção destas ERO's (loais onde ele se acumula na célula) são diretamente afetados pela PDT. A meia vida do oxigênio singlete em sistemas biológicos é inferior a 40 ns e, portanto, o raio de ação desta espécie reativa é da ordem de 20 nm (Moan & Berg, 1991).

1.4.2. Fotossensibilizadores

A maioria das moléculas fotossensíveis apresenta em sua estrutura um anel heterocíclico similar àquele presente na clorofila e hemoglobina (Huang, 2005). O PS ideal deve apresentar baixa toxicidade no escuro e preferencialmente absorver luz em comprimentos de onda na região do vermelho e vermelho distante, região do espectro eletromagnético entre 600 e 800 nm, denominada janela terapêutica. Devido às absorções endógenas e dispersão da luz, a administração de comprimentos de onda longos garante sua melhor penetração nos tecidos. Dependendo do tipo de tecido e fonte luminosa, a iluminação superficial com comprimento de onda nesta região pode atingir a profundidade de 5 a 10 mm (Wainwright, 2009).

Entre outras características desejáveis aos PSs pode-se citar: a estabilidade da molécula por longos períodos de armazenamento e solubilidade em água ou em misturas de solventes não nocivos. O PS não deve se autoagregar em ambiente biológico e após administração deve ser capaz de penetrar nas células alvo e, caso ela seja eucariótica, se acumular em organelas estratégicas como mitocôndria, retículo endoplasmático, lisossomos

ou complexo de Golgi para que, após irradiação, a morte celular desencadeada seja por apoptose (Oleinick, Morris, Belichenko, 2002). As substâncias geradas da sua metabolização não podem ser nocivas e a eliminação pelo paciente deve ser rápida. Um curto intervalo de tempo entre a administração e iluminação é desejável para facilitar o tratamento ambulatorial. Também é desejável a existência de um método que permita o monitoramento da dose do PS, após o tratamento, por meio da determinação de sua fluorescência *in vivo* para acompanhamento da sua extinção no organismo por fotodegradação. Por fim, a obtenção do PS deve ser fácil e barata (Castanho; Demidova; Hamblin, 2004).

Considerando-se os parâmetros acima mencionados, a maioria dos PSs que estão sendo empregados ou investigados para o tratamento de câncer e de doenças infecciosas apresenta núcleos tetrapirrólicos incluindo porfirinas, clorinas, bacterioclorinas, ftalocianinas e naftalocianinas (Perrussi, 2007; Detty, Gibson, Wagner, 2004). Há também um conjunto de derivados químicos obtidos de porfirina e clorinas que ocorrem naturalmente e incluem estruturas como purpurinas, feoforbides, pirofeoforbides e feofitinas, alguns dos quais têm sido estudados como PS para PDT. O núcleo tetrapirrólico frequentemente detém um átomo de metal coordenado e somente quando esse metal é diamagnético, como por exemplo, Zn, Pd, In, Sn e Lu, o núcleo mantém suas características fotossensibilizantes, enquanto que com metais paramagnéticos (Fe, Cu, Gd) esta habilidade é perdida (Allison *et al.*, 2004; Castano, Demidova, Hamblin, 2004).

Há também PSs não derivados de núcleos tetrapirrólicos ou derivados de corantes vitais, tais como, xantenos halogenados (Rose de Bengala), fenotiazídicos (Azul de Toluidina, Azul de Metileno), acrinas, e conjugados de clorina (e6) (Mojzisova *et al.*, 2007a e b, Perrussi, 2007). Outra ampla classe de PSs, completamente sintéticos, de ocorrência não natural são os derivados de sistemas de anéis pirrólicos conjugados e compreendem estruturas

como texafirinas (Detty, Gibson, Wagner, 2004), porfíricos (Szeimies *et al.*, 1996) e safirinas (Kral *et al.*, 2002).

Nos últimos anos observa-se ainda um aumento no número de publicações focando na aplicação de substâncias fotoativas naturais, derivadas de espécies vegetais, tanto na PDT antimicrobiana, como antitumoral. Destaca-se a classe das antocianinas e betalainas, como a gomfrenina, isolada de espécies de *Amaranthaceae* (Zhang *et al.*, 2008; Qin & Clark, 2007); dos antraderivados, como as antraquinonas (Nunez-Montoya *et al.*, 2003, 2005; Comini *et al.*, 2001), curcumina, isolada da planta *Curcuma longa* (Leung *et al.*, 2009; Adhikari *et al.*, 2009; Park & Lee, 2007; Koon *et al.*, 2006) e perilenequinonas, como a hipericina, um pigmento fotoativo natural produzido por plantas do gênero *Hypericum* da família *Hypericaceae* (Kaskakova *et al.*, 2005 e 2008; Stupakova *et al.*, 2009; Huntosova *et al.*, 2010). Outros fotossensibilizadores naturais também foram descritos isolados de micro-organismos, por exemplo, as perilenequinonas Hipocrelina A e B isolada do fungo *Hypocrella bambusae* (Liu *et al.*, 2009; Su *et al.*, 2011).

Vários destes compostos citados acima já receberam aprovação regulamentar para uso médico ou estão em avaliação pré-clínica ou clínica avançada. Como muitos deles são lipofílicos ou completamente insolúveis e a eficiência da PDT está diretamente relacionada à biodisponibilidade e biodistribuição, observa-se atualmente um aumento no número de investigações destinadas a incorporar o fármaco fotossensível em sistemas de liberação, tais como micro e nanoemulsões ou nanopartículas (Simioni *et al.*, 2007; Primo *et al.*, 2008; Dickerson & Bae, 2013; Sadasivam *et al.*, 2013).

Apesar dos avanços nas pesquisas objetivando o desenvolvimento do PS ideal que apresente elevada seletividade para tumores ou outras lesões alvo, bem como com um elevado

nível de fototoxicidade para células e tecidos na área iluminada ainda existem muitos questionamentos a serem elucidados (Huang, 2005).

1.4.3. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

As bactérias replicam-se muito rapidamente e mutações que asseguram a sua sobrevivência na presença de antibióticos tornam-se rapidamente predominantes na população microbiana. Elementos genéticos tais como plasmídeos codificadores de enzimas de resistência e de bombas de efluxo de drogas também podem ser facilmente transferidos entre espécies. Além disso, prescrição inadequada de antibióticos, o seu uso incorreto por pacientes que não completam o seu regime de tratamento e a utilização generalizada de antibióticos em alimentos para animais só agravam o problema, selecionando repetidamente estirpes cada vez mais resistentes a múltiplas drogas (Zand *et al.*, 2013).

Todos estes fatores têm provocado sérios problemas de saúde pública, especialmente nos países em desenvolvimento, onde as infecções microbianas são a causa de morte de cerca de 45% de toda a população (Lerma *et al.*, 2010). A menor eficácia observada para os antimicrobianos atuais em certos micro-organismos prejudica, portanto, o paciente em tratamento, assim como todo o ambiente em que ele está inserido (Martínez, 2009). Frente a este contexto, tem se observado nos últimos anos, um grande esforço na pesquisa médica para encontrar alternativas terapêuticas antibacterianas para as quais não haja possibilidade para o desenvolvimento de resistência.

A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (APDT), também conhecida como Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana (do inglês *Photodynamic Antimicrobial Chemoterapy- PACT*), ou ainda inativação fotodinâmica (do inglês *Photodynamic*

Inactivation- PDI) vem sendo designada como uma nova modalidade promissora no tratamento de doenças infecciosas sejam elas causadas por vírus, bactéria, protozoário, parasita ou fungo. Assim como na PDT antitumoral, na qual busca-se a destruição de células e tecidos alvo, na APDT a associação da luz com o PS tem o objetivo de provocar inativação microbiana (Perussi, 2007; Dai, Huang, Hamblin, 2009). Como o mecanismo de ação é via produção de espécies reativas que matam as células por estresse oxidativo, não existe resistência microbiana natural para este tipo de ação e, portanto cepas resistentes a diferentes classes de agentes antimicrobianos também são sensíveis a este método.

Em 1900, Raab (do grupo de pesquisa de von Tappeiner) observou que a ação biocida do corante acrina sobre o *Paramecium caudatum*, ativado com luz solar era maior em relação ao tratamento não exposto à luz. Já em 1928 (Schultz & Krueger, 1928) a inativação viral (Bacteriófago de *Staphylococcus aureus*) foi reportada pela primeira vez utilizando-se azul de metileno. Ao longo do século XX, mais estudos foram realizados relatando completa inativação microbiana por várias combinações de PS e luz (Hamblin & Hasan, 2004). Contudo, a ação antimicrobiana da PDT passou a ser efetivamente explorada a partir de sua aplicação na odontologia para eliminar as bactérias envolvidas na formação da cárie e doença periodontal (Christodoulides *et al.*, 2009; Polansky *et al.*, 2009; Eduardo *et al.*, 2010; Saini & Poh, 2012).

Em relação às terapias tradicionais contra doenças infecciosas, a APDT tem como vantagens: baixa possibilidade de desenvolvimento de resistência microbiana (Lauro *et al.*, 2002), cepas resistentes à antimicrobianos são susceptíveis à terapia (Wainwright *et al.*, 1998), apresenta menor toxicidade (morte microbiana é rápida e por isso não requer uso contínuo do agente fotoativável por período de tempo prolongado) e efeitos colaterais podem

ser minimizados pelo uso de PSs destinados somente ao patógeno e não às células hospedeiras.

Embora a fotoquímica seja a mesma para a PDT antimicrobiana e antitumoral existem diferenças consideráveis na estrutura dos PSs utilizados e células alvo nos dois métodos (Kiesslich *et al.*, 2013). Vários estudos mostraram que os PSs que tem a capacidade de matar micro-organismos são os derivados de xantenos halogenados (Schafer *et al.*, 2000), fenotiazídicos (Usacheva, Teichert, Biel, 2001) e conjugados de clorina (Dai, Huang, Hamblin., 2009), sendo os principais alvos para a inativação fotodinâmica antimicrobiana a membrana externa e o DNA (Demidova & Hamblin, 2004).

Cabe ressaltar que os corantes fenotiazídicos como a Azul de Metileno e Azul de orto-Toluidina podem formar complexos metacromáticos com lipopolissacarídeos e isto otimiza seu efeito fotossensibilizante (Usacheva *et al.*, 2006). O efeito biocida de ambos corantes, utilizando diferentes fontes de radiação já foi avaliado contra diversas cepas bacterianas tais como *Staphylococcus aureus* (Wilson & Praten, 1994), *Streptococcus sanguis* (Soukos *et al.*, 1996), *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Hemophilus influenzae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Usacheva, Teichert, Biel, 2001). Nestes estudos buscou-se determinar a efetividade de cada corante contra cada cepa em diferentes condições de cultivo (Wilson & Praten, 1994) variando-se a concentração do PS, tempo de incubação, fluência e intensidade de luz (Usacheva, Teichert, Biel, 2001). Cepas de *Candida* ssp também já foram avaliadas para estes corantes e efeitos de inibição do crescimento foram observados (Teichert *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2006).

Na PDT para infecções localizadas, o PS deve ser aplicado na área infectada, assim como a luz (se administrado sistemicamente pode ficar espalhado por todo o organismo deixando-o completamente suscetível à iluminação) (Dai, Huang, Hamblin, 2009). A

aplicação pode-se tópica com géis, pomadas ou aerosóis, instilação ou injeção intersticial. Assim, em teoria, a eficácia do tratamento dependerá da seletividade do PS pelo agente infeccioso (e não pela célula do hospedeiro) e da manutenção de suas propriedades fotossensibilizantes uma vez dentro dele (Kiesslich *et al.*, 2013)

Neste contexto há vários estudos que focaram na avaliação do efeito da PDT em bactérias relacionadas a infecções cutâneas e de boca. No caso de infecções cutâneas e de mucosas, resultados promissores foram verificados contra bactérias Gram positivas como *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* e *Corynebacterium minutissimum* (Zeina *et al.*, 2001) e Gram negativas como *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Proteus mirabilis* (Hamblin *et al.*, 2002; Garcez *et al.*, 2007). Outros estudos, na área dermatológica verificaram o efeito fototóxico de alguns PSs na eliminação da bactéria causadora da acne, *Propionibacterium acnes* (Hongcharu, *et al.*, 2000; Itoh *et al.*, 2001) e contra infecções causadas por leveduras do gênero *Candida ssp.* (Souzas *et al.*, 2006).

Já na área da odontologia verificou-se que os biofilmes naturais que formam a placa oral podem ser tratados por PDT utilizando-se ftalocianina catiônica nos casos em que outros métodos terapêuticos não foram eficazes ou foram inviáveis (Wood *et al.*, 1999; Konopka & Goslinski, 2009). No caso da doença periodontal, vários estudos mostraram a efetividade da PDT para eliminar a principal bactéria relacionada à etiologia da doença, a *Porphyromonas gingivalis* (Kömerik *et al.*, 2003). Outros estudos buscaram eliminar a candidíase mucocutânea orofaríngea (*Candida albicans*) em pacientes imunodeprimidos e observaram-se resultados promissores (Donnelly *et al.*, 2007; Mima *et al.*, 2010).

1.4.4. Terapia Fotodinâmica Antitumoral

Estudos na década de 60 de Lipson (Lipson & Baldes, 1960; Lipson *et al.*, 1964), nos quais observou-se acúmulo preferencial de corantes em tumores implantados em ratos e tratamento de câncer de mama com derivados de hematoporfirina e irradiação seletiva do tumor, marcaram o início da aplicação da PDT no tratamento clínico do câncer (Prates, 2005). Desde então as descobertas avançaram e esta técnica foi aprovada para tratamento de alguns tipos de câncer nos Estados Unidos e posteriormente em vários outros países (Mang *et al.*, 2010).

Contudo, atualmente os tratamentos mais empregados para neoplasias ainda consistem na quimioterapia, radioterapia, cirurgia e transplante de medula óssea, quando não da combinação entre eles. No entanto, todas estas metodologias apresentam inúmeros efeitos colaterais e muitas vezes não são completamente efetivas frente à alta reincidência de alguns tipos de câncer (Sharman, Allen, van Lier, 1999). É dentro deste cenário que a PDT se estabelece como alternativa terapêutica como menos invasividade e efeitos colaterais além de possibilitar repetibilidade. Além disso, sua utilização como uma terapia contra o câncer é particularmente atrativa devido a sua seletividade e especificidade fundamentais: o fotossensibilizador pode se acumular somente nas células ou tecido doente e a luz pode ser focada somente no local da lesão (Castano, Demidova, Hamblin, 2004).

Em relação à seletividade, os PSs comumente utilizados na PDT antitumoral são aqueles baseados em núcleos tetrapirrólicos. Estas moléculas têm sido escolhidas devido a sua baixa toxicidade na ausência de luz para células de mamíferos e por suas propriedades de localização dos tumores (acumulam-se especificamente em células tumorais). Uma vez concentrados no tumor, a fototoxicidade fica limitada ao tecido alvo e não compromete o

equilíbrio metabólico do organismo como um todo. Quanto à especificidade, efeitos indesejados podem ser minimizados através de um fornecimento de luz espacialmente confinada e concentrada no tecido alvo, para geração localizada das espécies citotóxicas que irão destruí-lo. A luz é dispersada ou absorvida quando entra nos tecidos, sendo que a extensão de ambos os processos dependerá do tipo de tecido e do comprimento de onda. A maioria dos órgãos é capaz de absorver a luz exceto aqueles altamente pigmentados, como fígado, baço, rins e medula óssea, nos quais a penetração da luz é baixa e o efeito da PDT tem se mostrado não satisfatório (Allison & Moghissi, 2013).

No entanto, cabe lembrar que a PDT pode ter efeitos colaterais, incluindo fotossensibilidade duradoura da pele, distúrbios sistêmicos e metabólicos ocasionais, e destruição excessiva do tecido no local tratado. Espera-se que os avanços na compreensão da mecanística desta terapia melhore a relação risco-benefício e possibilite a expansão da sua aplicação para os mais variados tipos de câncer (Kiesslich *et al.*, 2013).

Atualmente os estudos focam em desvendar os processos envolvidos na incorporação celular dos PSs pelas células do tecido tumoral e a influência disso no local de acúmulo intracelular, que tem se mostrado um dos principais fatores na efetividade da PDT (discutido no Capítulo 2). Além disso, os estudos avançam na detecção do estresse celular gerado, enzimas e fatores de transcrição ativados e, conseqüentemente, no tipo de morte celular desencadeada, além das suas repercussões na estimulação do sistema imune no reconhecimento e destruição de tumores. A partir destes estudos espera-se a otimização da PDT como um tratamento contra diversos tipos de tumores e a possibilidade de associação desta terapia com outras mais difundidas.

2. Objetivos

Tendo em vista a busca de moléculas e fitoderivados com propriedades biológicas fotoinduzidas para aplicação em PDT antimicrobiana e PDT antitumoral, o objetivo geral deste trabalho foi realizar o estudo químico e a avaliação da atividade biológica dos extratos brutos, frações e substâncias isoladas obtidos das plantas *G. blepharophylla* e *I. truxillensis* visando à bioprospecção de fotossensibilizadores naturais para aplicação em PDT.

Objetivos específicos:

- Realizar estudo fitoquímico de *G. blepharophylla* e *I. truxillensis*, focando no isolamento de substâncias com propriedades fotossensibilizantes para aplicação em PDT;
- Proceder estudo fotofísico (análises de absorção UV-Visível e emissão de fluorescência) e fotoquímico (ensaio 1,3-DPBF e ensaios para avaliação de predominância do mecanismo fotoquímico do tipo 1 ou 2) para os extratos brutos, frações e substâncias isoladas;
- Avaliar atividade antimicrobiana *in vitro* (frente a bactérias e leveduras) e atividade antiproliferativa (linhagens tumorais e não tumorais) dos extratos brutos, frações e das substâncias isoladas e determinar suas concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentração para inibição total do crescimento das linhagens celulares (TGI);
- Padronizar protocolo experimental *in vitro* de PDT antimicrobiana e PDT antiproliferativo para avaliar o efeito do extrato, frações e substâncias isoladas como fotossensibilizadores naturais.

3. Material e Métodos

3.1. Estudo fitoquímico

3.1.1. Coleta, classificação e obtenção do Material Vegetal

Cascas de *Guatteria blepharophylla* (Mart.) R.E. Fries foram coletadas no Campus Universitário da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Amazonas, Brasil, sendo identificadas pelo Professor Dr. Antônio Carlos Webber (Depto. de Biologia- Instituto de Ciências Biológicas- UFAM), especialista em Annonaceae. Uma exsicata foi depositada no herbário da própria UFAM sob o número de registro 7340.

As partes aéreas de *Indigofera truxillensis* (Kunth), foram coletadas na beira da Av. Guilherme de Campos, próximo ao Shopping Dom Pedro, Campinas, São Paulo, Brasil, sendo identificadas pelo Professor Jorge Yoshio Tamashiro (Depto. de Biologia Vegetal- IB- UNICAMP). Uma exsicata foi depositada no Herbário do Instituto de Biologia- UNICAMP sob o número de registro de UEC 150055.

3.1.2. Produtos, reagentes e solventes

Todos os solventes utilizados (qualidade espectroscópica), hexano, (C₆H₁₄); metanol (CH₄O); etanol (C₂H₆O); diclorometano (CH₂Cl₂); clorofórmio (CHCl₃); acetato de etila (C₄H₈O₂) e dimetilsulfóxido (DMSO), a solução de hidróxido de amônia (NH₄OH), solução

de bicarbonato de sódio (NaHCO_3), ácido clorídrico (HCl), ácido acético ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$), propilenoglicol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2$), o reagente de Dragendorff e o azul de metileno foram obtidos da Merck (Darmstadt, Germany) e armazenados à temperatura ambiente (25°C).

Sílica gel (alto grau de pureza, $60\text{\AA}$, malha 70-230, 0,063-0,200 mm) para cromatografia em coluna (CC) foi obtida da Fluka® Analytical (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Sílica gel (poro $60\text{\AA}$, com indicador de fluorescência para 254 nm, PF_{254}) para preparo das placas para cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foi adquirida junto a Merck (Darmstadt, Germany). As placas para cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), feitas de sílica gel ($60\text{\AA}$), com indicador de fluorescência para 254 nm, foram obtidas da Macherey-Nagel (Düren, Germany). Sephadex LH-20, para cromatografia em coluna, foi obtida da GE Healthcare Life Science (Fairfield, CT, USA). Os filtros ($22\text{ }\mu\text{m}$) foram obtidos junto à EDM Millipore Chemicals (Billerica, MA, USA). Os cartuchos para eliminação de sal das amostras (Strata C18-E, $55\text{ }\mu\text{m}$, $70\text{\AA}$) foram adquiridos da Phenomenex (Torrance, CA, USA).

3.1.3. Preparo dos extratos brutos

O material coletado de cada uma das espécies estudadas foi submetido à secagem em estufa de ar circulante à temperatura de 40°C (de quatro a sete dias) e em seguida pulverizado em moinho de faca. O pó obtido foi submetido ao processo de maceração com solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade (hexano para baixa polaridade e metanol, para alta polaridade), na proporção 1:20 (m/v). Das espécies *I. truxillensis* e *G. blepharophylla* utilizou-se respectivamente 350 g e 200 g de pó. Das soluções obtidas foram removidos os

solventes em rota evaporador rotatório sob pressão reduzida, obtendo-se assim diferentes extratos brutos (Figura 6).

Cabe ressaltar que para *G. blepharophylla* a extração com cada solvente foi repetida 10 vezes, enquanto que para *I. truxillensis*, apenas 5 vezes (ou seja, até que o líquido extrator ficasse incolor). Após completa secagem e cálculo dos rendimentos obtidos, os extratos foram armazenados em alíquotas (aproximadamente 50 mg) para posteriores análises espectroscópicas e biológicas.

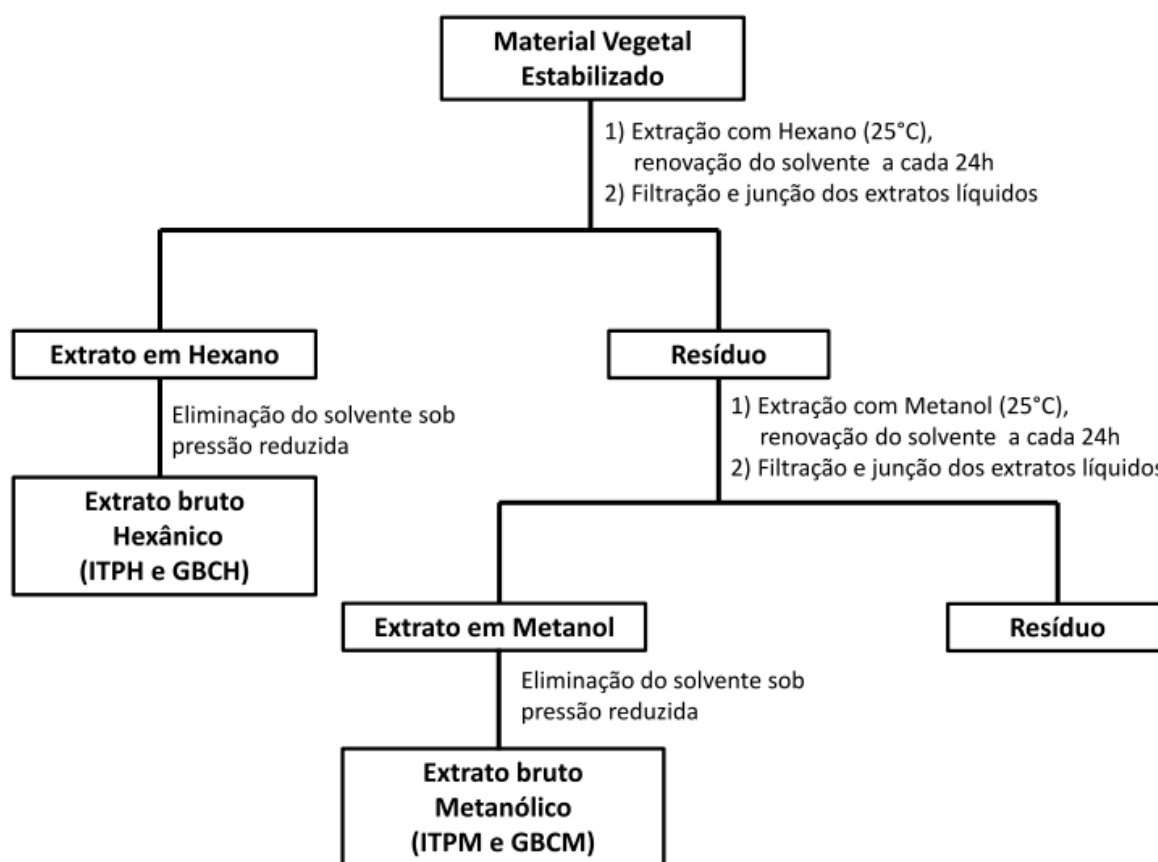


Figura 6. Esquema de preparação dos extratos brutos extraídos em solventes orgânicos das duas espécies estudadas. GBCH e GBCM, extratos hexânico e metanólico de *G. blepharophylla*, respectivamente; ITPH e ITPM, extrato hexânico e metanólico de *I. truxillensis*, respectivamente.

3.1.4. Fracionamento dos extratos brutos ativos e isolamento e purificação dos constituintes químicos

Em função dos resultados positivos e promissores obtidos nos ensaios microbiológicos (antibacteriano e antifúngico com aplicação da radiação *laser*, item 3.3.2.2.), bem como dos resultados sugestivos de produção de oxigênio singlete (1,3-DPBF, item 3.2.3.), os extratos metanólicos de ambas as espécies foram escolhidos para realização do fracionamento biomonitorado.

3.1.4.1. Extrato metanólico de *Guatteria blepharophylla* (GBCM).

O extrato metanólico da casca de *G. blepharophylla* (GBCM) foi submetido à extração ácido-base de acordo com Costa *et al.* (2006) (Figura 7). Para tanto, o extrato (25 g) foi solubilizado em 100 mL de CHCl_3 , e extraído 3 vezes (30 mL) com solução de HCl 3% v/v, obtendo-se duas frações, a fração aquosa ácida e a fração clorofórmica neutra. A fração aquosa ácida foi basificada com NH_4OH (P.A.) até pH 12 e extraída com CHCl_3 sucessivamente, resultando em duas novas frações: a fração clorofórmica alcaloídica e a fração aquosa básica. A fração aquosa básica (GBFAB) foi congelada e seca em liofilizador enquanto que as frações alcaloídica (GBFA) e neutra (GBFN) foram secas (eliminação do solvente) em rota evaporador. Estas duas últimas frações foram submetidas a testes de atividade biológica na presença e ausência da irradiação *laser*.

Para isolamento dos alcaloides, uma parte da fração alcaloídica (1,0 g), foi submetida ao fracionamento através de uma CC (altura x ϕ = 42,0 x 3,5 cm) de sílica gel (0,063-0,200 mm, 20,0 g) tratada com solução de NaHCO_3 10%. Este tratamento consistiu em adicionar a

sílica (90g) em uma solução aquosa de NaHCO_3 (10g/L), deixar sobre agitação contínua por 48 h à temperatura ambiente, em seguida secar em estufa a 200°C para eliminação completa na água.

Após aplicação da amostra na coluna ela foi efluída com $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$, CH_2Cl_2 , $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ e CH_4O em misturas de polaridades crescentes, obtendo-se 157 frações de 20 mL cada. As frações obtidas foram analisadas por CCDA (reveladas em luz ultravioleta a 254 e 366 nm) e as que apresentaram os mesmos índices de retenção (R_f s) foram reunidas (Tabela 1). Em seguida as frações resultantes desta união (em particular as frações 4, 5, 8 e 10) foram submetidas à técnica de CCDP ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_4\text{O}$, 95:05, 5x) o que resultou no isolamento de 5 substâncias, GB1, GB2, GB3, GB4 e GB5.

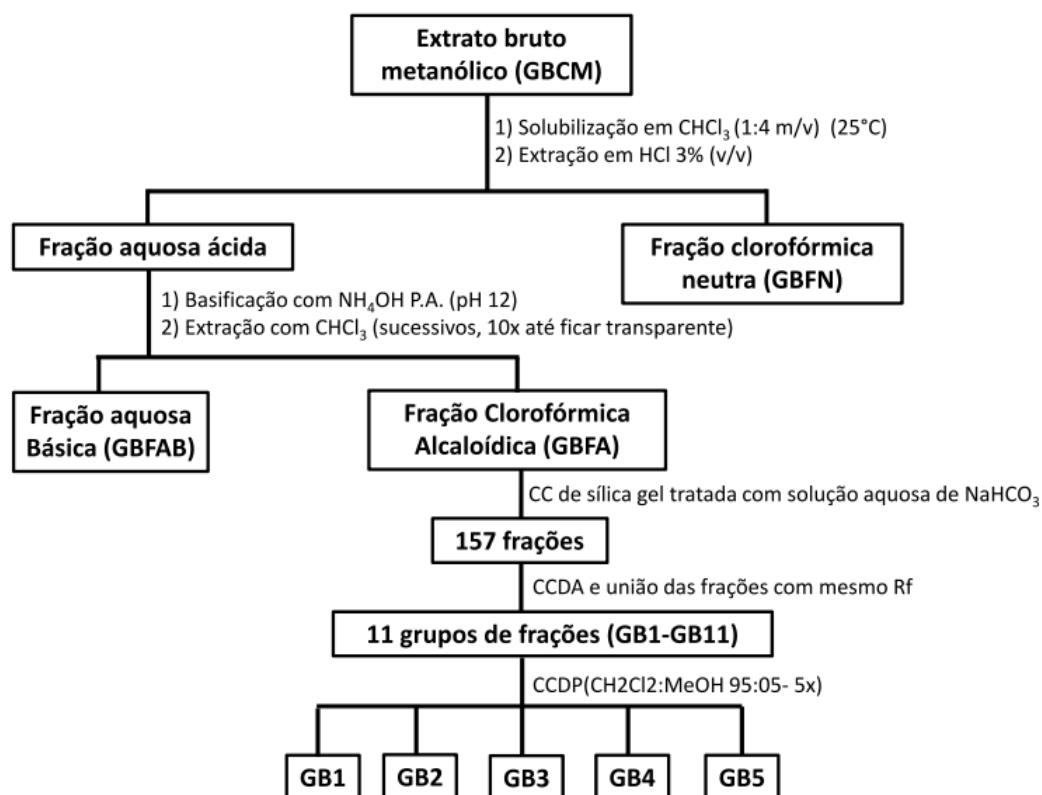


Figura 7. Fluxograma do fracionamento do extrato metanólico das cascas de *Guatteria blepharophylla*.

Tabela 1. Grupos de frações e substâncias isoladas a partir da fração alcaloídica (GBFA) de *Guatteria blepharophylla*.

Grupo de frações (G)	Fração	Substâncias isoladas
1	1-10	
2	11-24	
3	25-29	
4	30-48	GB3 e GB5
5	49-59	GB2
6	60-108	
7	109-110	
8	111-127	GB1
9	128-147	
10	148-154	GB4
11	155-158	

3.1.4.2. Extrato metanólico de *Indigofera truxillensis* (ITPM)

O extrato metanólico das partes aéreas de *I. truxillensis* (ITPM) foi submetido à mesma extração ácido-base como descrito para GBCM (*G. blepharophylla*) no item 3.1.4.1., também visando ao isolamento de compostos alcaloídicos (Figura 8). A fração aquosa básica (ITFAB) foi congelada e seca em liofilizador enquanto que as frações alcaloídica (ITFA) e clorofórmica neutra (ITFN) foram secas (eliminação do solvente) em rota evaporador. Estas duas últimas frações foram submetidas a testes de atividade biológica na presença e ausência da irradiação *laser*.

Para isolamento dos alcaloides, uma parte da fração alcaloídica (1,0 g) foi submetida ao fracionamento através de uma coluna de Sephadex LH-20, eluída em metanol, obtendo-se 76 frações de 15 mL cada. As frações obtidas foram analisadas em CCDA (reveladas em luz ultravioleta a 254 e 366 nm) e aquelas que apresentaram os mesmos Rfs foram reunidas (Tabela 2). A análise dos grupos de amostras por espectrometria de massas direcionou o fracionamento posterior que resultou no isolamento de IT1.

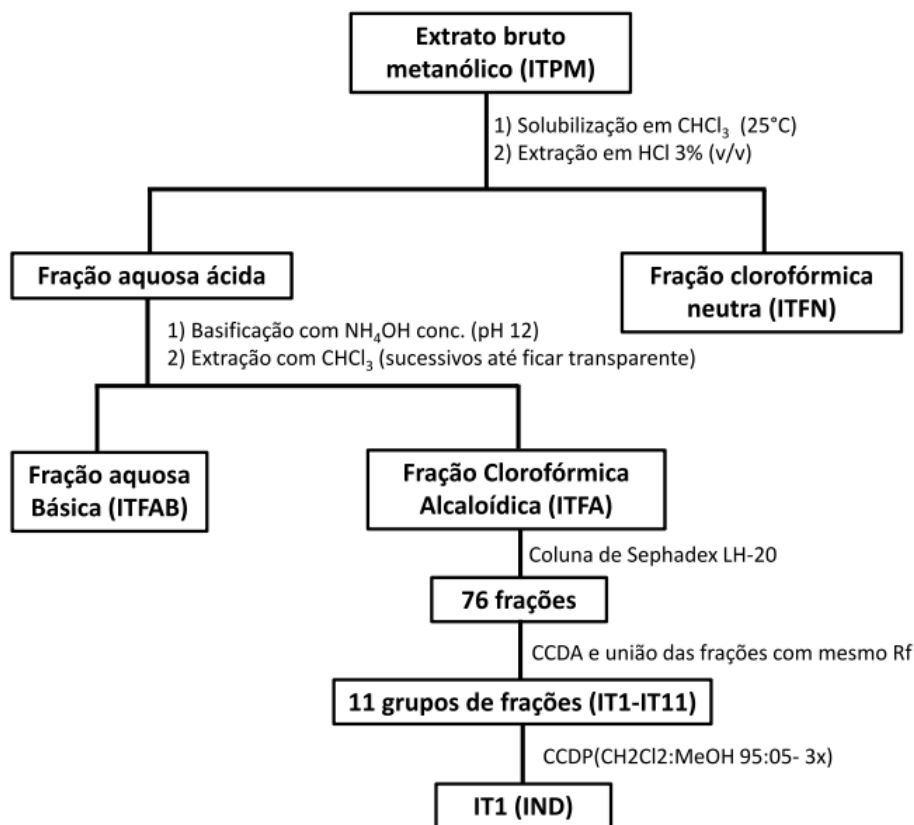


Figura 8. Fluxograma do fracionamento do extrato metanólico das partes aéreas de *Indigofera truxillensis*.

Tabela 2. Grupos de frações e substâncias isoladas a partir da fração alcaloídica de *I. truxillensis*.

Grupo de frações (I)	Fração	Substâncias isoladas
1	1-17	
2	18-33	
3	35-35	IT1
4	36	
5	37-43	
6	44	
7	45-47	
8	48-69	
9	70-72	
10	73-76	

3.1.5. Identificação dos constituintes químicos

A identificação dos constituintes químicos foi realizada pela análise de seus dados espectrais obtidos pelas técnicas de espectrometria de massas (EM) e de ressonância magnética nuclear (RMN ^1H , RMN ^{13}C , gHMQC e gHMBC) e por comparação com informações da literatura.

Para as análises por EM, as amostras (0,1 mg/mL) foram diluídas em metanol, filtradas em um filtro de seringa (0,22 μm). Três μL da solução resultante foram injetados em cromatógrafo de alto desempenho acoplado a um espectrômetro de massas (Ultra-high Performance Chromatography – Mass Spectrometry, UPLC–MS/MS system, Waters, Milford, MA, USA) utilizando-se uma coluna UPLC BEH (tamanho de partícula= 2,1 x 50 mm, 1,7 μm) à 30°C, com eluição isocrática em metanol ao longo de 5 min. Os espectros de massa nos modos positivos e negativos foram obtidos com um espectrômetro de massas Acquity TQD (MicromassWaters, Milford, MA, USA) nas seguintes condições: capilar 3,5 kV, cone: 30 V, temperatura de origem a 150° C e temperatura de dessolvatação a 350° C. Para aquelas amostras que apresentavam pureza elevada, o íon com m/z de interesse foi selecionado e obteve-se seu espectro de fragmentação (MS/MS), com equipamento nas mesmas condições e energia de colisão a 25 V.

As medidas de massa dos compostos intactos (EM de alta resolução) foram feitas por ESI(+)-MS em um instrumento Waters Synapt HDMS, equipado com fonte de ESI. As amostras foram diluídas a concentração de 3 ppm, utilizando-se uma mistura de $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 1:1 e em seguida coletadas com uma seringa de 250 μL (Hamilton) e injetadas por infusão direta a um fluxo de 15 $\mu\text{L min}^{-1}$ pela bomba de seringa do próprio instrumento. Como demais parâmetros do espectrômetro de massas estão voltagem do capilar 3,0 kV, voltagem

do cone 20 V, temperatura da fonte 100°C, temperatura do gás de dessolvatação 200°C, fluxo do gás do cone 30 L h⁻¹, fluxo do gás de dessolvatação 900 L h⁻¹, energias de colisão das celas Trap e Transfer respectivamente em 6 e 4 eV, detector em 1700 V. Os espectros de MS (fullscan) foram adquiridos a uma taxa de 1 espectro s⁻¹. Previamente às análises, o instrumento foi calibrado com oligômeros de ácido fosfórico (solução de H₃PO₄ 0,05% v/v em H₂O/MeCN 50:50) de m/z 90 a 1960. Argônio a uma pressão de 9,7.10⁻³ mbar foi utilizado como gás de colisão sendo os experimentos de MS/MS realizados com uma rampa de energia de colisão na cela Trap indo de 6 a 35 eV. Para tratamento dos espectros de proteínas, foi utilizado o software disponível no próprio software do instrumento (MassLynx v.4.1.).

Os espectros de ressonância magnética nuclear de Hidrogênio e Carbono, uni e bidimensionais, foram obtidos em equipamento Bruker 250, pertencente à Central Analítica do Instituto de Química da UNICAMP ou em um equipamento Bruker 400, pertencente ao Centro de RMN da UFPR. As substâncias isoladas da espécie *G. blepharophylla* foram solubilizadas em clorofórmio deuterado e o alcaloide isolado de *I. truxillensis* em DMSO deuterado.

3.2. Estudo Fotofísico e Fotoquímico

3.2.1. Reagentes

1,3-dimetilisobenzofurano (1,3-DPBF, massa molar 270,3 g M⁻¹), histidina e ácido ascórbico foram obtidos da Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA) e armazenados a 25° C, no escuro. Manitol e azida sódica foram adquiridos da Fluka-Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA). A solução estoque de 1,3-DPBF (100µM) foi preparada em DMSO alguns

minutos antes da realização dos ensaios. A fim de evitar sua fotodegradação ela foi manipulada no escuro. O manitol, ácido ascórbico, azida sódica e histidina foram solubilizados em água purificada e deionizada.

3.2.2. Estudos espectroscópicos no estado estacionário: espectros de absorção e emissão de fluorescência

Determinou-se o perfil de absorção e de emissão de fluorescência dos extratos, frações e substâncias isoladas (amostras-teste) das duas espécies vegetais em estudo. O solvente utilizado para diluição das amostras foi o DMSO.

Os espectros de absorbância foram realizados em espectrofotômetro UVIKON 923 Double Beam UV/VIS (Biotek Kontron Instruments, Milão, Itália) e tratados no software UVS900 Lite 5.1 (DuSotec).

Os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos em espectrofluorímetro AMINCO®-Bowman Série 2 Luminescence (Bioritech) e tratados no software AB2. A excitação foi fornecida por uma lâmpada de xenônio, havendo dois monocromadores que permitiram selecionar respectivamente os comprimentos de onda de excitação e emissão. A luz emitida pela amostra era coletada a 90° em relação à excitação e transformada em um sinal eletrônico por um fotomultiplicador. A fim de corrigir eventuais flutuações da lâmpada, o sinal do detector foi dividido por um sinal de referência, medido na saída do monocromador de excitação. Em todas as análises, utilizou-se uma cubeta de quartzo com 1 cm de trajeto óptico à temperatura ambiente (25° C). Todas as medidas foram realizadas aproximadamente 1 min após o preparo das amostras. Os gráficos com os dados de absorção e fluorescência

foram plotados utilizando-se o software GrafPad®Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3.2.3. Avaliação da formação de Oxigênio Singleto (Ensaio 1,3-DPBF)

Equipamento *Laser*

Foi utilizado o equipamento *laser* diodo de baixa potência do tipo InGaAlP (meio ativo fosfeto de índio-gálio-alumínio) modelo Photon Lase nod. III (DMC Equipamentos LTDA), que opera com potência de 35mW e comprimento de onda de emissão de 660 nm, localizado na faixa de luz visível, região do vermelho do espectro eletromagnético (Figura 9).



Figura 9. Equipamento *laser* Photon Lase®

Verificação do comprimento de onda e potência do aparelho *laser* utilizado

O comprimento de onda e a potência do aparelho *laser* foram avaliados por um espectrômetro/monocromador modelo Princeton instruments acton SP2300 e medidor de potência modelo Fildmaster. Os dados obtidos a partir dessas análises demonstraram que durante 5 min de radiação a monocromaticidade do *laser* manteve-se constante e não houve

perda de energia. Os dados obtidos a partir dessas análises foram processados no programa Win Spec/32 e o resultado expresso em forma de gráfico (Figura 10).

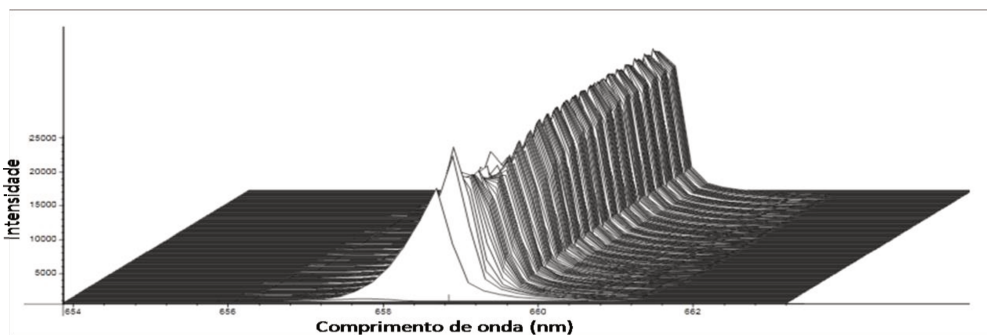


Figura 10. Espectro de absorção da radiação *laser* durante 5 minutos de irradiação, avaliado por um espectrômetro/monocromador modelo Princeton instruments acton SP2300 e medidor de potência modelo fildmaster.

A produção de oxigênio singleto pelas amostras-teste foi determinada utilizando-se o método de fotodecomposição do 1,3-DPBF de acordo com Alves e colaboradores (2009) e Robertson e colaboradores (2009), modificado. O 1,3 DPBF é um conhecido “sequestrador” de oxigênio singleto e através da sua queda da intensidade de sua absorbância, avaliada espectroscopicamente, a eficiência das substâncias em questão em gerar oxigênio singleto pode ser monitorada.

Soluções estoque dos extratos brutos hexânicos e metanólicos 1 mg/mL, frações a 0,6 mg/mL e substâncias puras a 50 μ M, todos em DMSO:H₂O (9:1) e uma solução estoque de DPBF a 100 μ M em DMSO foram preparadas no mesmo dia de realização do ensaio. Para análise, a mistura de reação constituía de 50 μ L da solução estoque de 1,3-DPBF (concentração final no poço de 50 μ M) e 50 μ L do estoque da amostra a ser analisada, colocados no poço 1A de placas com 96 poços. Desta forma os extratos brutos foram avaliados a 0,5 mg/mL, as frações a 0,3 mg/mL e as substâncias puras a 25 μ M.

Para cada amostra duas misturas de reações foram feitas, uma irradiada com *laser* e outra não irradiada e sequer exposta à luz ambiente. A mistura irradiada foi submetida ao *laser* (660 nm, densidade de energia de 28 J/cm² e área irradiada de 0,38 cm²) em intervalos de 1 min e após cada intervalo mediu-se a queda da absorbância do 1,3 DPBF a 410 nm. As respectivas amostras não irradiadas foram submetidas à mesma leitura em intervalos de 1 min.

3.2.4. Avaliação da atividade fotodinâmica pelos mecanismos fotoquímicos do tipo I ou tipo II em modelo biológico *in vitro*

Este ensaio teve como objetivo determinar qual dos mecanismos fotoquímicos, I ou II, predominava na ação antimicrobiana, na presença de irradiação, de cada uma das substâncias analisadas na PDT (GB1 e IT1). Para tanto, realizou-se ensaio com modelo biológico *in vitro* com utilização de supressores de oxigênio singlete ou de radicais livres segundo procedimento experimental realizado por Su e colaboradores (2011), com modificações.

Os supressores de espécies reativas utilizados neste teste foram para o mecanismo do tipo I, o manitol e ácido ascórbico, para o mecanismo do tipo II, azida sódica e histidina e para ambos os mecanismos, o triptofano. Utilizou-se como indicador biológico a bactéria Gram positiva *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228).

O micro-organismo e os supressores foram solubilizados em solução NaCl 0,9%. Já as amostras-teste foram solubilizadas em propilenoglicol: solução NaCl 0,9% (5:95). Assim, em uma placa de microdiluição estéril de 96 poços, em poços individuais foram adicionados 100 µL de solução salina 0,9%, 10 µL da suspensão do micro-organismo (10⁷ UFC/mL segundo a escala de Mac Farland) e 50 µL do supressor, de tal forma que a sua concentração final no poço, após a inclusão da amostra-teste, fosse: 10 mM (manitol, hitidina e triptofano) 30 mM

(ácido ascórbico) e 1 mM (azida sódica) para os supressores. Esperou-se 5 min e em seguida adicionou-se 50 µL da amostra-teste na concentração sub-inibitória (Resultados, item 4.3.1.1). Após mais 5 min para interação amostra-teste/micro-organismo/supressor e então procedeu-se à irradiação dos poços como descrito no item 3.3.2.2.

Outra placa igual à descrita acima foi feita, porém as amostras não foram submetidas à irradiação (controles não irradiados). Preparou-se também os controles do micro-organismo e do diluente (propilenoglicol:solução NaCl 0,9%, 5:95) irradiado e não irradiado e do micro-organismo + supressores, irradiado e não irradiado.

Logo após a irradiação (ou montagem dos controles não irradiados), procedeu-se diluição seriada, de 10^{-3} , para cada um dos tratamentos em solução NaCl (0,9%) e alíquotas de 10 µL foram plaqueadas em duplicatas no meio TSA e incubadas a 37° C por cerca de 24 h. Decorrido o período de incubação, determinou-se o número de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) dos tratamentos e dos controles.

As porcentagens de sobreviventes foram calculadas de acordo com a equação $[(N1/N0) \times 100]$, em que N0 representa o número de UFC/mL de cada amostra não irradiada e N1 representa o número de UFC/mL após a exposição à luz. Nas placas de 96 poços, este experimento foi realizado em duplicata para cada supressor/amostra-teste (dois poços) e cada poço resultou no plaqueamento de duas placas, resultando em um $n = 4$ no intra-ensaio. Foram realizados dois experimentos em dois dias diferentes resultando em um $n_{\text{total por amostra}} = 8$ por supressor/amostra-teste no total dos resultados inter-ensaios. Os resultados foram expressos como médias $\pm$ erro padrão das oito repetições.

Diferenças estatísticas na porcentagem de sobrevivência entre os diferentes tratamentos (substância sozinha ou acrescida de supressores), na mesma condição de irradiação (presente ou ausente), foram determinadas via *one-way* ANOVA seguidas pelo

teste de Tukey. Já as comparações do crescimento do micro-organismo dentro de um mesmo tratamento, irradiado ou não, foram feitas via test t. O nível de significância para ambos os testes estatísticos foi fixado em $p < 0,05$. Para estas análises, assim como para a representação gráfica dos resultados, utilizou-se o programa GraphPad Prism (GraphPad Software, Version 6.00, San Diego, CA).

3.3. Estudos Biológicos

Os ensaios biológicos *in vitro* frente a bactérias e fungos foram realizados no Departamento de Biologia Vegetal, Laboratório de Farmacognosia, Produtos Naturais e Bioensaios do Instituto de Biologia da UNICAMP. Já os ensaios com as culturas de células animais foram realizados na Divisão de Farmacologia e Toxicologia, CPQBA-UNICAMP, em colaboração com os pesquisadores Dra. Ana Lúcia Tasca Góis Ruiz e Dr. João Ernesto de Carvalho.

3.3.1. Reagentes

Os meios de cultura para cultivo para bactérias, Müller-Hilton ágar (MH); Tryptocase Soy Agar (TSA) e Tryptocase Soy Broth (TSB) e para leveduras, Sabouraud Dextrose ágar (ASD) ou Sabouraud Dextrose Broth (SDbroth) foram adquiridos junto a Becton, Dickinson and Company (Sparks, Maryland, USA) e armazenados à temperatura ambiente (25°C).

O trizma base (TB), ácido tricloroacético (TCA), sulforrodamina B (SBR) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). O meio de cultura RPMI 1640 (sem vermelho fenol), soro fetal bovino (SFB) e os antibióticos penicilina e estreptomicina foram

obtidos da Gibco® (Carlsbad, California, USA) e armazenados à -20°C. A Doxorubicina foi adquirida da Oncorio Distribuidora de Medicamentos LTDA (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e armazenada a 4°C.

3.3.2. Atividade antimicrobiana

3.3.2.1. Determinação da atividade antimicrobiana e da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de difusão em ágar pela técnica de poço em camada dupla e pelo método de microdiluição (NCCLS, 1993 e 1998, Espinhel-Ingroff *et al.*, 1995; Okeke *et al.*, 2001, Grove & Randall, 1955) seguido de adequação de metodologia como descrito por Salvador *et al.* (2003 e 2004).

Para realização dos ensaios utilizaram-se 14 cepas de bactérias, entre cepas padrão e cepas de campo (Gram-negativas *Escherichia coli* - ATCC 10538, *Escherichia coli* – ATCC 10799, *Proteus vulgaris* – cepa de campo Pv, *Salmonella typhi* – cepa de campo St e *Pseudomonas aeruginosa* - ATCC 27853; Gram-positivas *Micrococcus luteus* - ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* - ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* - ATCC 14458, *Staphylococcus aureus* cepa de campo 8⁻ penicilinase negativo, *Staphylococcus aureus* cepa de campo 7⁺ penicilinase positivo, *Staphylococcus epidermidis* – ATCC 12228, *S. epidermidis* – cepa de campo 6epi, *Bacillus subtilis* – cepa de campo Bs e *Enterococcus faecalis* – ATCC 10100), cultivadas por 24 horas a 37°C em meio MH e 8 cepas de leveduras (*Candida albicans* – ATCC 1023, *Candida albicans* - ATCC 10231, *Candida tropicalis* ct – cepa de campo, *Candida tropicalis* – ATCC 157, *Candida glabrata* - ATCC 30070, *Candida dubliniensis* -

ATCC 778157, *Candida dubliniensis* ATCC 777 e *Candida parapsilosis* - ATCC 22019), cultivadas por 24 a 37° C em meio ASD.

Para plaquear as bactérias, uma camada base de meio de cultura MH (20 mL) foi adicionada em placas de petri (20 x 150 mm). Após a solidificação, em outros 20 mL de meio, a aproximadamente 40° C, inoculou-se as cepas bacterianas (10^6 UFC/mL), que em seguida foi vertido em cima da camada base obtendo-se, assim, a camada *seed*. Após sua solidificação, confeccionaram-se poços com 5 mm de diâmetro utilizando-se canudos de plástico esterilizados. No caso das leveduras, a camada base foi obtida pela adição de 20 mL de meio ASD e posterior à solidificação foram adicionados 20 mL de ASD, a aproximadamente 40° C, inoculado com cepas padrão para obter-se a camada *seed* e em seguida foram confeccionados poços com 5 mm de diâmetro.

Em cada poço foram aplicados 20 µL das soluções controle (positivo e negativo) e das amostras-teste, soluções estas, preparadas em propilenoglicol: água (5:95, v/v) nas concentrações descritas na Tabela 3. Como controle positivo foram utilizados bacitracina (2 UI/mL), para o ensaio com bactérias e cetoconazol (100 µg/mL) para o ensaio com leveduras. Como controle negativo, foi utilizado o diluente das amostras, propilenoglicol:água (5:95, v/v). Também reservou-se poços nas placas para realização dos controles do inóculo e do meio de cultura.

Tabela 3. Concentrações das amostras utilizadas nos ensaios de atividade antimicrobiana para determinação da CIM (técnica de poço em camada dupla)

Amostra	Concentrações
Extratos brutos	25;12,5; 5 e 1 mg/mL
Frações	12,5; 6,25, 3,13 e 1 mg/mL
Substâncias puras	500; 250; 125; 62,5 e 31,25 µg/mL

As placas-testes foram mantidas à temperatura ambiente, dentro do fluxo laminar por cerca de 2 h após aplicação das amostras teste e depois incubadas a 37° C por cerca de 24/48 h para as bactérias e leveduras, respectivamente.

Decorrido o período de incubação, as zonas de inibição do desenvolvimento microbiano foram mensuradas, em milímetros, em termos de diâmetro (halo) e aro da borda do poço a início do desenvolvimento. Os experimentos foram realizados pelo menos em duplicata, para cada cepa indicadora utilizada.

Para as amostras-teste que se mostraram ativas nas concentrações testadas (presença de aro e halo) procedeu-se à determinação da concentração Inibitória Mínima (CIM), realizadas pelo método de microdiluição em placa com 96 poços, de acordo com metodologia preconizada pela ANVISA (2008). Foi considerada como CIM a menor concentração na qual observou-se a presença de inibição do desenvolvimento microbiano (Okeke *et al.*, 2001; Salvador *et al.*, 2002).

Em uma placa de microdiluição estéril com 96 poços, em poços individuais, foram aliquotados 50 µL dos caldos TSB, para bactérias, e SDbroth, para fungos, 50 µL da amostra-teste em diferentes concentrações (extratos 25-0,25 mg/mL e substâncias puras de 0,250-0,0078 mg/mL), e 5 µL da suspensão de micro-organismos com turvação equivalente a 1.10⁸ufc/mL da escala de Mac Farland. Os controles positivos, negativos, do inóculo e do meio de cultura foram os mesmos com descritos anteriormente.

Ao término do período de incubação, a 37° C por cerca de 24/48 h, procedeu-se à leitura visual da turvação nos poços e quando da presença de inibição total, o material foi inoculado (estrias) em placas contendo meio TSA, para bactérias, e meio ASD, para fungos, e incubadas a 37°C por cerca de 24/48 h para verificar se o efeito era biocida ou não, ou seja verificou-se se houve ou não crescimento do micro-organismo. Determinou-se como CIM a

menor concentração (mg/mL) onde se observou a presença de inibição do desenvolvimento microbiano (Salvador et al., 2002; Okeke et al., 2001). Os experimentos foram realizados pelo menos em duplicata para cada cepa indicadora utilizada.

3.3.2.2. Avaliação da atividade antimicrobiana na presença de irradiação

Cepas bacterianas:

Para este ensaio foram escolhidas algumas das cepas de bactéria avaliadas no item 3.3.2.1. Foram utilizadas bactérias Gram- positivas e Gram- negativas, cepas padrão, cultivadas por 24 h a 37°C em meio MH.

Staphylococcus aureus – ATCC 14458
Staphylococcus epidermidis – ATCC 12228
Escherichia coli – ATCC 10799
Proteus vulgaris – Pv

Cepas fúngicas:

Foram empregados fungos leveduriformes, cepas padrão, cultivados por 48 h a 37°C em meio ASD.

Candida albicans – ATCC 1023
Candida albicans– ATCC 10231
Candida dubliniensis– ATCC 778157
Candida dubliniensis– ATCC 777

Como controle positivo da PDT utilizou-se o corante azul de metileno, um composto fenotiazínico cujo tamanho e forma permitem que ele se intercale no ácido nucleico. Quando ativado pela luz, ele age seletivamente sobre os resíduos de guanossina conduzindo à formação de 8-hidroxiguanossina (Schneider *et al.*, 1990) que leva à desestabilização da molécula de

DNA, comprometendo a suas funções e conseqüentemente a viabilidade celular (Munin, 2007; Giroldo, 2008).

Procedeu-se à análise seguindo procedimento experimental de Gaspareto *et al.* (2010), Gasparetto, (2008), Lapinski, (2008) e Souza *et al.*, (2006), com modificações. Em uma placa de microdiluição estéril com 96 poços, em poços individuais foram adicionados 50 µL do meio de cultura (TSB para bactérias e SDbroth para os fungos), 50 µL da amostra-teste (metade da CIM) e 5 µL da suspensão de micro-organismos (10^7 UFC/mL, segundo a escala de Mac Farland, tendo sido realizada a contagem do inóculo para cada cepa estudada). A concentração utilizada do azul de metileno foi 0,1 mg/mL, solubilizado no mesmo diluente das amostras teste, propilenoglicol/água 5:95 (v/v), que também foi testado como controle negativo, assim como os controles do inóculo e os controles dos meios de cultura (TSB ou SDbroth).

Este experimento foi realizado em duplicata para cada amostra-teste (irradiação e plaqueamento resultando em um $n = 4$), sendo realizados dois experimentos em dois dias diferentes ($n_{\text{total por amostra}} = 8$). Em cada ensaio uma das placas foi submetida à radiação e outra não (placa controle a qual não ficou exposta sequer a luz ambiente). O período de incubação de cada amostra-teste em contato com os micro-organismos, previamente à aplicação do laser foi de 5 min.

Feito isto, procedeu-se a irradiação das placas do grupo irradiado com o *laser* diodo InGaAlP. Como cada poço da placa com 96 poços possui área igual a $0,38 \text{ cm}^2$ e foi irradiado por 5 min o que totalizou uma densidade de energia igual a 28 J/cm^2 . Finalizada a irradiação, as placas foram incubadas a 37°C por cerca de 24h. Ao término do período de incubação, procedeu-se a diluição seriada, em tubos de centrifuga de 15 mL até 10^{-3} , para cada um dos tratamentos em solução NaCl (0,9%) e alíquotas de 10 µL foram plaqueadas em duplicatas

mL no meio TSA (bactérias) ou ASD (fungos) e incubadas a 37° C por cerca de 24/48 h. Decorrido o período de incubação, determinou-se o número de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) de cada tratamento e controles.

Os dados foram analisados determinando-se o percentual de redução do crescimento microbiano de cada amostra-teste irradiada em relação à condição não irradiada. Os resultados foram expressos com média de oito repetições ($\pm$ erro padrão). Diferenças estatísticas entre amostra-teste dentro da mesma condição de irradiação (presente ou ausente) foram determinadas via *one-way* ANOVA seguidos pelo teste de Tukey. As comparações do crescimento do micro-organismo com a mesma amostra-teste, irradiada ou não, foram feitas via test t. O nível de significância para ambos os testes estatísticos foi fixado em $p < 0,05$. Para estas análises assim como para a representação gráfica dos resultados, utilizou-se o programa GraphPad Prism (GraphPad Software, Version 6.00, San Diego, CA).

3.3.2.3. Avaliação da atividade antimicrobiana na presença de irradiação: variação da densidade de energia

Neste ensaio procurou-se avaliar se o aumento na densidade de energia de irradiação aumentava a suscetibilidade microbiana ao tratamento com amostra-teste e radiação *laser*. Para tanto, escolheu-se duas cepas microbianas como indicadoras biológicas, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Candida albicans* ATCC 1023 e realizaram-se ensaios (preparo, execução e análise) como descrito no item acima, variando-se somente os tempos de irradiação para desta forma, aumentar a densidade de energia final recebida pelos tratamentos (triplicatas para cada amostra teste em cada densidade de energia utilizada). As densidades de energia aplicadas foram 28, 56, 84 e 112 J/cm². Decidiu-se não usar dosimetrias maiores que

112 J/cm², uma vez que, para fonte luminosa aqui utilizada alguns autores afirmam que dosimetrias mais altas que 130 J/cm² são recomendadas somente para áreas de inflamação crônica (Almeida-Lopes, Massini, 2002).

As amostras-teste avaliadas em concentração subinibitória foram os extratos brutos de *G. blepharophylla*, GBCH e GBCM, fração alcaloídica (GBFA) e alcaloide isomoschatolina (GB1). Para *I. truxillensis*, avaliou-se as amostras ITPH, ITPM, ITFA e alcaloide índigo (IT1).

Para cada amostra teste e condição de irradiação, o experimento foi realizado em duplicata, resultando em um n= 4 após o plaqueamento, sendo realizados dois experimentos em dois dias diferentes (n_{total por amostra}=8). Os resultados foram expressos como as médias ± erro padrão de oito repetições. O plaqueamento e análise dos resultados foram feito com descrito anteriormente.

3.3.2.4. Avaliação da atividade antimicrobiana na presença de irradiação: dose dupla da amostra-teste e de irradiação na mesma densidade de energia (28 J/cm²).

Diferentemente do item anterior, nesta análise buscou-se verificar o efeito de uma dose dupla da amostra-teste e de irradiação, na mesma densidade de energia, na sobrevivência bacteriana. As cepas utilizadas foram às mesmas, *S.epidermidis* ATCC 12228 e *C. albicans* ATCC 1023, assim como as amostras- teste analisadas.

O experimento foi conduzido como descrito no item anterior (preparo, execução, tratamento dos dados), variando-se número de aplicação da amostra e as condições de exposição à luz. Após o primeiro período de irradiação (5 min, densidade de energia total igual a 28 J/cm²), metade das placas foi incubada durante 24 h em estufa à 30°C. A outra

metade ficou incubada por somente 3 h e, após este período, foram novamente submetidas a mais uma dose das respectivas amostras-teste, na mesma concentração da primeira dose e irradiadas por mais 5 min (também 28 J/cm^2). Em seguida estas placas foram incubadas por mais 24 h (30° C). Para cada tratamento, o experimento foi realizado em duplicata, resultando em um $n=4$ após o plaqueamento, sendo realizados dois experimentos em dois dias diferentes ($n_{\text{total por amostra}}=8$). Os resultados foram expressos como as médias $\pm$ erro padrão das oito repetições. O plaqueamento e análise dos resultados foram feitos com descrito anteriormente.

3.3.2.5. Avaliação da atividade antimicrobiana na presença de irradiação e permeabilizantes

Neste ensaio as substâncias cloreto de cálcio (CaCl_2) e cloreto de magnésio (MgCl_2) foram utilizadas para investigar as mudanças na suscetibilidade bacteriana de cepas Gram-negativas à ação das amostras-teste associadas a irradiação *laser*. Estas duas substâncias são responsáveis por aumentar a permeabilidade do envelope bacteriano e assim proporcionar uma entrada mais efetiva e rápida de agentes externos (no caso, da substância fotoativável).

Procedeu-se de forma semelhante ao descrito no item 3.2.4., incluindo-se os permeabilizantes (0,05 M) na mistura de amostra-teste + micro-organismo antes da irradiação ao invés dos supressores. Antes da inclusão da amostra- teste, esperou-se 5 min de tal forma que o permeabilizante pudesse interagir com a solução contendo a bactéria e consequentemente com a sua membrana plasmática. Após a pipetagem da amostra-teste, esperou-se mais 5 min e então foi irradiada (5 min, densidade de energia total igual a 28 J/cm^2). Foram feitos controles para cada amostra-teste na ausência de permeabilizantes ou na presença deles sem irradiação. O micro-organismo utilizado nesse ensaio foi a bactéria

Escherichia coli – ATCC 10799 e as amostras-teste foram todas as substâncias isoladas nas mesmas concentrações utilizadas como descrito no item 3.2.4.

As porcentagens de sobreviventes foram calculadas de acordo com a equação $[(N1/N0) \times 100]$, em que N0 representa o número de UFC/mL de cada amostra-teste (com ou sem permeabilizante) antes da irradiação e N1 representa o número de UFC/mL após a exposição à luz. Este experimento foi realizado em duplicata para cada permeabilizante resultando em um n= 4 após plaqueamento, sendo realizados dois experimentos em dois dias diferentes ($n_{\text{total por amostra}}=8$). Os resultados foram expressos como as médias $\pm$ erro padrão de oito repetições. O plaqueamento e análise dos resultados foram feitos com descrito anteriormente.

3.3.3. Avaliação da atividade antiproliferativa

3.3.3.1. Avaliação da atividade antiproliferativa em painel de células tumorais e determinação da concentração para inibição total do crescimento celular (TGI)

Todas as amostras- teste foram avaliadas quanto a sua atividade antiproliferativa em células tumorais humanas utilizando-se o ensaio com Sulforrodamina (SBR), para avaliação do crescimento celular (Monks *et al.*, 1991).

Foram empregadas doze linhagens de células tumorais humanas (Tabela 4). Estas linhagens foram cedidas gentilmente pelo NCI (National Cancer Institute, EUA) e foram mantidas no laboratório de cultura de células em frascos de 25 cm³ (Nunc), com 5 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 5% de SFB e incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Cabe ressaltar que para cada linhagem celular foi feito um estudo, no qual se

determinou suas respectivas curvas de crescimento num período de 72 h, definindo-se a densidade celular de inoculação ótima necessária para montagem das placas. Assim após 24 h do plaqueamento as células se encontravam em fase logarítmica de crescimento (fase de plena atividade biológica), momento em que as amostras-teste foram adicionadas.

Tabela 4. Linhagens celulares empregadas na avaliação de atividade antiproliferativa.

Linhagem	Órgão/Doença	D.I.** (x10⁴ cel/mL)
U251	SNC; glioma	4,0
UACC-62	Pele; melanoma	4,0
MCF-7	Mama; adedcarcinoma	6,0
NCI-DR/RES*	Ovário; adenocarinoma	5,0
786-0	Rim; adenocarcinoma	5,0
NCI-H460	Pulmão; carcinoma tipo não pequenas células	4,0
PC-3	Próstata; adenocarcinoma	4,0
OVCAR-03	Ovário; adenocarcinoma	7,0
HT-29	Cólon; adenocarcinoma	5,0
K562	Medula óssea; Leucemia	6,0
VERO	Rim, célula normal, macaco verde	4,0
3T3	Fibroblasto, linhagem controle	4,0

* esta linhagem apresenta resistência a múltiplos fármacos

** D.I.= densidade de inoculação ótima para cada linhagem celular. Valores determinados experimentalmente pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho, Divisão de Farmacologia e Toxicologia, CPQBA, UNICAMP que se refere à densidade padronizada de células para cada linhagem celular (numero de células/ mL) necessária para a realização dos ensaios.

Foram inoculados 100 µL/poço, em placas com 96 poços (Nunc), de suspensão celular em meio RPMI/SFB acrescido 1mL/L de penicilina/estreptomicina (1000 U/mL:1000 µg/mL). Após 24h de incubação, a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, foram adicionados 100 µL/poço da amostra a ser testada em quatro concentrações distintas (Tabela 5).

Para preparação das amostras, uma alíquota de 10 mg de cada extrato ou fração foi dissolvida em 100 µL de DMSO. Em seguida, 50 µL dessa solução-estoque foram dispersos em 950 µL de meio RPMI/5% SFB, para preparação da solução de trabalho. Esta foi então diluída sucessivamente, em meio de cultura, para preparo das concentrações finais de 0,25;

2,5; 25 e 250 µg/mL. No caso das substâncias puras partiu-se de 1 mg para obter as concentrações finais iguais a 62,5; 6,25; 0,62 e 0,062 µg/mL. Como controle positivo foi utilizado o quimioterápico doxorrubicina, nas concentrações finais de 0,025; 0,25; 2,5 e 25 µg/mL. A concentração final de DMSO nas amostras foi inferior a 0,25% (v/v) o que não interfere no crescimento celular das linhagens testadas (Monks *et al.*, 1991)

No momento de aplicação das amostras-teste, procedeu-se também á fixação com ácido tricloroacético a 50% da placa controle chamada T0, que permitiu determinar qual a quantidade de células no momento da adição das amostras-teste. Ao final de 48 h de incubação, as células tratadas foram fixadas com 50 µL/poço de TCA a 50% e as placas foram incubadas por 1h a 4°C. Na linhagem K-562, que é uma linhagem em suspensão, adicionou-se lentamente o ácido, para evitar agitação das células, pois o objetivo da aplicação de TCA é também fixar células no fundo dos compartimentos da placa.

A seguir, as placas foram lavadas quatro vezes consecutivas com água corrente para remoção de resíduos de TCA, meio, SFB e outros metabólitos. Depois de secas completamente, à temperatura ambiente, as células foram coradas com 50 µL/poço de SRB a 0,4% (m/v, dissolvido em ácido acético a 1%) e mantidas por 30 min a temperatura ambiente; em seguida, foram lavadas, quatro vezes, com ácido acético a 1%, tomando-se o cuidado ao lavar, a fim de garantir a total remoção do excesso de corante, evitando-se resultados negativos falsos e então foram deixadas para secar à temperatura ambiente. Finalmente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com Trizma Base (pH 10), 150 µL/poço. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 540 nm em leitor de microplacas.

Com os valores de absorbância, calculou-se a porcentagem de crescimento celular para cada uma das concentrações testadas, levando-se em conta que:

Se $T_A \geq T_B \rightarrow$ estímulo de crescimento celular

Se $T_0 \leq T_A < T_B \rightarrow$ atividade citostática: Crescimento (%) = $100 \times [(T_A - T_0)/(T_B - T_0)]$

Se $T_A < T_0 \rightarrow$ atividade citocida: Crescimento (%) = $100 \times [(T_A - T_0)/T_0]$

Sendo que:

T_A = média da absorbância da célula tratada – absorbância do branco da amostra;

T_B = absorbância da suspensão celular sem tratamento;

T_0 = absorbância do controle de células na placa T_0 .

Foram então gerados gráficos da porcentagem de crescimento *versus* concentração para cada uma das linhagens testadas, utilizando-se o programa Origin 8 SR4 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). Este mesmo software possibilitou o cálculo da concentração para inibir o crescimento celular em 100% (TGI em $\mu\text{g/mL}$) através de regressão não-linear, tipo sigmoidal.

Tabela 5. Esquema da aplicação das amostras, em quatro concentrações distintas, na placa teste.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Legenda

-  Branco do meio de cultura (sem células)
-  Branco da suspensão celular
-  Branco das amostras teste
-  Suspensão celular na presença da amostra 1, em quatro concentrações distintas
-  Suspensão celular na presença da amostra 2, em quatro concentrações distintas
-  Suspensão celular na presença da amostra 3, em quatro concentrações distintas
-  Suspensão celular na presença da amostra 4, em quatro concentrações distintas
-  Suspensão celular na presença da amostra 5, em quatro concentrações distintas

3.3.3.2. Avaliação da atividade antitumoral na presença de irradiação

Neste ensaio foi avaliado o efeito antiproliferativo das amostras-teste na presença de irradiação. O equipamento *laser* e condições de irradiação foram as mesmas aplicadas nos ensaios antimicrobianos. Escolheu-se a linhagem fibroblasto 3T3 como controle de célula não tumoral e a de melanoma (UACC-62) como linhagem tumoral.

O procedimento experimental foi semelhante ao descrito no item 3.3.3.1, com algumas modificações. Foram preparadas duas placas com 96 poços para cada uma das linhagens testadas (uma placa que seria irradiada e a outra, não) e após as 24 h de incubação a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, período este em que as células já estão aderidas no fundo do poço, adicionou-se 100 µL/poço das amostras-teste em diferentes concentrações.

Para os extratos e frações as concentrações utilizadas foram iguais à metade e dez vezes menos que o valor de TGI, determinado nos ensaios com painel de células tumorais para a cultura de melanoma. Assim as concentrações finais utilizadas foram: GBCH, 56 µg/mL e 11,2 µg/mL; GBCM, 125 µg/mL e 25 µg/mL; GBFA, 48 µg/mL e 9,25 µg/mL; GBFN, 125 µg/mL e 25 µg/mL; ITPH, 118 µg/mL e 24 µg/mL; ITPM, 125 µg/mL e 25 µg/mL; ITFA, 125 µg/mL e 25 µg/mL e ITFN, 68,5 µg/mL e 14 µg/mL. Já para as substâncias isoladas GB1 e IT1 as concentrações utilizadas foram entre 3,125 e 100 µM.

Como controle positivo antitumoral utilizou-se a doxorrubicina (0,25 µM) e como controle positivo da PDT foi utilizado o fotossensibilizador corante azul de metileno (0,3 µM). Todas as amostras-teste foram diluídas em RPMI-1640 incolor/DMSO (0,1%) e como controle negativo utilizou-se este diluente, além de serem feitos os controles das células e do meio de cultura. Cada amostra-teste foi testada em triplicata na presença (linhas B,C e D) e na ausência de luz (linhas E, F e G).

Neste ensaio, para os extratos brutos (GBCH, GBCM, ITPH e ITPM) e frações (GBFA, GBFN, ITFA e ITFN) o tempo de interação entre amostra-teste e células foi de 5 min, já para as substâncias puras foram realizados ensaios com dois tempos de incubação entre amostra-teste e células, 5 min e 4 h (neste último, as placas foram mantidas no escuro, em estufa de CO₂ à 37° C até o momento da irradiação). Após os respectivos períodos de interação, cada amostra-teste foi irradiada por 5 min (28 J/cm²).

Após irradiação das células, as placas foram incubadas em estufa de CO₂, a 37°C por 48 h e em seguida fixadas, coradas e lidas como descrito no item 3.3.3.1. Para análise dos dados determinou-se o crescimento celular (%) para cada amostra-teste sendo os resultados expressos com médias de três repetições ($\pm$ erro padrão). Diferenças estatísticas entre tratamentos dentro da mesma condição de irradiação (presente ou ausente) foram determinados via *one-way* ANOVA e teste de Tukey. Já, comparações do crescimento celular com a mesma amostra-teste, irradiada ou não, foram feitas via test t. O nível de significância para ambos os testes estatísticos foi fixado em $p < 0,05$. Para estas análises assim como representação gráfica dos resultados utilizou-se o programa GraphPad Prism (GraphPad Software, version 5.00, San Diego, CA).

3.3.3.3. Avaliação do efeito antiproliferativo de cada substância isolada empregando-se diferentes densidades de energia da irradiação *laser*

Os resultados do ensaio descrito no item anterior nos permitiram determinar em qual das concentrações utilizadas se observava um menor crescimento celular da linhagem tumoral (melanoma, UACC-62), sem que afetasse na mesma intensidade o crescimento da célula controle (3T3, fibroblasto). Esta concentração foi então escolhida para realização de um novo ensaio no qual o efeito antiproliferativo foi avaliado, variando-se a dose de energia de irradiação das amostras-teste.

O preparo e incubação das placas (duas para cada linhagem) foram feitos como descrito no item 3.3.3.2. Cada linhagem foi incubada com as amostras-teste por 5 min ou 4 h antes da irradiação e quando irradiadas foram submetidas a diferentes densidades de energia na irradiação *laser*, 28, 56 e 84 J/cm². A fixação, coloração e leitura das placas assim como coleta dos dados, análise e apresentação dos resultados foi feita como descrito no item 3.3.3.2

4. Resultados e Discussão

4.1. Estudo fitoquímico

Nesta seção dos resultados são apresentados os extratos, frações e substâncias obtidas a partir do estudo fitoquímico biomonitorado focando no isolamento de compostos fotoativáveis das espécies *G. blepharophylla* e *I. truxillensis*. As estruturas químicas das substâncias isoladas e purificadas foram caracterizadas e relações entre suas estruturas moleculares são discutidas quanto ao seu potencial enquanto fotossensibilizantes.

Inicialmente, foram obtidos os extratos brutos hexânico e metanólico das duas espécies estudadas e em seguida, frações do extrato metanólico por extração ácido-básica. Os rendimentos em massa de todas estas amostras foram calculados (Tabela 6). A partir das frações obtidas, substâncias foram isoladas e identificação química realizada como descrito a seguir.

Tabela 6. Rendimento em massa (g) dos extratos brutos e frações obtidos de *G. blepharophylla* e *I. truxillensis*.

	Parte da planta	Massa do pó (g)	Rendimento dos extratos e frações (g)				
			Hexânico	Metanólico	Alcaloídica	Neutra	Aq básica
<i>G.blepharophylla</i>	Casca	200	3,11 (GBCH)	45,58 (GBCM)	1,79 (GBFN)	1,5 (GBFA)	10,23 (GBFAB)
<i>I. truxillensis</i>	Partes aéreas	350	4,32 (ITPH)	65,21 (ITPM)	2,22 (ITFA)	1,09 (ITFN)	4,67 (ITFAB)

4.1.1. Substâncias isoladas de *G. blepharophylla*

Foram isoladas e identificadas cinco substâncias, GB1 (72 mg), GB2 (41 mg), GB3 (24 mg), GB4 (17 mg) e GB5 (10,7 mg), no fracionamento do extrato metanólico das cascas da espécie *G. blepharophylla*. O teste com o reagente de Dragendorff foi positivo para todas elas sendo um primeiro indicativo de que estes compostos eram alcaloides.

Os espectros de massas do extrato metanólico, GBCM (Anexo 1), assim como da fração alcaloídica, GBFA (Anexo 2) confirmaram a presença das massas correspondentes de cada uma destas substâncias (identificação e dados espectroscópicos de cada uma delas encontram-se nos ANEXOS).

4.1.1.1. Substância GB1: Isomoschatolina ($C_{18}H_{13}NO_4$), massa molecular 307,0

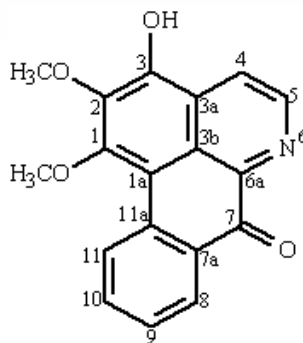


Figura 11. Fórmula estrutural da substância Isomoschatolina (GB1).

Trata-se de um sólido cristalino de cor azul-anil. Sua fórmula molecular, $C_{18}H_{13}NO_4$ (307,07) foi determinada com base nas análises dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e espectro de massas (Anexo 3-25) e comparação com dados de literatura (Wijeratne *et al.*, 1996 e Costa, 2009). Nos espectros de massa ESI-MS/MS (Anexo 25) no modo positivo observou-se a presença do íon molecular $[M + H]^+ = 308,10$ e também da sua forma sodiada $[M + Na]^+ =$

330,20. A partir destes dados, acredita-se que a forma azul é aquela que ocorre naturalmente na planta, uma vez que esta substância foi diretamente isolada como uma fração pura (Tabela 1). Após tratamento deste composto em cartucho de sílica C-18 para eliminação completa do sal (Na), o composto passou a se apresentar com um sólido cristalino de cor avermelhada. Análise desta forma no espectrômetro de massas (modo positivo) revelou a presença exclusiva do íon com m/z igual a 308,10.

Quanto à estrutura molecular desta substância (análises de RMN foram feitas com a substância na sua forma azul), a presença de um esqueleto oxoaporfínico na molécula foi deduzida pela análise do espectro de absorção na região do Infravermelho (IV), no qual observou-se uma banda em 1653 cm^{-1} , típica de grupo carbonila conjugado, como já descrito por Wijeratne *et al.* (1996) e Costa (2009). Neste espectro observou-se ainda uma banda larga em 3325 cm^{-1} , característica de uma hidroxila fenólica e absorções entre $1614\text{-}1494\text{ cm}^{-1}$, típicas de estiramento N-O/C-O. O espectro de absorção no UV também apresentou padrão absorptivo compatível com a presença de um esqueleto oxoaporfínico na molécula pelas absorções em 287, 320, 380, 470 e 620 (Figura 26).

As análises dos espectros de RMN de ^1H (400 MHz, Tabela 7) revelaram a presença de seis sinais aromáticos com integração para seis hidrogênios aromáticos. Quatro deles são característicos dos hidrogênios aromáticos do anel D não substituído de um esqueleto oxoaporfínico e atribuídos aos hidrogênios H-8 (δ 7,41- 1H, ddd, $J = 8,0, 1,6$ e $0,5\text{ Hz}$), H-9 (δ 7,33- 1H, ddd, $J = 8,0; 7,0$ e $1,0\text{ Hz}$), H10 (δ 7,68- 1H, ddd, $J = 8,6, 7,0$ e $1,6\text{ Hz}$), e H-11 (δ 9,08- 1H, ddd, $J = 8,6, 1,0$ e $0,5\text{ Hz}$). Os outros dois sinais (dubletos) foram atribuídos aos hidrogênios do anel B, H-4 (δ 8,73) e H-5 (δ 8,60). Outros dois sinais foram observados (singletos) em δ 4,08 e δ 3,97 e correspondiam aos hidrogênios dos grupos metoxílicos ligados ao C-1 e C-2.

Os espectros de RMN de ^{13}C (100 MHz) revelaram a presença de 15 carbonos aromáticos com valores de deslocamento químico entre δ 166,07 e δ 102,73, dois metoxílicos em δ 61,29 (1-OCH₃) e δ 60,67 (2-OCH₃) e um carbonílico em δ 184,58 (C-7). O sinal em δ 166,07 ajudou a confirmar os dados observados no espectro de IV com indícios de presença de um grupo hidroxila, por ser um sinal característico de um carbono aromático oxigenado. As análises por gHSQC (do inglês *heteronuclear single quantum coherence*) e gHMBC (do inglês *heteronuclear multiple bond correlation*) confirmaram a presença do grupo carbonílico pela relação do sinal em δ 8,41 do H-8, a J^3 , com o sinal do carbono em δ 184,58. A presença do grupo hidroxila em C-3 foi confirmada pela correlação do sinal em δ 8,60 relativo ao H-4, a J^3 , com o sinal em δ 166,07 do C-9. Ainda, o grupo hidroxila em C-3 foi reforçado pela análise de NOE 1D (do inglês *Nuclear Overhauser Effect*), em que a irradiação do sinal em δ 8,60 (H-4) evidenciou correlação apenas com o sinal em δ 8,73 (H-5). A posição do grupo metoxílico em C-1 foi definida pela análises em NOE 1D, devido à correlação do sinal em δ 9,08 (H-11) com o sinal do grupo metoxílico em δ 4,08 (1-OCH₃) correlacionado ao sinal do carbono em δ 61,29 no mapa de contorno gHSQC. Da mesma forma, o grupo metoxílico em δ 3,97 (1-OCH₃), correlacionado ao sinal do carbono em δ 60,67, foi atribuído à substituição em C-2 (Figura 12, Tabela 7).

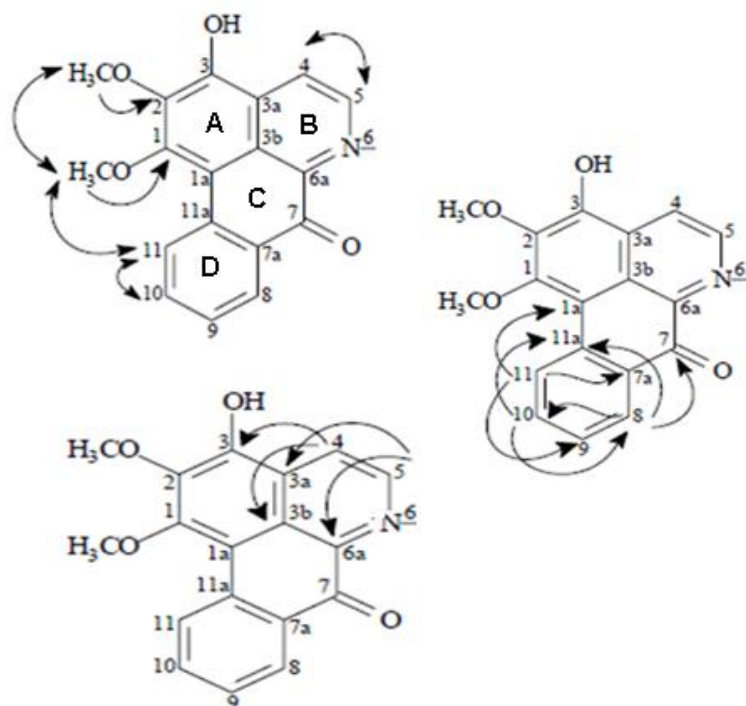


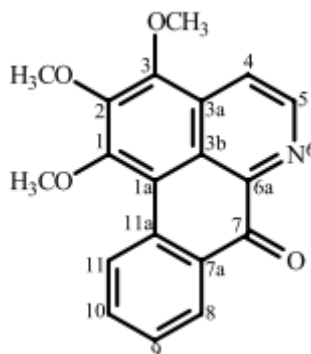
Figura 12. Principais correlações observadas no mapa de contorno gHMBC e medidas de NOE 1D de GB1.

Tabela 7. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância GB1^a

Posição	^{13}C (δ) ^{a,b}	^1H (δ) (mult., J em Hz) ^a	gHMBC (^1H - ^{13}C) ^{a,c}	NOE ^{a,d}
1	162,74 s			
1 ^a	102,73 s			
2	144,00 s			
3	166,07 s			
3 ^a	136,15 s			
3b	124,71 s			
4	124,01 d	8,60 (1H, d, 5,1)	3, 3b e 5	H-5
5	141,96 d	8,73 (1H, d, 5,1)	3a, 4 e 6 ^a	H-4
6 ^a	145,08 s			
7	184,58 s			
7 ^a	130,62 s			
8	128,89 d	8,41 (1H, ddd, 8,0, 1,6 e 0,5)	7, 10 e 11 ^a	
9	125,57 s	7,33 (1H, ddd, 8,0, 7,0 e 1,0)	7a e 11	
10	135,14 d	7,68 (1H, ddd, 8,6, 7,0 e 1,6)	8 e 11 ^a	
11	127,38 d	9,08 (1H, ddd, 8,6, 1,0 e 0,5)	1a, 7a e 9	H-10 e 1-CH ₃
11 ^a	138,79 s			
1-OCH ₃	61,29 q	4,08 (3H, s)	1	
2-OCH ₃	60,67 q	3,97 (3H, s)	2	1-OCH ₃
3-OH				

^aAnálise realizada a 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C em CDCl_3 . TMS foi utilizado como padrão interno. ^b Multiplicidades determinadas pelos espectros de ^{13}C e gHSQC. ^c Átomos de carbonos que mostraram correlação com os respectivos hidrogênios. ^d Medidas de NOE 1D. (δ) Deslocamento químico em ppm. (J) Constante de acoplamento.

4.1.1.2. Substância GB2: O-metilmoschatolina ($\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{NO}_4$), massa molecular 321,20

**Figura 13.** Fórmula estrutural da substância O-metilmoschatolina (GB2).

Trata-se de um sólido cristalino de cor alaranjada com massa molecular igual a 321,20 ($C_{19}H_{15}NO_4$) deduzida a partir dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e de massas (Anexo 26-45). Os espectros de absorção na região do IV de **GB2** apresentaram similaridades quando comparados com os espectros **GB1**.

Similaridades também foram encontradas entre os espectros de ^1H e ^{13}C destes dois compostos. Em GB2, observou-se a ausência do sinal em δ 7,23 (1H, s) no espectro de ^1H e δ 106,48 no espectro de ^{13}C referentes a H-3 e C-3, respectivamente. Em contrapartida, para esta substância, observou-se a presença de um sinal a mais em δ 4,20 (3H, s), referente a um grupo metoxílico que em análise por gHSQC correlaciona-se ao sinal de carbono em δ 61,81 (Tabela 8). O mapa de contorno deduzido por gHMBC revelou uma correlação do sinal em δ 8,24 (H-4) com o sinal do carbono em δ 148,45 ligado ao grupo metoxílico em δ 4,20 (3-OCH₃) no espectro de RMN de ^1H , confirmando a presença deste grupo metoxila como substituinte em C-3 (Figura 14, Tabela 8).

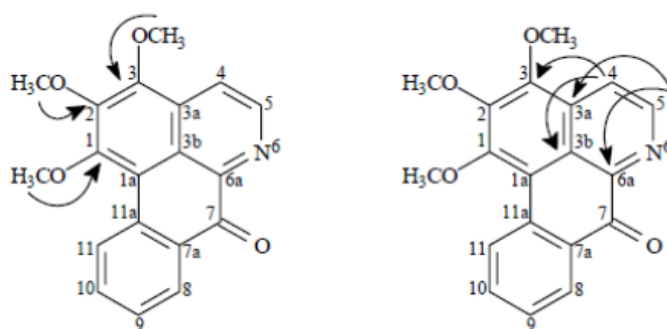


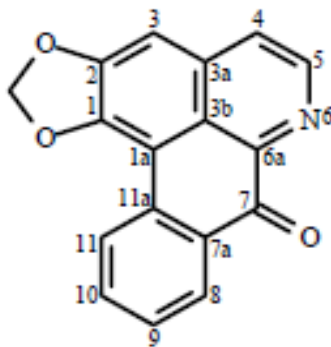
Figura 14. Principais correlações observadas no espectro de HMBC de GB2

Tabela 8. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância GB2^a.

Posição	^{13}C (δ) ^{a,b}	^1H (δ) (mult., <i>J</i> em Hz) ^a	<i>g</i> HMBC (^1H - ^{13}C) ^{a,c}
1	156,49 s		
1 ^a	115,66 s		
2	147,35 s		
3	148,45 s		
3 ^a	131,10 s		
3b	122,82 s		
4	119,18 d	8,24 (1H, d, 5,3)	3, 3b e 5
5	144,52 d	9,00 (1H, d, 5,3)	3a, 4 e 6 ^a
6 ^a	145,47 s		
7	182,63 s		
7 ^a	131,43 s		
8	128,92 d	8,57 (1H, dd, 7,9 e 1,4)	7, 10 e 11 ^a
9	128,16 s	7,54 (1H, ddd, 7,9, 7,2 e 1,1)	7a 10 ^d e 11
10	134,38 d	7,75 (1H, ddd, 8,4, 7,2 e 1,5)	8, 9 ^d e 11 ^a
11	127,66 d	9,11 (1H, ddd, 8,4, 1,1 e 0,6)	1a, 7a e 9
11 ^a	134,54 s		
1-OCH ₃	61,01 q	4,08 (3H, s)	1
2-OCH ₃	61,48 q	4,11 (3H, s)	2
3-OCH ₃	61,81 q	4,20 (3H, s)	3

^aAnálise realizada a 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C em CDCl_3 . TMS foi utilizado como padrão interno. ^b Multiplicidades determinadas pelos espectros de ^{13}C e *g*HSQC. ^cÁtomos de carbonos que mostraram correlação com os respectivos hidrogênios. ^d Correlação fraca. (δ) Deslocamento químico em ppm. (*J*) Constante de acoplamento.

4.1.1.3. Substância GB3: Liriodenina ($\text{C}_{17}\text{H}_9\text{NO}_5$), massa molecular 275,10.

**Figura 15.** Fórmula estrutural da substância Liriodenina (GB3).

A substância **GB3** apresentou-se como sólido cristalino amarelo com massa molecular igual a 275,05 ($\text{C}_{17}\text{H}_9\text{NO}_5$), deduzida a partir dos espectros de massas e de RMN de ^1H e ^{13}C (Anexo 47-62). O espectro de absorção no IV desta substância também mostrou-se bastante

semelhante aos apresentados pelas demais substâncias isoladas de *G. blepharophylla*. O espectro de RMN de ^1H diferenciou-se dos espectros de **GB1** pela ausência dos sinais dos grupos metoxílicos substituídos em C-1 (δ 4,02) e C-2 (δ 4,10) e sinais em δ 60,67 e δ 56,23 no mapa de contorno gHSQC. **GB3** apresentou um sinal δ 6,37 (2H, s, OCH_2O) que se correlacionou ao sinal do carbono em δ 102,44 na análise por gHSQC típico de grupo metilenodióxi substituído em C-1 e C-2 (Ortiz *et al.*, 2007; Costa, 2009). Este grupo foi ainda confirmado frente à correlação por gHMBC do sinal em δ 6,37 com os sinais dos carbonos em δ 147,92 e δ 151,65 (Figura 16, Tabela 9).

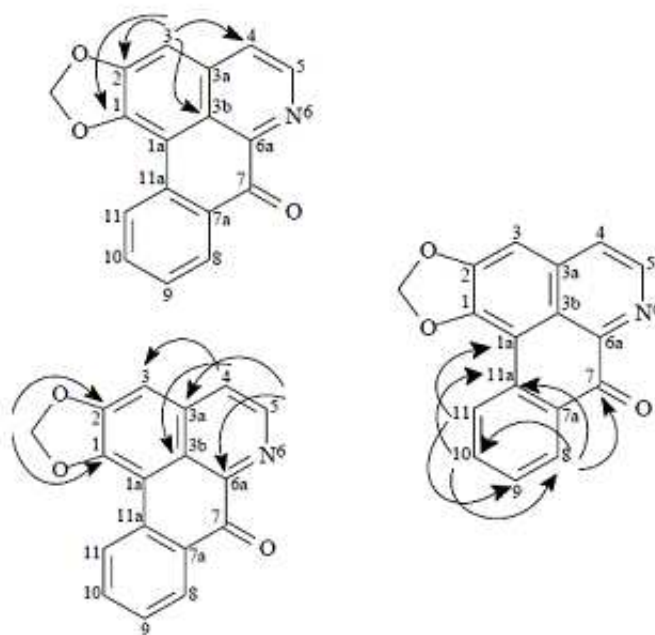


Figura 16. Principais correlações observadas no espectro de HMBC de GB3

Tabela 9. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância GB3^a.

Posição	^{13}C (δ) ^{a,b}	^1H (δ) (mult., J em Hz) ^a	gHMBC (^1H - ^{13}C) ^{a,c}
1	147,92 s		
1 ^a	107,98 s		
2	151,65 s		
3	103,20 d	7,16 (1H,s)	1, 1a ^d , 2 ^d , 3b e 4
3 ^a	135,73 s		
3b	123,16 s		
4	124,33 d	7,75 (1H, d, 5,2)	3,3a ^d , 3b e 5
5	144,74 d	8,87 (1H, d, 5,2)	3a, 3b ^d , 4 e 6 ^a
6 ^a	145,31 s		
7	182,51 s		
7 ^a	131,25 s		
8	128,81 d	8,57 (1H, ddd, 7,9, 1,4 e 0,5)	7, 10 e 11 ^a
9	128,56 d	7,56 (1H, ddd, 7,9, 7,4 e 1,0)	7a e 11
10	133,80 d	7,73 (1H, ddd, 8,1, 7,4 e 1,4)	8 e 11 ^a
11	127,32 d	8,61 (1H, ddd, 8,1, 1,0 e 0,5)	1a, 7a e 9
11 ^a	132,87 s		
(1-2)-OCH ₂ O	102,44 t	6,37 (2H, s)	1e 2

^aAnálise realizada a 400MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C em CDCl_3 . TMS foi utilizado como padrão interno. ^bMultiplicidades determinadas pelo mapa de contorno gHSQC. ^cÁtomos de carbonos que mostraram correlação com os respectivos hidrogênios. ^dCorrelação fraca. (δ) Deslocamento químico em ppm. (J) Constante de acoplamento.

4.1.1.4. Substância GB4: Subsessilina ($\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{NO}_5$), massa molecular 337,09

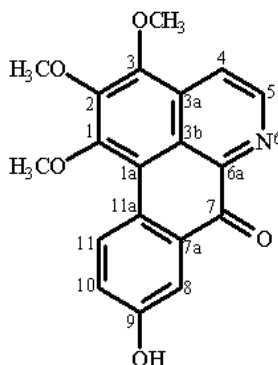


Figura 17. Fórmula estrutural da substância Subsessilina (GB4).

A substância **GB4** apresentou-se como um sólido vermelho-alaranjado em forma de agulhas, massa molecular igual a 337,09 ($\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{NO}_5$), deduzida com base nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e de massas (Anexo 64-78). Os espectros de absorção no IV entre **GB4** e

GB1 foram similares principalmente em 3431cm^{-1} , típica de um grupo hidroxila fenólica (C-9).

A presença de uma hidroxila fenólica em C-9 foi confirmada nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , em comparação com os mesmos espectros de GB1. GB3 não apresentou sinal de hidrogênio aromático no anel D, o que levantou a hipótese de um substituinte. Confirmou-se ser uma hidroxila pela análise por gHMBC devido à correlação do sinal em δ 8,96 (H-11) com o sinal do carbono em δ 157,53 (C-9), no qual não se evidenciou nenhuma correlação com os grupos metoxílicos. Este composto ainda apresentou sinais dos três hidrogênios em δ 8,96 (^1H , d, $J = 9,0$ Hz), δ 7,82 (^1H , d, $J = 2,8$ Hz) e δ 7,25 (^1H , dd, $J = 9,0$ e $2,8$ Hz) correlacionados aos carbonos δ 129,94, δ 113,48 e δ 123,21 no mapa de contorno gHSQC, atribuídos respectivamente a H-11/C-11, H-8/C-8 e H-10/C10, evidenciando mais uma vez uma substituição no anel D (Figura 18, Tabela 10)

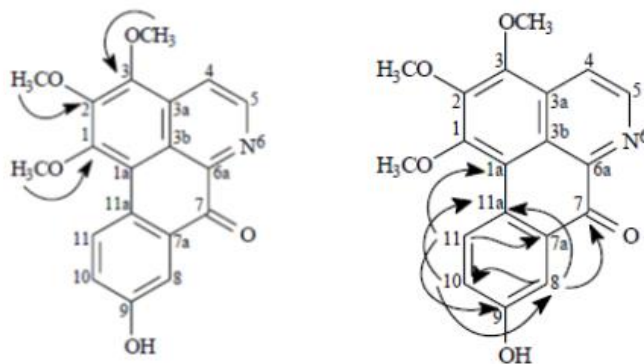


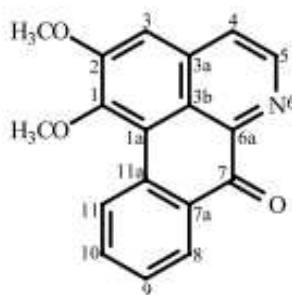
Figura 18. Principais correlações observadas no espectro de HMBC de GB4

Tabela 10. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para Gb4^a

Posição	^{13}C (δ) ^{a,b}	^1H (δ) (mult., <i>J</i> em Hz) ^a	<i>g</i> HMBC (^1H - ^{13}C) ^{a,c}
1	155,55 s		
1 ^a	116,23 s		
2	147,91 s		
3	147,53 s		
3 ^a	131,41 s		
3b	122,20 s		
4	119,86 d	8,24 (1H, d, 4,7)	3, 3b e 5
5	144,04 d	8,88 (1H, d, 4,7)	3a, 4 e 6 ^a
6 ^a	145,12 s		
7	183,11 s		
7 ^a	132,67 s		
8	113,48 d	7,82 (1H, d, 2,8)	7, 7a ^d , 9 ^d , 10 e 11a
9	157,35 s		
10	123,21 d	7,25 (1H, dd, 9,0 e 2,8)	8, 9 e 11 ^a
11	129,94 d	8,96 (1H, d, 9,0)	1a, 7 ^d , 7a, 8 ^d e 9
11 ^a	126,89 s		
1-OCH ₃	60,92 q	4,05 (3H, s)	1
2-OCH ₃	61,93 q	4,11 (3H, s)	2
3-OCH ₃	61,49 q	4,17 (3H, s)	3

^aAnálise realizada a 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C em CDCl_3 . TMS foi utilizado como padrão interno. ^b Multiplicidades determinadas pelos espectros de ^{13}C e *g*HSQC. ^c Átomos de carbonos que mostraram correlação com os respectivos hidrogênios. ^d Correlação fraca. (δ) Deslocamento químico em ppm. (*J*) Constante de acoplamento.

4.1.1.5. Substância GB5: Lysicamina ($\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{NO}_3$), massa molecular 291,08

**Figura 19.** Fórmula estrutural da substância Lysicamina (GB5).

A substância GB5 exibiu coloração amarela e aspecto cristalino, sendo sua massa molecular, 291,08 ($\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{NO}_3$), deduzida a partir de seus espectros de massa e de RMN de

^1H e ^{13}C . A presença de uma banda de absorção no IV em 1656 cm^{-1} (Anexo 80-84) indicou de grupo carbonila conjugado semelhantes aos descritos para os alcaloides GB1-GB4.

Pelos espectros de ^1H (400 MHz) a semelhança ficou mais evidente com sinais sugerindo que GB5 fosse um alcaloide oxoaporfínico dissubstituído. Observou-se a presença de sete sinais aromáticos com integração para sete hidrogênios aromáticos. Quatro deles foram atribuídos aos H-11 (δ 9,18/ 1H, ddd, $J = 8,4, 1,1$ e $0,5\text{ Hz}$), H-8 (δ 8,58/ 1H, ddd, $J = 7,9, 1,6$ e $0,5\text{ Hz}$), H-9 (δ 7,77 - 1H, ddd, $J = 8,4, 7,2$ e $1,6\text{ Hz}$) e H-10 (δ 7,58/ 1H, ddd, $J = 7,9, 7,2$ e $1,1\text{ Hz}$), que são característicos dos hidrogênios aromáticos do anel D não substituído. Outro hidrogênio foi atribuído ao H-3 do anel A do sistema oxoaporfínico. Por fim, outros dois sinais (dubletos) foram atribuídos aos H-5 (δ 8,91) e H-4 (δ 7,81) compatível com um sistema piridínico do anel B do sistema oxoaporfínico. Dois sinais singletos em δ 4,02 e δ 4,10, com integração para três hidrogênios foram relacionados aos grupos metoxílicos em C-1 e C-2 do anel A do sistema oxoaporfínico, respectivamente (Tabela 11).

Os espectros de RMN de ^{13}C (400 MHz) confirmaram a identidade do substância verificando-se à presença de 15 carbonos aromáticos (δ 156,90 e δ 106,48), dois carbonos metoxílicos (δ 60,67 para 1-OCH₃ e δ 56,23 para 2-OCH₃) e um carbonílico (δ 182,68 para C-7). As posições das metoxilas foram confirmadas por gHBMC pela correlação do sinal em δ 8,58 (H-8) com o sinal do carbono em δ 182,68 (C-7) e pela correlação do sinal δ 7,23 de H-3 com o sinal em δ 123,62 do C-4. Também foram verificadas as correlações de C-1 e H-3 a partir dos sinais de H-3, δ 7,23 e sinal de C-1 em δ 152,12 e de C-1 com o grupo metoxila ligado a ele em δ 4,02 (1-OCH₃) (Figura 20, Tabela 11).

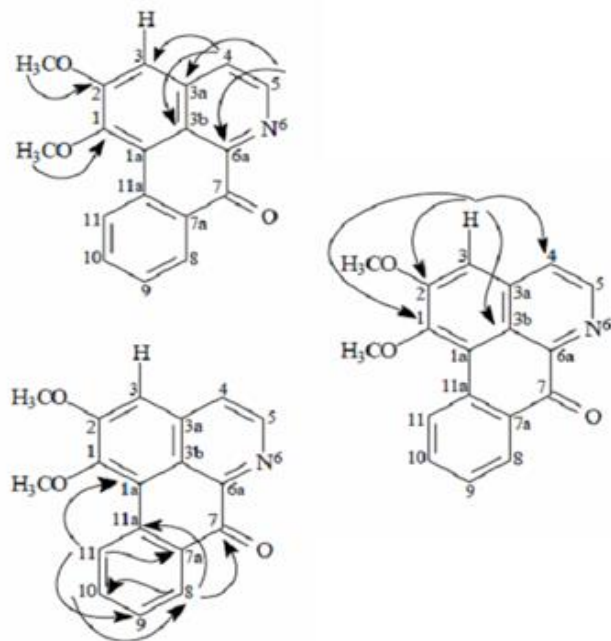


Figura 20. Principais correlações observadas no espectro de HMBC de GB5

Tabela 11. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância GB5^a

Posição	^{13}C (δ) ^{a,b}	^1H (δ) (mult., J em Hz) ^a	$g\text{HMBC}$ (^1H - ^{13}C) ^{a,c}
1	152,12 s		
1 ^a	119,88 s		
2	156,90 s		
3	106,48 s	7,23 (1H, s)	1, 1a ^d , 2 ^d , 3b e 4
3 ^a	135,56 s		
3b	122,21 s		
4	123,62 d	7,81 (1H, d, 5,2)	3, 3b e 5
5	145,01 d	8,91 (1H, d, 5,2)	3a, 3b ^d , 4 e 6 ^a
6 ^a	145,36 s		
7	182,68 s		
7 ^a	132,11 s		
8	128,91 d	8,58 (1H, ddd, 7,9, 1,6 e 0,5)	7, 10 e 11 ^a
9	128,82 s	7,58 (1H, ddd, 7,9, 7,2 e 1,1)	7a, 10 ^d , 11 e 11 ^{ad}
10	134,35 d	7,77 (1H, ddd, 8,4, 7,2 e 1,6)	8 e 11 ^a
11	128,46 d	9,18 (1H, ddd, 8,4, 1,1 e 0,5)	1a, 7 ^d , 7a, 9
11 ^a	134,35 s		
1-OCH ₃	60,67 q	4,02 (3H, s)	1
2-OCH ₃	56,23 q	4,11 (3H, s)	2

^aAnálise realizada a 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C em CDCl_3 . TMS foi utilizado como padrão interno. ^b Multiplicidades determinadas pelos espectros de ^{13}C e $g\text{HSQC}$. ^c Átomos de carbonos que mostraram correlação com os respectivos hidrogênios. ^d Correlação fraca. (δ) Deslocamento químico em ppm. (J) Constante de acoplamento.

A substância GB1, isomoschatolina, já foi descrita em outros trabalhos (Atti *et al.*, 1982; Goulart *et al.*, 1986; Guinaudeau, Lebouf, Cavé., 1983, 1988; Fleischer, Waigh, Waterman, 1998; Osorio *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2009a) e mais recentemente sua caracterização completa por espectrometria de massas e RMN de ^1H e ^{13}C foi publicada por Costa *et al.* (2011). A substância GB2, O-metilmoschatolina, já foi extensivamente descrito na literatura tendo sido isolado de diversas espécies de Annonaceae (Guinaudeau *et al.*, 1975, 1979, 1983, 1988, 1994; Rahman *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2010 e 2011). A liriodenina, composto GB3, consiste no alcaloide mais representativo dentro desta família, encontrado praticamente em todos os gêneros já estudados (Guinaudeau *et al.*, 1975, 1979, 1983, 1988; Caetano & Dadoun, 1987; Costa *et al.*, 2006 e 2009a e b). Esta substância tem mostrado ampla gama de atividades biológicas, tais como leishmanicida, antitumoral, antimicrobiana e antioxidante (Wu *et al.*, 1993; Mahiou *et al.*, 1994; Queiroz *et al.*, 1996; Khan *et al.*, 2002, López *et al.*, 2002; Stévigny *et al.*, 2005; Rahman *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2009a, 2010 e 2011), constituindo-se como uma substância promissora para o desenvolvimento de novos medicamentos e de interesse para produção em escala comercial. A subessilina, GB4, foi descrita em outros dois trabalhos: Hasegawa *et al.* (1972), estudando a espécie *Guatteria ouregou* e Costa *et al.* (2011), no estudo fitoquímico de *G. blepharophylla*, no qual a presença deste alcaloide nesta espécie vegetal foi reportada pela primeira vez. Já a lysicamina, substância GB5, costuma aparecer como constituintes junto com liriodenina, substância GB3, na maioria das espécies de *Guatteria* já estudadas, uma vez que o primeiro é precursor do segundo na rota biossintética aceita para esta classe de alcaloides (Guinaudeau *et al.*, 1983, 1988, 1994; Montenegro *et al.*, 2003; Costa, 2009). Inclusive, neste trabalho, durante o processo de fracionamento, ambos estes alcaloides eluíram conjuntamente, concentrando-se

nas frações 30-48. A separação foi atingida após tratamento em CCDP. Por fim, cabe ressaltar que tanto GB2, GB3 e GB5 são considerados marcadores taxonômicos de Annonaceae.

Todas estas substâncias pertencem à classe dos alcaloides isoquinolínicos (mais de 15000 substâncias descritas na literatura), grupo dos aporfinóides *lato sensu*, subgrupo dos oxoaporfínicos. Seus precursores biossintéticos são os aminoácidos fenilalanina e tirosina. Ocorre condensação do precursor proveniente do aminoácido com unidades alifáticas para formar as isoquinolinas. A partir desta estrutura diversos grupos de moléculas podem ser formados: isoquinolinas simples; benziltetraidroisoquinolinas; bisbenzilisquinolinas e bisbenziltetraidroisoquinolinas; protoberberinas e tetraidroprotoberberinas; aporfinoides *sensu lato*, que por sua vez englobam os aporfínicos *stricto sensu*, oxoaporfinos, fenantrenos e proaporfínicos; e alcaloides de biossíntese mista do tipo isoquinolino (Shama & Guinaudeau, 1984).

Estudos mais detalhados sobre os aporfinoides datam das décadas de 70 e 80 contém informações quanto às suas fontes botânicas, estruturas químicas, dados espectrais e atividades farmacológicas (Guinaudeau *et al.*, 1975, 1979, 1983, 1988, 1994; Leboeuf *et al.*, 1982). Atualmente cerca de 500 alcaloides foram isolados e identificados como aporfinoides, porém poucos deles explorados farmacologicamente. Constituem os principais produtos biossintéticos de Annonaceae, mas também se distribuem em outras famílias, tais como Berberidaceae, Lauraceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Monimiaceae, Ranunculaceae, Papaveraceae e Rhamnaceae (Stévigny *et al.*, 2005).

Como dito anteriormente, os aporfinoides *lato sensu* são divididos em quatro subgrupos (Figura 21) aporfínicos (*stricto sensu*) e os alcalóides biogeneticamente relacionados (mesma rota biossintética), como os proaporfínicos e os derivados do catabolismo, os oxoaporfínicos e também os fenantrenos que são os produtos de

degradação mais comuns destes alcaloides. As formas diméricas e os desidroaporfínicos, caracterizados por uma insaturação adicional no carbono 6a, estão incluídos neste subgrupo (Guinaudeau *et al.*, 1975, 1979, 1983, 1988, 1994; Leboeuf *et al.*, 1982).

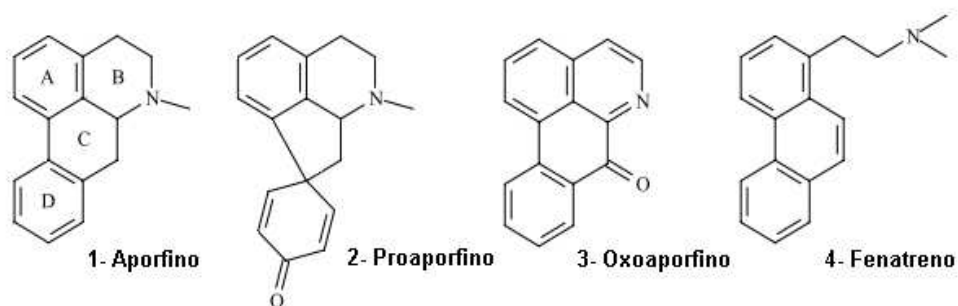


Figura 21. Esqueletos químicos dos aporfínóides *lato sensu*

Na terminologia química, os aporfínicos *stricto sensu* são bases tetracíclicas formadas por ligação direta dos anéis aromáticos A e D dos núcleos benzilisoquinolínicos típicos (Figura 22). O átomo de nitrogênio na posição 6 é normalmente terciário na forma básica, mas pode também ser quaternário, menos frequentemente acetilado ou formilado. Compostos N-óxidos também já foram descritos. O alcaloide é chamado noraporfínico quando o nitrogênio é secundário. Nos aporfínicos naturais, as posições 1 e 2 são normalmente substituídas por grupos hidroxila, metoxila ou metilenodióxido. O núcleo tetracíclico pode ser substituído em diferentes locais, nas posições 9, 10 e 11 e menos frequentemente nas posições 3 e 8. Há também a possibilidade de oxigenação das posições 7 ou 4. Os aporfínicos são opticamente ativos, possuindo tanto a configuração absoluta R-(-) ou S-(+), dependendo da estereoquímica do carbono 6a (Stévigny, Bailly, Quetin- Leclerc, 2005).

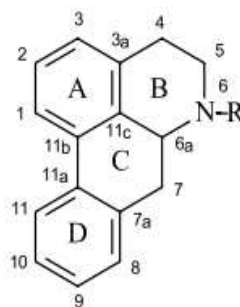


Figura 22. Estrutura química dos núcleos benzilisoquinólicos típicos.

Os proaporfinos constituem um subgrupo minoritário em Annonaceae, contudo atuam como precursores de alguns outros tipos de aporfínoides (Shama & Guinaudeau, 1984; Pelletier, 1987). Os fenantrenos são derivados dos aporfínoides em função de uma quebra entre N-6 e C-6, que resulta na formação do núcleo fenantreno com uma cadeia etilamina, e uma ou duas metilas ligadas ao nitrogênio (Shama & Guinaudeau, 1984; Pelletier, 1987).

Já os oxoaporfinos, subgrupo ao qual pertencem os alcaloides aqui isolados e identificados, apresentam uma carbonila em C-7 e um esqueleto aporfínico aromático com alta conjugação. Como constatado, em geral são compostos coloridos com coloração amarelada (liriodenina, GB3), alaranjada (O-metilmoschatolina, GB2 e lysicamina, GB5), avermelhada (subsessilina, GB4), azul ou vermelho-alaranjada (isomoschatolina, GB1).

A estrutura planar e alta conjugação destas substâncias reforçam a possibilidade delas apresentarem propriedades fotossensibilizantes. Fotossensibilizadores em geral possuem estrutura aromática, ou seja, sistema conjugado π , denominado cromóforo, frequentemente em conjunto com substituintes periféricos, denominados auxocromos. Normalmente, quando em solução e isolado, o cromóforo é incolor ou exibe cor amarelo-clara e só se torna intensamente colorido quando unido ao auxocromo. Isto se deve à intensa interação que ocorre entre eles, uma vez que os grupos auxocromos ligam-se em conjugação com o sistema

π do cromóforo, permitindo a sua participação na deslocalização de elétrons em torno da molécula como um todo e na distribuição da nuvem eletrônica (Wainwright, 2009).

Dentre os alcaloides isoquinolínicos, até o momento, somente para aqueles pertencentes ao grupo protoberberínico, como a sanguinarina, berberina e palmatina foram encontrados relatos na literatura envolvendo estudos de suas características fotoquímicas e fotofísicas (Arnason *et al.*, 1992; Inbaraj *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2009a e b; Hu *et al.*, 2010; Shen & Ji, 2010), assim como de suas aplicações enquanto agentes fototóxicos e anticarcinogênicos em PDT (Jantova *et al.*, 2006). Por exemplo, no caso da berberina e sanguinarina, atribui-se a eficiência fotoquímica ao razoável rendimento quântico de produção de oxigênio singlete que fica em torno de 0,25 e 0,16, respectivamente (Wainwright, 2009). Outros estudos indicam que a capacidade destes alcaloides de ligarem-se aos ácidos nucleicos, contribui para sua cito e fotocitotoxicidade (Sinha & Kumar, 2009; Bhowmik *et al.*, 2012).

Todos estes fatos reforçam a importância de continuar com os estudos para a prospecção químico-farmacológica de fotossensibilizadores naturais em espécies vegetais visando possível aplicação em PDT.

4.1.2. Substância isolada de *Indigofera truxillensis*

Foi identificada a substância, IT1 (16 mg) no estudo fitoquímico do extrato metanólico de *I. truxillensis*, com auxílio de dados espectroscópicos (RMN 1D e 2D) e espectrometria de massas, cujos dados encontram-se nos ANEXOS.

4.1.2.1. Substância IT1: Índigo ($C_{16}H_{10}N_2O_2$), massa molecular 262,07.

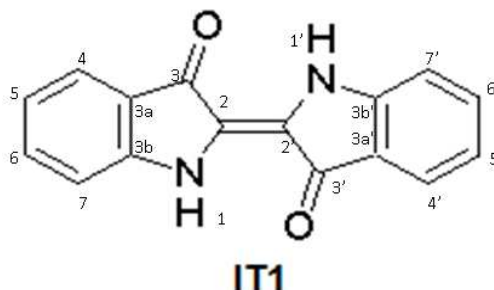


Figura 23. Fórmula estrutural da substância Índigo (IT1).

Trata-se de um sólido cristalino de coloração azul anil intensa, sendo que sua massa molecular, 262,07 ($C_{16}H_{10}N_2O_2$), foi determinada com base nos espectros de RMN de ^1H , análises por gHSBC e gHMBC e espectros de massas (Anexo 86-92). Nos espectros de massa no modo positivo observou-se a presença do íon molecular $[M + H]^+ = 263,08$.

As análises do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, Tabela 12) revelaram a presença de quatro sinais de hidrogênios, compatíveis com sinais de hidrogênios de anéis aromáticos do sistema bis-indólico: H-4 e H-4' (δ 7,50/ 1H, dt, $J = 7,9$ e $0,7$ Hz), H-5 e H5' (δ 7,06/ 1H, ddd, $J = 7,5$ 7,5 e $0,9$ Hz), H-6 e H6' (δ 7,58/ 1H, ddd, $J = 1,4$; 7,8 e 7,7 Hz) e em H-7 e H-7' (δ 6,91/ 1H, dt, $J = 7,5$ e $0,7$ Hz). Pelas análises de gHMBC e gHSBC confirmaram-se as correlações entre os átomos hidrogênio e carbono, que juntamente com dos dados de espectrometria de massas, foram coerentes com os dados espectrais de um alcaloide bis-indólico que, devido à simetria molecular, possui dois hidrogênios equivalentes de cada lado da molécula, ligados aos seus respectivos carbonos. Todos estes dados foram confirmados com análises comparativas dos dados espectrais de RMN (uni e bi-dimensionais) e de espectrometria de massas de amostra-padrão autêntica de índigo e estão coerentes com outros trabalhos já descritos na literatura (Faria-Silva *et al.*, 2007; Calvo *et al.*, 2009).

Tabela 12. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância IT1^a

Posição	^1H (δ) (mult., J em Hz) ^a	$g\text{HSQC}(^1\text{H}-^{13}\text{C})^{a,c}$	$g\text{HMBC}(^1\text{H}-^{13}\text{C})^{a,c}$
1			
2			
3			
3 ^a			
3b			
4	7,50 (1H, dt, 7,9 e 0,7)	124,2	138,3; 150,4
5	7,06 (1H, ddd, 7,5; 7,5 e 0,9)	122,4	112,0; 117,7
6	7,58 (1H, ddd, 1,4; 7,8 e 7,7)	138,0	124,6; 150,7
7	6,91 (1H, dt, 7,5; 0,7)	112,0	117,7; 122,7

^aAnálise realizada a 400 MHz para ^1H e 200 MHz para C^{13} em $\text{DMSO}-d_6$. TMS foi utilizado como padrão interno. ^b Multiplicidades pelos espectros de $g\text{HSQC}$ $g\text{HBMC}$. ^c Átomos de carbonos que mostraram correlação com os respectivos hidrogênios. (δ) Deslocamento químico em ppm. (J) Constante de acoplamento.

Este alcaloide pertence à classe indólica (bis-indólico, pois são duas unidades indólicas ligadas), que possui mais 4100 moléculas já descritas em literatura, sendo uma das maiores classes, correspondendo a 25% de todos os alcaloides conhecidos (Seigler *et al.*, 2001). Muitos deles possuem atividade biológica significativa e alguns deles são usados na medicina.

O alcaloide índigo (IT1) é um dos corantes mais antigos e mais populares conhecido pelo homem. Seu uso remonta as civilizações egípcia e romana e continua até os dias de hoje (de pinturas a óleo até de tecidos de vestuário, como do famoso jeans). A alta estabilidade da molécula explica sua longevidade como corante.

Os derivados do índigo são geralmente insolúveis em água na sua forma oxidada colorida. A característica comum destes corantes é a presença de um ou mais grupos carbonila, que, quando tratados com agente de redução na presença de uma base, formam uma espécie solúvel em água denomina espécie *leuco*. Esta é a forma utilizada nos processos de tinturaria (Gandra *et al.*, 2006).

Enquanto agente terapêutico, para o alcaloide índigo, já foram descritas propriedades como antioxidante e de seu consequente efeito preventivo contra o dano no DNA, causado pelo etanol na mucosa gástrica (Faria-Silva *et al.*, 2007), assim como atividade anti-inflamatória (comunicação pessoal, Profa Dra. Alba. R. M. S. Brito) e antinoceptiva (comunicação pessoal, Dr. Ricardo José Dunder).

Outro alcaloide bis-indólico bastante frequente nas espécies do gênero *Indigofera* é indirubina (isômero do índigo). É uma substância intensamente empregada na medicina chinesa, sendo o principal constituinte do fitoterápico chinês Danggui Longhui Wan, utilizado no tratamento de infecções virais (Mak *et al.*, 2004), doenças inflamatórias do sistema respiratório (Kunikata *et al.*, 2000) e contra doenças crônicas, tais como leucemia (Wu, Yang, Zhu, 1979; Wu *et al.*, 1980; Christina *et al.*, 2003). Acredita-se que as propriedades antitumorais deste alcaloide estão relacionadas com sua atividade antimetabólica. Além disso, também já foi descrito seu potencial como inibidor de ciclinas dependentes de quinases, responsáveis pelo controle do ciclo celular (Leclerc *et al.*, 2001).

Em relação ao seu uso na PDT alguns compostos com núcleo indólico, tais como o ácido indol- 3- acético e a indocianina verde, já foram avaliados no tratamento contra *Acne vulgaris* (Jang *et al.*, 2011; Na *et al.*, 2011). A indocianina verde já vem sendo estudada enquanto fotossensibilizador para o tratamento do câncer, em estudos com células de melanoma murino e com células escamosas do câncer de boca (Lim & Oh, 2011 Radzi *et al.*, 2012) e também como substância fluorescente no auxílio de diagnósticos para detecção do câncer (Aoyama *et al.*, 2011).

Estes fatos encorajam a continuidade dos estudos para isolamento de outros alcaloides indólicos de espécies vegetais, que possam apresentar características fotossensibilizantes, bem

como a avaliação do efeito biológico fotoinduzido por estes produtos naturais, visando possível aplicação em PDT.

4.2. Estudo fotofísico e fotoquímico

4.2.1. Estudos espectroscópicos no estado estacionário

O material vegetal, de ambas as espécies em estudo, foi submetido a processo de extração, de tal forma a separar e concentrar pigmentos fotossensibilizantes naturalmente presentes, tais como a clorofila e carotenoides, com solvente de menor polaridade (hexano), uma vez que não se desejava isolar tais compostos ou que eles interferissem na caracterização espectroscópica das demais amostras-teste. No caso de *G. blepharophylla* utilizou-se a casca, parte da planta que normalmente apresenta baixa ou nenhuma quantidade de clorofila. Além disso, os extratos brutos foram submetidos a processos de fracionamento que concentram os pigmentos em algumas frações, minimizando sua presença em outras, como é o caso da extração ácido-básica.

Assim, uma vez que a definição de uma substância enquanto fotossensibilizador baseia-se na investigação de seus parâmetros fotofísicos em solução homogênea, nesta segunda etapa do trabalho, foram realizados estudos das propriedades espectroscópicas no estado estacionário das amostras em meio orgânico (DMSO) a partir de medidas diretas dos espectros de absorção e emissão de fluorescência.

O perfil de absorção e fluorescência dos extratos brutos, frações e substâncias puras de ambas as espécies podem ser visualizados nas Figuras 24-40. Apesar de haver absorção em comprimentos de onda menores que 400 nm, para os extratos brutos e frações, estes não

foram representados, pois mesmo em baixas concentrações, observa-se uma saturação do leitor na região do UV e desaparecimento das absorções na faixa do visível. Assim, várias concentrações foram avaliadas, escolhendo-se aquelas em que a absorção em torno de 600-800 nm não fosse maior que 0,3. Os resultados foram então normalizados para apresentação gráfica.

4.2.1.1. Extratos, frações e substâncias isoladas de *Guatteria blepharophylla*

Para os extratos e frações de *G. blepharophylla*, de maneira geral, observa-se que GBCH apresentou pico de absorção em 660nm e ombro a 418 nm, enquanto que GBCM apenas exibiu leves ombros em 418 e 660 nm. Já nas frações, oriundas deste extrato, nota-se em GBFA um pico bastante claro em 455 nm e leve ombro entre 600-700 nm, enquanto que em GBFN, somente ombros nos mesmos comprimentos de onda de GBFA. Este perfil absorptivo das frações sugere maior acúmulo das substâncias com absorção na faixa do visível em GBFA. A absorção na região do vermelho (600-700 nm), apresentada por todas estas amostras, pode ser resultado da partição de um mesmo composto entre elas, mas que se acumula majoritariamente no extrato hexânico (visto a maior clareza e intensidade do pico nesta amostra), mas não descarta a possibilidade de ser uma substância diferente presente em GBCM e acumulada em GBFA.

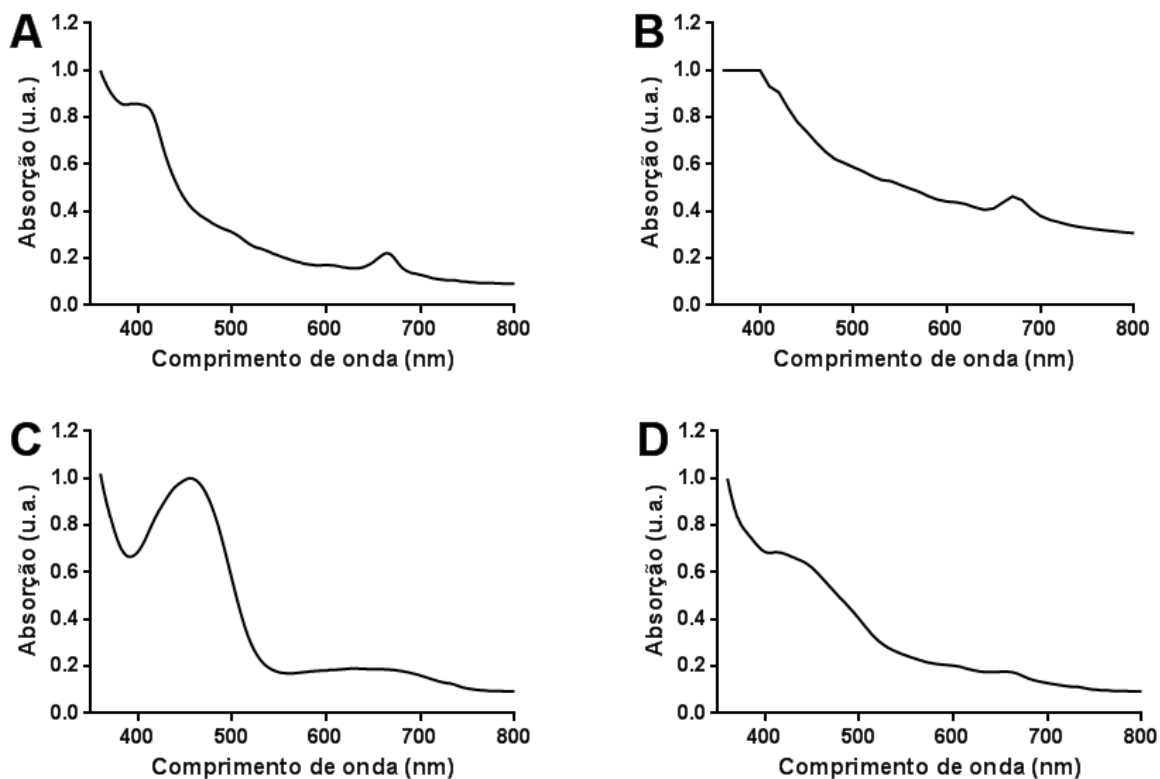


Figura 24. Espectros de absorção normalizados dos extratos e frações de *G. blepharophylla*, GBCH, 0,5 mg/mL (A), GBCM, 0,5 mg/mL (B), GBFA, 0,3 mg/mL (C) e GBFN, 0,3 mg/mL (D).

A excitação dos extratos e frações nos comprimento de onda correspondentes ao perfil de absorção forneceu os perfis de emissão de fluorescência das amostras que podem ser visualizados na Figura 25. De modo geral GBCM, GBFA e GBFN exibiram picos de emissão máximos em 560 nm, sendo que o extrato metanólico também apresentou um pico adicional em 670 nm. Já o extrato hexânico apresentou picos de emissão em 480 e 530 nm.

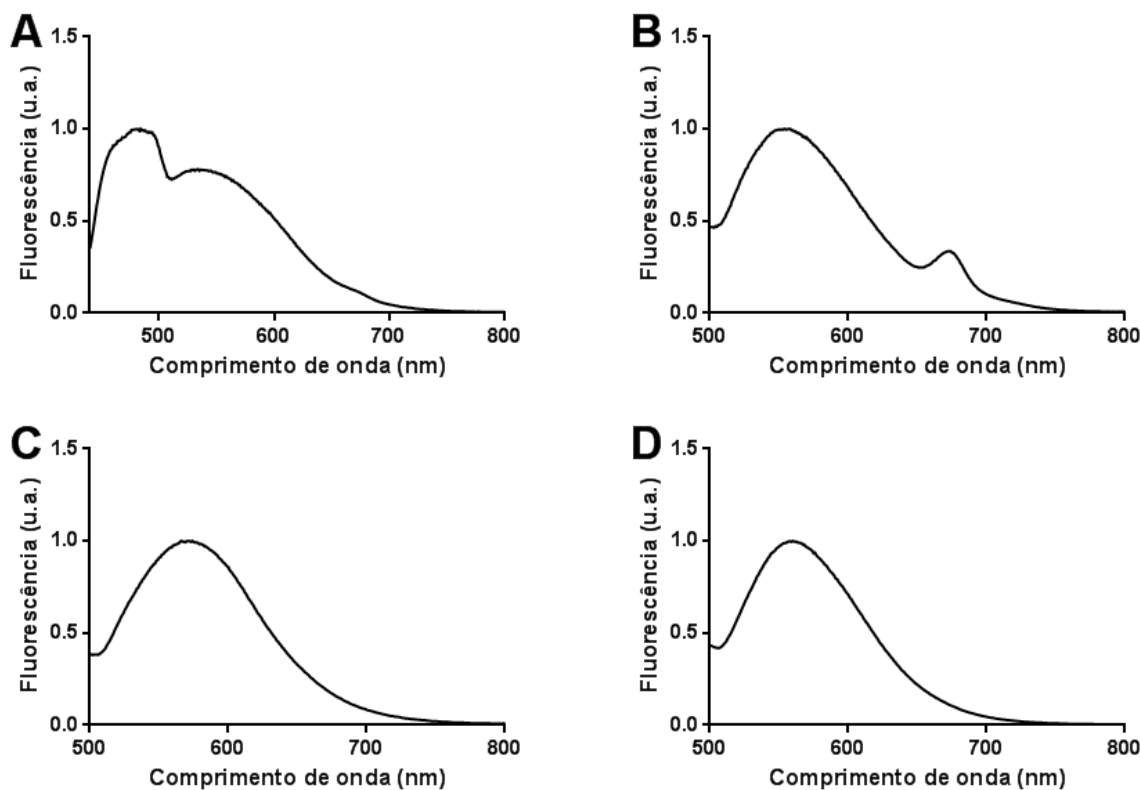


Figura 25. Espectros de emissão de fluorescência normalizados dos extratos e frações de *G. blepharophylla*, GBCH, 0,5 mg/mL (A), GBCM, 0,5 mg/mL (B), GBFA, 0,3 mg/mL (C) e GBFN, 0,3 mg/mL (D). Excitação em 418 nm para GBCH, 470 nm para GBCM e 455 nm para GBFA e GBFN.

Quanto às substâncias isoladas de *G. blepharophylla*, em relação a GB1 obteve-se espectros de absorção e fluorescência tanto de sua forma sodiada (azul) como de sua forma não sodiada (vermelha) constatando-se diferenças consideráveis no perfil de absorção entre elas. Na Figura 26 encontram-se os espectros de absorção de espécies não agregadas deste composto, sendo que na forma sodiada (Figura 26A) há picos em 660 e 320 nm e leves ombros em 287, 380 e 470 nm. Já na forma não sodiada (Figura 26B) os picos máximos de absorção passam a ser em comprimentos de onda menores (205, 281 e 470 nm) e leves ombros em 320 e em 620 nm.

A presença do sódio, apesar de não estar ligado à molécula quimicamente (covalente ou ionicamente), mas apenas complexado, é suficiente para causar uma alteração na sua configuração eletrônica, resultando, quando presente em um deslocamento batocrômico (deslocamento da absorção para comprimento de onda com maior valor), como no caso da sua forma sodiada que absorve na região do vermelho e emite azul (inclusive é a cor do pó seco) ou em um deslocamento hipsocrômico (deslocamento da absorção para comprimento de onda com menor valor) quando ausente, como no caso da forma não sodiada, que absorve no verde e emite na região do laranja-avermelhado.

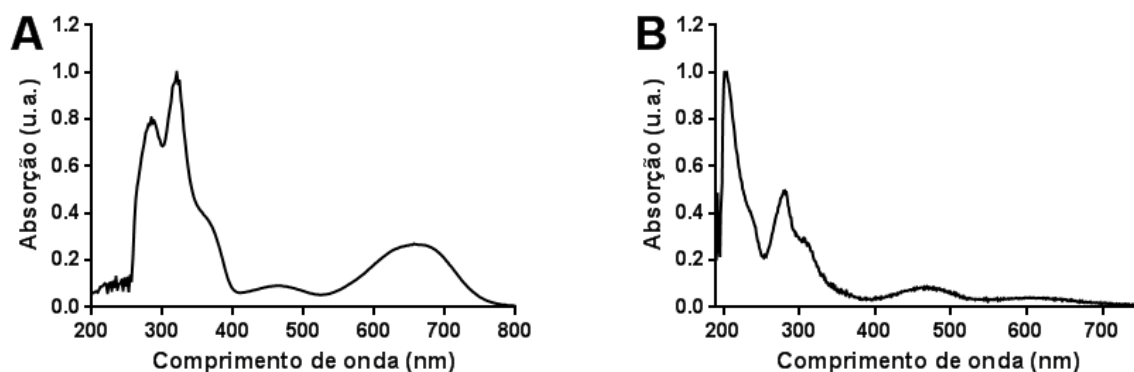


Figura 26. Espectros de absorção normalizados da substância GB1 (5 μ M) na sua forma sodiada, coloração azul (A) e não sodiada, coloração vermelha (B).

A determinação dos espectros de absorção em diferentes concentrações (Figura 27) nos permitiu calcular o coeficiente de extinção molar (ϵ) da GB1 nas duas formas quando solubilizadas em DMSO. Este parâmetro descreve a capacidade (o quão fortemente) de 1 mol de substância tem em absorver luz em um determinado comprimento de onda. Trata-se de uma propriedade intrínseca de um composto, em um determinado solvente, em que a absorbância real dele, A , é dependente do comprimento da trajetória da luz por ele, ℓ

(caminho óptico, 1cm), e da sua concentração, c , por meio da lei de Beer-Lambert: $A = \varepsilon cl$.

Este valor auxilia a verificar a solubilidade da amostra.

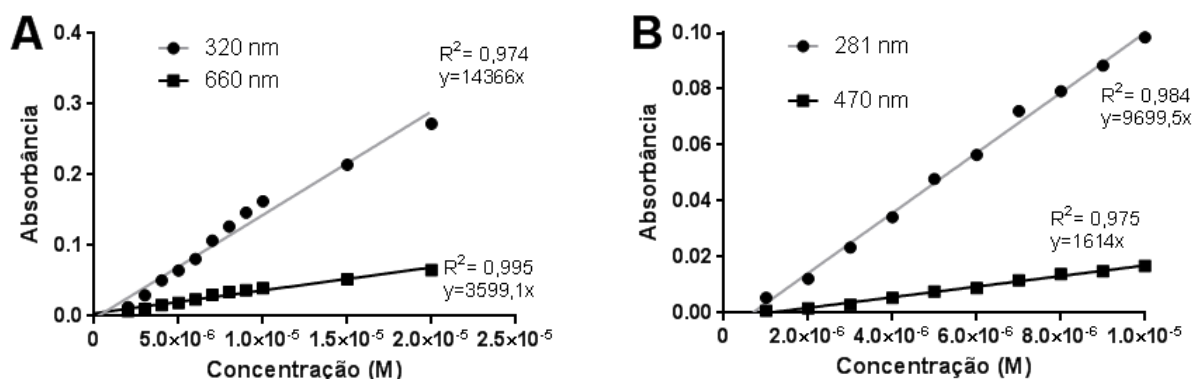


Figura 27. Absorbância em função da concentração da substância GB1 sodiada (A) para os picos de absorção em 320 e 660nm (2-20 μ M) e não sodiada (B), para picos de absorção em 281 e 470 nm (1-10 μ M), ambas solubilizadas em DMSO.

Para GB1 sodiada (Figura 27A), nos picos de 320 e 660 nm os coeficiente de absorção molar foram iguais a $14366 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e $3599,1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, respectivamente. Já para forma não sodiada (Figura 27B), além da alteração dos picos de absorção para comprimentos de ondas menores, a capacidade absorptiva também foi menor, exibindo coeficientes iguais a $9699,5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e $1614 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, para os picos em 281 e 470 nm, respectivamente.

A fluorescência da GB1 foi avaliada excitando à forma sodiada em 320 e 470 nm e a forma não sodiada somente em 470 nm. Nos comprimentos de onda em torno de 600 nm não foi detectado sinal de emissão de fluorescência para ambas as formas. A emissão de GB1 sodiada sob excitação à 320 nm exibiu máximo em 400 nm (espectros não apresentados), enquanto a excitação de ambas as formas em 470 nm resultou em emissão de fluorescência em torno de 540 nm (Figura 28).

Acredita-se que a fluorescência emitida por GB1 sodiado quando excitado neste comprimento de onda seria resultado da excitação da forma não sodiada que também estaria presente na solução da forma sodiada solubilizada em DMSO. Isto poderia estar acontecendo caso o DMSO utilizado, mesmo que anidro, apresentasse uma pequena quantidade de água, possibilitando que a forma sodiada da molécula sofresse uma troca iônica liberando o sódio e ligando-se a um hidrogênio da água. Esta hipótese é suportada pela presença de um pequeno ombro em 470 nm observado no espectro de absorção da forma sodiada.

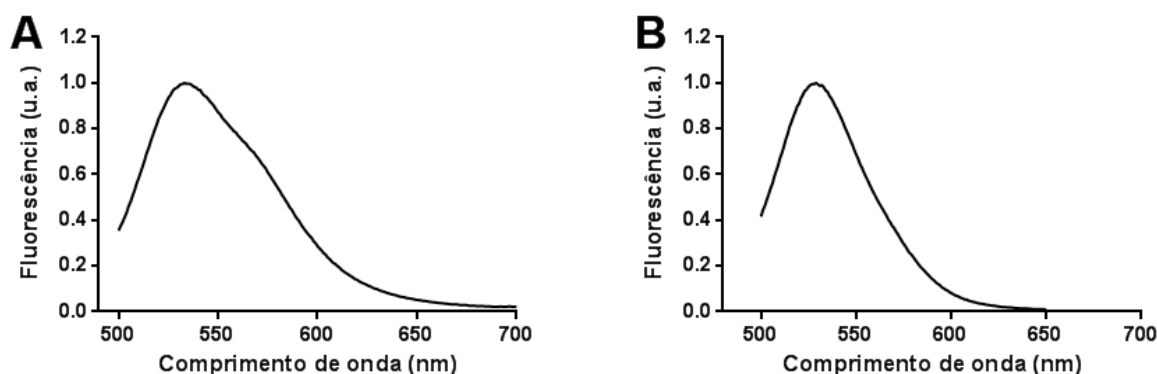


Figura 28. Espectros de emissão de fluorescência normalizados da substância GB1 (20 μ M) na sua forma sodiada (A) e na forma não sodiada (B). Excitação fixa em 470 nm.

As substâncias GB2, O-metilmoschatolina e GB3, liriodenina (Figura 31), apesar de apresentarem fórmula molecular e massas distintas, apresentaram perfis de absorção semelhantes. GB2 (Figura 29A) exibiu picos máximos em 272 e 435 nm, com absorvidade molar iguais a $8352 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e $1785,2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, respectivamente (Figura 29B), enquanto que para GB3, os picos de absorção foram em 280 e 420 nm (Figura 31A), e seus respectivos coeficientes de absorção molar iguais a $31610 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e $14069 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Figura 31B). Já os perfis de emissão de fluorescência dessas duas substâncias foram bastante distintos. A excitação de GB2 em 435 nm resultou em um pico de emissão de fluorescência bem definido,

com máximo em 560 nm (Figura 30), enquanto que a excitação de GB2 em 420 nm resultou em uma emissão mais fraca e com máximo em 470 nm (Figura 32).

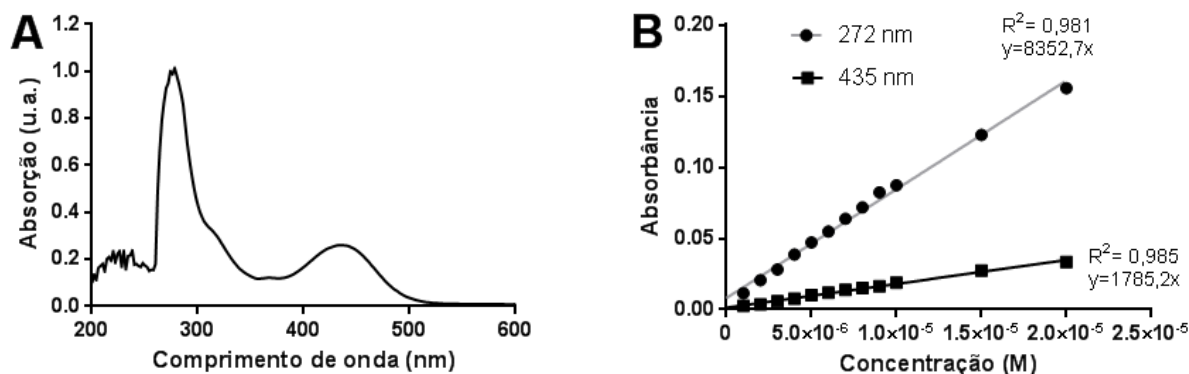


Figura 29. Espectro de absorção normalizado da substância GB2 (5 μ M) (A) e absorbância em função da sua concentração para os picos de absorção em 272 e 435 nm (1-20 μ M) (B).

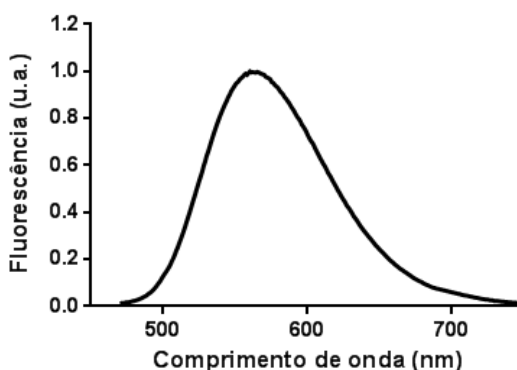


Figura 30. Espectro de emissão de fluorescência normalizado da substância GB2 (20 μ M). Excitação fixa em 435 nm.

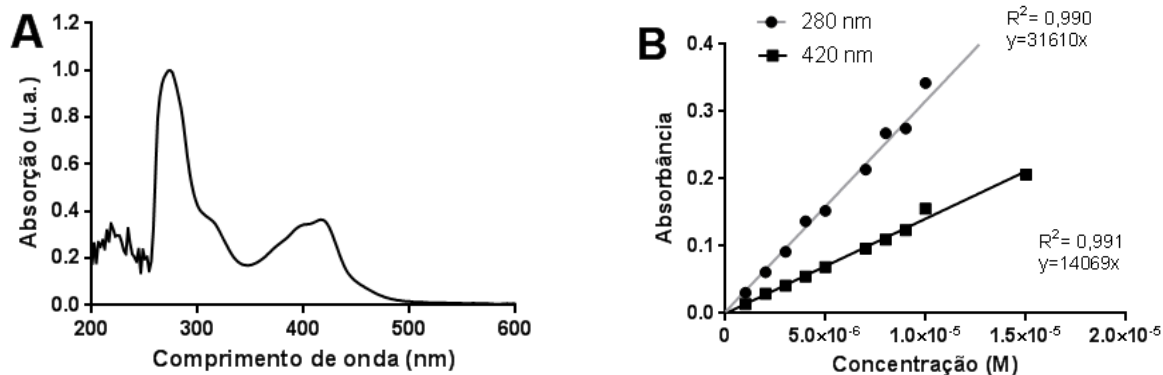


Figura 31. Espectro de absorção normalizado da substância GB3 (5 μM) (A) e absorbância em função da sua concentração para os picos de absorção em 280 e 420nm (1-15 μM) (B).

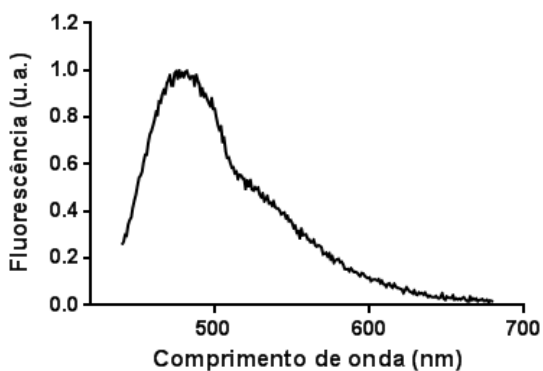


Figura 32. Espectros de emissão de fluorescência normalizado da substância GB3 (20 μM). Excitação fixa em 420 nm.

Já a substância GB4, subsessilina, (Figura 33A), também apresentou dois picos de absorção máxima, um a 280 nm, com coeficiente de absorção molar igual a $47696 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e outro a 480 nm, com coeficiente de absorção molar igual a $9827,4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Figura 33B). A excitação deste composto no comprimento de onda na faixa do visível, resultou em emissão de fluorescência com pico máximo em 606 nm (Figura 34).

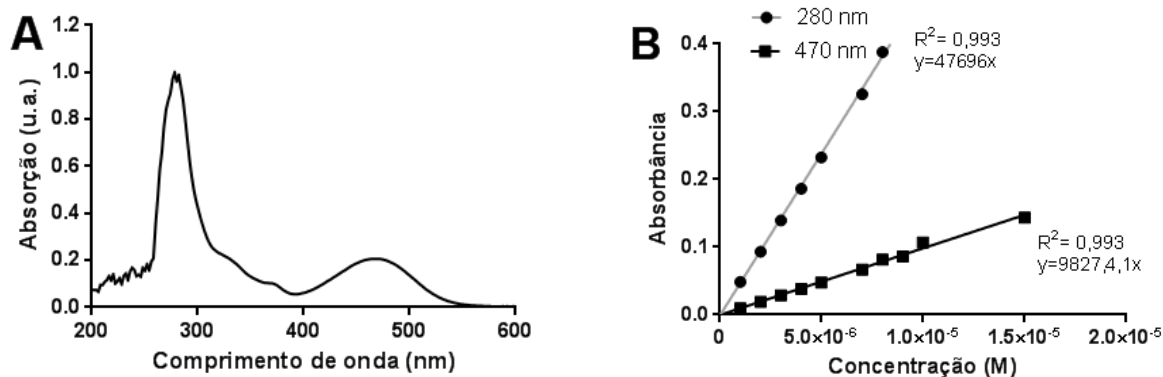


Figura 33. Espectros de absorção normalizado da substância GB4 (5 μM) (A) e absorbância em função da sua concentração para os picos de absorção em 280 e 470 nm (1-15 μM) (B).

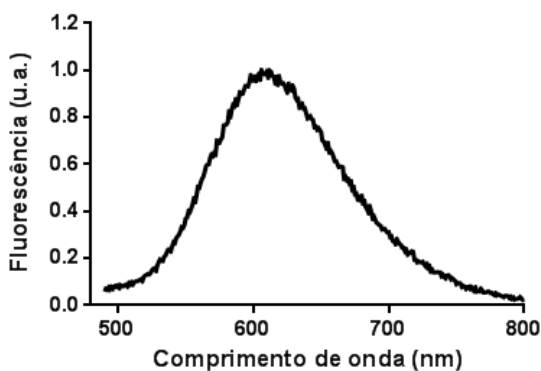


Figura 34. Espectros de emissão de fluorescência normalizado da substância GB4 (20 μM). Excitação fixa em 470 nm.

Para a substância GB5, lysicamina, não foi detectado picos de absorção na região do visível quando solubilizada em DMSO. O pico de maior absorção foi em 282 nm ($\epsilon = 101017 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), além de apresentar ombros em 325 ($\epsilon = 61430 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) e 256 nm (Figura 35 A e B). A excitação em 282 evidenciou fluorescência com máximo de emissão em 340 nm (Figura 35).

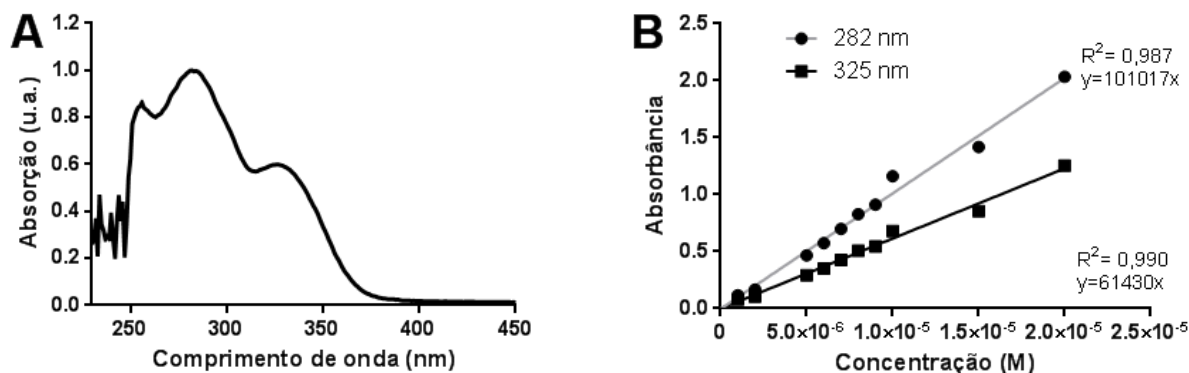


Figura 35. Espectros de absorção normalizado da substância GB5 (5 μ M) (A) e absorbância em função da sua concentração para os picos de absorção em 282 e 325 nm (1-20 μ M) (B).

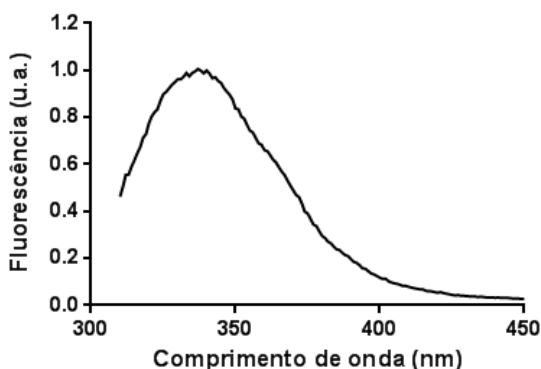


Figura 36. Espectros de emissão de fluorescência normalizado da substância GB5 (20 μ M). Excitação fixa em 470 nm.

Para todas as substâncias isoladas de *G. blepharophylla*, comparando-se os resultados de absorção com aqueles já descritos na literatura, observa-se que o perfil de absorção varia consideravelmente dependendo do solvente utilizado, sendo que em DMSO, de maneira geral, em relação a solventes mais polares, os picos de absorção deslocam-se para comprimento de onda maior (Guinaudeau *et al.*, 1975, 1979, 1983, 1988, 1994; Costa *et al.*, 2009 e 2011). Para algumas substâncias, como por exemplo GB1, o efeito solvente foi o mais evidente de

todos e visualmente verificável. Por exemplo, em DMSO a solução resultante apresentava coloração azul-esverdeada, em metanol, roxo-avermelhada e em etanol, vermelho-amarelada.

4.2.1.2. Extratos, frações e substâncias isoladas de *Indigofera truxillensis*

Todos os extratos e frações de *I. truxillensis* apresentaram um pico de absorção bem definido a 660 nm (Figura 37). ITPH também exibiu um pico em 418 nm e ombros em 500 e 700 nm. As demais amostras- testes também exibiram absorção em 418 nm, mas com picos definidos somente nas frações e com um ombro em ITPM, mascarado pela alta absortividade em comprimentos de onda menores. Os extratos e frações quando excitados a 418 nm apresentaram altas intensidades de fluorescência com emissão máxima a 670 nm. No entanto, quando excitados a 660 nm não foi detectada emissão de fluorescência.

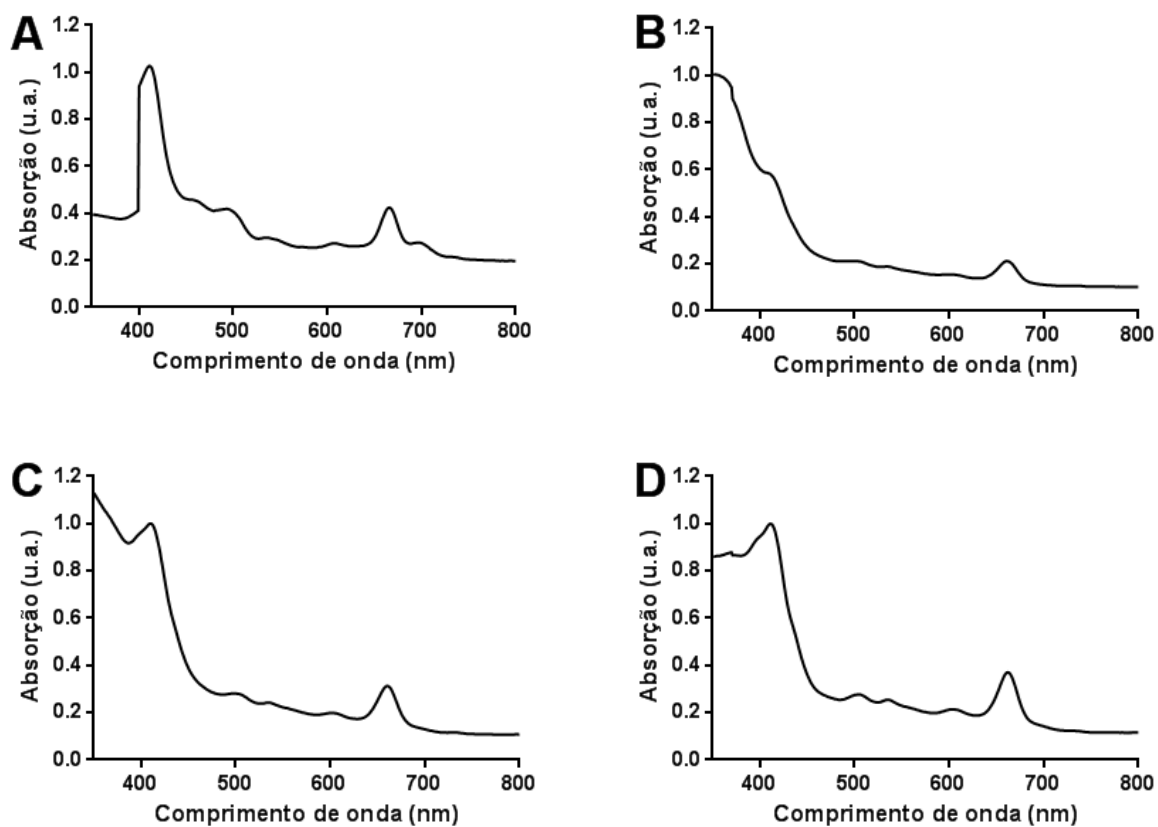


Figura 37. Espectros de absorção normalizado dos extratos e frações de *I. truxillensis*, ITPH, 0,5 mg/mL (A), ITPM, 0,5 mg/mL (B), ITFA, 0,3 mg/mL (C) e ITFN, 0,3 mg/mL (D).

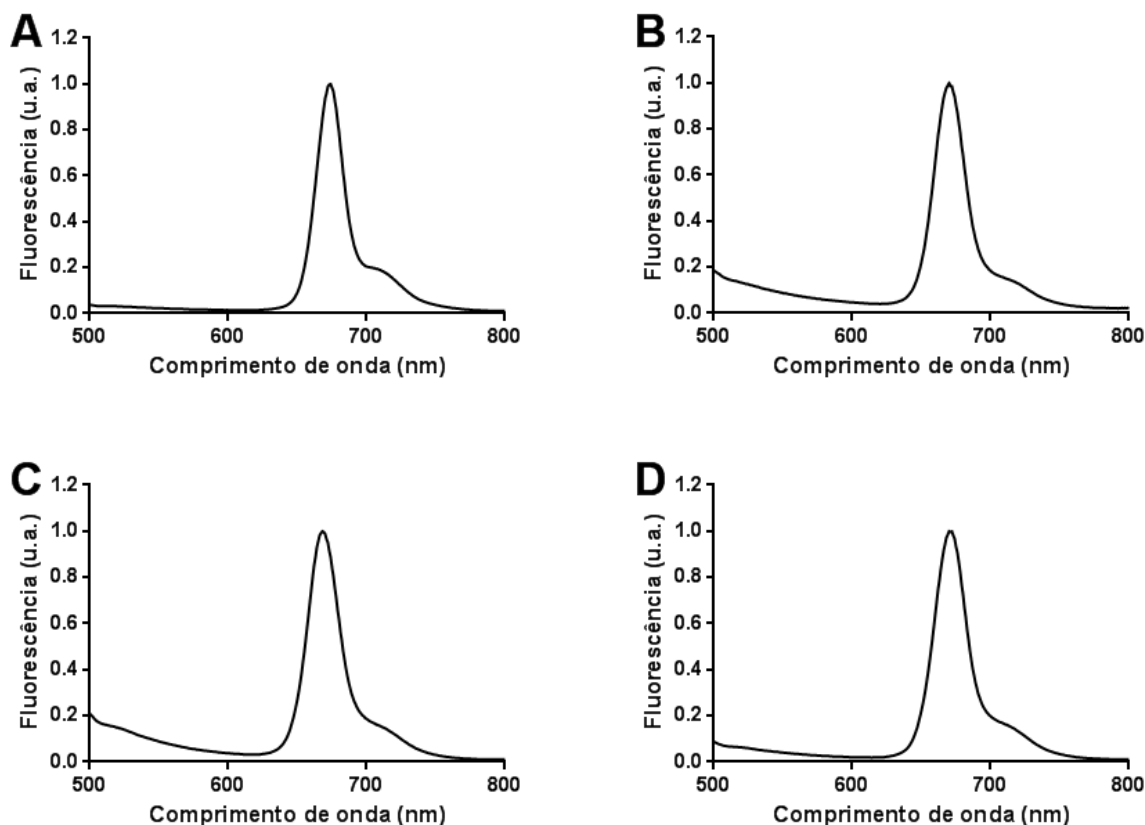


Figura 38. Espectros de emissão de fluorescência normalizado dos extratos e frações de *I. truxillensis*, ITPH, 0,5 mg/mL (A), ITPM, 0,5 mg/mL (B), ITFA, 0,3 mg/mL (C) e ITFN, 0,3 mg/mL (D). Excitação fixa em 418 nm.

De modo geral, os extratos e frações de ambas as espécies apresentaram pico de absorção na região entre 600-800 nm, indicando a possível existência de compostos que podem absorver nesta região. A excitação em 660 nm não revelou emissão de fluorescência, mas não exclui a possibilidade de tais compostos isolados emitirem.

Cabe lembrar que, como extratos e frações são misturas de várias substâncias em concentrações desconhecidas e, a intensidade de fluorescência é proporcional à concentração do fluoróforo somente em soluções muito diluídas, mesmo que tais compostos estejam em concentração suficiente para fluorescer, a existência de outras moléculas na solução comprometem a incidência da luz diminuindo a eficiência quântica resultando na supressão de

fluorescência como um todo. Por fim, em relação à sua matriz, o perfil de absorção da substância IT1, alcaloide índigo revelou um deslocamento dos picos principais com valores de comprimento de onda menores, com máximos a 290 e 620 nm. A excitação deste composto neste último comprimento de onda de absorção revelou a emissão de fluorescência com o máximo a 670nm.

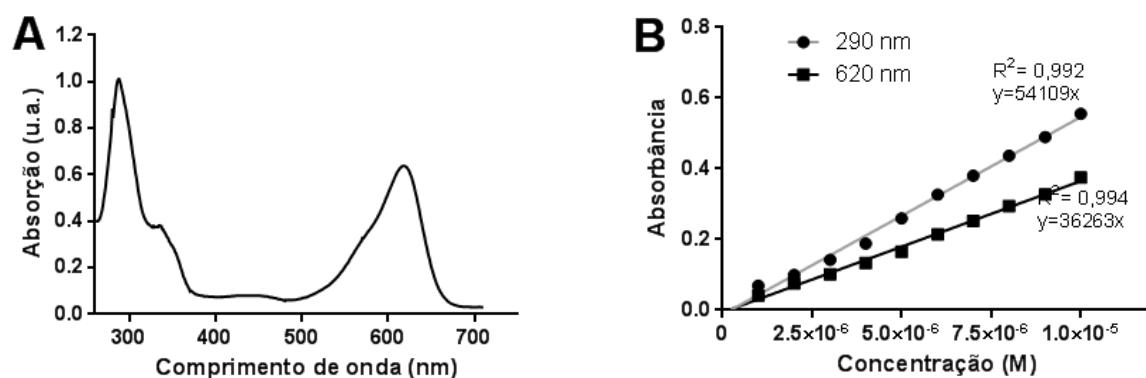


Figura 39. Espectro de absorção normalizado da substância IT1 (5 μM) (A) e absorbância em função da sua concentração para os picos de absorção em 290 e 620nm (2-10 μM) (B).

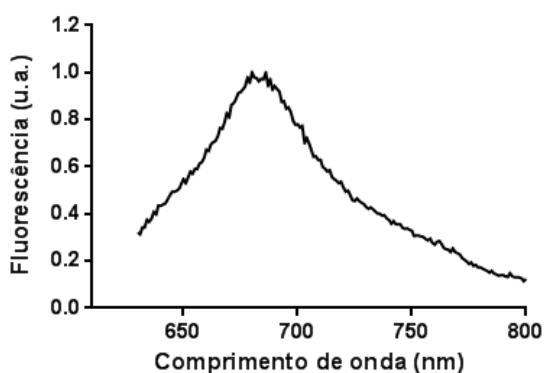


Figura 40. Espectros de emissão de fluorescência normalizado da substância IT1 (5 μM). Excitação fixa em 620 nm.

4.2.2. Avaliação da formação de Oxigênio Singlete (Ensaio 1,3 DPBF)

A capacidade dos extratos brutos e frações em gerar oxigênio singlete (fotossensibilizadores com reação tipo II) foi avaliado qualitativamente através do acompanhamento da fotodecomposição do 1,3-difenilisobenzofurano

Os resultados deste monitoramento fotoquímico permitiram selecionar aqueles extratos, frações com potencial para presença de fotossensibilizadores ou para uso como agente fotossensibilizante. Os ensaios de absorção e fluorescência evidenciaram duas substâncias com picos de absorção entre 600 e 700 nm, GB1 e IT1, que também foram submetidas ao mesmo teste fotoquímico com o 1,3-DPBF. Os extratos brutos, frações e substâncias puras foram avaliados nas mesmas concentrações em que os espectros de absorção foram adquiridos.

Os resultados podem ser observados nas Figuras 41-42 sendo que, para todas as amostras-teste, na ausência de irradiação, não houve variação significativa na absorção do furano e, na presença de irradiação, a diminuição na absorção da sonda, indicou a produção do oxigênio singlete. Como a redução na absorção desta sonda seria proporcional a produção do oxigênio singlete supõe-se que quanto maior ela é, maior seria produção do radical pela amostra-teste em questão (Alves et al., 2009)

A Figura 41 ilustra a redução da absorção de 1,3-DPBF nas condições de escuro e luz, na presença dos extratos brutos, frações e GB1. Nota-se que houve uma diminuição rápida e imediata na absorção de 1,3-DPBF após 60 s de iluminação para maioria das amostras, indicando produção de oxigênio singlete.. A maior redução na absorção do 1,3- DPBF, sob irradiação (600 s), em relação ao controle não irradiado, foi observada para GBFA e igual a 30,1% (Figura 41C). Os extratos apresentaram reduções um pouco menores, 28,7% para o

GBCH (Figura 41A) e 24,9% GBCM (Figura 41B). Por fim, GBFN apresentou redução muito baixa igual a 4,7%. Os valores encontrados para GBFA indicam um provável acúmulo de substâncias pro-oxidativas nesta fração, o que justifica sua escolha para subseqüentes fracionamentos e detalhamento fotoquímico. Para o alcaloide GB1, observou-se uma rápida diminuição na absorbância do furano após 120 s de irradiação. Assim como para os extratos, na ausência de luz, não houve redução na absorção. Após 600 s de irradiação, o decaimento total foi igual a 40,2%, maior que aquele apresentado por suas matrizes de origem.

Para as amostras da espécie *I. truxillensis*, todos os extratos e frações apresentaram reduções muito pequenas na absorção do 1,3-DPBF sob irradiação ao longo do tempo (Figura 42), o que indicaria baixa produção de oxigênio singlete. ITPH e ITPM apresentaram diminuição de 7,6% e 14,44% respectivamente. Para as frações, as reduções foram ainda menores e iguais a 5,9% e 10% para ITFA e ITFN, respectivamente e para o alcaloide indigo igual a 5%.

A triagem inicial dos extratos e frações evidenciou que ambos os extratos brutos de *G. blepharophylla*, GBCH e GBCM, como a sua fração alcaloídica, GBFA podiam conter substâncias com propriedades fotooxidativas. O estudo fitoquímico de GBFA resultou no isolamento de 5 substâncias. Somente a substância GB1 foi avaliada, uma vez que foi a única a apresentar pico de absorção em 660 nm, compatível com o comprimento do *laser* utilizado como fonte de irradiação e ideal para aplicação em PDT (janela terapêutica). Para este composto, por sua vez evidenciou produção de oxigênio singlete sob condições de irradiação e, portanto, ocorrência de mecanismo do tipo II na sua ação fotossensibilizante.

Para as todas as amostras oriundas de *I. truxillensis*, observou-se baixa redução da absorção do furano após 600s de irradiação, o que indica baixa produção de oxigênio singlete. A pequena produção deste radical por estas amostras-teste não exclui em definitivo a presença

de substâncias fotossensíveis que podem estar presentes em concentrações muito baixas e insuficientes para apresentar efeito fotoquímico ou em concentrações muito altas que resultam na supressão de sua fluorescência e conversão para estados excitados tripleto. Para o alcaloide IT, o decaimento insignificante na absorção do 1,3-DPBF, igualmente indica apresenta baixa ou nenhuma produção de oxigênio singleto. Isto não impediu a realização dos ensaios biológicos, uma vez que tal composto poderia majoritariamente pelo mecanismo do tipo 1.

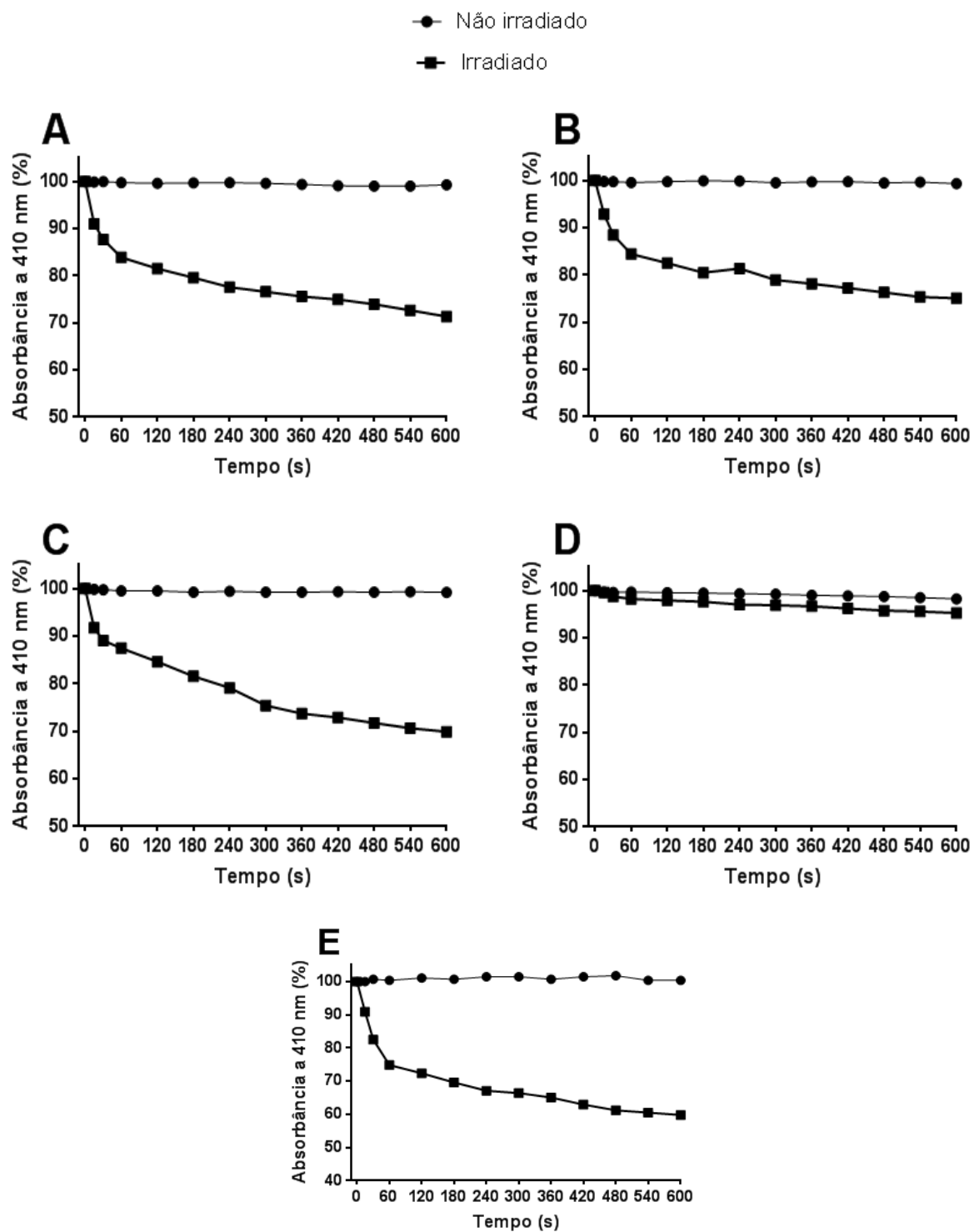


Figura 41. Produção de oxigênio singlete de GBCH (A), GBCM (B), GBFA (C), GBFN (D) e GB1 (E), oriundos de *G. blepharophylla* na presença de 1,3-DPBF, (●) não irradiado e (■) irradiado. Os extratos foram avaliados a 0,5 mg/mL, frações a 0,3 mg/mL e GB1 a 20 µM.

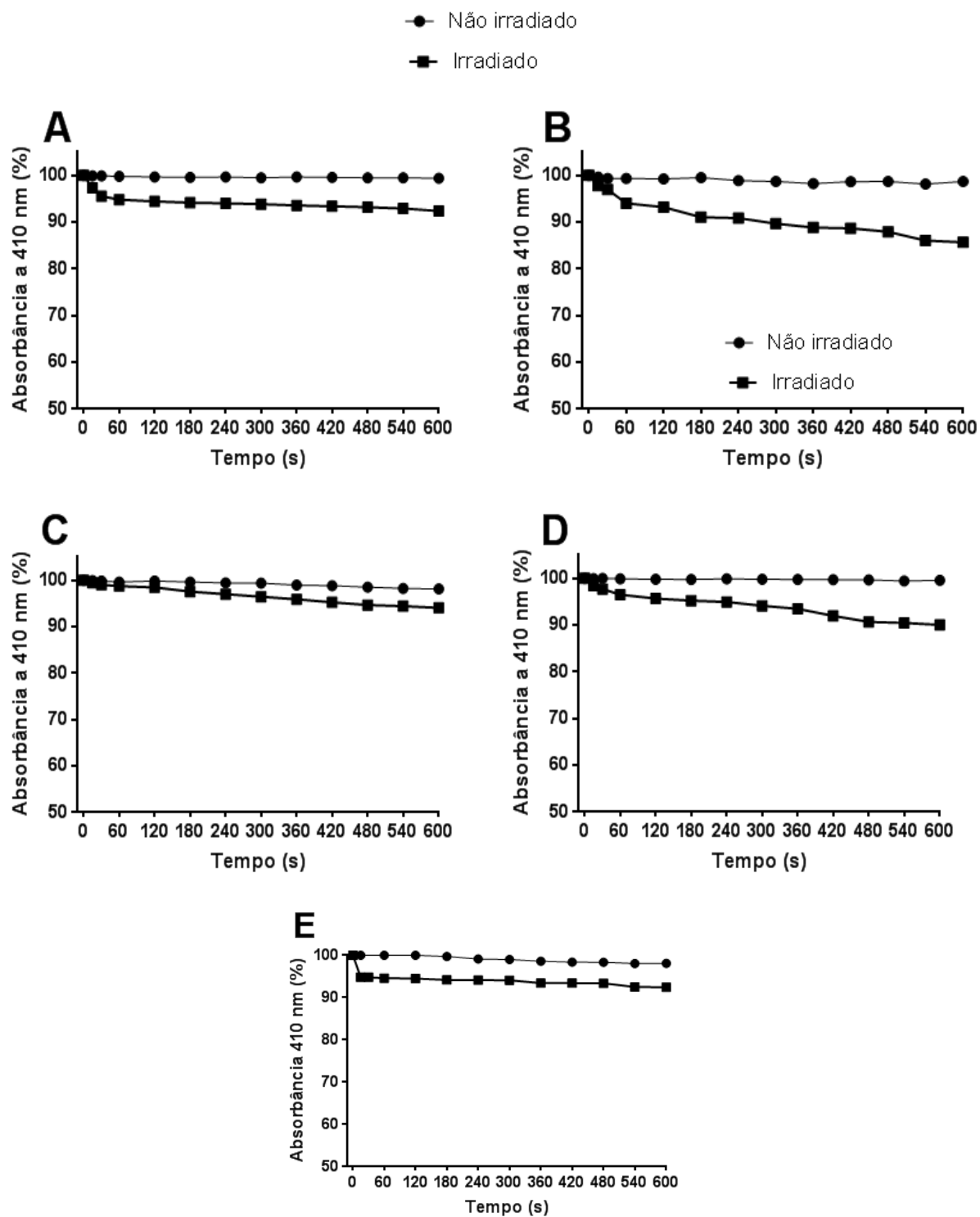


Figura 42. Produção de oxigênio singlete de ITPH (A), ITPM (B), ITFA (C) e ITFN (D) e IT1 (E), oriundos de *I. truxillensis* na presença de 1,3-DPBF, (●) não irradiado e (■) irradiado. Os extratos foram avaliados a 0,5 mg/mL, frações a 0,3 mg/mL e IT1 a 5 μ M.

4.2.3. Avaliação da atividade fotodinâmica pelos mecanismos fotoquímicos do tipo I ou tipo II em modelo biológico in vitro

Embora a PDT antimicrobiana já tenha sido descrita a mais de um século, o mecanismo de ação pela qual ela age ainda não foi completamente elucidado (Robertson, Evans, Abrahamse, 2009). Além disso, cada fotossensibilizador pode apresentar características fotoquímicas distintas e específicas, que resultam na inativação microbiana.

Neste contexto, o objetivo deste ensaio foi determinar qual dos mecanismos, tipo I ou tipo II prevalece na ação fotooxidativa das substâncias GB1 e IT1, utilizando modelo biológico bacteriano e comparar os resultados obtidos com aqueles observados no teste com o 1,3-DPBF.

Os resultados obtidos com as amostras controle confirmaram que a sobrevivência da bactéria indicadora não é afetada quando submetida somente à irradiação na densidade de energia de 28 J/cm^2 , e nem quando incubadas no escuro somente com as amostras-teste ou com o diluente. Os controles experimentais com os supressores foram realizados, sendo avaliado o efeito dos supressores na concentração teste frente à cepa indicadora na ausência dos alcaloides, em ensaio com e sem irradiação *laser*, não se verificando alteração no desenvolvimento microbiano. Além disso, a incubação de *S. epidermidis* ATCC 12228 com as amostras-teste, na presença dos supressores sem iluminação, também não teve efeito no desenvolvimento desta cepa indicadora (todos estes resultados não foram apresentados graficamente).

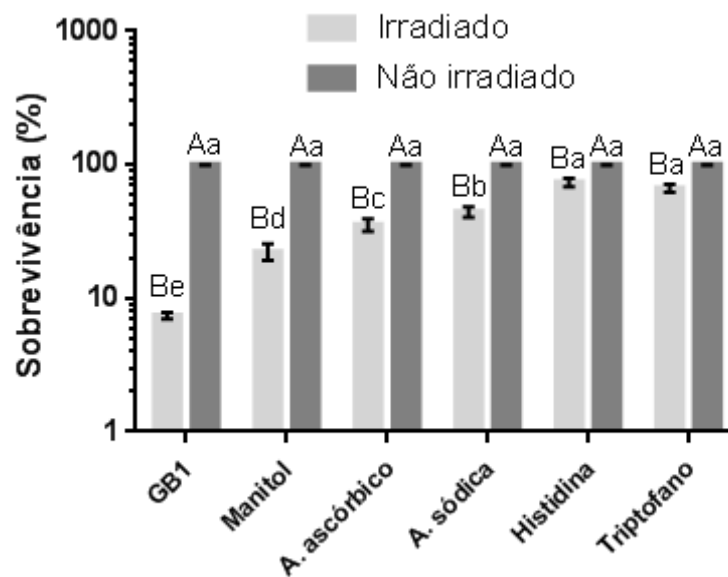


Figura 43. Efeito de supressores de espécies excitadas e antioxidantes para avaliação da prevalência dos mecanismos do tipo I ou II na inativação fotodinâmica de *S. epidermidis* ATCC 12228 pela substância GB1 a 50 μ M. A bactéria foi incubada com o alcalóide sozinho ou com o alcalóide e as seguintes substâncias: manitol (10 mM), ácido ascórbico (30 mM), histidina (10 mM), azida de sódio (1 mM) ou triptofano (10 mM) sob irradiação (■, 28 J/cm², laser diodo InGaAlP, λ = 660 nm) e ausência de irradiação (□). Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre a condição irradiada e não irradiada para uma mesma amostra- teste (teste t, $p < 0,05$) e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre as diferentes amostras- teste na condição irradiada ou não irradiada (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão de oito repetições.

Para o alcaloide isolado de *G. blepharophylla*, GB1 (Figura 43), todos os tratamentos com os supressores aumentaram significativamente a porcentagem de sobrevivência de *S. epidermidis* ATCC 1228 após a irradiação, indicando a possível ocorrência dos dois mecanismos de ação fotoquímica na ação biocida desta substância. Notou-se ainda, a prevalência do mecanismo tipo II, considerando-se que os resultados de sobrevivência bacteriana obtidos nos tratamentos com as substâncias supressoras histidina e azida sódica (específicos de espécies reativas originadas pelo mecanismo do tipo II, ou seja, oxigênio singlete) foram maiores que para os demais supressores utilizados. Por exemplo, a presença

de histidina aumentou a porcentagem de sobrevivência da bactéria indicadora de 7,2% (tratamento com GB1, sem supressor) para 73,7%.

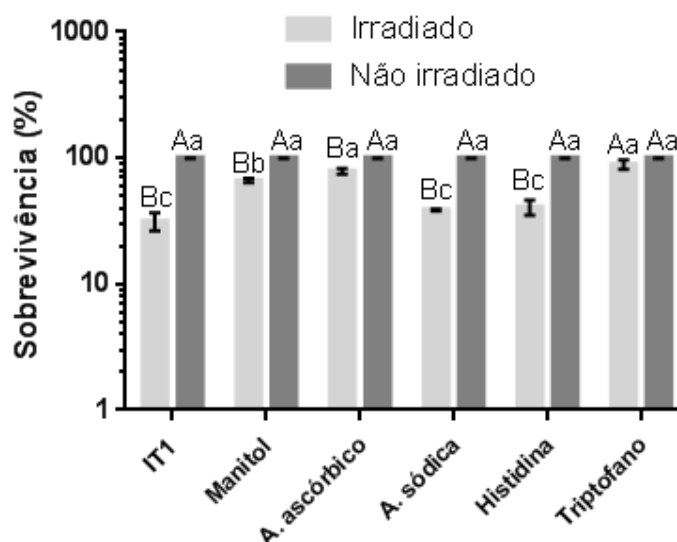


Figura 44. Efeito de supressores de espécies excitadas e antioxidantes para avaliação da prevalência dos mecanismos do tipo I ou II na inativação fotodinâmica de *S. epidermidis* ATCC 12228 pela substância IT1 a 120 μ M. A bactéria foi incubada com o alcalóide sozinho ou com o alcalóide e as seguintes substâncias: manitol (10 mM), ácido ascórbico (30 mM), histidina (10 mM), azida de sódio (1 mM) ou triptofano (10 mM) sob irradiação (■, 28 J/cm², laser diodo InGaAlP, λ = 660 nm) e ausência de irradiação (□). Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre a condição irradiada e não irradiada para uma mesma amostra- teste (teste t, $p < 0,05$) e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre as diferentes amostras- teste na condição irradiada ou não irradiada (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão de oito repetições.

Já na Figura 44, observou-se que a irradiação aumentou o efeito antibacteriano de IT1 e que este foi diminuído na presença de manitol e do ácido ascórbico, não sendo estatisticamente diferente para a adição de azida sódica e histidina. Assim, em oposição a GB1, para este alcaloide, os resultados indicaram uma maior predominância do mecanismo do tipo I, uma vez que estatisticamente, o aumento na sobrevivência bacteriana foi maior quando

tratada com os supressores do tipo I. Por exemplo, quando tratada com ácido ascórbico o aumento observado na sobrevivência microbiana em relação ao tratamento sem supressores e somente com o alcaloide sozinho foi de 31,50% para 78,36%.

De modo geral, a partir do estudo fotofísico no estado estacionário e fotoquímico dos extratos, frações e substâncias isoladas de ambas as espécies confirmou-se seu potencial enquanto agentes fotoativáveis. Para GB1 e IT1, os resultados obtidos nos ensaios com supressores mostraram-se coerentes com aqueles observados no teste de fotodecomposição do 1,3-DPBF, no qual houve uma redução significativa na sua absorção quando irradiado em presença do alcaloide oxoaporfínico, indicando alta produção de oxigênio singlete e predominância da reação do tipo II para GB1 e nenhuma diminuição significativa na absorbância do furano, quando irradiado junto com o alcaloide índigo, que se traduz em baixa produção do radical citotóxico, sugerindo prevalência do mecanismo do tipo I.

Sobre o alcaloide GB1, poucas informações são encontradas na literatura e majoritariamente focadas na sua elucidação estrutural (Atti *et al.*, 1982; Goulart *et al.*, 1986; Guinaudeau, Lebouf, Cavé, 1983, 1988; Fleischer, Waigh, Waterman, 1998; Osório *et al.*, 2006) e atividades biológicas (Costa *et al.*, 2009a), sendo que até o presente momento não foram encontradas publicações que explorassem suas características espectroscópicas relacionadas à formação de estados singlete, tripleto e produção de radicais livres e oxigênio singlete. Acredita-se que isto se deve tanto à escassez de estudos fitoquímicos com plantas que acumulam este alcaloide, como quanto à dificuldade de isolá-lo em quantidade suficiente para realização de estudos com diferentes abordagens científicas. Além disso, como são recentes os estudos de bioprospecção de metabólitos secundários vegetais como fotossensibilizadores para PDT (Kaskakova *et al.*, 2005, 2008; Su *et al.*, 2009; Huntsova *et al.*, 2009), a compreensão das propriedades fotofísicas e fotoquímicas de produtos naturais

também é recente, sendo encontrados estudos com poucas moléculas naturais documentados em literatura para esta este fim.

A confirmação do potencial aqui encontrado requer estudos mais detalhados a partir de técnicas de espectroscopia avançada que caracterizem com mais detalhes as propriedades fotofísicas e fotoquímicas deste composto, como por exemplo, ensaios que permitam a determinação dos rendimento quânticos de produção de espécies transientes tripletes (Φ_T) e do rendimento quântico de produção de oxigênio singlete (Φ_Δ).

Por outro lado para a substância IT1, já existem muitos trabalhos na literatura em relação a suas características espectroscópicas de absorção e fluorescência que datam da década de 50 e basicamente limitavam seu uso enquanto fotossensibilizador devido aos baixos rendimentos de estados tripletos obtidos. No entanto, trabalhos mais recentes têm documentado novas informações em relação a esta aplicabilidade. Em artigo publicado em 2004 (Seixa de Melo, Moura, Melo), trabalhando com as formas *ceto* (igual à isolada neste trabalho) e *leuco* desta substância e com três outros derivados em solução (DMF), verificou-se que para ambas as formas e derivados houve formação de espécies transientes tripletes, sendo que para forma *ceto*, uma vez excitada, a principal via de desativação envolve uma conversão interna (ver Figura 5) do estado excitado singlete mais baixo (S_1) para retornar ao estado fundamental (S_0). Isto ocorre devido ao baixo intervalo energético entre S_0 e S_1 , que favorece um decaimento não radioativo. Já para as formas *leuco*, observou-se uma competição entre os processos de conversão interna, formação de tripletos e fluorescência. Neste trabalho, os rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_F) e o tempo de vida de fluorescência (τ_F) foram muitos baixos e iguais a 0,0023 e 0,14 ns, respectivamente, que de certa forma corroboram seu baixo potencial para geração de oxigênio singlete por fotossensibilização (Seixa de Melo, Moura, Melo, 2004).

Já em trabalho publicado em 2006 (Gandra, *et al.*), através do método fotofísico que consistiu no monitoramento da intensidade de emissão de fosforescência do $^1\text{O}_2$ em 1270 nm, empregando-se o sistema resolvido no tempo, foi observado rendimento quântico na produção de oxigênio singleto (Δ_g) para a forma *ceto*, solubilizada em DMSO (0,5% H_2SO_4) e saturada com oxigênio molecular, igual a 0,6. Apesar do alto rendimento quântico, os autores ressaltaram que a baixa absorvidade molar do composto e rápida extinção física (fotodegradação) também limitam seu uso como PS.

Cabe ressaltar ainda, que neste estudo a inclusão do ácido sulfúrico no DMSO foi feita para aumentar a solubilidade do composto que se mostrava bastante insolúvel mesmo em solventes orgânicos de baixa polaridade. Isto pode explicar o baixo decaimento na absorção do 1,3- DPBF, sob irradiação e na presença do alcaloide, nos experimentos aqui realizados para verificar produção de oxigênio singleto. Mesmo que em baixa concentração (5 μM) a formação de agregados da molécula provavelmente não foi completamente evitada o que pode ter interferido por impedir a sua excitação, formação de espécies transientes tripletes e consequentemente, de oxigênio singleto.

Frente a tais fatos, decidiu-se prosseguir com os estudos biológicos empregando-se todos os extratos, frações alcaloídicas e neutras e as substâncias isoladas GB1 e IT1 como fotossensibilizadores na PDT antimicrobiana e antitumoral como discutido a seguir.

4.3. Estudos Biológicos

4.3.1. Atividade antimicrobiana

4.3.1.1. Avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A atividade antimicrobiana dos extratos brutos, frações e substâncias puras foi determinada inicialmente pelo método de difusão em ágar pela técnica de poço em camada dupla, utilizando-se 15 cepas de bactérias e 8 de leveduras como indicadoras. Para aquelas amostras ativas, determinou-se então a concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição em placa com 96 poços.

Dentre os extratos brutos e frações de ambas as espécies observou-se que GBCH apresentou, em geral, contra todas as cepas testadas, a menor CIM (2,50 mg/mL). Já para GBCM, ITPH e ITPM a concentração utilizada para obter o mesmo efeito, foi 10 vezes maior (25 mg/mL). Para as frações, somente GBFA apresentou atividade antimicrobiana a 12,5 mg/mL para a maioria das bactérias e fungos avaliados, enquanto que para as demais frações (GBFN, ITFA, ITFN), não foi observado efeito biocida nesta concentração (Tabela 13).

Para as substâncias isoladas, observou-se que GB1 causou inibição do crescimento microbiano para uma grande parte das cepas avaliadas a uma concentração igual a 31,2 µg/mL (100 µM). Já, frente às cepas *S. epidermidis* 6ep, *M. luteus* ATCC 9341, *B. subtilis* Bs, a CIM observada foi o dobro (62,5 µg/mL/mL; 200 µM) e quatro vezes maior contra *C. tropicalis* ATCC 157, *C. glabrata* ATCC 30070 e *S. aureus* campo 8⁻ (125 µg/mL; 400 µM).

O maior valor de CIM (250 µg/mL) foi verificado para as cepas *S. aureus* campo 7⁺, *S. thypi*, *C. tropicalis* campo, *C. parapsilopsis* ATCC 22019.

Por outro lado, GB2 apresentou valores de CIM semelhantes a GB1, exceto para as cepas *S. typhimurium*- cepa campo *St*, *S.* campo 8⁻, *S. aureus* campo 7⁺ que teve crescimento inibido a uma concentração igual a 125 µg/mL. GB3 e GB4 apresentaram CIM igual a 62,5 µg/mL para grande parte das cepas, exceto para *S. epidermidis* 6ep, *S. aureus* 7⁺, *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *C. tropicalis* ATCC 157, para quais observou-se CIM igual a 125 µg/mL e para as cepas *M. luteus* ATCC 9341, *B. subtilis*- cepa campo *Bs*, *E. faecalis* ATCC 10100, *S. typhimurium*- cepa campo *St*, *S. aureus* 8⁻, *C. tropicalis* campo, *C. glabrata* ATCC 30070 e *C. parapsilopsis* ATCC 22019 a CIM foi igual a 250 µg/mL.

Em comparação com outros trabalhos descritos na literatura, nos quais ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados com estas mesmas substâncias e micro-organismos, verificou-se que, de maneira geral as concentrações inibitórias mínimas aqui determinadas foram um pouco maiores. Em trabalho publicado em 2011, Costa *et al*, observaram que GB1 inibiu o crescimento completo da cepa de levedura *C. albicans* 10231 a uma concentração igual a 50,81 µM, igual ao dobro da CIM aqui verificada. Neste mesmo trabalho, frente às cepas *S. epidermidis* 6ep, *C. dubliniensis* ATCC 777 e ATCC 778157, GB2 apresentou CIM iguais a 25, 12,5 e 25 µg/mL, respectivamente, em contraste com os 62,5, 31,25 e 31,25 µg/mL observados aqui (Costa *et al.*, 2011). Para o alcaloide GB3 os resultados também foram diferentes para estas três cepas. Naquele trabalho as CIMs determinadas foram iguais a 50, 50 e 100 µg/mL para *S. epidermidis* 6ep, *C. dubliniensis* ATCC 777 e ATCC 778157, respectivamente em contraste com as CIMs obtidas aqui e iguais a 125, 62,5 e 62,5 µg/mL, respectivamente. Em contrapartida, para substância GB4 e GB5, Costa *et al.*, 2011 não observaram atividade antimicrobiana, que por sua vez foi observada em nossos ensaios, com

destaque para as diferentes cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis*. Estas diferenças podem ser atribuídas a diferenças metodológicas do bioensaio para a determinação da CIM, como por exemplo, meio de cultura utilizado para crescimento dos micro-organismos, cepas microbianas, tamanho de inóculo, pureza da amostra-teste, concentração, método de preparo e diluente empregado para a amostra teste, método de leitura dos resultados dentre outras variáveis experimentais (Scorzoni *et al.*, 2007a e b).

Para o alcaloide indigo observou-se CIM igual a 62,5 µg/mL frente às cepas bacterianas de *S. aureus* ATCC 6538 e ATCC, *S. epidermidis* ATCC 12238, *E. coli* ATCC 10538 e ATCC 10799, *Proteus vulgaris* cepa campo Pv e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e igual a 125 µg/mL para as cepas *S. epidermidis* (6ep), *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis*-cepa campo Bs, *Enterobacter faecalis* ATCC 10100, *Salmonella typhimurium* – cepa campo St. Já frente às cepas de leveduras observou-se os menores valores de CIM (62,5 µg/mL) para *C. albicans* ATCC 1023 e 10231 e *C. dubliniensis* ATCC 777 e 778157, enquanto que CIM igual a 250 µg/mL para as cepas *Candida tropicalis* ATCC 157, *C. tropicalis* campo, *C. glabrata* ATCC 30070, *C. parapsilopsis* ATCC 22019.

Tabela 13. Atividade antimicrobiana expressa em Concentração Inibitória Mínima, CIM (mg/mL para os extratos e frações e substâncias isoladas). - : cepa não testada

Amostras Micro	GBCH	GBCM	GBFA	GBFN	GB1	GB2	GB3	GB4	GB5	ITPH	ITPM	ITFA	ITFN	IT1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	2,50	25	12,50	>12,5	31,2	31,2	62,5	62,5	125	>25	25	>12,5	>12,5	62,5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 14438	2,50	25	12,50	>12,5	31,2	31,2	62,5	62,50	125	25	25	>12,5	>12,5	62,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12238	2,50	25	12,50	>12,5	31,2	31,2	62,5	62,50	62,50	25	25	>12,5	>12,5	62,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (6ep)	2,50	25	12,50	>12,5	62,50	62,5	125	125	-	25	25	>12,5	>12,5	125
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	12,50	>25	>12,50	>12,5	62,50	62,5	250	250	-	25	>25	>12,5	>12,5	125
<i>Bacillus subtilis</i> -cepa campo Bs	2,50	12,5	12,50	>12,5	62,50	62,5	250	250	62,5	25	12,5	>12,5	>12,5	125
<i>Enterobacter faecalis</i> ATCC 10100	2,50	25	12,50	>12,5	31,25	31,2	250	250	-	25	25	>12,5	>12,5	125
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10538	2,50	25	12,50	>12,5	32,5	31,2	62,5	62,50	250	>25	25	>12,5	>12,5	62,5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10799	2,50	25	12,50	>12,5	32,5	31,2	62,5	62,50	250	>25	25	>12,5	>12,5	62,5
<i>Proteus vulgaris</i> - Cepa campo Pv	2,50	25	12,50	>12,5	32,5	31,2	62,5	62,50	250	>25	25	>12,5	>12,5	62,5
<i>Salmonella typhimurium</i> – cepa campo St	2,50	>25	>12,50	>12,5	>250	125	0,25	250	-	>25	>25	>12,5	>12,5	125
<i>Staphylococcus aureus</i> campo8*	6,50	25	6,25	6,25	0,06	125	0,25	250	-	25	25	>12,5	>12,5	125
<i>Staphylococcus aureus</i> campo 7*	2,50	25	>12,50	>12,5	>250	125	125	125	125	25	25	>12,5	>12,5	125
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	2,50	>25	12,50	>12,5	31,2	31,2	125	125	500	>25	>25	>12,5	>12,5	62,5
<i>Candida albicans</i> ATCC 1023	2,50	25	12,50	>12,5	31,2	31,2	62,5	62,5	500	>25	25	>12,5	>12,5	62,5
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	2,50	25	12,50	>12,5	31,2	31,2	62,5	62,5	500	>25	25	>12,5	>12,5	62,5
<i>Candida dubliniensis</i> ATCC 777	2,50	25	12,50	>12,5	31,2	31,2	62,5	62,5	>500	>25	25	>12,5	>12,5	62,5
<i>Candida dubliniensis</i> ATCC 778157	2,50	25	12,50	>12,5	31,2	31,2	62,5	62,5	>500	>25	25	>12,5	>12,5	62,5
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 157	2,50	>25	12,50	>12,5	125	125	125	125	>500	>25	>25	>12,5	>12,5	250
<i>Candida tropicalis</i> campo	12,50	>25	>12,50	>12,5	250	250	250	250	>500	>25	>25	>12,5	>12,5	250
<i>Candida glabrata</i> ATCC 30070	6,50	>25	12,50	>12,5	125	125	250	250	>500	>25	>25	>12,5	>12,5	250
<i>Candida parapsilopsis</i> ATCC 22019	6,50	>25	>12,50	>12,5	250	250	250	250	>500	>25	>25	>12,5	>12,5	250

4.3.1.2. Avaliação da atividade antimicrobiana na presença de irradiação

A partir das 23 cepas avaliadas no *screening* foram escolhidas 8 cepas para emprego no ensaio para avaliação do efeito das amostras-teste na presença de irradiação *laser*. Os critérios utilizados para escolha destas cepas basearam-se nos resultados obtidos nos ensaios de atividade antimicrobiana na ausência de irradiação, assim como em sua incidência em patologias que atualmente permitem tratamento por meio do uso de radiação *laser*.

Todas as amostras-teste foram testadas em concentração sub-inibitória definida como sendo igual à metade do valor da concentração inibitória mínima (CIM/2), determinada no item 4.3.1.1., e iguais a 1,25 mg/mL para GBCH, 12,5 mg/mL para GBCM, ITPH e ITPM, 6,25 mg/mL para as frações GBFA, GBFN, ITFA e ITFN. Para as substâncias isoladas as concentrações utilizadas nos ensaios com irradiação *laser* foram 50 μ M para GB1 e 120 μ M para IT1. A redução pela metade na concentração das amostras-teste teve como finalidade garantir inatividade antimicrobiana na ausência de luz. Na prática terapêutica da PDT esta característica é desejada para compostos com propriedades fotossensíveis, pois evita alta sensibilidade à exposição luminosa fora do tratamento ambulatorial.

Quanto ao controle do inóculo (Tabela 14), a exposição somente ao *laser* não foi capaz de interferir no desenvolvimento microbiano de nenhuma das cepas estudadas. Alguns trabalhos mostraram a presença de grupos cromóforos intrínsecos na composição química de certos micro-organismos, o que os tornaria mais suscetíveis à PDT, visto que estes grupos poderiam absorver a luz aplicada e auxiliar na produção em cadeia dos radicais livres (Wilson & Pratten, 1994, Almeida *et al.*, 2006, Souza *et al.*, 2006). Como não houve alteração no crescimento dos inóculos diante de irradiação, considerou-se a inexistência de tais grupos cromóforos endofíticos ou em caso de existência, a manifestação de atividade

fotossensibilizante provavelmente foi tão baixa ou nula, a ponto de não interferir nos resultados do teste.

O diluente (propilenoglicol: água, 5:95 v/v), empregado como controle negativo, não interferiu no desenvolvimento dos micro-organismos, tanto na presença quanto na ausência de exposição ao *laser*, enquanto que os antimicrobianos padrões utilizados como controles positivos (bacitracina e cetoconazol) foram bioativos tanto nas condições de irradiação, como na ausência de exposição à luz (Tabela 15).

O corante azul de metileno, empregado neste estudo como controle positivo da PDT, sem irradiação, promoveu uma redução no número de UFC/mL das cepas na concentração, porém sem caracterizar-se como biocida. Quando irradiado seu efeito foi otimizado, resultando na total eliminação de crescimento de todos os micro-organismos.

Tabela 14. Atividade antimicrobiana das amostras controles, **placas não-irradiadas**, expressa como média do número de UFC/mL.

Grupo não irradiado (L-)						
Média do número de micro-organismos expressa em UFC/mL						
Micro-organismos	Inoculo inicial	Controle do inóculo L ⁻	Controle do diluente L ⁻	Controle do meio de cultura L ⁻	Controle positivo PDT L ⁻	Controle positivo, L ⁻
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 14458	5,54.10 ⁸ (6,73)	>10 ⁸	>10 ⁸	0	2,61.10 ⁵ (11,44)	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	2,7.10 ⁷ (13,35)	>10 ⁷	>10 ⁷	0	6,53.10 ⁴ (2,33)	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10799	8,2.10 ⁶ (7,87)	>10 ⁶	>10 ⁶	0	3,5.10 ⁴ (8,50)	0
<i>Proteus vulgaris</i> - cepa de campo PV	2,24.10 ⁷ (13,39)	>10 ⁷	>10 ⁷	0	1,5.10 ⁵ (2,17)	0
<i>Candida albicans</i> ATCC 1023	8,37.10 ⁸ (3,11)	>10 ⁸	>10 ⁸	0	4,78.10 ⁵ (11,64)	0
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	2,25.10 ⁸ (8,03)	>10 ⁸	>10 ⁸	0	1,48.10 ⁵ (14,23)	0
<i>Candida dubliniensis</i> ATCC 777	6,2.10 ⁸ (9,76)	>10 ⁸	>10 ⁸	0	2,24.10 ⁵ (7,62)	0
<i>Candida dubliniensis</i> ATCC 778157	4,6.10 ⁸ (5,70)	>10 ⁸	>10 ⁸	0	>10 ⁸	0

Dados expressos como média n= 8, (coeficiente de variação, CV%, sendo que CV (%) = (desvio padrão/média) x 100); controle positivo: bacitracina (2 UI/ml) ou cetoconazol (100 µg/ml); controle positivo PDT: azul de metileno (0,1 mg/ml); controle negativo: diluente-propilenoglicol/água (5:95, v/v); inóculo inicial= número de UFC/ml do inóculo.

Tabela 15. Atividade antimicrobiana das amostras controles, **placas irradiadas**, expressa como média do número de UFC/mL.

Micro-organismos	Grupo irradiado (L ⁺) Média do número de micro-organismos expressa em UFC/mL					
	Inóculo inicial	Controle do inóculo L ⁺	Controle do diluente L ⁺	Controle do meio de cultura L ⁺	Controle positivo PDT L ⁺	Controle positivo, L ⁺
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 14458	5,54.10 ⁸ (6,73)	3,7.10 ⁸ (2,7)	>10 ⁸	0	0	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	2,7.10 ⁷ (13,35)	>10 ⁷	>10 ⁷	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10799	8,2.10 ⁶ (7,87)	6,04.10 ⁶ (0,92)	>10 ⁶	0	0	0
<i>Proteus vulgaris</i> - cepa de campo PV	2,24.10 ⁷ (13,39)	>10 ⁷	>10 ⁷	0	0	0
<i>Candida albicans</i> ATCC 1023	8,37.10 ⁸ (3,11)	>10 ⁸	>10 ⁸	0	0	0
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	2,25.10 ⁸ (8,03)	>10 ⁸	>10 ⁸	0	0	0
<i>Candida dubliniensis</i> ATCC 777	6,2.10 ⁸ (9,76)	>10 ⁸	>10 ⁸	0	0	0
<i>Candida dubliniensis</i> ATCC 778157	4,6.10 ⁸ (5,70)	>10 ⁸	>10 ⁸	0	0	0

Dados expressos como média n= 8, (coeficiente de variação, CV%, sendo que CV (%) = (desvio padrão/média) x 100); controle positivo: bacitracina (2 UI/mL) ou cetoconazol (100 µg /mL); controle positivo PDT: azul de metileno (0,1 mg/mL); controle negativo: diluente-propilenoglicol/água (5:95, v/v); inóculo inicial= número de UFC/mL do inóculo.

Para as amostras-teste oriundas de *G. blepharophylla*, frente às cepas bacterianas (Figura 45) a fração neutra foi à única que não apresentou efeito antimicrobiano na ausência ou presença de irradiação. Para os extratos brutos, GBCH e GBCM, frente às bactérias *S. aureus* ATCC 14458 e *E. coli* ATCC 10799, não foi verificado efeito no crescimento bacteriano na ausência de irradiação (Figura 45A e Figura 45C). Após exposição ao *laser* verificaram-se reduções no número de UFC/mL (em relação aos controles não irradiados) iguais a 97,5% e 98,6% da cepa *S. aureus* ATCC 14458 quando submetida aos extratos GBCH e GBCM, respectivamente e reduções iguais a 77,1% e 68,2% da cepa *E. coli* ATCC

10799 quando tratada com estes mesmos extratos, respectivamente. Para estas duas cepas GBFA resultou em uma redução de crescimento bacteriano na ausência de irradiação, que foi intensificada na presença dela (67,6% e 80,1% de reduções para as cepas *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente).

Já para as bactérias *S. epidermidis* ATCC 12228 e *Proteus vulgaris* Pv (Figura 45B e Figura 45D), GBCH, GBCM e GBFA proporcionaram uma redução no crescimento bacteriano sem exposição ao *laser* (em relação ao crescimento do controle microbiológico) que foi intensificado na presença da irradiação. Assim, para *S. epidermidis* ATCC 12228 as reduções provocadas por GBCH, GBCM e GBFA, foram respectivamente, 89,2%, 90,6% e 90,8%. Já para *P. vulgaris* Pv, observou-se reduções de 90,2%, 91,8% e 93,2% no crescimento bacteriano frente às mesmas amostras-teste, respectivamente.

Para o composto GB1, pode-se observar redução do crescimento bacteriano na ausência de luz para todas as cepas, que foi mais acentuado na ainda maior na presença de irradiação, exceto para a cepa de *E. coli* ATCC 10799, que só foi suscetível quando irradiada. De modo geral, a porcentagem de redução no crescimento bacteriano causado por esta substância quando irradiada em relação ao controle não irradiado (69,3%, 97,8%, 91,6%, 94,3% para *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. vulgaris*) foi semelhante a aquele gerado por suas matrizes GBCM e GBFA, exceto para a *S. aureus* ATCC 14458, no qual o efeito inibidor do crescimento foi maior quando tratada com GBCM.

Tabela 16. Atividade antimicrobiana dos extratos brutos, frações e GB1 oriundos de *Guatteria blepharophylla*, **placa não irradiada**, expressa como média do número de UFC/mL.

Micro-organismo	Inoculo inicial	MICRO	GBCH	GBCM	GBFA	GBFN	GB1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 14458	5,54.10 ⁸ (6,73)	>10 ⁸	>10 ⁸	>10 ⁸	4,21.10 ⁶ (1,5)	>10 ⁸	2,48.10 ⁶ (2,11)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	2,7.10 ⁷ (13,35)	>10 ⁸	3,89.10 ⁶ (1,88)	3,65.10 ⁶ (1,11)	4,06.10 ⁶ (3,7)	>10 ⁷	3,86.10 ⁶ (1,72)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10799	8,2.10 ⁶ (7,87)	>10 ⁸	>10 ⁶	>10 ⁶	>10 ⁶	>10 ⁶	8,65.10 ⁵ (3,95)
<i>Proteus vulgaris</i> - cepa de campo PV	2,24.10 ⁷ (13,39)	>10 ⁸	2,59.10 ⁶ (6,00)	2,64.10 ⁶ (5,62)	3,61.10 ⁶ (1,02)	>10 ⁷	1,94.10 ⁶ (3,87)
<i>Candida albicans</i> ATCC 1023	8,37.10 ⁸ (3,11)	>10 ⁸	>10 ⁸	3,8.10 ⁶ (3,57)	4,03.10 ⁶ (2,48)	>10 ⁸	3,44.10 ⁶ (3,44)
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	2,25.10 ⁸ (8,03)	>10 ⁸	>10 ⁸	3,64.10 ⁶ (2,88)	3,61.10 ⁶ (4,17)	>10 ⁸	2,95.10 ⁶ (3,57)
<i>Candida dubliniensis</i> ATCC 777	6,2.10 ⁸ (9,76)	>10 ⁸	3,7.10 ⁶ (2,89)	3,45.10 ⁶ (4,36)	>10 ⁸	>10 ⁸	3,76.10 ⁶ (3,12)
<i>Candida dubliniensis</i> ATCC 778157	4,6.10 ⁸ (5,70)	>10 ⁸	3,48.10 ⁶ (1,85)	3,25.10 ⁶ (1,39)	>10 ⁸	>10 ⁸	3,48.10 ⁶ (2,91)

Dados expressos como média n= 8, (coeficiente de variação, CV%, sendo que CV (%) = (desvio padrão/média) x 100); Inóculo inicial= número de UFC/mL do inóculo; MICRO= controle do micro-organismo. Os extratos foram avaliados na concentração sub-inibitória mínima (CIM/2), extratos a 12,5 mg/mL, frações a 6,25 mg/mL e substância pura a 50 µM.

Tabela 17. Atividade antimicrobiana dos extratos brutos, frações e GB1, oriundos de *Guatteria blepharophylla*, **placa irradiada**, expressa como média do número de UFC/mL.

Micro-organismo	Inoculo inicial	MICRO	GBCH	GBCM	GBFA	GBFN	GB1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 14458	5,54.10 ⁸ (6,73)	>10 ⁸	1,56.10 ⁶ (8,43)	1,40.10 ⁶ (4,86)	1,36.10 ⁶ (4,48)	>10 ⁸	7,6.10 ⁵ (3,67)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	2,7.10 ⁷ (13,35)	>10 ⁷	4,18.10 ⁵ (4,37)	3,43.10 ⁵ (8,05)	3,74.10 ⁵ (6,19)	>10 ⁷	8,4.10 ⁴ (10,39)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10799	8,2.10 ⁶ (7,87)	>10 ⁶	2,29.10 ⁵ (5,7)	3,17.10 ⁵ (2,47)	1,98.10 ⁵ (6,47)	>10 ⁶	7,23.10 ⁴ (9,71)
<i>Proteus vulgaris</i> - cepa de campo PV	2,24.10 ⁷ (13,39)	>10 ⁷	2,54.10 ⁵ (5,58)	2,17.10 ⁵ (2,27)	2,47.10 ⁵ (5,71)	>10 ⁷	1,12.10 ⁵ (5,08)
<i>Candida albicans</i> ATCC 1023	8,37.10 ⁸ (3,11)	>10 ⁸	8,68.10 ⁵ (3,08)	5,71.10 ⁵ (4,87)	2,47.10 ⁵ (5,71)	>10 ⁸	1,74.10 ⁵ (10,58)
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	2,25.10 ⁸ (8,03)	>10 ⁸	7,40.10 ⁵ (13,21)	6,35.10 ⁵ (3,33)	2,27.10 ⁵ (5,94)	>10 ⁸	2,27.10 ⁵ (5,94)
<i>Candida dubliniensis</i> ATCC 777	6,2.10 ⁸ (9,76)	>10 ⁸	3,19.10 ⁶ (8,11)	2,6.10 ⁵ (7,62)	2,8.10 ⁵ (8,27)	>10 ⁸	1,39.10 ⁵ (11,61)
<i>Candida dubliniensis</i> ATCC 778157	4,6.10 ⁸ (5,70)	>10 ⁸	2,57.10 ⁵ (10,32)	2,20.10 ⁵ (7,91)	3,67.10 ⁵ (6,58)	>10 ⁸	1,55.10 ⁵ (6,46)

Dados expressos como média n= 8, (coeficiente de variação, CV%, sendo que CV (%) = (desvio padrão/média) x 100); Inóculo inicial= número de UFC/mL do inóculo; MICRO= controle do micro-organismo. Os extratos foram avaliados na concentração sub-inibitória mínima (CIM/2), extratos a 12,5 mg/mL, frações 6,25 mg/mL e substância pura a 50 µM.

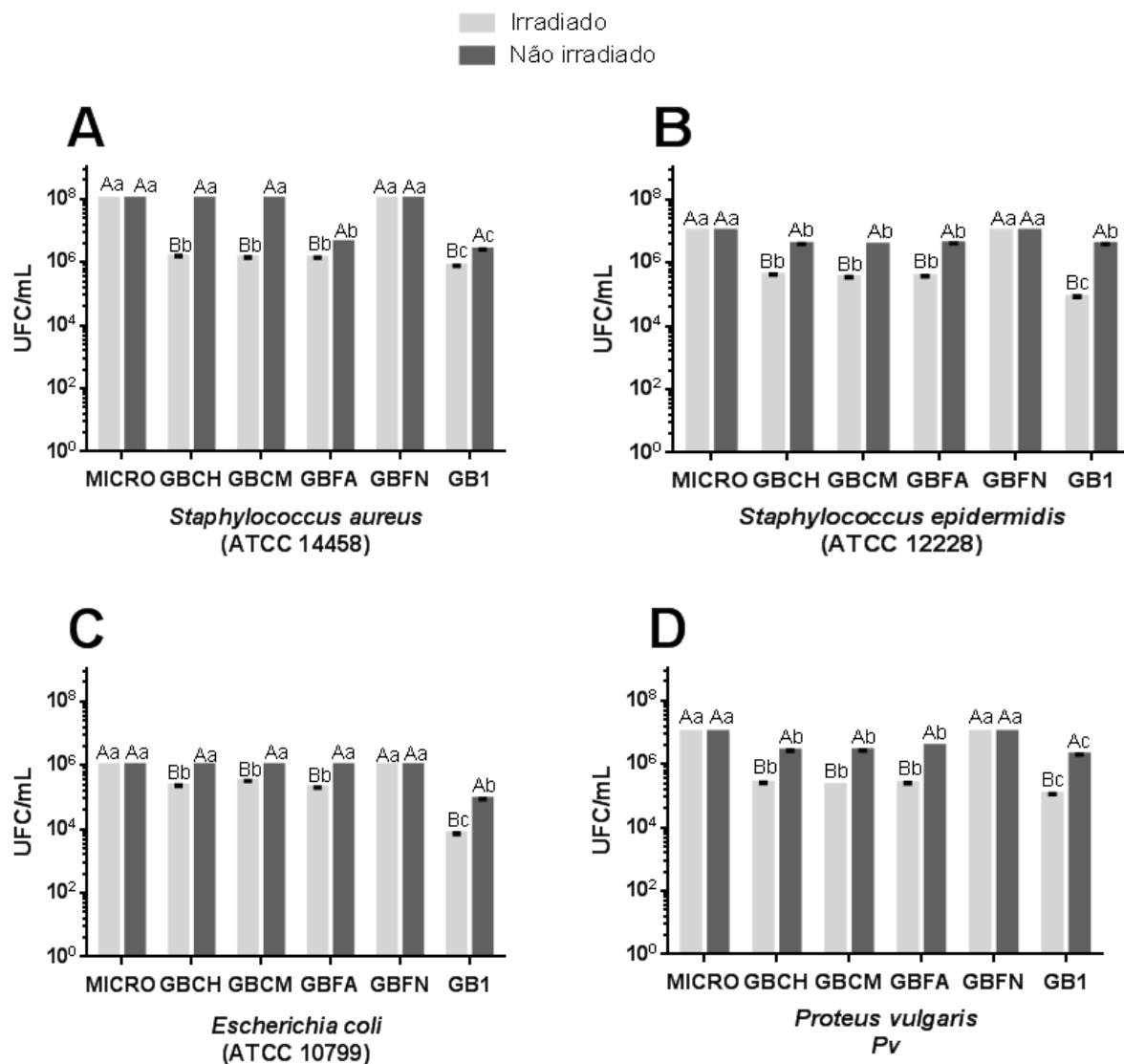


Figura 45. Número de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL), das cepas *S. aureus* ATCC 14458 (A), *S. epidermidis* ATCC 12228 (B), *E. coli* ATCC 10799 (C) e *P. vulgaris* Pv (D) tratadas com GBCH (1,25 mg/mL), GBCM (12,5 mg/mL), GBFA e GBFN (6,25 mg/mL) e GB1 (50 µM) oriundas de *G. blepharophylla*, na ausência (■) e na presença (■) de irradiação com laser diodo InGaAIP (28J/ cm², λ= 660nm). MICRO= controle microbiológico. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre a condição irradiada e não irradiada dentro de cada amostra-teste (teste t, p<0,05) e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre as diferentes amostras-teste nas condições irradiada ou não irradiada (one way ANOVA, seguida do teste de Tukey, p<0,05). Os valores representam a média±erro padrão de oito repetições.

Quanto aos fungos (Figura 46), GBCH não afetou o crescimento de *C. albicans* ATCC 1023 e ATCC 10231, mas foi ativo para as duas cepas de *C. dubliniensis* na ausência de luz. Quando irradiado o efeito antimicrobiano apresentou-se ou foi intensificado. Para *C. albicans* ATCC 1023, ATCC 10231, *C. dubliniensis* ATCC 777 e ATCC 778157 as reduções no crescimento dos fungos, observadas para este extrato foram iguais a 99,1%, 99,3%, 91,5% e 92,6%, respectivamente. Em contrapartida, GBCM afetou o crescimento de todas as cepas de fungos testadas na ausência de luz, com efeito intensificado na presença. As reduções foram iguais a 85,3%, 82,6%, 92,3% e 93,2% para *C. albicans* ATCC 1023 e ATCC 10231 e *C. dubliniensis* ATCC 777 e ATCC 778157, respectivamente.

Já, GBFA reduziu o número de CFC/mL, na ausência de irradiação, para ambas as cepas de *C. albicans*, mas não para as cepas de *C. dubliniensis*. Após irradiação, observou-se redução no crescimento de todas elas, exceto para *C. dubliniensis* ATCC 777, que curiosamente não foi afetada. Para *C. dubliniensis* ATCC 778157 a redução obtida foi de 99,7% no crescimento em relação ao controle não irradiado. Assim como para as bactérias, GBFN não afetou o crescimento dos fungos quando irradiados ou não. Por fim, GB1 apresentou efeito contra todas as cepas na ausência de irradiação, que foi intensificado na presença desta. As maiores reduções no número de UFC/mL foram observadas, respectivamente contra as cepas *C. dubliniensis* 778157, 777, *C. albicans* ATCC 10231 e 1023 iguais a 99%, 96,7%, 92,3%, 91%.

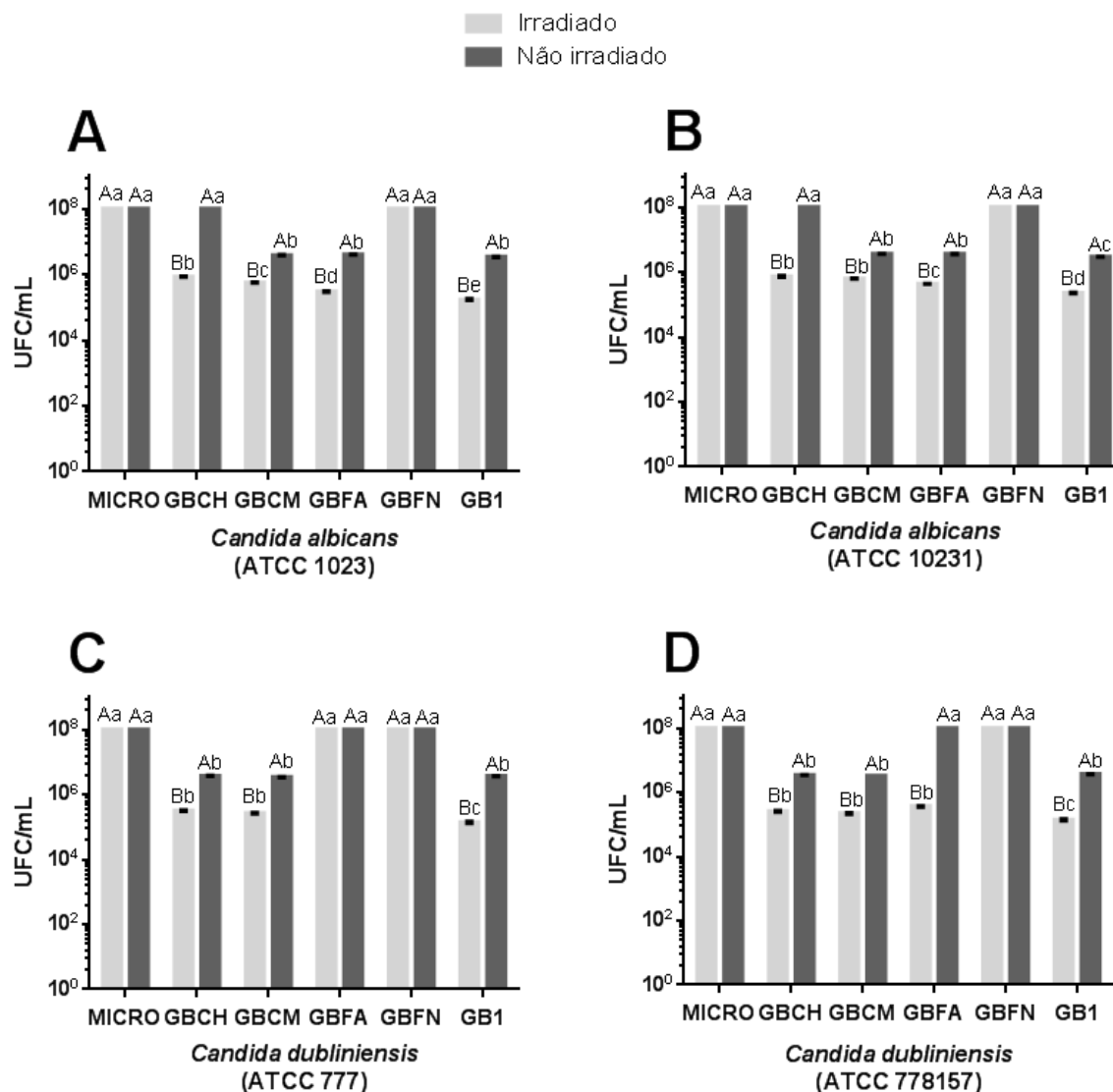


Figura 46. Número de unidades formadoras de colônia por mililitros (UFC/mL), das cepas *C. albicans* ATCC 1023 (A), *C. albicans* ATCC 10231 (B), *C. dubliniensis* ATCC 777 (C) e *C. dubliniensis* ATCC 778157 (D) tratadas com GBCH (1,25 mg/mL), GBCM (12,5 mg/mL), GBFA e GBFN (6,25 mg/mL) e GB1 (50 µM) oriundas de *G. blepharophylla*, na ausência (■) e na presença (■) de irradiação com laser diodo InGaAlP (28 J/cm², λ= 660 nm). MICRO= controle microbiológico. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre a condição irradiada e não irradiada dentro de cada amostra-teste (teste t, p<0,05) e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre as diferentes amostras-teste nas condições irradiada ou não irradiada (one way ANOVA, seguida do teste de Tukey, p<0,05). Os valores representam a média±erro padrão de oito repetições.

Em relação às amostras oriundas de *I. truxillensis* também pode-se observar efeitos variados em relação à amostra-teste e cepa avaliada (Tabela 18). O extrato bruto, ITPH não apresentou efeito frente a nenhuma cepa de bactéria ou fungo avaliado (Tabela 19)

Para *E. coli* ATCC 10799, *S. epidermidis* ATCC 12228 e *P. vulgaris* Pv, a redução no crescimento bacteriano causada por ITPM, ITFA e IT1, foi semelhante. ITPM resultou em uma redução no número de UCF/mL de *S. epidermidis* ATCC 12228 de 90% e em torno de 85% para as outras duas cepas citadas. Frente a *S. aureus* ATCC 14458, a redução um pouco menor foi igual a 73,8%. Frente a esta mesma cepa, ITFA resultou em inibição total do crescimento bacteriano, e reduções em torno de 85% para as demais (Figura 47).

A fração neutra, não foi ativa contra *P. vulgaris* Pv, provocou redução de 99,1% no crescimento de *S. aureus* ATCC 14458, de 81% e 73,5% para *S. epidermidis* ATCC 12228 e *E. coli* ATCC 10799, respectivamente. ITFA, ITFN e também provocaram reduções no número de UFC/mL, na ausência de luz para a cepa *S. aureus* ATCC 14458 (Figura 47).

Já o alcaloide IT1, ativo frente todas as cepas na presença de irradiação, resultou em reduções no número de UFC/mL de 94,5%, 83,6%, 84,6% e 89,5% contra *S. aureus* ATCC 14458, *S. epidermidis* ATCC 12228, *E. coli* ATCC 10799 e *P. vulgaris* Pv, respectivamente. Na ausência de irradiação também provou redução no crescimento de *S. aureus* ATCC 14458, mas em menor intensidade do que quando irradiado e avaliado na mesma concentração da amostra-teste (Figura 47).

Tabela 18. Atividade antimicrobiana dos extratos, frações e IT1, oriundos de *Indigofera truxillensis*, placa **não-irradiada**, expressa como média do número de UFC/mL.

Micro-organismo	Inoculo inicial	MICRO	ITPH	ITPM	ITFA	ITFN	IT1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 14458	4,52.10 ⁶ (13,47)	>10 ⁶	>10 ⁶	9,5.10 ⁵ (3,85)	8,95.10 ⁴ (12,59)	3,91.10 ⁵ (8,69)	8,17.10 ⁴ (11,40)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	7,76.10 ⁷ (5,23)	>10 ⁷	>10 ⁷	> 10 ⁷	> 10 ⁷	> 10 ⁷	> 10 ⁷
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10799	1,43.10 ⁷ (6,29)	>10 ⁷	>10 ⁷	> 10 ⁷	> 10 ⁷	> 10 ⁷	> 10 ⁷
<i>Proteus vulgaris</i> - cepa de campo Pv	2,72.10 ⁷ (8,80)	>10 ⁷	>10 ⁷	> 10 ⁷	> 10 ⁷	> 10 ⁷	> 10 ⁷
<i>Candida albicans</i> ATCC 1023	2,65.10 ⁶ (3,13)	2,61.10 ⁶ (3,13)	2,55.10 ⁶ (3,77)	2,44.10 ⁶ (4,41)	1,95.10 ⁶ (1,02)	2,03.10 ⁶ (1,69)	2,05.10 ⁶ (1,36)
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	3,41.10 ⁶ (9,54)	2,67.10 ⁶ (9,54)	2,66.10 ⁶ (2,66)	2,56.10 ⁶ (2,90)	2,65.10 ⁶ (2,31)	2,57.10 ⁶ (1,4)	2,08.10 ⁶ (1,47)
<i>Candida dubliniensis</i> ATCC 778157	8,12.10 ⁶ (5,48)	2,62.10 ⁶ (5,48)	2,47.10 ⁶ (1,51)	2,43.10 ⁶ (0,88)	2,28.10 ⁶ (1,98)	2,63.10 ⁶ (4,25)	1,73.10 ⁶ (6,40)
<i>Candida dubliniensis</i> ATCC 777	4,69.10 ⁶ (1,95)	2,58.10 ⁶ (4,63)	2,56.10 ⁶ (4,13)	2,46.10 ⁶ (0,86)	2,58.10 ⁶ (4,38)	2,48.10 ⁶ (3,08)	2,08.10 ⁶ (1,38)

Dados expressos como média n= 8, (coeficiente de variação, CV%, sendo que CV (%) = (desvio padrão/média) x 100); Inóculo inicial= número de UFC/mL do inóculo; MICRO= controle do micro-organismo. Os extratos foram avaliados na concentração sub-inibitória mínima (CIM/2), extratos a 12,5 mg/mL, frações a 6,25 mg/mL e substância pura a 120 µM.

Frente às cepas fúngicas, a redução observada no número de UFC/mL foi inferior em relação as cepas de bactérias, sendo o composto IT1 a amostra-teste mais efetiva de *I. truxillensis*. A cepa mais suscetível foi *C. albicans* ATCC 1023 que sofreu reduções iguais a 3,6%, 30,5%, 49,9%, 54,7% e 57,3% quando tratadas com ITPH, ITPM, ITFA, ITFN e IT1, respectivamente. Frente à cepa de *C. albicans* ATCC 10231 os efeitos de ITPH e ITPM foram insignificantes, com reduções de 0,26% e 2,57% no crescimento da levedura. Já ITFA, ITFN e IT1 provocaram reduções iguais a 34,81%, 28,02% e 51,22% no número de UFC/mL desta cepa. As cepas *C. dubliniensis* ATCC 777 e ATCC 778157 foram mais resistentes entre as leveduras, sendo observadas reduções no crescimento da primeira iguais a 2,7%, 12%, 12%,

13,7% e 48%, quando submetida ao tratamento com ITPH, ITPM, ITFA, ITFN e IT1, respectivamente. Para *C. dubliniensis* ATCC 778157, os efeitos de ITPH e ITPM também foram baixos com reduções no número de UFC/mL iguais a 2,3% e 5,8%, respectivamente. Para as frações ITFA e ITFN e a substância IT1 as reduções observadas foram de 18,6%, 11,7% e 46,6% no crescimento da levedura.

Tabela 19. Atividade antimicrobiana dos extratos, frações e substâncias IT1, oriundos de *I. truxillensis*, **placa irradiada**, expressa como média do número de UFC/mL.

Micro-organismo	Inoculo inicial	MICRO	ITPH	ITPM	ITFA	ITFN	IT1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 14458	4,52.10 ⁶ (13,47)	>10 ⁶	>10 ⁶	2,49.10 ⁵ (11,62)	0	2,7.10 ³	4,5.10 ³ (12,83)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	7,76.10 ⁷ (5,23)	>10 ⁷	>10 ⁷	9,96.10 ⁵ (11,62)	1,42.10 ⁶ (8,03)	1.83.10 ⁶	1,64.10 ⁶ (1,62)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10799	1,43.10 ⁷ (6,29)	>10 ⁷	>10 ⁷	2,17.10 ⁶ (2,95)	1,47.10 ⁶ (6,28)	1,86.10 ⁶	1,53.10 ⁶ (2,55)
<i>Proteus vulgaris</i> - cepa de campo Pv	2,72.10 ⁷ (8,80)	>10 ⁷	>10 ⁷	1,82.10 ⁶ (7,52)	1,70.10 ⁶ (4,72)	>10 ⁷	9,6.10 ⁵ (10,63)
<i>Cândida albicans</i> ATCC 1023	2,65.10 ⁶ (3,13)	2,55.10 ⁶ (3,13)	2,46.10 ⁶ (3,77)	1,69.10 ⁶ (6,27)	9,7.10 ⁵ (8,39)	9,2.10 ⁵ (10,93)	1,3.10 ⁶ (7,16)
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	3,41.10 ⁶ (9,54)	2,68.10 ⁶ (3,01)	2,65.10 ⁶ (1,4)	2,5.10 ⁶ (3,55)	1,72.10 ⁶ (5,05)	1,85.10 ⁶ (4,41)	1,01.10 ⁶ (12,91)
<i>Candida dubliniensis</i> ATCC 778157	8,12.10 ⁶ (5,48)	2,69.10 ⁶ (3,37)	2,4.10 ⁶ (5,04)	2,29.10 ⁶ (7,93)	1,86.10 ⁶ (5,08)	2,27.10 ⁶ (3,09)	9,28.10 ⁵ (15,00)
<i>Candida dubliniensis</i> ATCC 777	4,69.10 ⁶ (1,95)	2,53.10 ⁶ (5,01)	2,5.10 ⁶ (2,74)	2,17.10 ⁶ (2,44)	2,27.10 ⁶ (4,07)	2,19.10 ⁶ (2,19)	1,08.10 ⁵ (9,77)

Dados expressos como média n= 8, (coeficiente de variação, CV%, sendo que CV (%) = (desvio padrão/média) x 100); Inóculo inicial= número de UFC/mL do inóculo; MICRO= controle do micro-organismo. Os extratos foram avaliados na concentração sub-inibitória mínima (CIM/2), extratos a 12,5 mg/mL, frações a 6,25 mg/mL e substância pura a 120 µM.

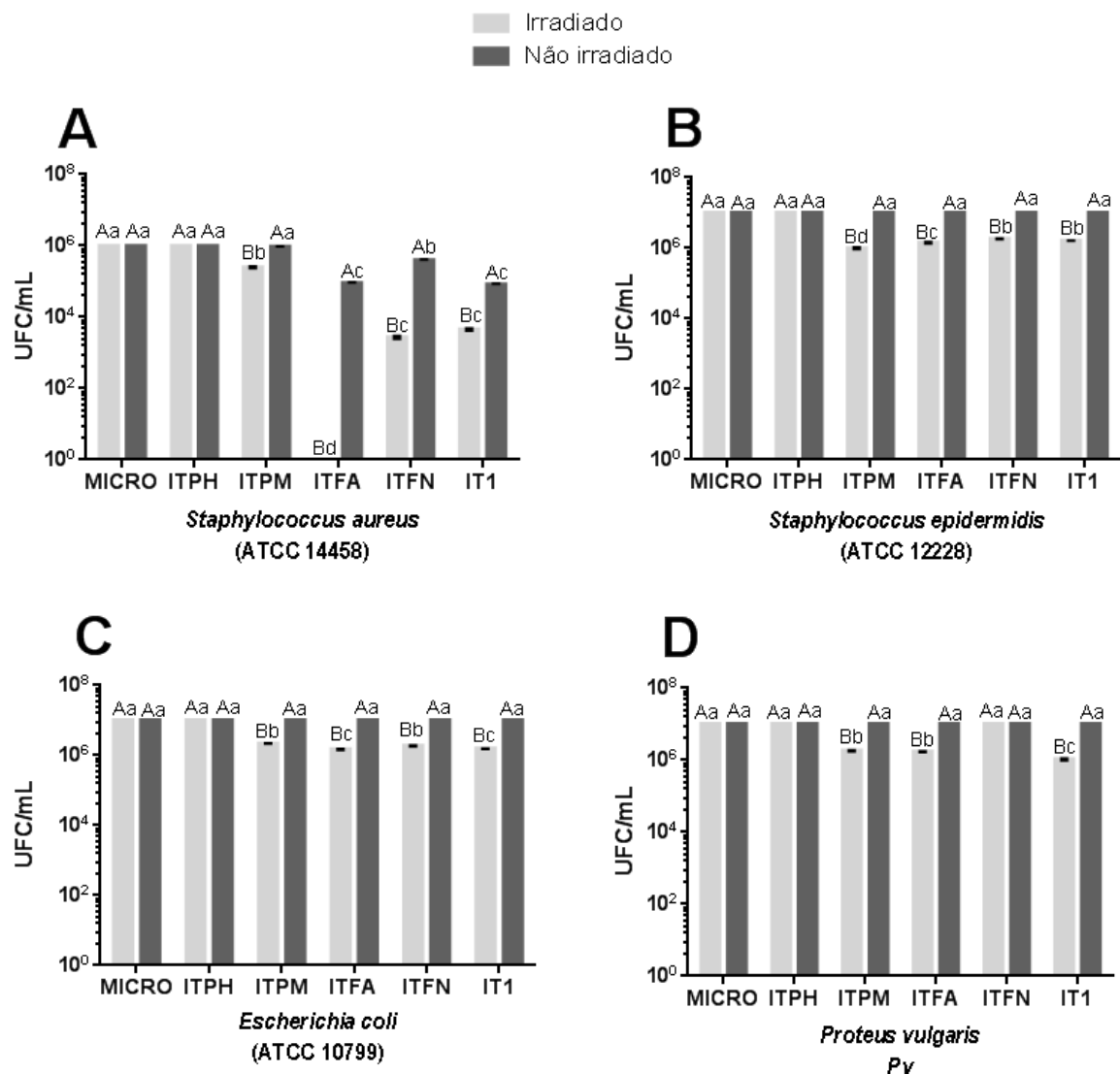


Figura 47. Número de unidades formadoras de colônia por mililitros (UFC/mL), das cepas *S. aureus* ATCC 14458 (A), *S. epidermidis* ATCC 12228 (B), *E. coli* ATCC 10799 (C) e *P. vulgaris* Pv (D) tratadas com ITPH e ITPM (12,5 mg/mL), ITFA e ITFN (6,25 mg/mL) e IT1 (120 µM) de *I. truxillensis*, na ausência (■) e na presença (■) de irradiação com laser diodo InGaAIP (28J/cm², λ= 660 nm,). MICRO= controle microbiológico. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre a condição irradiada e não irradiada dentro de cada amostra-teste (teste t, p<0,05) e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre as diferentes amostras-teste nas condições irradiada ou não irradiada (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, p<0,05). Os valores representam a média±erro padrão de oito repetições.

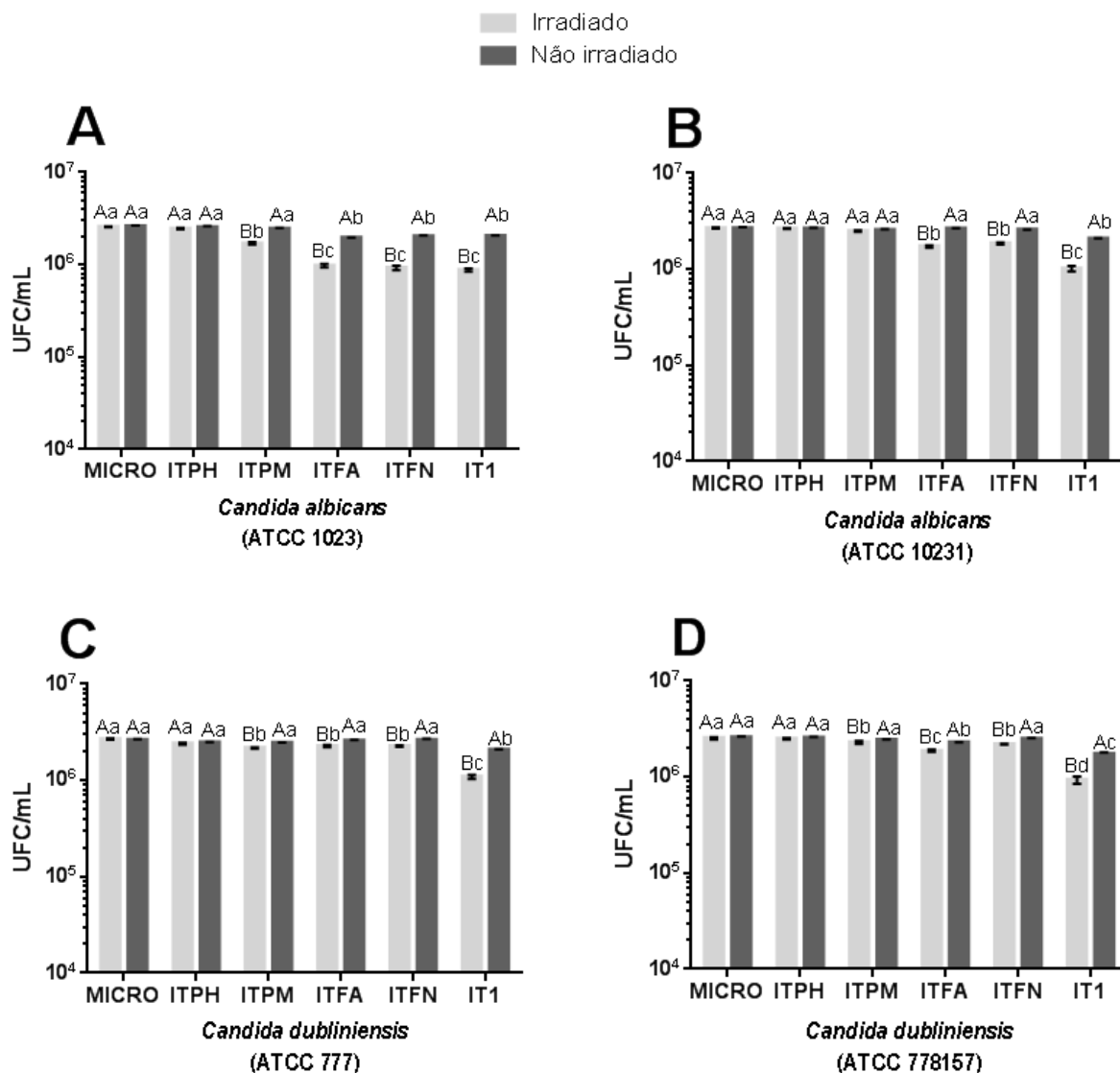


Figura 48. Número de unidades formadoras de colônia por mililitros (UFC/mL), das cepas *C. albicans* ATCC 1023 (A), *C. albicans* ATCC 10231 (B), *C. dubliniensis* ATCC 777 (C) e *C. dubliniensis* ATCC 778157 (D), tratadas com ITPH e ITPM (12,5 mg/mL), ITFA e ITFN (6,25 mg/mL) e IT1 (120 µM) de *I. truxillensis*, na ausência (■) e na presença (■) de irradiação com laser diodo InGaAIP (28J/cm², λ= 660 nm.). MICRO= controle microbiológico. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre a condição irradiada e não irradiada dentro de cada amostra-teste (teste t, p<0,05) e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre as diferentes amostras-teste nas condições irradiada ou não irradiada (one way ANOVA, seguida do teste de Tukey, p<0,05). Os valores representam a média±erro padrão de oito repetições.

4.3.1.3. Avaliação da atividade antimicrobiana na presença de irradiação: variação da densidade de energia

Também foram realizados estudos nos quais a variação da densidade de luz foi avaliada frente a algumas das amostras-teste. Neste ensaio, as cepas utilizadas foram: *S. epidermidis* ATCC 12228 (bacteriana) e *C. albicans* ATCC 1023 (fúngicas). Foram avaliadas somente as amostras-teste oriundas de *G. blepharophylla* testadas. As concentrações das amostras-teste foram as mesmas do ensaio anterior, 1,25 mg/mL para GBCH, 12,5 mg/mL para GBCM, 6,25 mg/mL para GBFA e 50µM para GB1. O procedimento experimental encontra-se descrito no item 3.3.2.3. Os resultados dos efeitos das amostras nas diferentes densidades de luz podem ser observados na Figura 49 e Figura 50. Cabe destacar que os resultados do controle microbiano não foram plotados nos gráficos, mas seu valor foi igual a 10^8 UFC/mL para ambas as cepas. Além disso, não foram observados efeitos no crescimento microbiano nas diferentes densidades de energia aplicadas.

Frente à cepa *S. epidermidis* ATCC 12228 pode-se verificar que, de maneira geral, para todas as amostras-teste (exceto GBCH), mesmo na ausência de irradiação, houve redução do crescimento microbiano e na presença de irradiação a $28\text{J}/\text{cm}^2$ este efeito foi intensificado. O aumento da dose de irradiação para $56\text{J}/\text{cm}^2$ proporcionou uma redução ainda maior no crescimento bacteriano que, no entanto foi o mesmo para as densidades de energia mais elevadas.

Somente para a amostra-teste GBCM observou-se uma maior redução no número de UFC/mL quanto maior a dose de irradiação, com diferença significativa estatisticamente e iguais a 64,61%, 95,21%, 96,21% e 96,93% para as dose de 28, 56, 84 e $112\text{ J}/\text{cm}^2$, respectivamente, em relação ao controle não irradiado.

Para GBCH, GBFA e GB1 as reduções no crescimento bacteriano foram de 99,31%, 64,75% e 55,74% na dose igual 28J/cm², respectivamente e em torno de 99,6%, 95,4% e 98,15% para as demais doses, respectivamente (Figura 49).

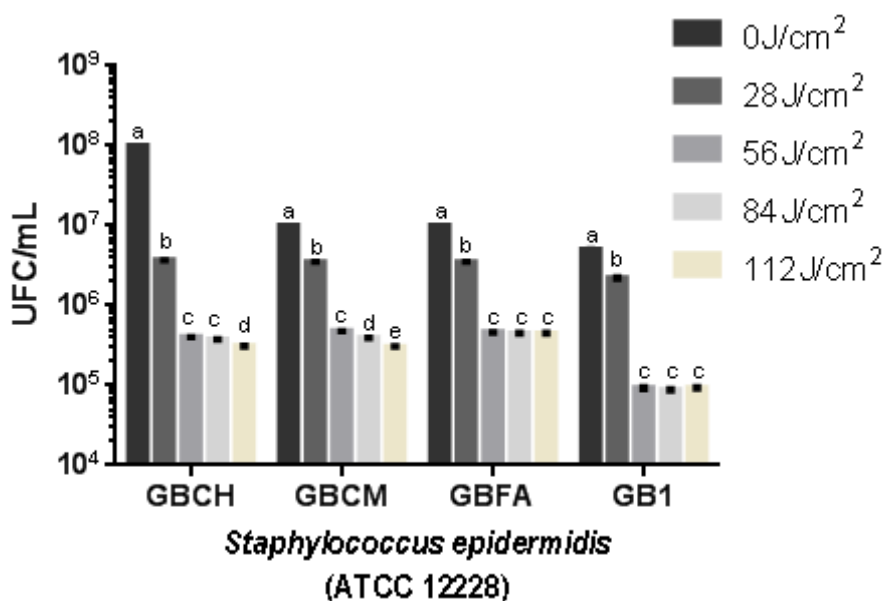


Figura 49. Número de unidades formadoras de colônia por mililitros (UFC/mL), da cepa de *S. epidermidis* ATCC 12228, tratada com GBCH e GBCM (12,5 mg/mL), GBFA (6,25 mg/mL) e GB1 (50 µM) de *G. blepharophylla*, na ausência (■) e na presença de irradiação com laser diodo InGaAlP ($\lambda = 660$ nm) em diferentes densidades de energia, 28 (■), 56 (■), 84 (■) e 112 J/cm² (■). Letras distintas indicam diferenças estatísticas entre as diferentes densidades de energia dentro de cada amostra-teste (one-way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão de oito repetições.

Para a cepa *C. albicans* ATCC 1023, a ausência de irradiação não alterou o crescimento da levedura. Na presença de irradiação observou-se efeito crescente na redução no número de UFC/mL quanto maior a irradiação, para os tratamentos com os ambos os extratos brutos, GBCH e GBCM. Já para as amostras-teste GBFA e GB1, a partir de 56J/cm², a redução no crescimento da levedura foi igual.

Assim, para GBCH e GBCM as reduções no número de UFC/mL obtidas foram iguais com os valores de 96,2%, 99,4%, 99,62% e 99,69% nas doses de irradiação de 28, 56, 84 e 112J/cm², respectivamente. Já para GBFA e GB1 as reduções no crescimento da levedura à 28J/cm² foram iguais apresentando valor de 96,46%. Frente às demais doses de irradiação, GBFA apresentou redução em torno de 96,5% e GB1, em torno de 99,9% (Figura 50).

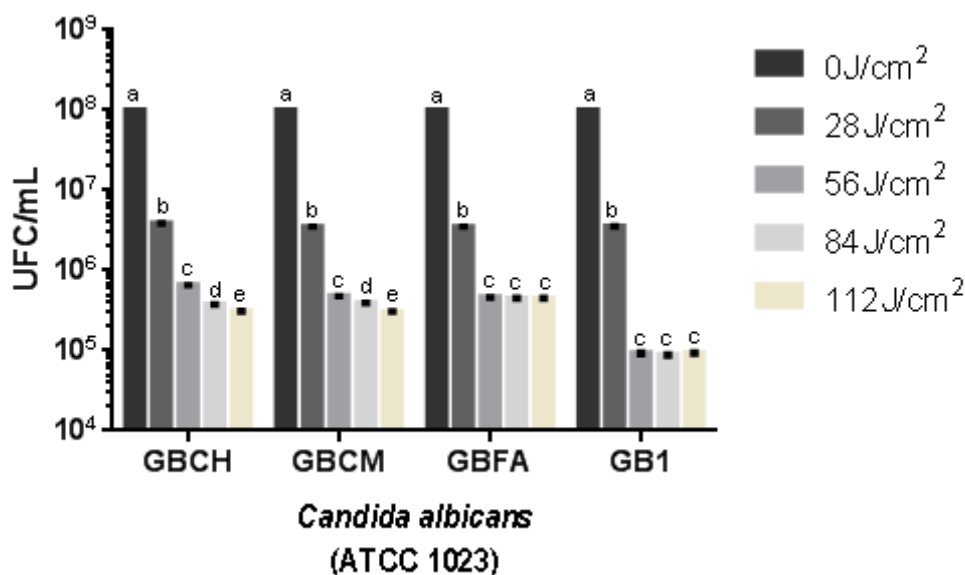


Figura 50. Número de unidades formadoras de colônia por mililitros (UFC/mL), da cepa de *C. albicans* ATCC 1023, tratada com GBCH e GBCM (12,5 mg/mL), GBFA (6,25 mg/mL) e GB1 (50 µM) de *G. blepharophylla*, na ausência (■) e na presença de irradiação com laser diodo InGaAIP ($\lambda = 660\text{nm}$) em diferentes densidades de energia, 28 (■), 56 (■), 84(■) e 112 J/cm² (■). Letras distintas indicam diferenças estatísticas entre as diferentes densidades de energia dentro de cada amostra-teste (one-way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão de oito repetições.

Em resumo, de maneira geral, para ambas as cepas avaliadas, o aumento da densidade de energia só foi efetivo na redução significativa do crescimento microbiano até 56 J/cm². Dentro de um contexto de PDT e frente ao delineamento experimental aqui realizado, acredita-se que esta dose já seja suficiente para promover a excitação a estados tripleto de

todas as moléculas da substância em análise, no caso de GB1 ou do conjunto de substâncias que compõem a amostra-teste, com efeito fotossensibilizante. Para GBCH e GBCM que são misturas complexas (e contém uma diversidade maior de composto em relação a GBFA), o aumento do efeito antimicrobiano, conforme aumentou-se a dose de irradiação, pode ser resultado da excitação simultânea dos diferentes compostos que as compõem e que contribuíram para uma maior produção de espécies reativas e dano celular. Por outro lado, baixas doses de energia podem não ser suficientes para excitá-los ao mesmo tempo, devido a fenômenos de supressão de fluorescência em soluções em que há alta concentração de moléculas fotoativáveis, e assim a ação nociva frente às células alvo mostra-se menos intensa.

4.3.1.4. Avaliação da atividade antimicrobiana na presença de irradiação: dose dupla da amostra-teste e de irradiação na mesma densidade de energia (28 J/cm²).

Neste ensaio observou-se a redução do crescimento microbiano submetendo as cepas indicadoras, *S. epidermidis* ATCC 12228 (Figura 50) e *C. albicans* ATCC 1023 (Figura 51) a duas doses de amostra- teste (somente de *G. blepharophylla*) e irradiação na mesma densidade de energia (28J/cm²). As concentrações das amostras teste foram as mesmas do ensaio descrito acima e o procedimento experimental encontra-se descrito no item 3.3.2.4. Os valores obtidos para o controle microbiano não foram plotado nos gráficos, sendo iguais a 10⁸ UFC/mL, para ambas as cepas.

Nas duas cepas, em relação ao controle microbiológico (10⁸ UFC/mL) observa-se que para todas as amostras-teste (exceto o tratamento com uma dose de GBCH, não irradiado em *C. albicans* ATCC 1023) houve redução microbiana como já constatado nos ensaios descritos no item 4.3.1.2. Já, comparando-se os resultados dos tratamentos para uma mesma amostra-

teste, na ausência e presença de luz, a redução no número de UFC/mL foi mais efetiva quando houve dose dupla de droga e irradiação. Este resultado é esperado uma vez que o micro-organismo foi submetido a dois eventos de produção de espécies fototóxicas e consequente estresse oxidante.

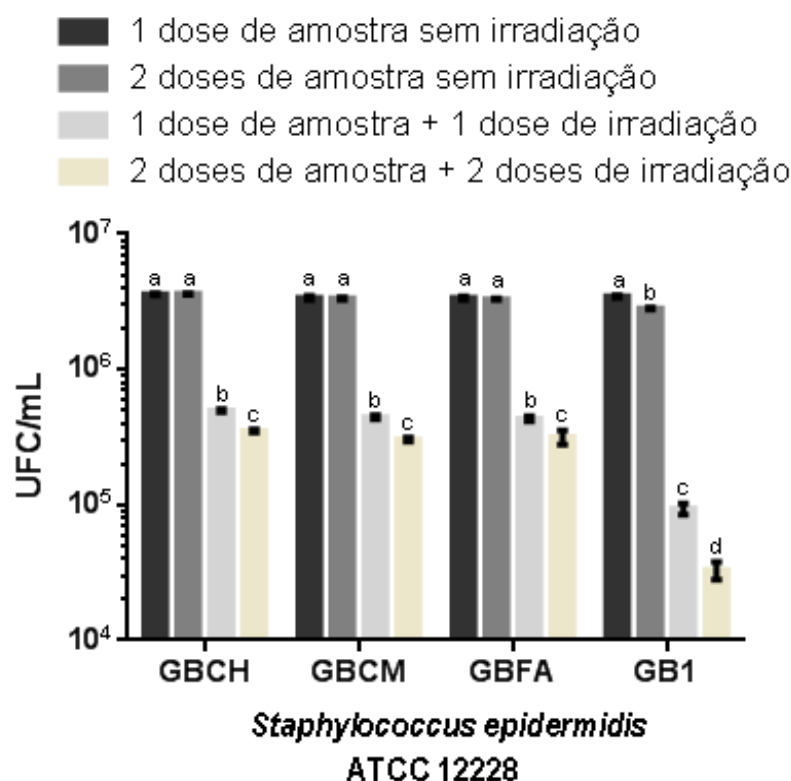


Figura 51. Número de unidades formadoras de colônia por mililitros (UFC/mL), da cepa de *S. epidermidis* ATCC 12228, tratadas com GBCH e GBCM (12,5 mg/mL), GBFA (6,25 mg/mL) e GB1 (50 µM) de *G. blepharophylla*, com uma dose de administração da amostra-teste sem irradiação (■), com duas doses de administração da amostra-teste sem irradiação (■), com uma dose de administração da amostra-teste e uma dose de irradiação (■) e com duas doses de administração da amostra-teste e duas doses de irradiação (■) com laser diodo InGaAIP ($\lambda = 660\text{nm}$). Densidade de energia de cada dose igual a 28 J/cm². Letras distintas indicam diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos (dose de amostra e de irradiação) para cada amostra-teste (one-way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$). Os valores representam a média ± erro padrão de oito repetições.

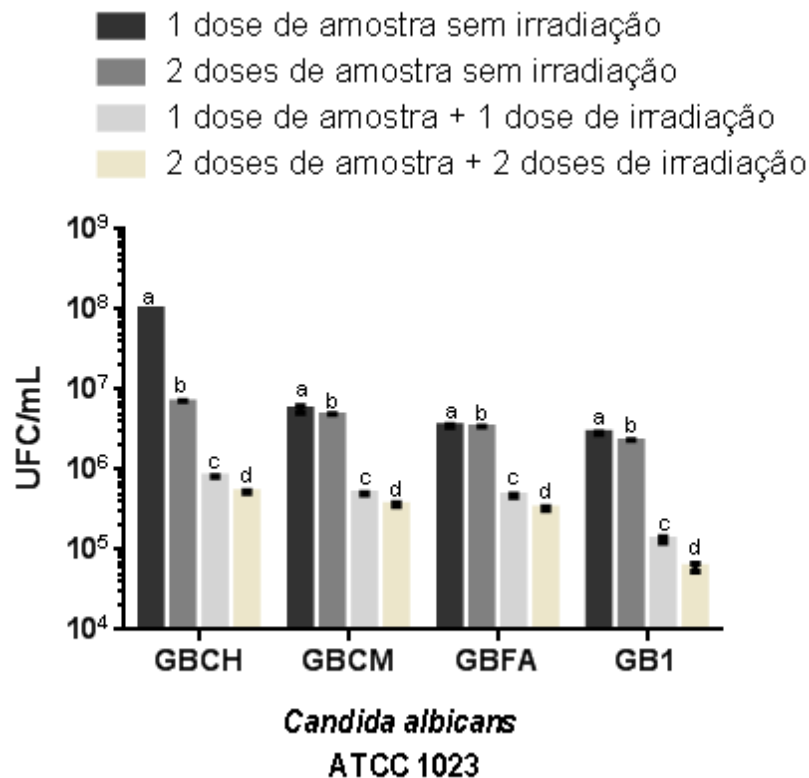


Figura 52. Número de unidades formadoras de colônia por mililitros (UFC/mL), da cepa de *C. albicans* ATCC 12228, tratadas com GBCH e GBCM (12,5 mg/mL), GBFA (6,25 mg/mL) e GB1 (50 μ M) de *G. blepharophylla*, com uma dose de administração da amostra-teste sem irradiação (■), com duas doses de administração da amostra-teste sem irradiação (■), com uma dose de administração da amostra-teste e uma dose de irradiação (■) e com duas doses de administração da amostra-teste e duas doses de irradiação (■) com *laser* diodo InGaAlP ($\lambda = 660\text{nm}$). Letras distintas indicam diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos (dose de amostra e de irradiação) para cada amostra-teste (one-way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão de oito repetições.

4.3.1.5. Avaliação da atividade antimicrobiana na presença de irradiação e permeabilizantes.

Os resultados apresentados no item 4.3.1.2 revelaram que, de maneira geral, a suscetibilidade bacteriana a todas as amostras- teste avaliadas era menor frente às bactérias Gram-negativas em relação às bactérias Gram positivas.

Esta diferença de susceptibilidade entre as espécies nestas duas classificações bacterianas pode ser explicada diferenças fisiológicas, uma vez que espécies de bactérias Gram-positivas apresentam uma membrana citoplasmática rodeada por uma parede celular relativamente porosa composta de peptídeoglicanos e ácido lipoteicóico (LPS) que permite a entrada de substâncias no interior citoplasmático. Já, o envelope celular das bactérias Gram-negativas consiste de uma membrana citoplasmática interior e uma membrana exterior, que são separadas por um periplasma contendo peptídeoglicanos. A membrana exterior forma uma barreira de permeabilidade eficaz entre a célula e seu ambiente e tende a restringir a ligação e penetração de diferentes tipos de substâncias (Minnock *et al.*, 2000).

Assim, com objetivo de aumentar a suscetibilidade das bactérias Gram-negativas ao tratamento, CaCl_2 e MgCl_2 foram adicionados às suspensões de células bacteriana concomitantemente à adição da amostra-teste, antes da iluminação. A cepa utilizada neste ensaio foi *E. coli* ATCC 10799 e as amostras testadas foram todas as substâncias isoladas GB1 e IT1, nas mesmas concentrações utilizadas anteriormente.

Para os alcaloides isolados de ambas as espécies, a presença de CaCl_2 e MgCl_2 contribuiu para uma redução significativa ($p < 0,05$) no número de UFC/mL quando comparado ao do tratamento com o alcaloide sozinho, após a irradiação. A presença de ambos

estes aditivos, somente com as bactérias ou acrescido da amostra teste, na ausência de irradiação, não afetou o crescimento microbiano (Figura 53).

Para GB1, a adição de CaCl_2 e MgCl_2 proporcionou uma redução no número de UFC/mL de 69,9 % e 87,2%, respectivamente. Já para o alcaloide IT1, a redução no crescimento bacteriano na presença de MgCl_2 foi de 31,5% em relação ao tratamento somente com o alcaloide e menor em comparação ao tratamento com o aditivo CaCl_2 , que resultou em redução igual a 53, %.

Vários trabalhos discutem que estes aditivos, que também podem ser substâncias tais como, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) ou polimixinas B (do inglês *polymyxin B non-aapeptidei*) podem aumentar a permeabilidade da membrana exterior das bactérias Gram-negativas reagindo seletivamente com os lipopolissacarídeos que as compõem, desestabilizando a sua integridade. Desta forma, a droga, ou ainda no caso da PDT, os ERO's fotogerados, que geralmente ficavam excluídos da célula bacteriana, passam a se localizar na membrana interna ou penetram no citoplasma podendo causar causando danos na sua integridade levando à morte celular (Bertolini *et al.*, 1990; Valduga *et al.*, 1993; Nitzan *et al.*, 1992; Su *et al.*, 2009).

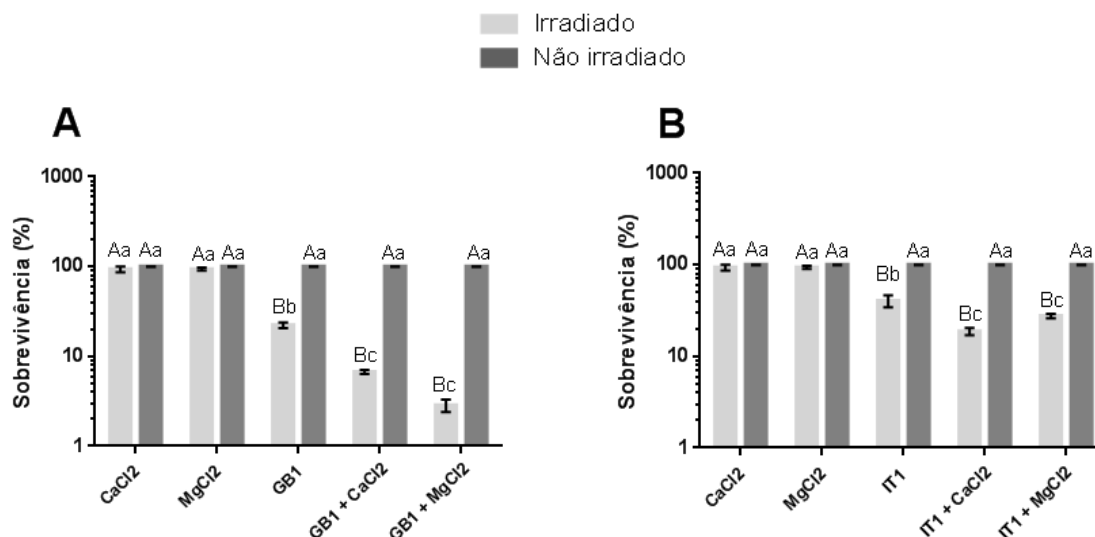


Figura 53. Efeito do CaCl₂ e MgCl₂ na fotoinativação da cepa *E. coli* ATCC 10799 pelas substância GB1, 50µM (A) e IT1, 120µM (B) na ausência (■) e na presença (■) de irradiação com *laser* diodo InGaAIP (28 J/cm², λ= 660nm). Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre a condição irradiada e não irradiada dentro de cada amostra-teste (teste t, p<0,05) e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre as diferentes amostras-teste nas condições irradiada ou não irradiada (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, p<0,05). Os valores representam a média±erro padrão de oito repetições.

Para todos os ensaios de atividade antimicrobiana, os cálculos de redução no número de UFC/mL de cada cepa foram feitos comparando-se o controle não irradiado (mas tratado com a amostra-teste) com o tratamento irradiado. Por isso, em muitos deles, em que também foi observada ação na ausência de luz, a porcentagem final de redução acaba sendo baixa, mas evidentemente maior quando a comparação é feita com o número de UFC/mL do controle microbiano. De qualquer forma, como o critério de taxa de inativação ótima da fotossensibilização é de 50% (Krespi *et al.*, 2005), pode-se admitir que os resultados foram satisfatórios nas condições de ensaios realizadas (dosimetria 28 J/cm², 5 min de interação amostra-teste/micro-organismo). A presença de atividade na ausência de irradiação mesmo em concentração sub-inibitória pode estar relacionada ao procedimento experimental

realizado nos ensaios com *laser*. A CIM foi determinada por método em placa de diluição e traçado de estrias para verificar crescimento microbiano. Já nos ensaios com *laser*, os tratamentos foram diluídos e plaqueados em meio TSA (bactérias) ou ASD (fungos), mais rico em nutrientes e que permitem melhor recuperação dos micro-organismos. A escolha deste meio teve como objetivo se aproximar ao máximo as condições do meio externo em que eles se desenvolvem na infecção e assim garantir uma maior confiabilidade nos resultados observados.

Quanto às amostras, comparativamente, aquelas oriundas de *G. blepharophylla* foram mais ativas frente às cepas de bactérias e principalmente contra as cepas fúngicas que as de *I. truxillensis*. Além disso, de maneira geral os efeitos antimicrobianos por fotoatividade das substâncias isoladas também foram mais intensos que de suas matrizes de origem. A pureza do agente fotossensibilizador é fundamental, pois garante uma melhor excitação das moléculas, uma vez que não há outros componentes que possam prejudicar os processos fotofísicos e fotoquímicos envolvidos na ação fotossensibilizante. Isto só se inverteu nos ensaios com maior dose de irradiação (item 4.3.1.3), nos quais a maior quantidade de energia fornecida pode contribuir para uma excitação mais efetiva de misturas e formação de espécies reativas citotóxicas, mas não necessariamente otimiza o efeito de fotossensibilidade de uma substância pura que já esteja em nível máximo de excitação.

Quanto à sensibilidade de cada cepa de bactéria, as bactérias Gram-positivas tiveram seus crescimentos mais afetados em relação às demais. Diferenças de suscetibilidade da PDT entre espécies bacterianas de Gram-positivas ou Gram-negativas estão diretamente relacionadas à suas morfologias como já discutido no item 4.3.1.5. Já diferenças entre espécies da mesma classificação Gram são mais difíceis de explicar. Fatores considerados são os tipos de barreiras membranares que cada uma possui, diferenças no tipo de enzimas

antioxidantes expressadas ou mecanismos de reparo do DNA disponíveis ou, até mesmo, o tamanho do micro-organismo (Demidova & Hamblin, 2009).

Vários estudos têm demonstrado que a inativação de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* é acompanhada pela alteração das suas ultra estruturas por meio da desorganização da membrana, alongamento das ligações entre células, separação das células filhas, surgimento de diferentes áreas de baixa densidade no citoplasma e por danos causados no DNA (Menezes, Capella, Caldas, 1990; Nitzan *et al.*, 1992; Malik, Faraggi, Savion, 1992; Raghavendra, Koregol, Bhola, 2009; Topaloglu, Gulsoy; Yuksel, 2013; Yao, 2013). Entretanto, cabe ressaltar que modificações na estrutura do DNA talvez não sejam a principal causa de morte celular bacteriana, uma vez que culturas de *D. radiodurans*, conhecidas por ter um mecanismo muito eficiente de reparação do DNA, são facilmente mortos por fotossensibilização (Schafer, Schmitz, Horneck, 1998). Outro fenômeno importante a ser considerado é o de que ao invés de absorver, as bactérias podem difundir a luz, o que torna mais difícil a excitação de agentes fotoativáveis uma vez dentro delas (Demidova & Hamblin, 2004).

Para a cepa *S. aureus* ATCC 14458, os resultados aqui encontrados foram bastante satisfatórios em relação a outros estudos de PDT, nos quais ela vem sendo extensivamente empregada, devido à importância epidemiológica das doenças que causa (Zeina *et al.*, 2001; Banfi *et al.*, 2006). O mesmo pode ser dito de *S. epidermidis* devido ao grande número de infecções hospitalares associadas a este patógeno. Por exemplo, Andreazza *et al.* (2013) observaram para estas duas bactérias reduções de 100% no crescimento bacteriano, quando submetidas ao extrato metanólico (12,5 mg/mL) e hexânico (25 mg/mL) de *Alternanthera brasiliana* e efeito somente contra *S. aureus* (100% de redução), quando tratadas com o extrato hexânico (ensaios realizados nas mesmas condições de irradiação das aqui realizadas).

Aqui, para os extratos metanólicos tanto de *G. blepharophylla* com de *I. truxillensis*, as reduções foram superiores a 90%. ITPH foi inativo na presença de irradiação, mas em contrapartida GBCH causou reduções superiores a 90% contra *S. epidermidis*. Já em trabalho com extratos etanólicos com *Eugenia jambolana* (Labiatae) e *Hyptis martiusii* (Myrtaceae) observaram-se efeitos fototóxicos frente às cepas de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* quando irradiadas com luz UV (Coutinho *et al.*, 2009) e que prejudicou o desenvolvimento destes micro-organismos.

Também foram observadas reduções significativas no crescimento dos fungos, apesar de menos intensas em relação às bactérias (mesmo frente às bactérias Gram negativas, que geralmente são mais resistentes). De modo geral, as cepas de *C. albicans* foram levemente mais suscetíveis que as de *C. dubliniensis*.

As espécies de *C. albicans* apresentam dimorfismo podendo ser encontradas na forma levuriforme (colonização assintomática) ou filamentosa (invasora de tecidos mais profundos em processos patogênicos) e isto está diretamente relacionado à sua patogenicidade e resistência a medicamentos. Diferentes cepas de *C. albicans* são causadoras ou participam de um amplo espectro de patologias superficiais e invasivas (Dignani, Solomkin, Anaissie, 2003) e são principalmente encontradas nas infecções da cavidade bucal em indivíduos imunocomprometidos, na candidíase vaginal e até mesmo em infecções sistêmicas.

Ademais, observou-se nos últimos anos, sem causa evidente, um aumento progressivo de doenças superficiais causadas por espécies emergentes não *albicans*, como *C. dubliniensis* e *C. glabrata*, e por isso acredita-se que elas apresentariam menor sensibilidade a medicamentos antifúngicos em relação às cepas de *C. albicans* (Colli, Clacy, Nguyen, 1999). Para *C. dubliniensis*, foi observada menor patogenicidade, contudo maior resistência a antifúngicos triazólicos (Sullivan *et al.*, 2005). Como o mecanismo de ação da PDT é por

estresse oxidativo, as diferenças encontradas entre as quatro cepas de fungos entre si, podem estar relacionadas a sua composição química como um todo, em particular a composição da membrana plasmática. A presença de componentes membranares mais ou menos suscetíveis a espécies reativas contribui para um maior ou menor dano da integridade da membrana. Lipídeos em geral são alvos fáceis de ERO's, mas quando curtos e saturados, esta sensibilidade aumenta.

Para as amostras de *G. blepharophylla* os resultados obtidos foram efetivos quando comparados à inativação provocada por extratos de outras espécies de fungos já avaliadas. Extratos brutos metanólico e hexânico de *Alternanthera maritima* a 25 mg/mL também reduziram o número de UFC/mL em cerca de 99% contra as cepas de *C. dubliniensis* ATCC 778157 e ATCC 777 com *laser* na mesma dosimetria aqui utilizada, 28J/cm² (Gasparetto *et al.*, 2009).

No caso das amostras de *I. truxillensis*, a ação biocida contra os fungos foi menor em relação às bactérias, uma vez que na mesma concentração de cada amostra teste, a redução bacteriana foi em média de 90% e dos fungos, de apenas 40%. Outros estudos tem mostrado que fungos requerem doses maiores de PS para que o tratamento seja tão efetivo quanto para bactérias. Por exemplo, em estudo com *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*, apesar de todas as cepas terem apresentado redução de crescimento, quando irradiadas na presença de clorina 6 catiônica, a dose deste PS utilizada contra fungo para atingir uma mesma porcentagem de redução obtida com as bactérias, foi cerca de três vezes maior (Demidova & Hamblin, 2004). Assim, o aumento da concentração das amostras-teste de *I. truxillensis* talvez pudesse aumentar o efeito fototóxico frente aos fungos aqui avaliados.

4.3.2 Atividade antiproliferativa

4.3.2.1. Avaliação da atividade antiproliferativa em painel de células tumorais e determinação na concentração para inibição total do crescimento celular (TGI)

Todos os extratos, frações e substâncias puras foram avaliados quanto a sua atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais humanas com diferentes origens histológicas e frente à linhagem controle, célula não tumoral (linhagens VERO (rim de macaco verde) ou 3T3 (fibroblasto murino). Empregou-se o ensaio da sulforrodamina B (SBR) para avaliação do crescimento celular em conformidade com o protocolo de avaliação de amostra-teste preconizado pelo NCI (Monks *et al.*, 1991). Utilizou-se a doxorrubicina como controle positivo (0,025 a 25 µg/mL, Figura 54). As células foram tratadas com quatro concentrações diferentes de cada amostra-teste estudada (0,25 a 250 µg/mL para extratos e frações e 0,0625 a 62,5 µg/mL para substâncias puras) e determinou-se a concentração de cada droga-teste necessária para inibição total do crescimento celular (TGI), com mostrado na Tabela 20.

Para os alcaloides GB2, GB3, GB4 e GB5 este ensaio não foi realizado, uma vez que em trabalho publicado por Costa *et al.* (2011), utilizando-se a mesma metodologia e linhagens celulares o efeito antiproliferativo destas substâncias já havia sido avaliado. De maneira geral GB2, GB4 e GB5 não foram ativos contra nenhuma linhagem testada, já GB3 mostrou atividade significativa contra as linhagens de células de mama (MCF-7) causando redução no crescimento microbiano superior ao do controle positivo doxorrubicina.

Tabela 20. Valores de TGI ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos brutos, frações e substâncias puras avaliados contra o painel de células tumorais. Amostras não irradiadas.

Linhagem Amostra	2	U	M	A	7	4	P	O	H	K	V	Ha
DOXO	0,46	1,39	1,23	38,41	1,01	1,11	29,76	3,61	9,59	197,17	4,11	-
GBCH	-	112,73	72,36	54,40	113,04	128,84	92,68	-	109,14	15,65	117,5	-
GBCM	-	>250	108,71	>250	>250	>250	>250	-	>250	>250	>250	-
GBFA	43,42	95,25	>250	>250	108,10	141,71	98,01	109,67	162,85	>250	74,63	-
GBFN	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	-
GB1	-	10,00	9,76	1,41	10,75	5,55	11,27	10,12	10,11	-	8,49	-
ITPH	-	236,78	53,51	>250	91,40	>250	>250	-	>250	1,2	>250	-
ITPM	-	>250	>250	>250	>250	>250	>250	-	>250	>250	>250	-
ITFA	>250	>250	234,03	>250	>250	>250	-	212,58	>250	-	-	>250
ITFN	>250	136,89	171,61	131,95	220,81	>250	-	129,73	>250	-	-	149,70
IT1	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	-

2 = U251 (glioma, SNC); u = UACC-62 (melanoma); m = MCF-7 (mama); a = NCI-ADR/RES (ovário, resistente a múltiplos fármacos); 7 = 786-0 (rim); 4 = NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); p= PC-3 (próstata) o = OVCAR-3 (ovário); h = HT-29 (colorretal); k = K562 (leucemia); v = VERO (rim, célula normal, macaco verde); Ha = HaCaT (fibroblasto humano). -: não avaliado.

Quanto às amostras-teste oriundas de *G. blepharophylla*, somente GBCH e GBFA (Figura 55A e Figura 55C) mostraram-se ativas. Todas as linhagens tumorais apresentaram alta suscetibilidade à GBCH, principalmente as linhagens K562, leucemia (TGI= 15,65 $\mu\text{g/mL}$), NCI-ADR/RES, ovário, resistente a múltiplos fármacos (TGI= 54,40 $\mu\text{g/mL}$) e MCF-7, mama (TGI= 72,36 $\mu\text{g/mL}$). No entanto, a linhagem controle VERO também se mostrou vulnerável a este extrato. Para GBFA, destaque contra a linhagem MCF-7, mama (TGI= 43,42 $\mu\text{g/mL}$). Para as demais linhagens esta fração também inibiu o crescimento, contudo apresentando valores de TGI superiores àqueles encontrados para a célula controle VERO (TGI= 74,63 $\mu\text{g/mL}$). Curiosamente o extrato GBCM, que deu origem à fração GBFA não apresentou efeito antiproliferativo relevante frente a nenhuma linhagem.

Por outro lado, GB1 mostrou-se muito potente, inibindo fortemente o crescimento celular de todas as linhagens e apresentando valores de TGI muito baixos (Figura 55E), com destaque contra as linhagens NCI-ADR/RES, ovário, resistente a múltiplos fármacos (TGI= 1,41 $\mu\text{g/mL}$) e NCI-H460, pulmão, tipo não pequenas células (TGI= 5,5 $\mu\text{g/mL}$) e UACC-6, melanoma (TGI= 10 $\mu\text{g/mL}$).

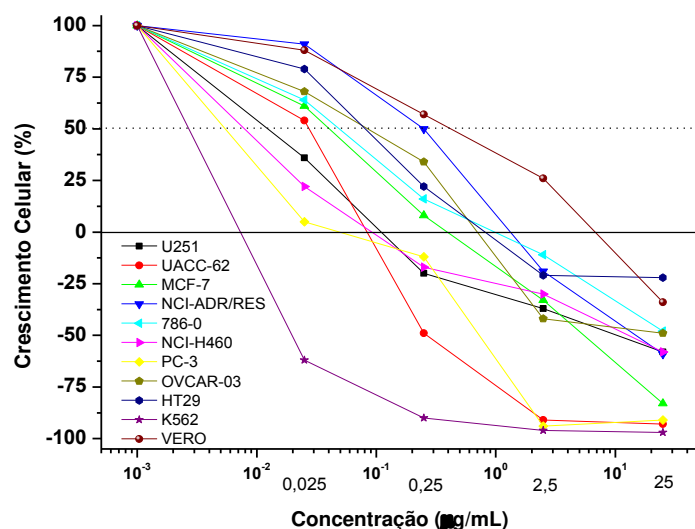
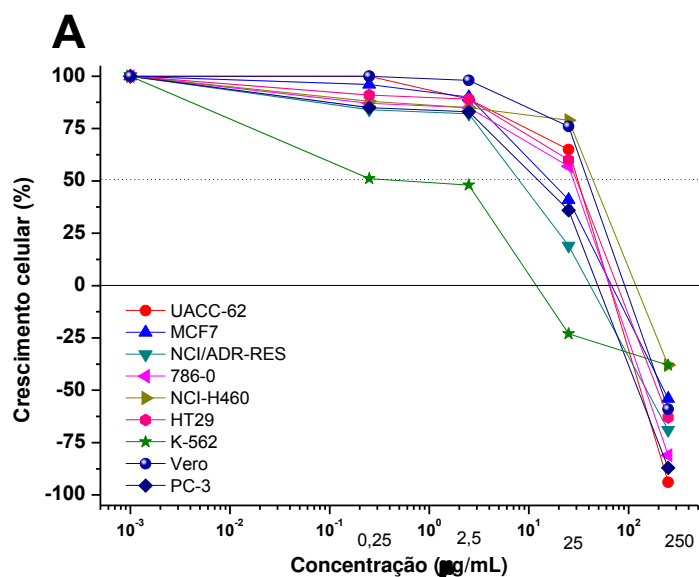
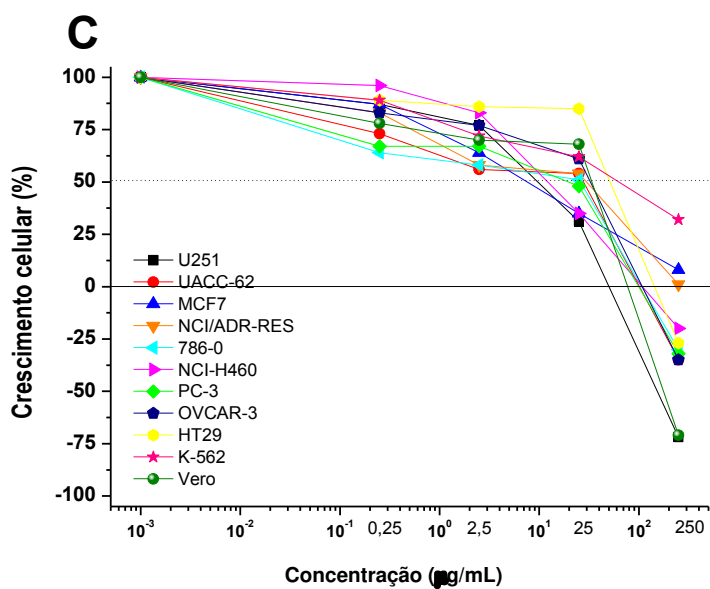
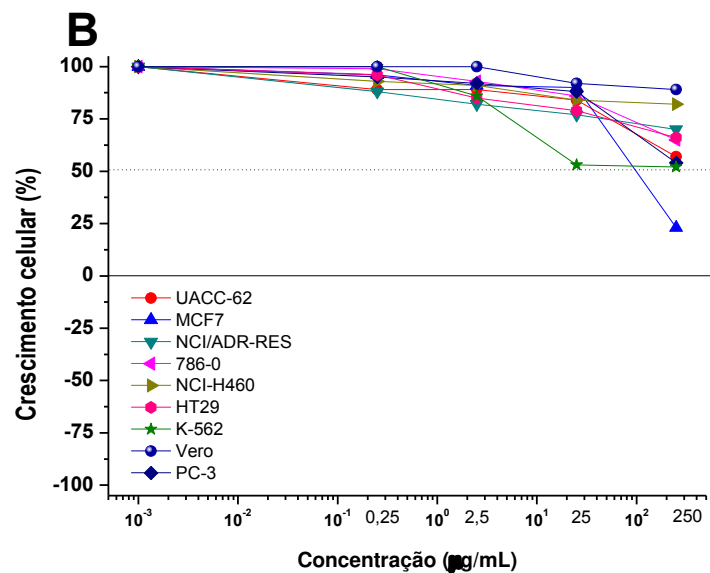


Figura 54. Crescimento celular em função da concentração de doxorrubicina. Linhagens tumorais: 2 = U251 (glioma, SNC); u = UACC-62 (melanoma); m = MCF-7 (mama); a = NCI-ADR/RES (ovário, resistente a múltiplos fármacos); 7 = 786-0 (rim); 4 = NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); p = PC-3 (próstata); o = OVCAR-3 (ovário); h = HT-29 (colorretal); k = K562 (leucemia) e v = VERO (rim, célula normal, macaco verde). Amostras não irradiadas.





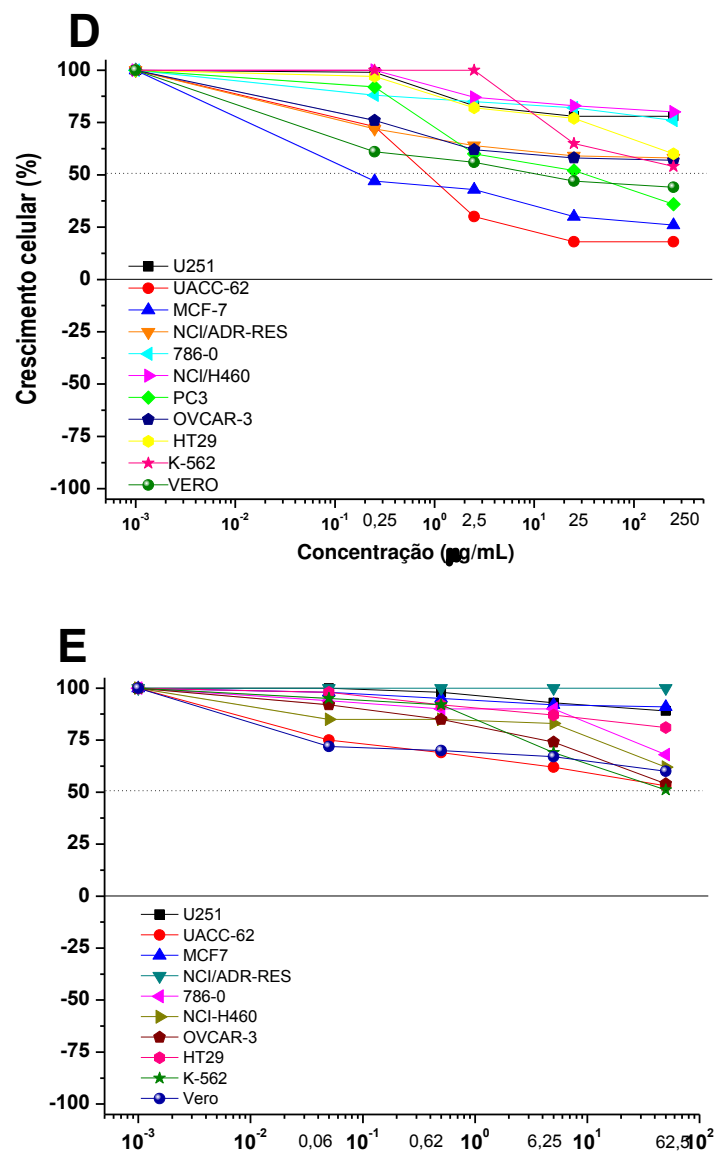
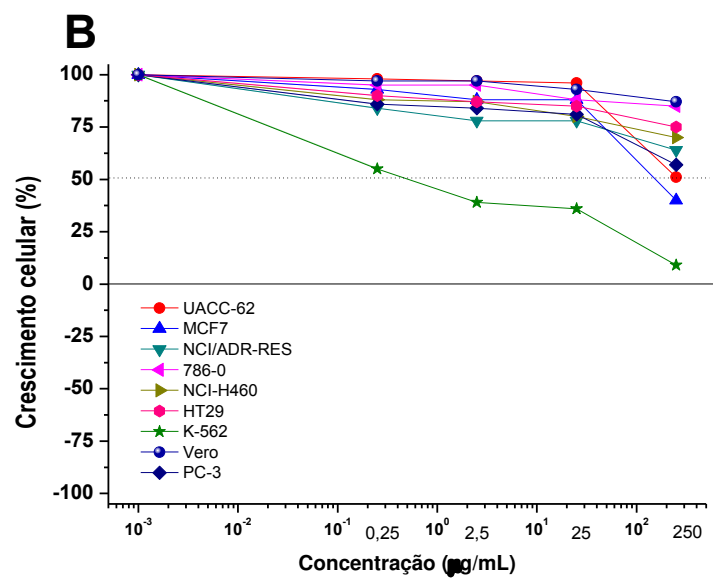
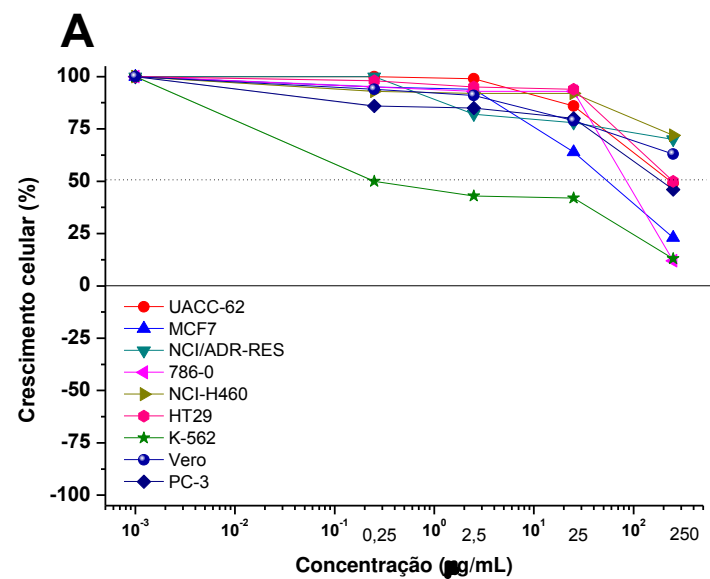


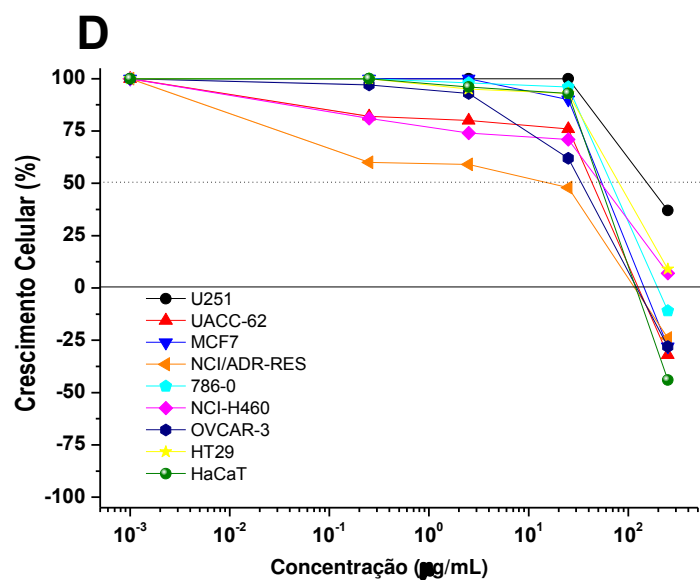
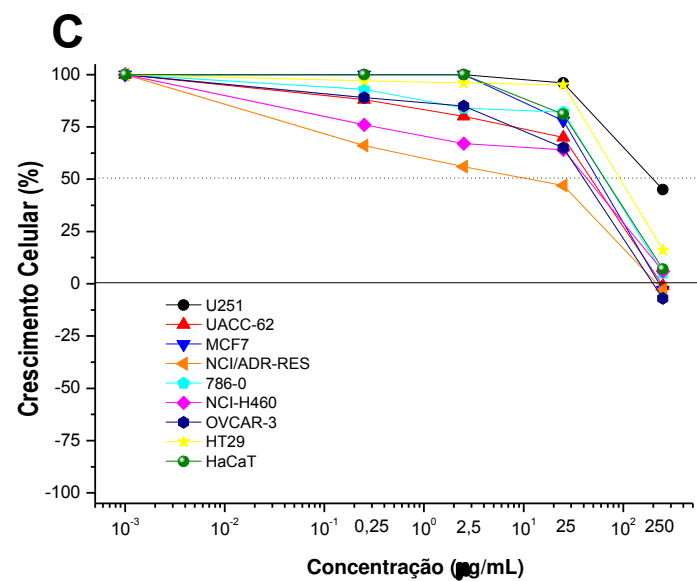
Figura 55. Crescimento celular em função da concentração das amostras-teste GBCH (A), GBCH (B), GBFA (C), GBFN (D) e GB1 (E) oriundas de *G. blepharophylla*. Linhagens tumorais: u = UACC-62 (melanoma); m = MCF-7 (mama); a = NCI-ADR/RES (ovário, resistente a múltiplos fármacos); 7 = 786-0 (rim); 4 = NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); p= PC-3 (próstata); h = HT-29 (colorretal); k = K562 (leucemia) e v = VERO (rim, célula normal, macaco verde).

Já os extratos, frações e substância isolada de *I. truxillensis* mostraram-se pouco ativos contra todas as linhagens de células tumorais testadas, apresentando TGI acima de 250 µg/mL, para os extratos ITPH e ITPM e substância pura IT1 (Figura 56A, B e E) ou valores muito próximos deste, no caso das frações ITFA e ITFN (Figura 56C e D).

Uma vez que a linhagem de melanoma UACC-62 foi uma das linhagens com maior suscetibilidade frente às amostras-teste analisadas, em particular frente às amostras de *G. blepharophylla*, ela foi escolhida para realização dos ensaios na presença de irradiação.

O câncer de pele é caracterizado pela proliferação incontrolável de células cutâneas anormais, que dão origem a um novo tecido, a neoplasia. Existem diferentes tipos que são nomeados segundo o tipo de célula da pele a partir do qual surgem. Os principais são o carcinoma basocelular, o carcinoma das células escamosas e o melanoma, que tem origem nos melanócitos (células produtoras de melanina, substância que determina a cor da pele). Este último consiste no tipo de câncer de pele mais grave, devido a sua alta possibilidade de metástase. O melanoma é uma doença com incidência crescente no mundo todo e no ano de 2012 representou 4% das neoplasias malignas do órgão no Brasil, sendo que em cerca de 24% dos casos, ele foi fatal (<http://www.inca.gov.br>, acessado em setembro de 2013). O fato de ser uma neoplasia cutânea e superficial (dependendo do estágio da doença), a torna uma boa candidata para PDT uma vez que a aplicação da irradiação luminosa é mais fácil de ser administrada (Huang et al., 2013).





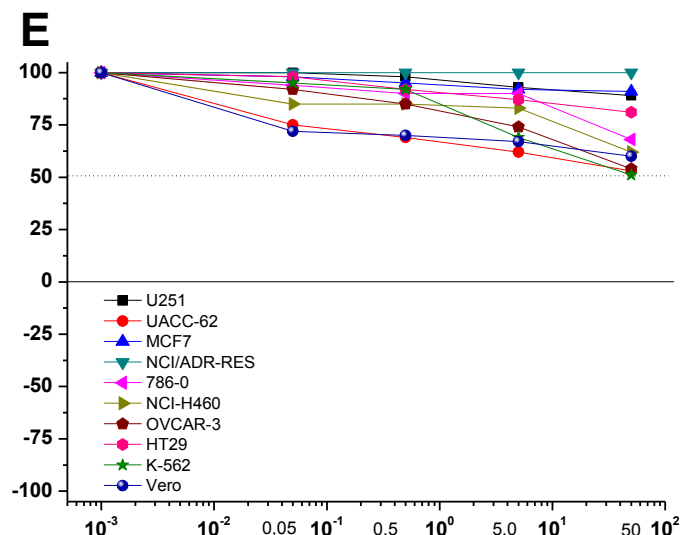


Figura 56. Crescimento celular em função da concentração das amostras-teste ITPH (A), ITPM (B), ITFA (C), ITFN (D) e IT1 (E) oriundas de *I. truxillensis*. Linhagens tumorais: u = UACC-62 (melanoma); m = MCF-7 (mama); a = NCI-ADR/RES (ovário, resistente a múltiplos fármacos); 7 = 786-0 (rim); 4 = NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); p= PC-3 (próstata); h = HT-29 (colorretal); k = K562 (leucemia) e v = VERO (rim, célula normal, macaco verde).

4.3.2.2. Avaliação da atividade antiproliferativa na presença de irradiação

Neste ensaio avaliou-se a atividade antiproliferativa das linhagens 3T3 (fibroblasto murino, célula normal, controle) e UACC-62 (melanoma humano tumoral). Em um primeiro ensaio, avaliou-se o efeito dos extratos e frações de cada espécie em estudo, na presença de irradiação após 5 min de contato das amostras-teste antes da irradiação, seguido de uma dose de irradiação na densidade de energia a 28 J/cm^2 (*laser* diodo InGaAlP à 660 nm) (Figura 57 e 58). Em um segundo momento, avaliou-se o efeito das substâncias isoladas GB1 e IT1 nas mesmas condições descritas acima considerando-se dois tempos de incubação das amostras-teste com às células, prévio à irradiação, iguais a 5 min a 4h (Figura 59 e 60).

A porcentagem de crescimento de ambas as linhagens analisadas foi determinada pelo ensaio da SFB. Os valores abaixo de 100% e acima de zero representam inibição de crescimento, enquanto os negativos (abaixo de zero por cento) representam morte celular, uma vez que a quantidade de células (aferida pela absorbância no final do experimento), no segundo caso, é menor do que aquela no início do experimento (absorbância do T₀). Em todos os experimentos realizados, somente a presença da luz não afetou o crescimento celular de nenhuma das linhagens analisadas. Já os controles positivos apresentaram efeito citotóxico frente às duas linhagens. A doxorrubicina apresentou efeito citocida com morte celular em torno de 30% dos fibroblastos, tanto na ausência como na presença de irradiação. Para linhagem de melanoma, a redução no crescimento celular foi de 60% nas duas condições de irradiação. O azul de metileno, controle positivo da PDT, apresentou efeito citocida, resultando na morte celular em torno de 37% dos fibroblastos, não havendo diferença estatística entre ausência e presença de irradiação. Já, frente ao melanoma, na ausência de irradiação, a morte celular foi de 19% e na presença, de 45%.

Para os extratos e frações oriundos de *G. blepharophylla* (Figura 57) não foi observado efeito citotóxico na ausência de luz. Já nos tratamentos irradiados observou-se efeito citotóxico dose dependente para ambas as linhagens analisadas. Frente à linhagem de melanoma, GBFA apresentou melhor efeito entre as amostras-teste, causando morte de 25% (em relação a T₀) na presença de irradiação, na maior concentração utilizada (48 µg/mL). Cabe ressaltar que esta foi a única amostra com efeito na ausência de luz (30% de proliferação celular em relação ao controle T₀). GBCM e GBFN, que não foram muito ativas nos ensaios com painel de células, passaram a apresentar efeito citotóxico na presença de luz, com 70% e 80% de proliferação celular em relação a T₀, na concentração de 125 µg/mL para ambas,

respectivamente. Já GBCH, na maior concentração avaliada (56 $\mu\text{g/mL}$), à proliferação celular, sob irradiação foi de 55%.

Por sua vez, a linhagem de fibroblasto foi mais suscetível frente todas as amostras teste comparativamente à linhagem de melanoma. As amostras-teste GBCH, GBCM e GBFA, nas maiores concentrações testadas, na ausência de irradiação, resultaram em proliferação celular em relação ao controle T0 iguais a 65,5%, 46,8% e 23%, respectivamente e na presença de irradiação o crescimento celular foi reduzido para 57,5% e 5,5% para GBCH e GBCM, respectivamente e em morte celular em torno de 19,7% para GBFA. Na menor concentração avaliada, 9,25 $\mu\text{g/mL}$, esta fração também mostrou alto efeito citotóxico sem luz, 62,2% de proliferação celular em relação a T0 e efeito citocida na presença de luz com 13,8% de morte celular. Já a fração neutra, GBFN, em ambas as concentrações avaliadas, foi ativa na presença de luz e apresentou efeito citotóxico, com proliferação celular em relação a T0 a 52,4% e 90%, para as concentrações iguais a 125 $\mu\text{g/mL}$ e 25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

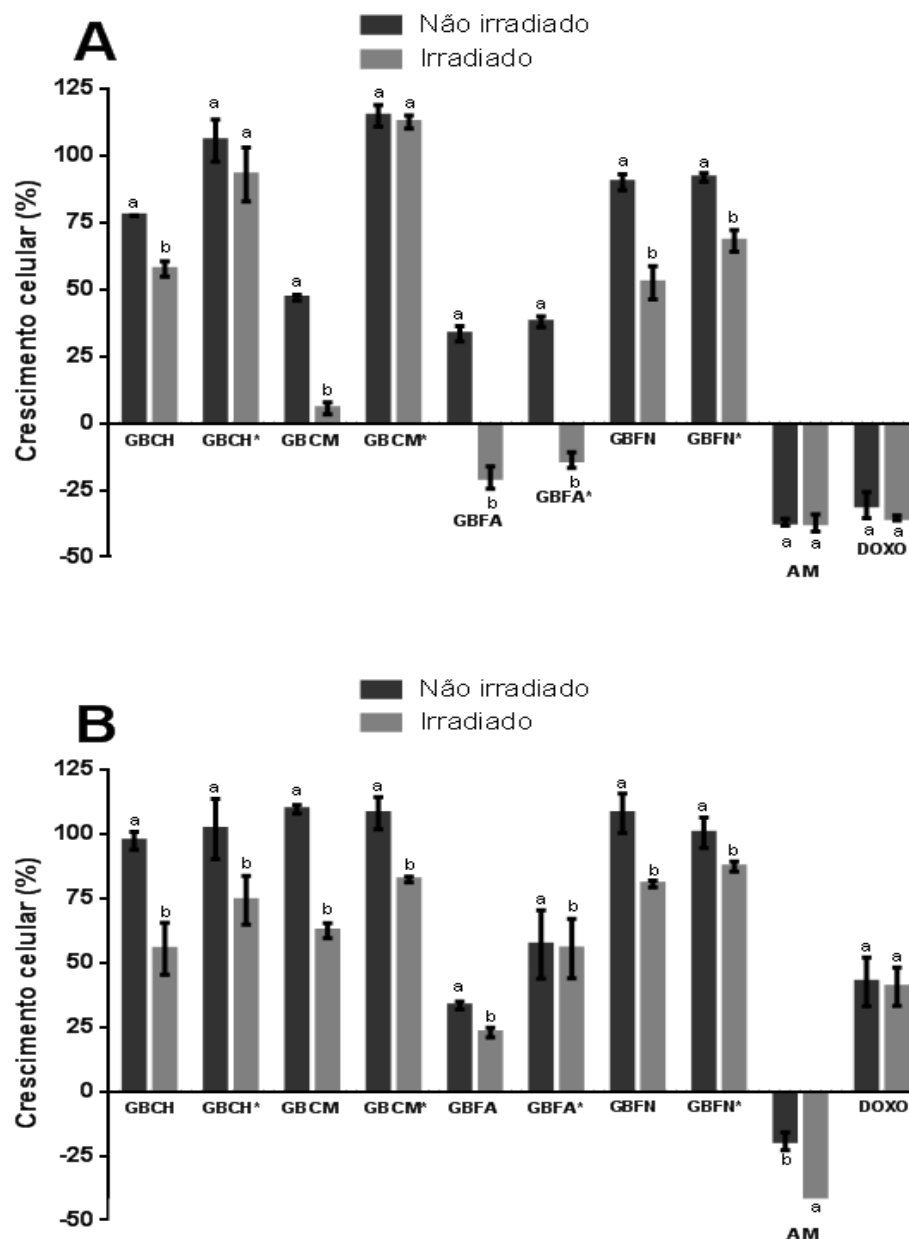


Figura 57. Crescimento celular (%) das linhagens celulares 3T3 de fibroblasto murino (A) e UACC-62 de melanoma humano, (B) em função da concentração das amostras-teste GBCH (56 $\mu\text{g/mL}$), GBCH* (11,2 $\mu\text{g/mL}$), GBCM (125 $\mu\text{g/mL}$), GBCM* (25 $\mu\text{g/mL}$), GBFA (48 $\mu\text{g/mL}$), GBFA* (9,25 $\mu\text{g/mL}$) e GBFN (125 $\mu\text{g/mL}$) e GBFN (25 $\mu\text{g/mL}$) de *G. blepharophylla* na ausência (■) e na presença (□) de irradiação com *laser* diodo InGaAIP (28 J/cm², λ = 660nm). As células foram incubadas por 5 minutos com a amostra-teste antes da irradiação. Letras distintas indicam diferenças estatísticas entre a condição irradiada e não irradiada dentro de cada amostra-teste (teste t, $p < 0,05$). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão de seis repetições.

As amostras-teste oriundas de *I. truxillensis* não apresentaram efeito citotóxico na ausência de irradiação, para ambas as linhagens testadas. Na presença de irradiação, quanto maior a concentração, menor foi a proliferação celular observada, observando-se apenas o efeito citotóxico. A ação frente à linhagem de fibroblasto foi um pouco mais intensa, com proliferação celular em relação a T0 de 75% para todas as amostras teste, na maior concentração testada. Já, nas menores concentrações, ITPH e ITPM a proliferação celular foi de 79%, enquanto que para ITFA a proliferação foi de 60 e 65%, respectivamente.

Frente à linhagem de melanoma, a proliferação celular, nas maiores concentrações utilizadas também foram semelhantes para as amostras-teste ITPH e ITPM, com valor em torno de 75% e em cerca de 85%, nas menores concentrações. Para ITFA e ITFN, nas maiores concentrações aplicadas, as proliferações obtidas ficaram na faixa de 60%, respectivamente. Para estas mesmas amostras, nas menores concentrações, as proliferações celulares foram de 80% para ITFN e 87% para ITFA.

Neste ensaio, observaram-se efeitos variados de cada extrato, mas de modo geral a presença da luz intensificou a ação citotóxica, assim como verificado para os micro-organismos.

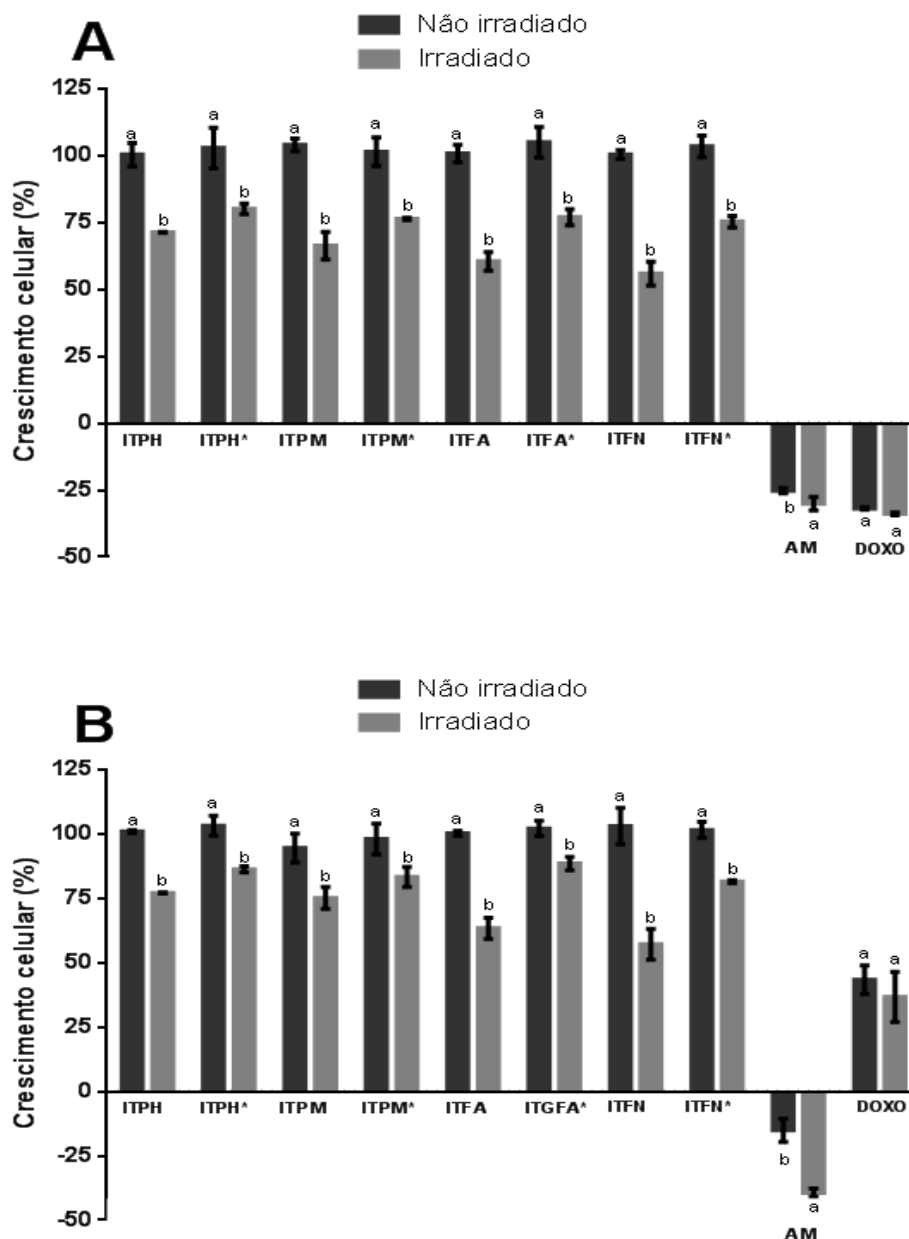


Figura 58. Crescimento celular (%) das linhagens celulares 3T3 de fibroblasto murino (A) e UACC-62 melanoma humano (B) em função da concentração da amostra-teste ITPH (118 µg/mL), ITPH* (24 µg/mL), ITPM (125 µg/mL), ITPM* (25 µg/mL), ITFA (125 µg/mL), ITFA* (25 µg/mL), ITFN (68,5 µg/mL) e ITFN* (14 µg/mL) de *I. truxillensis* na ausência (■) e na presença (▒) de irradiação com *laser* diodo InGaAlP (28 J/cm², λ = 660 nm). As células foram incubadas por 5 minutos com a amostra-teste antes da irradiação. Letras distintas indicam diferenças estatísticas entre a condição irradiada e não irradiada dentro de cada amostra-teste (teste t, p<0,05). Os valores representam a média±erro padrão de seis repetições.

A Figura 59 apresenta o efeito antiproliferativo de GB1, na ausência e presença da irradiação *laser*. Nas duas linhagens celulares estudadas pode-se observar um efeito inibidor da proliferação celular dose dependente, tanto nos tratamentos sem irradiação como em ambos os tratamentos com irradiação (5 min ou 4 h de contato da amostra-teste com as células antes da irradiação), ou seja, quanto maior a concentração do alcaloide, menor a proliferação celular em relação a T0, com exceção da dose de 3,13 µg/mL que mostrou efeito citotóxico promissor frente à linhagem de melanoma quando irradiado e baixo efeito quando não irradiado. Quanto à linhagem de fibroblasto, nesta mesma concentração observou-se baixa redução no crescimento celular em todas as condições de irradiação. A baixa e alta suscetibilidade do fibroblasto e melanoma, respectivamente, na concentração de 3,13 µg/mL, em específico, no tratamento com irradiação após 5 minutos da amostra em contato com as células, indicam ser esta uma concentração interessante para maiores investigações, uma vez que a proliferação celular observada para o fibroblasto manteve-se alta (91,3% em relação a T0) e para o melanoma ela foi menor (62,7%)..

Além disso, de modo geral, a cultura UACC-62 foi mais suscetível a este alcaloide comparando-se as porcentagens de crescimento para uma mesma concentração com e sem irradiação *laser* (5 min ou 4 h após aplicação da droga).

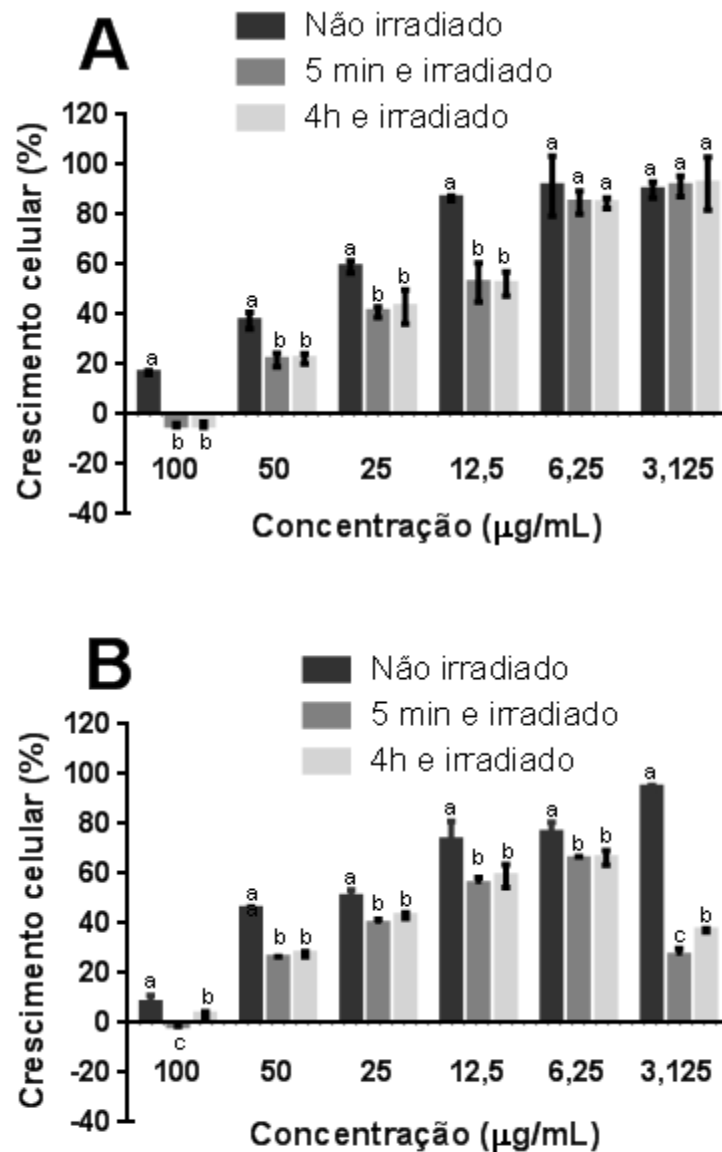


Figura 59. Crescimento celular (%) das linhagens celulares 3T3 de fibroblasto murino (A) e UACC-62 de melanoma humano, (B) em função da concentração da amostra-teste GB1 de *G. blepharophylla* na ausência (■) e na presença (▒) de irradiação com *laser* diodo InGaAIP (28 J/cm^2 , $\lambda = 660 \text{ nm}$). As células foram incubadas por 5 min e 4 h com a amostra-teste antes da irradiação. Letras distintas indicam diferenças estatísticas entre as diferentes condições de irradiação dentro de cada concentração (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão de seis repetições.

A suscetibilidade da linhagem de melanoma ao composto IT1 (Figura 60) também foi maior em comparação à linhagem de fibroblasto em todas as concentrações avaliadas, com efeito de dose dependência aparente, somente frente ao fibroblasto. Além disso, de modo geral não foram observadas diferenças estatísticas significativas na proliferação celular para os tratamentos irradiados após 5 min ou 4 h de exposição da amostra-teste às células, tanto para o melanoma como para o fibroblasto. Nas menores concentrações, 3,13 µg/mL e 6,25 µg/mL, em particular esta última, a proliferação celular do melanoma foi significativamente menor quando comparado ao fibroblasto (60% contra 80%), sendo então selecionada para realização de outras análises discutidas a seguir.

Comparando-se os alcaloides entre si, verifica-se que tanto para o fibroblasto, como para o melanoma, GB1 foi mais ativa que IT1 (menor proliferação celular em doses menores). Isto pode estar relacionado ao grau de hidrofobicidade de cada molécula, uma vez que GB1 possui caráter mais anfifílico que IT1. Diversos estudos com diferentes classes de PSs têm mostrado que aqueles mais anfifílicos exibem maiores taxas de incorporação que aqueles mais hidrofóbicos, além de se manterem em menor estado de agregação, uma vez dentro do interior celular aquoso (Perussi, 2007). Além disso, este resultado é coerente com os resultados encontrados nos ensaios fotoquímicos nos quais a produção de oxigênio singlete (principal agente da PDT) seria maior para GB1 que para IT1.

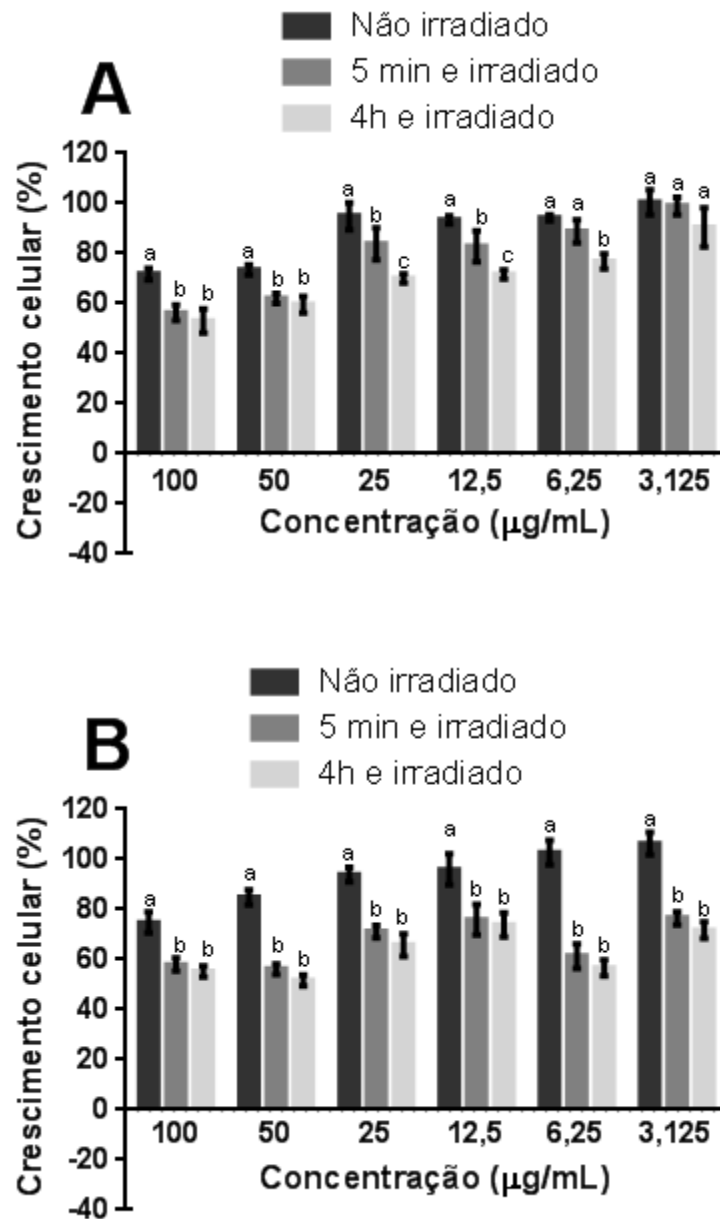


Figura 60. Crescimento celular (%) das linhagens celulares 3T3 de fibroblasto murino (A) e UACC-62 de melanoma humano, (B) em função da concentração da amostra-teste IT1 de *I. truxillensis* na ausência (■) e na presença (■) de irradiação com *laser* diodo InGaAIP (28 J/cm², λ = 660nm). As células foram incubadas por 5 min e 4 h com a amostra-teste antes da irradiação. Letras distintas indicam diferenças estatísticas entre as diferentes condições de irradiação dentro de cada concentração (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão de seis repetições.

4.3.2.3. Avaliação da atividade antiproliferativa de cada substância isolada empregando-se diferentes densidades de energia da irradiação *laser*

O resultado do ensaio anterior permitiu determinar quais das concentrações utilizadas proporcionavam o menor crescimento celular da cultura da linhagem tumoral (melanoma, UACC-62), sem afetar na mesma intensidade o crescimento da célula controle (3T3, fibroblasto).

Assim, neste segundo ensaio foi avaliado o efeito das substâncias isoladas GB1 e IT1, na presença de irradiação *laser* a 660 nm, na viabilidade das mesmas culturas celulares, empregando-se três densidades de energia durante a irradiação (28, 56 e 84 J/cm²). O tempo de incubação de cada amostra-teste com as culturas celulares antes da irradiação foi de 5 min ou 4 h.

Os resultados obtidos indicaram que o tratamento somente com o *laser*, nas diferentes densidades de energia utilizada, não teve efeito no crescimento celular (resultados não apresentados nos gráficos).

Para a amostra-teste, GB1 (Figura 61), na cultura controle, fibroblasto, observou-se pequena redução do crescimento celular nas diferentes densidades de energia utilizadas, em comparação com os tratamentos não irradiados e, portanto, baixo efeito citotóxico. Já, para linhagem de melanoma, observou-se que quanto maior a densidade de energia, menor a proliferação celular, sendo que a incubação a 5 min, prévia à irradiação, foi estatisticamente mais efetiva no efeito citotóxico do composto em relação ao tratamento de incubação por 4 h.

A maior efetividade na ação citocida, com irradiação após 5 min de exposição à amostra teste GB1 na cultura de melanoma levanta a hipótese de que este alcaloide, quando em baixas concentrações (uma vez que não foram observadas diferenças estatísticas no efeito

citotóxico nos diferentes períodos de incubação para as maiores doses) deva ser rapidamente metabolizado em outras substâncias que não apresentam propriedades fotossensibilizantes. Dessa forma, após 4 h, supõe-se, que a concentração no meio intracelular estaria bem mais baixa resultando em menor quantidade de espécies reativas e assim efeito fototóxico mais brando.

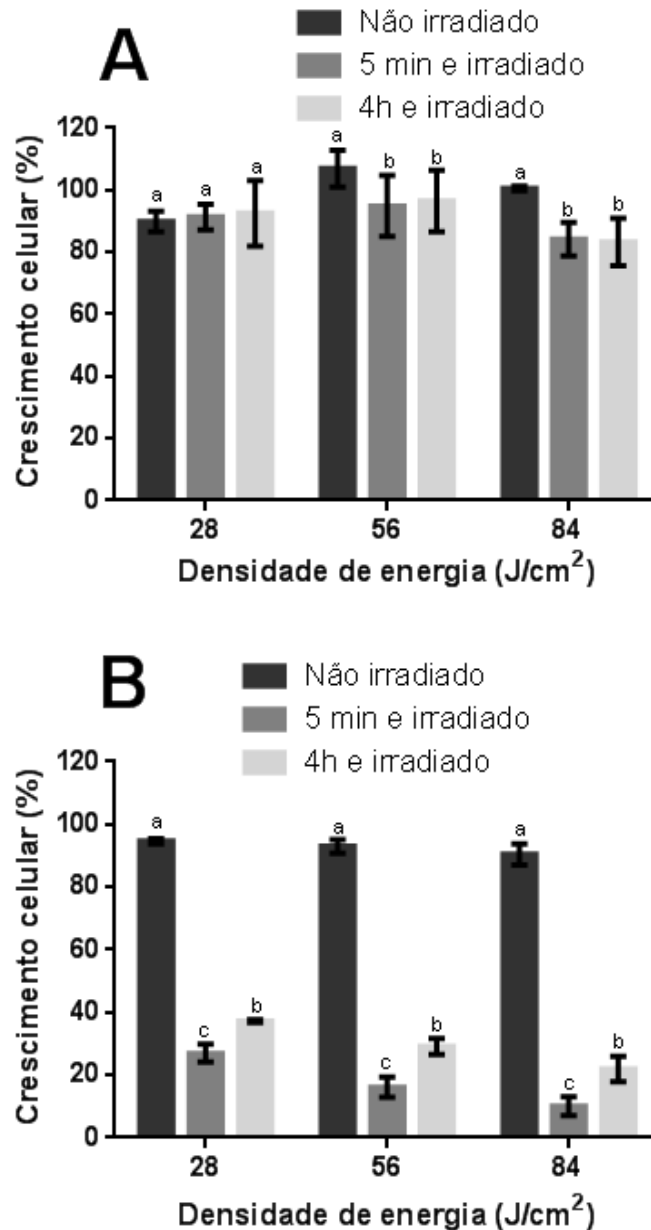


Figura 61. Crescimento celular (%) das linhagens celulares 3T3 de fibroblasto murino (A) e UACC-62 de melanoma humano, tratadas com GB1 (3,13 $\mu g/mL$) de *G. blepharophylla* na ausência (■) e na presença de irradiação com *laser* diodo InGaAIP ($\lambda = 660nm$) em diferentes densidades de energia, 28 (■), 56 (■), 84 (■) e 112 J/cm^2 (■). A amostra-teste foi incubada com as células por 5 min ou 4 h antes da irradiação. Letras distintas indicam diferenças estatísticas entre as diferentes condições de irradiação dentro de uma mesma densidade de energia (one-way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão de seis repetições.

Os resultados obtidos com a substância IT1 (Figura 62) indicaram que para a linhagem de fibroblasto, houve redução no crescimento celular nos tratamentos irradiados em relação ao tratamento com ausência de luz, mas que de modo geral o tempo de incubação com a droga antes da exposição da luz foi indiferente estatisticamente para o efeito citotóxico. A menor proliferação celular foi observada para o tratamento a 84 J/cm^2 e igual a 29,9%.

Já o melanoma, foi mais suscetível ao composto, com maior redução no crescimento, quanto maior a densidade de energia. Contudo o tempo de incubação da amostra-teste prévio à irradiação, só foi significativo para o tratamento a 84 J/cm^2 , que levou a uma proliferação celular de apenas 31,4%. A indiferença do tempo de incubação prévio à irradiação na sua ação citotóxica seria reflexo da maior estabilidade do composto, provavelmente com metabolização mais lenta pelas células.

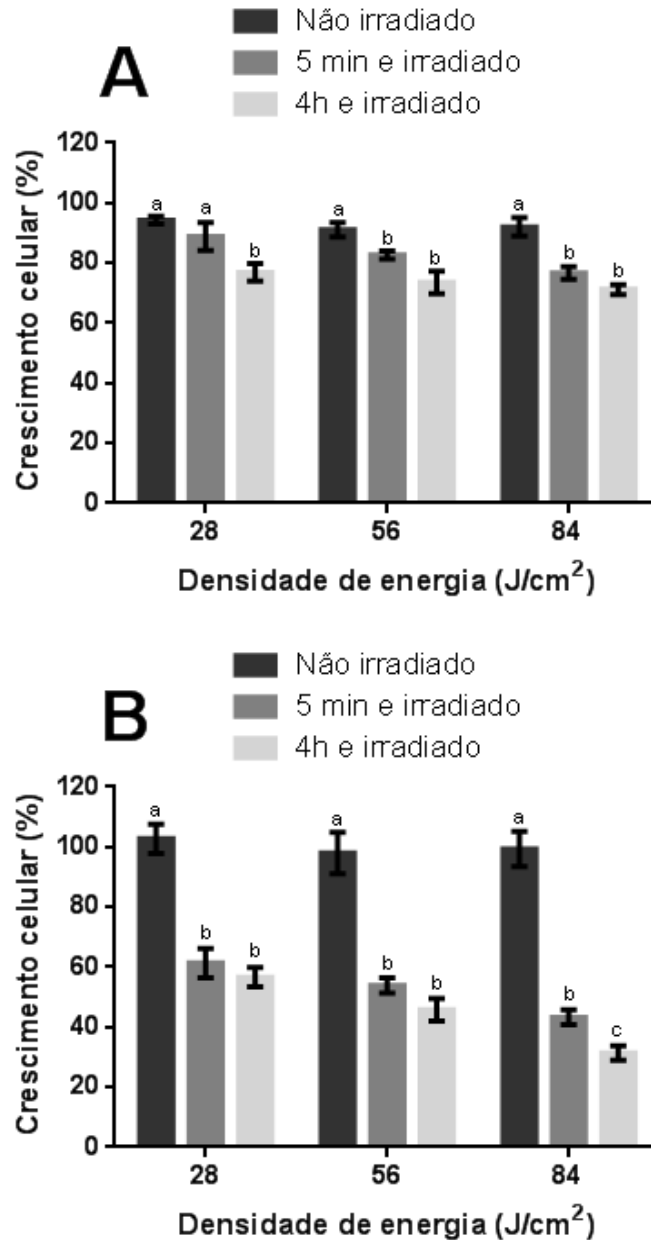


Figura 62. Crescimento celular (%) das linhagens celulares 3T3 de fibroblasto murino (A) e UACC-62 de melanoma humano, tratadas com IT1 (6,25 $\mu g/mL$) de *I. truxillensis* na ausência (■) e na presença de irradiação com *laser* diodo InGaAlP ($\lambda = 660$ nm) em diferentes densidades de energia, 28 (■), 56 (■), 84 (■) e 112 J/cm^2 (■). A amostra-teste foi incubada com as células por 5 min ou 4 h antes da irradiação. Letras distintas indicam diferenças estatísticas entre as diferentes condições de irradiação dentro de uma mesma densidade de energia (one-way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão de seis repetições.

Na Figura 63 são apresentados os resultados para o alcaloide Berberina, utilizado como produto natural de referência e controle experimental nos ensaios de PDT antitumoral que, como esperado, não apresentou efeito fototóxico frente à linhagem 3T3 de cultura de célula de fibroblasto, quando submetido à irradiação *laser* a 660 nm por 5 min (28 J/cm^2), uma vez que esse alcaloide não absorve luz no comprimento de onda de excitação utilizado e sim a 420 nm (vide Capítulo 2). Isto mostra que a irradiação *laser* em PDT deve ocorrer no comprimento de onda, onde a substância fotossensibilizante apresenta absorção naquele ambiente químico (Inbaraj *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2009a e b). Cabe ressaltar ainda que neste ensaio o controle celular apresentou crescimento de 100% e os controles positivos doxorrubicina e azul de metileno, efeito semelhante ao verificado nos ensaios anteriores.

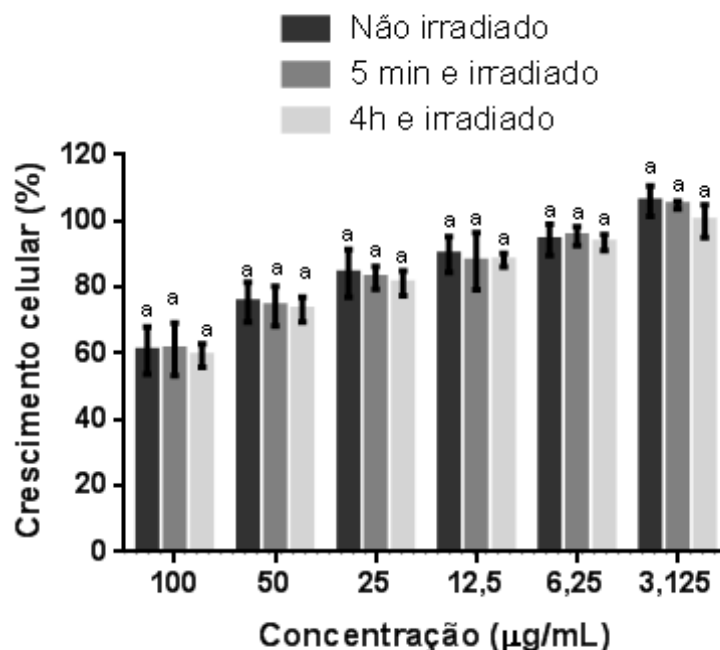


Figura 63. Crescimento celular (%) das linhagens celulares 3T3 de fibroblasto murinho em função da concentração do padrão de referência Berberina na ausência (■) e na presença (■) de irradiação com *laser* diodo InGaAlP (28 J/cm^2 , $\lambda = 660 \text{ nm}$). As células foram incubadas por 5 min e 4 h com o padrão antes da irradiação. Letras distintas indicam diferenças estatísticas entre as diferentes condições de irradiação dentro de cada concentração (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão de seis repetições.

Na análise das características espectroscópicas no estado estacionário (absorção e fluorescência) dos extratos e frações das duas espécies estudadas, observou-se que estas amostras apresentaram picos de absorção na região em torno de 660 nm e emissão de fluorescência quando excitados nos respectivos comprimentos de onda de absorção.

Como já apontado anteriormente, este comportamento absorptivo é ideal dentro de um contexto de PDT, pois se encontra na região do espectro eletromagnético denominado janela terapêutica, no qual a luz é absorvida mais eficientemente por tecidos biológicos, garantindo uma excitação mais eficiente dos PSs presentes nestes extratos/frações e consequentemente, a geração de espécies citotóxicas que podem levar à morte das células alvo. A fonte de luz

empregada nos ensaios biológicos, o *laser* diodo InGaAlP, com emissão de luz à 660 nm, remeteu à possibilidade destas amostras-teste absorverem tal comprimento de onda, e consequentemente serem avaliadas como fotossensibilizadores naturais.

Associado a isso, os resultados obtidos nos ensaios de fotodegradação do 1,3-DPBF são sugestivos da produção de oxigênio singleto para maioria dos extratos e frações. O oxigênio singleto, resultado da reação do tipo II, é descrito (Castano, Demidova, Hamblin, 2004) como o principal responsável como agente citotóxico da PDT e altos rendimentos na sua produção garantiriam um efeito citocida mais eficiente em comparação com o efeito de outras espécies radicalares geradas pela reação do tipo I.

Apesar disso, o extrato ITFA, o qual apresentou baixa produção de oxigênio singleto no monitoramento fotoquímico, nos ensaios biológicos, mostrou excelente ação biocida contra todas as cepas bacterianas (destaque para *S. aureus* ATCC 14458, com inibição completa do crescimento) e ação satisfatória contra as cepas de fungos e linhagem de célula tumoral melanoma, UACC-62, que muito provavelmente é resultado na produção radicais livres na interação desta fração com a luz nos ensaios de PDT.

Como estes extratos e frações são misturas complexas, deduz-se que, as propriedades fotossensibilizantes observadas seriam o resultado de diferentes tipos de reações químicas entre seus diversos componentes entre si, que em conjunto com o substrato biológico, culminariam na formação de espécies radicalares citotóxicas. Dependendo da composição de cada um deles, estas reações tenderiam a seguir processos fotoquímicos voltados para produção majoritária de radicais livres ou de oxigênio singleto, com a prevalência do mecanismo fotoquímico tipo I ou tipo II.

Assim, na prática da PDT, os extratos e frações que apresentaram efeito biocida poderiam ser utilizados como um fitoterápico, desde que garantidas a segurança, eficácia e a

qualidade do produto. Como a ação destas amostras se daria, por efeito sinérgico cabe ressaltar que a administração do fitoterápico seria exclusivamente por via tópica para evitar alteração de sua composição devido ao processo de metabolização que pode acontecer com algumas substâncias quando administradas por via oral. Além do uso terapêutico, estas amostras poderiam ser aplicadas para outras finalidades, tais como na esterilização de sangue, eliminação de pragas agrícolas e no tratamento de efluentes (Sharman, Allen, Lier, 1999; Ben & Jori, 2000; Carvalho *et al.*, 2007)

Além disso, a garantia da ação fotossensibilizante por efeito sinérgico dos diferentes constituintes e a reprodutibilidade da atividade biológica exigem um conhecimento mais detalhado do perfil químico destes fitoderivados. Para tanto, variações de composição geradas por sazonalidade, fatores edáficos e até mesmo região de coleta das matrizes vegetais precisariam ser avaliados.

A mesma lógica discutida para os extratos e frações pode ser aplicada às substâncias GB1 e IT1. Tanto GB1, quanto IT1 são alcaloides que apresentaram pico de absorção a 660 nm e a irradiação das amostras testes em comprimento de onda compatível ao perfil de absorção nos ensaios biológicos, também remete à possibilidade de a resposta biológica por eles apresentada respeitar mecanismos característicos de geração de espécies citotóxicas segundo os conceitos fotofísicos e fotoquímicos que definem um fotossensibilizador. Associado a isto, os resultados de avaliação de produção de oxigênio singlete realizados com estas amostras-teste reforçam esta hipótese.

Ainda, os estudos fotoquímicos remetem à provável ocorrência majoritária do mecanismo do tipo II para o alcaloide GB1 e do mecanismo do tipo I para IT1. O efeito oxidativo gerado pelo oxigênio singlete é mais pronunciado que o causado por ERO's e isto estaria relacionado ao melhor efeito fotossensibilizante observado para GB1, tanto frente aos

micro-organismos como contra as duas linhagens de células animais. No entanto, o menor efeito de IT1 frente à linhagem humana saudável, fibroblasto, o torna um candidato mais interessante para ensaios mais detalhados de PDT antitumoral tanto *in vitro* com *in vivo*. Para ambas as substâncias, os maiores desafios encontrados estão relacionados à suas solubilidades em solventes aquosos. Sabe-se que a insolubilidade pode levar à formação de agregados das moléculas em solução o que dificulta a sua excitação adequada e a ocorrência homogênea das reações fotoquímicas para formação das espécies reativas em PDT.

Contudo, a confirmação do potencial destas duas substâncias como fotossensibilizadores, carece de análises espectroscópicas mais avançadas e com medidas quantitativas diretas que determinem os rendimentos quânticos de seus estados tripletes (Φ_T) e rendimentos quânticos de produção de oxigênio singlete (Φ_Δ). Assim, este estudo abre perspectivas para pesquisas futuras para caracterização fotoquímica e fotofísica destes alcaloides isolados uma vez que inclusive não existem dados disponíveis na literatura para se utilizar como valores de referência para os cálculos de alguns parâmetros fotoquímicos.

Além disso, no caso da PDT antimicrobiana, são necessários ensaios mais detalhados que avaliem os alvos intracelulares preferenciais dos produtos fototóxicos gerados por estes alcaloides (membrana, mitocôndria, DNA), assim como o desenvolvimento de sistemas nanoparticulados carreadores que aumentem a absorção destes agentes pelas bactérias e possibilitem a administração de doses menores.

Já no caso do estudo com linhagens celulares cancerígenas, são indispensáveis investigações mais pormenorizadas quanto à toxicidade frente a diferentes linhagens celulares saudáveis, assim como análises de solubilidade e estabilidade destas substâncias em diferentes meios de solubilização, uma vez que a natureza do solvente interfere diretamente no grau de agregação das partículas e, conseqüentemente, nas suas propriedades fotofísicas e, portanto

efeito fotobiológico. Além disso, uma vez que muitos fármacos interagem com diferentes proteínas do soro fisiológico (LDL e albumina), estudos tanto *in vitro* como *in vivo* que elucidem a influência destas moléculas na incorporação celular das amostras estudadas. Ainda, a realização de estudos farmacocinéticos e biofarmacotécnicos também são importantes com vistas à aplicações terapêuticas destes fitoderivados bioativos.

Portanto, pelos resultados obtidos, pode-se dizer que este estudo mostrou-se efetivo na prospecção químico-farmacológica de substâncias e fitoderivados bioativas para aplicação em PDT antimicrobiana e antitumoral, gerando novos conhecimentos na área e cumprindo seus objetivos uma vez que foram isolados e identificados alcaloides que apresentaram efeitos fototóxicos nos diferentes modelos biológicos empregados quando submetidos a irradiação *laser* a 660 nm em concentração sub-inibitória.

5. Conclusões

Dentro da proposta do trabalho neste primeiro Capítulo, podemos destacar as seguintes conclusões:

- Os extratos brutos hexânico e metanólico de *G. blepharophylla* (GBCH e GBCM), o metanólico de *I. truxillensis* (ITPM) e frações alcaloídicas (GBFA e ITFA) de ambas as espécies vegetais apresentaram bandas de absorção entre 600-800 nm compatíveis com a região de trabalho da PDT;
- Do estudo fitoquímico biomonitorado destas plantas isolaram-se cinco substâncias de *G. blepharophylla*, todas alcalóides isoquinolínicos do subgrupo dos oxoaporfínicos e um de *I. truxillensis*, da classe dos alcalóides bis-indólicos. As substâncias GB1 e IT1 apresentaram bandas de absorção da região do espectro eletromagnético interessante para emprego em PDT;
- Os ensaios fotoquímicos com a sonda 1,3 DPBF são sugestivos da produção de oxigênio singlete por GBCH, GBCM, GBFA, ITPM, assim como para a substância isolada GB1.
- Ensaio microbiológico *in vitro* de PDT com o emprego de substâncias supressoras de espécies reativas excitadas e antioxidantes evidenciou predominância da ação fototóxica pelo mecanismo do tipo II para substância GB1 (prevalência da formação de oxigênio singlete) e do mecanismo do tipo I, para substância IT1 (prevalência da formação de outras espécies radicalares).
- Os extratos metanólicos, frações alcaloídicas e substâncias GB1 e IT1, em concentração sub-inibitória, reduziram o crescimento microbiano das cepas bacterianas e fúngicas quando irradiadas com *laser* de baixa potência (InGaAIP) a 660nm nas condições experimentais

realizadas. Estas mesmas amostras-teste, em concentração abaixo da TGI, também apresentaram efeito citóxico frente às linhagens celulares humanas fibroblasto (linhagem celular não tumoral) e melanoma, sendo a linhagem tumoral de melanoma mais suscetível ao efeito da PDT com GB1 e IT1.

CAPÍTULO 2

Sistemas nanoparticulados com alcaloides isoquinolínicos para aplicação em PDT antitumoral: emprego da biofotônica na análise da interação da berberina e isomoschatolina com LDL em modelos celulares.

1. Introdução

As células eucarióticas são limitadas por uma membrana plasmática e o seu interior divide-se em compartimentos aquosos separados por um sistema de membrana interna. Assim, a penetração de uma molécula na célula, e a sua distribuição pelas várias estruturas intracelulares, estão intimamente ligados, com a sua solubilidade nos compartimentos aquosos e a sua capacidade de atravessar as membranas. Para uma molécula hidrofílica, a menos que o seu tamanho reduzido permita que ela se distribua mais ou menos livremente através da membrana, esta última constituirá uma difícil barreira. A passagem pela membrana, só é então possível devido a diferentes processos (difusão facilitada, transporte ativo, etc.). Já para uma molécula hidrofóbica, as membranas são ao contrário uma localização bastante favorável (Alberts, 2007).

Na maioria das vezes, quando caminham no corpo, moléculas insolúveis são carregadas por “transportadores”. O β -caroteno, por exemplo, é transportado no sangue por meio de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (Bjornson *et al*, 1976). Tais associações podem também influenciar a entrada da molécula carregada nas células.

O desenvolvimento de formulações farmacêuticas que melhorem a estabilidade, a solubilidade e tenha reflexo na farmacocinética de uma substância pode contribuir para uma maior eficácia terapêutica, permitindo sua administração em menores doses e diminuindo efeitos adversos (Sharge & Yu, 1999). No contexto da PDT, estudos neste sentido têm se multiplicado nos últimos anos, uma vez que um dos maiores desafios é solucionar o problema de solubilidade dos PSs, que insolúveis formam agregados e com isso não atuam da maneira mais eficiente possível na formação de espécies fototóxicas.

Além disso, a fim de se fazer escolhas racionais dentro do grande rol de PSs disponíveis, em particular para tratamento do câncer, é necessário compreender alguns dos aspectos mecanísticos de como eles se comportam sob iluminação, quando colocados em contato com células de mamíferos em cultura de tecidos, tais como: mecanismos de absorção envolvidos, localização intracelular, mecanismo fotoquímico predominante (tipo I ou II), vias de sinalizações celulares ativadas, mudanças provocadas no metabolismo celular, fatores de transcrição e genes expressados e tipo de morte celular induzida (Castanho, Demidova, Hamblin, 2004, 2005).

O mecanismo de absorção e a distribuição intracelular do fotossensibilizador são os principais determinantes de sua eficácia na PDT (Mojzisova *et al.*, 2007). Como o oxigênio singlete e os radicais livres possuem uma meia vida curta (cerca de 3 μ s para $^1\text{O}_2$ em água) e pouco se difundem nos tecidos biológicos (raio de ação de 20 nm), é esperado que o local de atuação seja próximo ao local de geração (Moan & Berg, 1991). O PS pode se acumular em diferentes organelas e isso estará diretamente relacionado ao dano fotoinduzido e, conseqüentemente, a sua eficiência citotóxica (Oliveira *et al.*, 2011). Ainda, o local preferencial de acúmulo e sua compartimentalização ou não, está diretamente relacionado ao tipo de PS e ao tipo celular, ou seja, a determinação de alvos primários que são afetados pela

irradiação esta diretamente ligada à localização precisa do PS, que por sua vez, está intimamente ligada à sua via de internalização celular.

Desde o início da década de 90 (Geze *et al.*, 1993) tem sido proposto que os lisossomos seriam um alvo intracelular crítico para localização dos PSs (principalmente os hidrofóbicos) e que, apesar de resultarem na morte celular após iluminação, a eficácia relativa dos PSs localizados nesta organela, era significativamente menor que aquela observada para os localizados em outros compartimentos intracelulares (Berg & Moan, 1994, MacDonald *et al.*, 1999). Outros estudos mostraram que PS inicialmente localizados em lisossomos podem se redistribuir no interior celular via permeabilização fotodinâmica da membrana lisossomal alcançando outros compartimentos como o citoplasma e núcleo, após uma pequena dose de irradiação. Além disso, foi ainda observado que o dano celular fotoinduzido aumentaria com doses maiores de irradiação (Berg *et al.*, 1991; Peng *et al.*, 1991). Mais recentemente, há relatos que para alguns PSs, após ruptura do lisossomo, ocorre à liberação de moléculas de sinalização que resultam na morte celular por apoptose pela via mitocondrial, com ativação da proteína Bax, liberação do citocromo c, e ativação de caspases (Liu, Zang, Ching, 2011).

Em muitos estudos também foi observado o acúmulo preferencial de alguns tipos de PSs nas mitocôndrias (Morgan & Oseroff, 2001; Kessel *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2010), principalmente de PSs hidrofóbicos e com cargas catiônicas, devido à composição da membrana externa da bicamada lipídica desta organela e devido ao seu potencial eletroquímico (Rashid & Hobin, 1990; Dummin, Cernay, Zimmermann, 1997). Em função do dano mitocondrial produzido após iluminação de células tratadas com estes PSs a morte celular geralmente se dá por apoptose. O complexo de Golgi e retículo endoplasmático já foram descritos como locais de acúmulo de PSs, principalmente nos casos em que se fornecem moléculas precursoras que, após metabolismo celular resultam na formação do PS

in situ (Peng *et al.*, 1997; Anand *et al.*, 2011). Já o acúmulo na membrana plasmática é relativamente incomum na PDT e geralmente não resulta em um alto dano fotoquímico nas células (Castano, Demidova, Hamblin, 2005).

O desenvolvimento da microscopia confocal de fluorescência por varredura *laser*, facilitou a determinação da localização intracelular dos PSs e forneceu maior sensibilidade e melhor resolução espacial que as técnicas de fluorescência não confocais. A técnica de FRET, Transferência de Energia de Ressonância por Fluorescência (do inglês *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) também pode ser usada para determinar a localização intracelular dos PSs (Morris *et al.*, 2003). Mais recentemente, a utilização de sondas fluorescentes (Rodamina- 123, Acridina laranja, Mitotracker®, Lysotracker®) que se ligam a organelas específicas e apresentam emissões máximas de fluorescência diferentes daquelas apresentadas pelos PSs, têm sido utilizadas para determinar suas localizações e identificação de seus sítio de acúmulo (Wilson, Olívio, Singh, 1997; Bonneau *et al.*, 2004; Mojzisova *et al.*, 2007a e b; Casanova *et al.*, 2008). Além disso, estas sondas também podem ser usadas para definir o local danificado após a iluminação em PDT (Kessel *et al.*, 1997).

Assim como a localização intracelular, a via de internalização celular está relacionada às características estruturais e físico-químicas do PS, que pode penetrar nas células, quer por difusão passiva através da membrana plasmática ou, por endocitose. O equilíbrio entre esses dois mecanismos é determinado pelas interações do PS com as membranas celulares ou carreadores sanguíneos, como por exemplo, a LDL.

1.1. Berberina

A berberina (BBR) é um pigmento fotossensibilizante de cor amarela intensa, obtido de espécies de Annonaceae e Ranunculaceae, utilizado como corante natural de lã, couro e algodão em regiões da Índia. Na medicina tradicional oriental constitui-se como principal substância ativa de medicamentos fitoterápicos contra doenças gastrointestinais (Liu *et al.*, 2007; Rempis *et al.*, 2010). A BBR é comercializada como um sal de amônio quaternário pertencente à classe de alcaloides isoquinolínicos, grupo protoberberínico.

Há diversos relatos na literatura que demonstram atividades farmacológicas deste alcaloide, tais como atividade antimicrobiana significativa contra uma variedade de organismos, incluindo bactérias, fungos, vírus, clamídia e protozoários, além de efeitos antitumoral, anti-inflamatório, antidiabético, anti-hipertensivo, antidiarreico, antiaterosclerótico, antiarrítmico, contra dislipidemias e doenças vasculares (Kupeli *et al.*, 2002; Kuo *et al.*, 2004; Yin, Xing, Ye, 2008; Wang., 2009; Sarna *et al.*, 2010; Gu *et al.*, 2010, Wu, Wang, Liu, 2010). Outros estudos ainda indicam como droga promissora para o tratamento da doença de Alzheimer (Zhu & Qian, 2006; Megyesi & Biczók, 2007).

Associado a isso, acredita-se que os resultados positivos observados em ensaios *in vitro* da sua aplicação enquanto agente fotossensibilizante na PDT antibacteriana e antitumoral estariam relacionados à sua eficiência fotoquímica na produção de oxigênio singlete e outras radicais livres (Inbaraj *et al.*, 2001; Brezová, Dvoranová, Kost'álová, 2004; Jantová *et al.*, 2006; Wainwright, 2009; Shen & Ji, 2010). Este alcaloide é capaz de se ligar ao DNA formando uma estrutura complexa (Kumar *et al.*, 1993; Kuo *et al.*, 1995), que é caracterizada por um aumento significativo de sua fluorescência (λ_{exc} = 355 ou 450 nm e λ_{emi} = 520 nm) e consequentemente uma produção mais elevada de EROs (Gong *et al.*, 1999).

Atualmente, um número maior de pesquisas científicas tem explorado a BBR graças aos resultados promissores relativos à sua atividade antiproliferativa frente diversas linhagens tumorais (Choi *et al.*, 2008; Ho *et al.*, 2009; Hsu *et al.*, 2007; Auyeung & Ko, 2009; Patil *et al.*, 2010). Contudo, devido a sua alta hidrofobicidade (causada pela presença de uma amida quaternária), baixa estabilidade e biodisponibilidade (baixa absorção pelo sistema gastrointestinal), o uso da berberina na clínica médica foi inviabilizado pela dificuldade de inclusão em preparações farmacêuticas, principalmente àquelas aplicáveis ao tratamento de úlceras gástricas. Assim, o desenvolvimento de um novo “sistema de entrega” da berberina que melhore sua solubilidade e biodisponibilidade é desejado (Tan *et al.*, 2011). Quanto ao seu uso na PDT, o maior desafio a ser vencido é a sua hidrofobicidade, que resulta em agregação de moléculas que provoca perda da sua capacidade de gerar ERO's sob irradiação.

Já há diversos relatos na literatura quanto ao desenvolvimento de sistemas de nanoparticulados para a BBR, tais como nanopartículas lipídicas sólidas (Wang *et al.*, 2009), nanoemulsões (Sun & Ouyang, 2007), lipossomos (Zhang & Na., 2006; Chen *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2007; Ju *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2013) e albumina bovina (Hu *et al.*, 2009). Estudos quanto a sua localização intracelular em linhagens celulares de melanoma ao recebem diferentes doses deste alcaloide e a influência do local de acúmulo no tipo de morte induzida também foram descritos (Burgueiro *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012). No entanto ainda não foram realizados estudos sobre a sua associação com a LDL, subsequente localização intracelular resultante desta associação e efeitos na viabilidade celular quando associada à PDT.

1.2. Lipoproteínas de baixa densidade (LDL)

Imprescindíveis para manutenção da vida celular, os lipídios constituem-se em moléculas caracterizadas por sua natureza apolar, em função de seu grande esqueleto carbônico hidrofóbico. Seu aporte satisfatório para cada tipo histológico (tecidual) representa um verdadeiro desafio para os seres vivos complexos, uma vez que a sua assimilação a partir da dieta alimentar, assim como sua quantidade e as trocas de produtos do metabolismo lipídico entre os diferentes tecidos e órgãos passa pelo tecido circulatório (linfa e plasma sanguíneo) majoritariamente composto por água (70%). Assim, a sua insolubilidade requer formas de transporte: em associação com proteínas, eles formam grandes complexos, as lipoproteínas (Vance & Vance, 2002).

No sangue humano distinguem-se cinco classes de lipoproteínas, definidas de acordo com a sua densidade, tal como determinado por ultra-centrifugação de flotação: quilomicrones (CM, do inglês *Chylomicron*), lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL, do inglês *Very Low-Density Lipoprotein*), de densidade intermediária (IDL, do inglês *Intermediate-Density Lipoprotein*), de baixa densidade (LDL, do inglês *Low-Density Lipoprotein*) e de alta densidade (HDL, do inglês *High Density Lipoprotein*). Essas classes de lipoproteínas diferem tanto pelo seu tamanho como pela sua composição lipídica, tipo e quantidade de apoB-100 e pela sua função no metabolismo dos lipídios. Assim, quando as células precisam de colesterol para sintetizar a sua membrana, elas expressa os receptores específicos de LDL (Fielding, 1992). Por causa de seu carácter hidrofóbico, estas lipoproteínas são também formas naturais de transporte para muitas vitaminas (por exemplo, vitamina E) e outras moléculas hidrofóbicas ou anfipáticas. O LDL entra na célula por endocitose através de receptores específicos apo"B/E". Os seus componentes são

incorporados nos lisossomos (Brown, Goldstein, Siperstein, 1973), onde os ésteres de colesterol são catabolisados para serem disponibilizados para a célula na forma de colesterol livre.

Este fenômeno constitui uma das explicações que ajuda a esclarecer a acumulação de algumas moléculas, especificamente fármacos, em tumores, capazes de se complexar ao LDL (Gal *et al.*, 1981, Vitols *et al.*, 1992, Narita *et al.*, 1997; Maletínská *et al.*, 2000; Castanho, Demidova, Hamblin, 2005). Sabe-se que a composição protéica e lipídica das células tumorais é modificada, o que induz a uma desregulação das concentrações iônicas intra e extracelular. Estas células apresentam um metabolismo acelerado e uma necessidade mais elevada por colesterol (devido à intensa divisão celular) que se traduz em um aumento de expressão dos receptores apo B/E (Ho *et al.*, 1978; Gal *et al.*, 1981; Vitols *et al.*, 1992).

Assim, o LDL, e a substância complexada a ele, são incorporados em grandes quantidades nestes tecidos. No entanto, uma vez no interior das células, a distribuição das substâncias complexadas e incorporadas por esta via nos lisossomos, pode ser feita por difusão através das membranas que delimitam os diferentes compartimentos celulares. Este papel de transportador-alvo do LDL constitui um importante fator de seletividade farmacocinética e, conseqüentemente, da eficácia farmacológica de certos produtos terapêuticos (Allison *et al.*, 1990).

As partículas de LDL são grandes, com cerca de 2500 kDa, constituídas por fosfolipídios, colesterol (frequentemente na sua forma esterificada), triglicerídeos e de uma apoB-100, que comporta, entre outros, 37 triptofanos e 151 tirosinas (Figura 64). O modelo consensual de organização destes constituintes consiste na divisão da partícula em três regiões: uma superfície exterior composta por uma monocamada de fosfolipídios e colesterol e apenas uma molécula da apoB-100; um núcleo envolto por esta monocamada de

fosfolipídios composto por lipídeos, triglicerídeos e ésteres de colesterol e uma terceira região de caráter aquoso entre o núcleo e a superfície (Segrest *et al.*, 2001).

A apoB-100, localizada em torno da partícula, mas também “mergulhada” nela, é constituída por uma alternância de folhas- β e α -hélices ($\text{NH}_3\text{-}\beta\alpha_1\text{-}\alpha_2\text{-}\beta_2\text{-}\alpha_3\text{-COOH}$). As folhas- β formam pontes irreversíveis com os lipídeos, o que provavelmente resulta na fase emética do colesterol. As α -hélices estão associadas com os fosfolípides externos. Para além do campo globular N-terminal, a maior parte da apoB-100 se situa no ambiente hidrofóbico. Elas são peças-chave para a solubilização dos lipídios, o que possibilita seu efetivo transporte via plasma sanguíneo, bem como sua identificação e destinação correta para cada célula-alvo. Além disso, para outras moléculas transportadas, infere-se que, quanto mais hidrofóbica ou apolar ela for, mais ao centro desse complexo ela estará e, quanto mais hidrofílica ou mesmo anfipática ela for, encontrar-se-á mais na periferia dessa estrutura.

Ainda que a forma exata do LDL seja muito discutida, de maneira geral, são consideradas partículas de 22 nm de diâmetro (Schumaker, Phillips, Chatterton, 1994; Segrest *et al.*, 2001). Cabe ressaltar que observações com microscopia eletrônica evidenciam uma forma discoidal (diâmetro de 215 Å e espessura de 120 Å) ou mesmo elipsoidal (250 Å x 210 Å x 175 Å (van Antwerpen *et al.*, 1999; Orlova *et al.*, 1999).

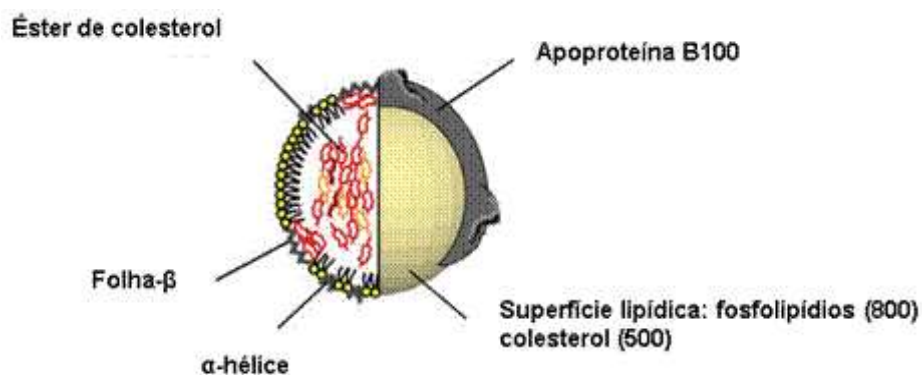


Figura 64. Representação esquemática do LDL e de seus constituintes.

Dentro do contexto da pesquisa aqui realizada, as propriedades espectrais do LDL são de extrema importância nos estudos de sua interação entre ele com a BBR (potencial fotossensibilizador). Ao ser excitado a 280nm, a LDL fluoresce evidenciando um espectro de emissão de fluorescência intrínseca com banda em torno de 330 nm, devido à presença de resíduos de tirosina e triptofano. Em pH neutro, a absorção máxima destes resíduos se mostra, respectivamente, em torno de 275 nm e 280 nm. Eles são, portanto, geralmente excitados ao mesmo tempo. Contudo, a emissão máxima da tirosina localiza-se em 305 nm, a sua energia de fluorescência é transmitida para o triptofano. Assim, é a emissão de fluorescência do triptofano que é então observada. Este último é muito sensível à natureza do meio ambiente. Na água, o máximo de emissão é de 350 nm. Em etanol, a banda se desloca para 340 nm e já em um solvente tal como o dioxano, completamente apolar, é a 325 nm. Este deslocamento é acompanhado por um aumento de fluorescência, sendo seu rendimento de 0,14 na água, 0,2 no etanol e 0,3 em dioxano. Os triptofanos da LDL apresentam um máximo de emissão em cerca de 330 nm e estão em um ambiente hidrofóbico. Assim como a apoB-100 se encontra em contato direto com a superfície lipídica da partícula de LDL e o comprimento de onda de emissão da LDL é muito próximo do máximo de absorção da berberina, em condições de proximidade e orientação favoráveis, uma transferência da fluorescência do LDL para a berberina é possível e isso permite colocar em evidência a interação do fluoróforo junto (ou próximo) à apoB-100.

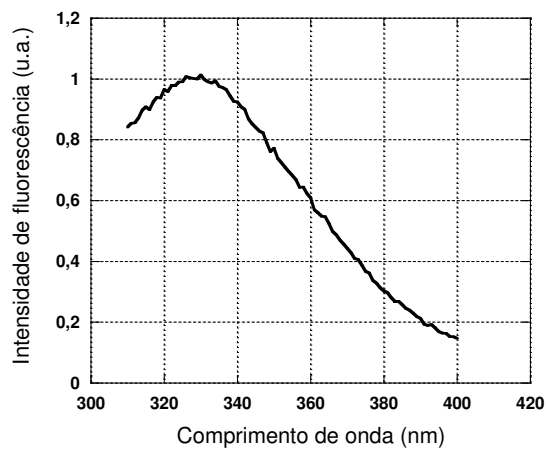


Figura 65. Espectro de emissão de fluorescência do LDL ($2 \cdot 10^{-8}$ M) quando excitado a 278nm.

Neste contexto, nesta segunda etapa do trabalho foi realizado o estudo de interação dos alcaloides isoquinolínicos berberina e isomoschatolina (apresentada no Capítulo 1) com lipoproteínas de baixa densidade- LDL (molécula carreadora) em modelos celulares (culturas oriundas de tecidos tumorais), associada à PDT.

2. Objetivos

Visando ao desenvolvimento de sistemas nanopartículados com os alcaloides isoquinolínicos berberina e isomoschatolina para sua aplicação em PDT antitumoral os objetivos desta etapa do trabalho foram:

- Proceder à caracterização das propriedades espectroscópicas (absorção UV-visível e fluorescência) da berberina e isomoschatolina solubilizados em solventes com diferentes polaridades e avaliar o efeito do solvente nas propriedades espectroscópicas destes alcaloides;
- Analisar as propriedades espectroscópicas (absorção UV-visível e fluorescência) e da química de ligação dos complexos formados entre os alcaloides e o LDL. Determinar o nível de saturação máxima para ligação monomérica entre os alcaloides e LDL, assim como comparar os perfis de absorção e fluorescência dos alcalóides sozinhos e dos complexos alcaloide/LDL.
- Avaliar o efeito das interações entre os alcaloides e LDL em modelos celulares.
- Analisar a cinética de absorção dos complexos alcaloide/LDL em culturas celulares de glioma humano U87MG (células normais ou tratadas para um aumento de expressão dos receptores de membrana plasmática responsáveis pela absorção de LDL), empregando-se técnicas de espectroscopia e microscopia de fluorescência.
- Investigar a localização intracelular dos alcaloides empregando-se análises por microscopia de fluorescência a *laser* e analisar a colocalização intracelular destes alcaloides usando sondas fluorescentes específicas para lisossomos e mitocôndria.

- Avaliar o efeito dos alcaloides como fotossensibilizador para aplicação em PDT em culturas tumorais de glioma humano U87MG empregando-se análises para quantificação da peroxidação lipídica.

3. Material e Métodos

Estes ensaios foram realizados durante o período de estágio no exterior no “Laboratoire Jean-Perrin, Université Pierre et Marie Curie, Campus Jussieu, Quartier Latin” Paris, França sob supervisão da Prof. Dra. Stephanie Bonneau.

3.1. Tampões, solventes, reagentes e substâncias

A BBR (na forma de sal de cloreto, massa molar 336,36 g.M⁻¹, pureza > 99%) foi adquirida da Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA) e armazenada a 25°C, no escuro. A isomoschatolina (GB1) foi isolada como descrito no Capítulo 1. Os antibióticos penicilina e estreptomicina foram adquiridos junto a Gibco-Invitrogen e armazenados a -20°C.

Os ensaios de interação entre os alcalóides e o LDL foram realizados em tampão fosfato salino (do inglês *fosfate buffer solution*- PBS, Na₂HPO₄/KH₂PO₄, fosfato total igual a 9,57.10⁻³ M, NaCl 0,15 M, KCl 2,68.10⁻³ M, pH 7,4) e os ensaios com as culturas celulares em solução tampão salina de Hanks (do inglês *Hank's buffer salt solution* -HBSS, pH 7,4). Ambos os tampões assim como a tripsina e o soro fetal bovino (SFB), foram adquiridos da Gibco® e armazenados a 4°C, por um período máximo de um mês após a abertura dos frascos. O Ultroserum G foi adquirido junto a BioSeptra SA (Pall Corporation, França) e armazenado a -20°C.

Todos os solventes utilizados, etanol (C₂H₆O), dimetilsulfóxido (DMSO), 1-butanol (C₄H₉OH) e tetraetoxi-propano (TEP) eram de qualidade espectroscópica (Merck, Darmstadt, Germany) e foram armazenados à temperatura ambiente (25°C). Para as diferentes avaliações bioquímicas os reagentes Dodecil sulfato de sódio (SDS), Triton X-100 e ácido tricloroacético

(TCA) foram adquiridos da Merck e armazenados a 25°C. Já os reagentes de Folin Ciocalteu, ácido tiobarbitúrico (TBA), butilhidroxitolueno (BHT) e vermelho neutro foram adquiridos junto a Sigma e armazenados a 4°C.

O LDL (massa molar da apoB-100 de 500 kDa) humana foi adquirida da Calbiochem (San Diego, CA, Estados Unidos). Para garantir a estabilidade, as soluções estoque de LDL foram mantidas a 4°C, por um período máximo de um mês. Para os ensaios, o LDL foi diluído em PBS ou HBSS e utilizado logo após o preparo. Já a albumina humana (do inglês, *human serum albumine*, HSA, massa molar 68 kDa) foi adquirida da Sigma (Saint Louis, Missouri, Estados Unidos) e estocada a 4°C. A solução estoque foi preparada em Triton 100-X 0,3% (0,5g/L).

As sondas fluorescentes, LysoTracker® Red e Mitotracker® Red foram adquiridas junto à Molecular Probes-Life Technology (Carlsbad, California, USA) e armazenadas a -20°C. As soluções estoques foram preparadas conforme indicações do fabricante.

3.2. Medidas no estado estacionário

Os espectros de absorbância dos dois alcaloides estudados (BBR e GB1) foram registrados utilizando-se um espectrofotômetro UVIKON 923 Double Beam UV/VIS (Biotek Kontron Instruments, Milão, Itália) e tratados no software UVS900 Lite 5.1 (DuSotec). Já os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos utilizando-se um espectrofluorímetro AMINCO®-Bowman Série 2 Luminescence (Bioritech) e tratados no software AB2. A excitação foi fornecida por uma lâmpada de xenônio, havendo dois monocromadores que permitiam selecionar respectivamente os comprimentos de onda de excitação e emissão. A luz

emitida pela amostra foi coletada a 90° em relação à excitação e transformada em um sinal eletrônico por um fotomultiplicador. A fim de corrigir eventuais flutuações da lâmpada, o sinal do detector foi dividido por um sinal de referência, medido na saída do monocromador de excitação. Em todas as análises, utilizou-se uma cubeta de quartzo com 1cm de trajeto óptico à temperatura ambiente (25° C). Todas as medidas foram realizadas aproximadamente 1 minuto após o preparo das amostras. Os gráficos com os dados de absorção e fluorescência foram plotados utilizando-se o software Kaleidagraph® 4.0 (Synergy Software, PA, USA).

3.3. Estudo da interação entre os alcaloides e LDL

A interação dos alcaloides-LDL foi estudada analisando-se, por um lado, as alterações na fluorescência intrínseca de LDL induzidas pela ligação do alcaloide (como a fluorescência intrínseca da lipoproteína é conferida pela apoB-100 que a constitui, somente as moléculas dos alcaloides que se ligam a sua proximidade seriam capazes, a priori de alterar suas propriedades fluorescentes). Por outro lado, avaliaram-se as mudanças na fluorescência do alcaloide. Essa última análise só foi realizado com a BBR uma vez que não foi possível detectar fluorescência significativa da GB1 quando solubilizada em tampão aquoso (efeito solvente).

Além disso, somente para a BBR, a interação alcaloide-LDL também foi estudada, analisando-se mudanças nos espectros de absorção do alcaloide e do LDL isoladamente e da interação entre os dois dentro de uma mesma concentração.

3.3.1. Extinção (*quenching*) de fluorescência do triptofano (fixação na ApoproteínaB-100 ou proximidades).

Esta abordagem baseia-se nas mudanças de fluorescência do PS e do LDL induzidas pela interação entre ambos. Este método permite diferenciar claramente ligações à apoB-100 e incorporação do fotossensibilizador à fase lipídica do LDL. Este parâmetro pode ser crucial, porque o reconhecimento do LDL pelas células, resultando na sua endocitose e de seus conteúdos, envolve uma interação específica da apoB-100 com os receptores apoB/E. Portanto, a integridade da apoB-100 deve ser preservada, mesmo quando associada ao PS. Assim, neste ensaio determinou-se a constante de afinidade global entre cada alcaloide e a porção proteica do LDL (K_p) e o número de moléculas de alcaloide que se associam a apoB-100.

Para tanto, fez-se medidas de fluorescência da lipoproteína (em duas concentrações distintas, 2 e $6 \cdot 10^{-8}$ M) adicionando-se quantidades crescentes do alcaloide em análise, mantendo-se a mesma proporção nas concentrações de alcaloide/LDL, para cada concentração de LDL (alcaloide/LDL=0, 5, 25, 35, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 750 e 1000). O comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) foi de 278 nm, leitura entre 310-400 nm. Utilizou-se um filtro a 295 nm para eliminar interferências do Raman da água nos espectros.

Para reconfirmar a extinção da fluorescência do LDL em função da sua ligação com a BBR, espectros de absorbância (200-650 nm) das mesmas amostras descritas acima (concentrações crescentes de berberina em duas concentrações distintas de LDL) foram obtidos. Mudanças no perfil espectral do LDL quando associado à BBR indicam que a ligação entre estas duas moléculas ocasiona uma transferência de energia entre elas (FRET- do inglês *Förster Resonance Energy Transfer*) que afeta diretamente a fluorescência do LDL.

3.3.2. Mudança no perfil de fluorescência da berberina (esquema global de fixação).

No ensaio anterior, o delineamento experimental foi conduzido de tal maneira a determinar os parâmetros de interação entre o alcaloide e a porção proteica do LDL. Neste ensaio, acompanharam-se as alterações de fluorescência da berberina, induzida pela adição de quantidades crescentes de LDL. Esta mudança no equilíbrio de ligação nos permitiu determinar a constante de equilíbrio entre a BBR e o LDL como um todo (K_{LDL}). Como descrito anteriormente este ensaio não foi realizado com a isomoschatolina devido à supressão de sua fluorescência em tampão aquoso nas concentrações utilizadas.

Para tanto, neste ensaio fez-se medidas de fluorescência da BBR ($10^{-6}M$) associada a concentrações crescentes de LDL (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, $10 \cdot 10^{-9} M$). O comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) foi de 350nm e leitura de emissão de fluorescência entre 420-650nm. Os dados foram analisados a partir de equações discutidas em Resultados (item 4.1.2.) e os gráficos resultantes foram plotados no programa Kaleidagraph® 4.0.

3.4. Irradiação luminosa

Para os ensaios de fotossensibilização (somente com o alcaloide BBR) utilizou-se uma bancada de irradiação contínua, equipado com uma lâmpada de xenônio de 300 W de potência como fonte de irradiação (Figura 66). Um filtro de interferência foi posicionado logo após da saída do feixe de luz branco para selecionar o comprimento de excitação ideal das amostras. Para a irradiação da BBR utilizou-se o filtro 410FS10-50 (Andover Corporation Optical

Filter, New Hampshire, USA) que permite passar os comprimentos de onda entre 410 ± 5 nm, selecionando assim uma banda estreita de irradiação correspondente à absorção da molécula de BBR (Figura 67). Para irradiar a clorina, utilizou-se o filtro K65 (Bolzer, Andover Corporation Optical Filter, New Hampshire, USA) que permite a passagem dos comprimentos de onda entre 660 ± 15 nm. Após a passagem pelos filtros o feixe de luz resultante possuía um diâmetro de cerca de 5 cm o que tornou possível a irradiação de uma placa de 30 mm de diâmetro por vez. A uniformidade da intensidade luminosa foi controlada pelo escaneamento da área de irradiação com um Medidor de Potência e Irradiância (Modelo 1918-R, Newport Corporation, Irvine, CA, USA). Diferenças menores de 5 % foram encontradas entre os diferentes pontos irradiados da placa. A intensidade luminosa foi de $65\pm 0,05$ mW/cm² tanto para a BRR como para a clorina. O volume de cada amostra era de 2 mL correspondendo a uma altura de líquido de apenas 0,5 cm. As amostras foram irradiadas por 2,5, 6,5, 13 e 23 minutos o que correspondeu a uma fluência total de energia (dose) de 10, 25, 50 e 100 J/cm².

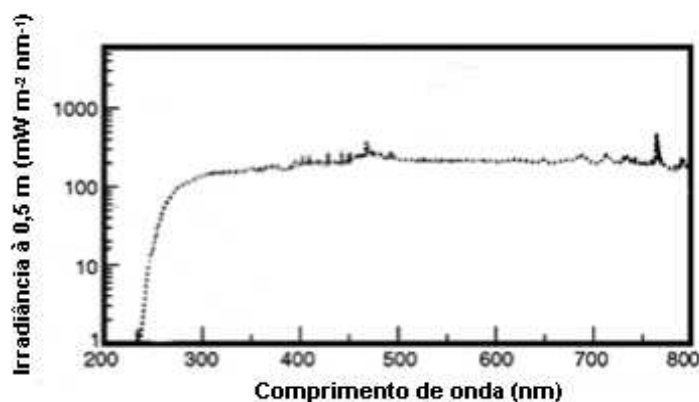


Figura 66. Espectro de uma lâmpada de xenônio (Oriel instruments)

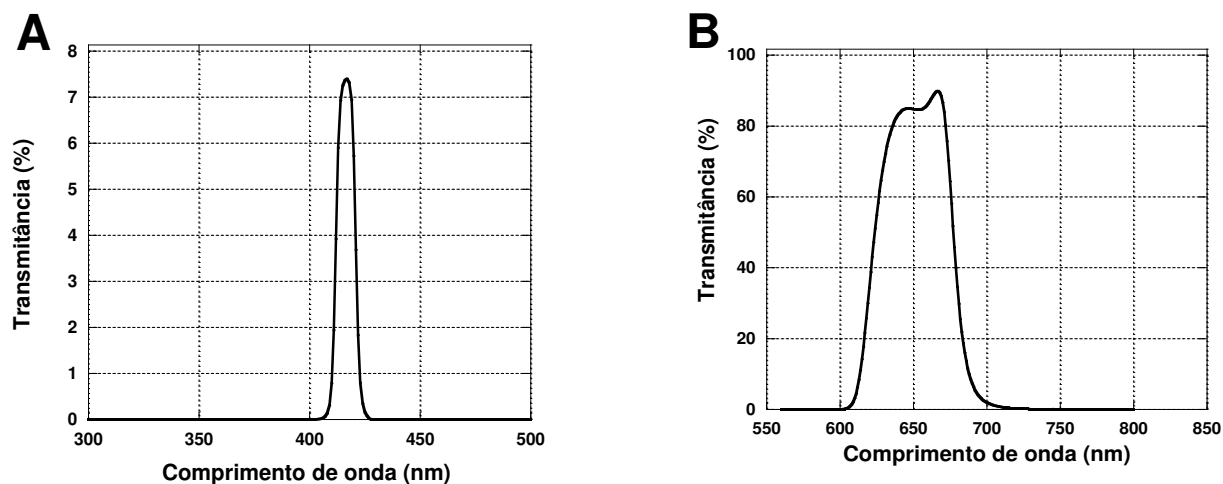


Figura 67. Transmitância do filtro 410FS10-50 para irradiação da BBR (A) e do filtro K65 (B) para irradiação da Clorina 6.

3.5. Células, meio de cultura e condições de incubação.

Utilizou-se a linhagem UG87MG. Trata-se de uma linhagem celular cancerígena humana de glioblastoma multiforme primário (tumor cerebral maligno), obtida a partir de pacientes em estágio quatro da doença (Clark *et al.*, 2010). Possui morfologia epitelial com cerca de 10 μ M de diâmetro ou mais.

O cultivo foi feito em meio DMEM (do inglês Minimum Eagle Medium de Dulbecco) suplementado com L-glutamina (862 mg/mL), piruvato de sódio (11 mg/mL), e 100 U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina.

Duas condições de incubação diferentes foram empregadas neste estudo a fim de se obter células com níveis normais de receptores LDL e células com níveis elevados de receptores LDL. Na primeira condição, as células foram constantemente cultivadas com meio de cultura descrito acima contendo 10% de SFB (soro fetal bovino). Na segunda condição,

para que mais receptores de LDL fossem expressos na superfície celular, duas semanas antes da realização dos ensaios, os meios de cultura contendo 10% de SFB foram trocados por meio DMEM suplementado com 2% de Ultroserum G (BioSeptra SA-Part of Pall Corporation, France), um substituinte do soro que contem uma concentração reduzida de lipídeos, o que resulta em uma maior expressão dos receptores de LDL na superfície celular. Em ambas as condições as células foram mantidas a 37°C, em atmosfera umidificada com 5% de CO₂.

3.5.1 Manutenção das culturas

As células foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm² e mantidas em uma estufa a 37°C e enriquecida com 5% de CO₂. As células da linhagem U87 MG são aderentes e se multiplicam formando uma monocamada até que a inibição de contato freie a divisão celular, algo que ocorre a cada 3 dias quando cultivadas em garrafas de 25 cm². Neste estágio as células eram repicadas (nova passagem): remoção de meio de cultura velho, tripsinização para descolar as células do fundo da garrafa (cerca de 0,5 mL por garrafa a 0,005% v:v), acréscimo de meio de cultura novo, divisão das células em novas garrafas e retorno a estufa de enriquecida com CO₂. A fim de evitar interferências oriundas do envelhecimento celular, as células utilizadas nos ensaios estavam entre as passagens 10 e 15.

3.6. Incorporação de berberina pelas células U87MG

As células foram cultivadas em placas de Petri de 35 mm de diâmetro numa concentração de 10.000 células/mL (2 mL de células por placa). As placas foram incubadas

por um período de 48 h (estufa a 37°C, CO₂ a 5%) para garantir a fixação e crescimento celular apropriado antes da execução dos tratamentos. Após este período o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas 3 vezes com tampão HBSS e em seguida acrescidas de meio de incubação (tampão HBSS acrescido de BBR, 10⁻⁶mol/L, complexada ou não com LDL, 10⁻⁸ mol/L). As células foram mantidas em contato com os meios de incubação por períodos de 15 min, 30 min, 1h, 2h e 3h após a sua inclusão e mantidas no escuro em estufa a 37°C, a 5% de CO₂ (Figura 68).

A absorção da BBR foi então determinada por extração e aquisição de fluorescência do extrato. Para tanto, após os respectivos períodos de incubação, os meios de incubação foram retirados e as células foram lavadas duas vezes com tampão HBSS e em seguida lisadas em Triton X-100 0,3% (1 mL). O lisado foi recuperado, sendo 900 µL utilizados para obtenção dos espectros de fluorescência (comprimento de onda de excitação a 350 nm; 540 nm para detecção, voltagem do detector a 950V). Os espectros de fluorescência das amostras de cada tratamento foram medidos e comparados com a curva de calibração feita a partir de concentrações conhecidas de BBR em solução 0,3% de Triton X-100 (Anexo 94) Subtraiu-se os valores de fluorescência de amostras branco (solução 0,3% de Triton X-100) dos valores de fluorescência das amostras a fim de corrigir a fluorescência de fundo.

Os outros 100 µL do lisado foram utilizados para determinar o teor de proteína da amostra pelo método de Lowy e colaboradores (1951) modificado. A albumina humana foi utilizada para obtenção da curva padrão para dosagem de proteínas (Anexo 95). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e os valores médios de concentração de BBR (µmol) por grama de proteína (± desvio padrão) foram calculados.

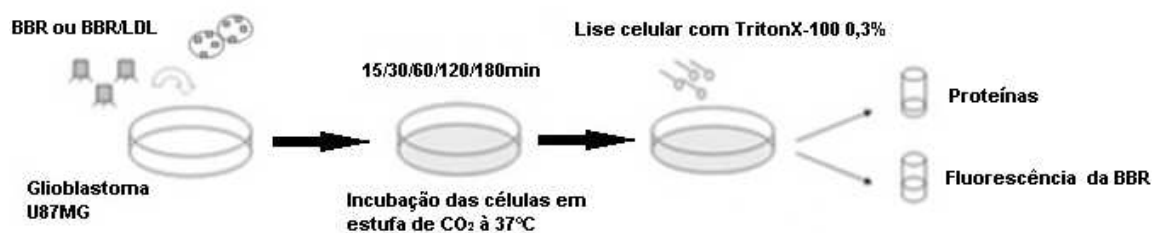


Figura 68. Esquema do protocolo experimental do ensaio de incorporação da BBR.

3.7. Microscopia de fluorescência

Para os ensaios de microscopia, as células (5000 células/mL) foram cultivadas em lamínulas de vidro de 0,17mm de espessura previamente depositado na parte inferior de placas de petri de plástico com 35 mm de diâmetro (2 ml de células por placa). Após cerca de 5 h que as células foram pipetadas (tempo suficiente para garantir a aderência das células nas lamínulas), retirou-se o meio de cultura e acrescentou-se um meio novo, de forma a eliminar resíduos celulares e substâncias que poderiam interferir no crescimento celular ou à sua observação ao microscópio. As placas de petri contendo as células foram então mantidas em estufa enriquecida com 5% de CO₂, a 37°C, por um período de 48 horas para crescerem e estabelecerem novamente um tapete aderente. Após este período os tratamentos foram realizados e as células foram observadas no microscópio.

Para montagem dos tratamentos, retirou-se o meio de cultura e lavou-se as células 2 vezes com tampão HBSS. Em seguida, elas foram incubadas no mesmo tampão acrescido de BBR (10^{-6} mol/L) complexada ou não com LDL (10^{-8} mol/L), durante diferentes períodos de tempo (15 min, 30 min, 1h, 2h e 3h). A escolha deste tampão permitiu excluir a possibilidade

de fixação da BBR em componentes biológicos do meio de cultura ou do soro fetal bovino que contém moléculas de transporte, tais como a albumina.

Após os respectivos períodos de incubação, retirou-se o meio de incubação, lavou-se as células 3 vezes com tampão HBSS e depositou-se as lamínulas de vidro em um instrumento metálico para observação ao microscópio (Figura 69).

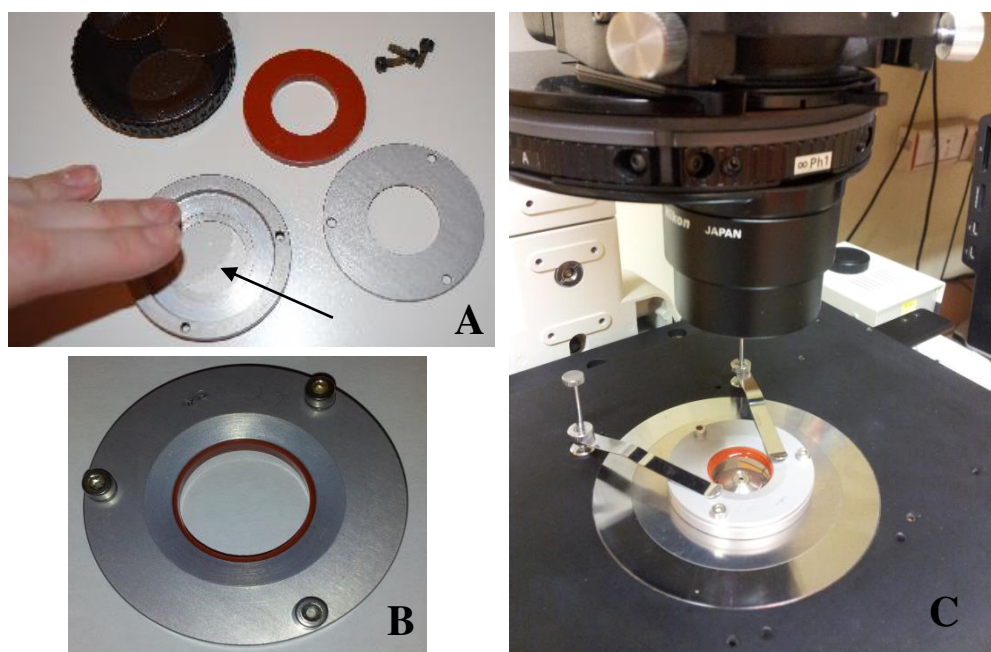


Figura 69. Esquema da câmara utilizada para encaixe das lamínulas de vidro contendo células para visualização no microscópio de fluorescência; seta aponta para lamela (A). Microscópio de fluorescência contendo câmara de visualização das lamínulas (B).

As células foram observadas em um microscópio invertido Nikon Eclipse TE 300 DV equipado com uma objetiva de imersão em óleo de 100x, com abertura numérica de 1,4 (Nikon, França). A iluminação (fonte de excitação) foi fornecida por uma lâmpada de mercúrio com 100 W de potência (Osram, HBO). Utilizou-se filtros de densidade neutra (NDx16, NDx8 e NDx4) para otimizar o nível de iluminação. Para observar a fluorescência

da BBR, as amostras foram excitadas no UV, com filtro de excitação *band pass* entre 330 e 380 nm (DAPI, com espelho dicroico a 400 nm) e a sua fluorescência na região do verde do espectro luminoso, foi coletada utilizando-se filtros de emissão *band pass* entre 510 e 560 nm montados num trilho rolante, posicionado no caminho óptico (10-2 lambda, Sutter Instrument Company). A aquisição das imagens (100 ms de tempo de integração para BBR) foi realizada com uma câmera CCD (CoolSNAPHQ², Roper Científica, França) e a aquisição dos dados com o software Metamorph fornecido pela Universal Imaging Corporation (Roper Scientific, França). As imagens foram analisadas e tratadas utilizando o software Image J (open source software, <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>).

3.8. Colocalização subcelular

Para este ensaio as células foram cultivadas da mesma maneira como descrito no item 3.7. Os ensaios de colocalização foram realizados utilizando-se sondas fluorescentes específicas para lisossomos (Lysotracker®) e mitocôndria (Mitotracker®). As sondas de Lysotracker são sondas fluorescentes acidotrópicas para marcação e rastreamento de organelas ácidas em células vivas. Esta sonda consiste de um fluoróforo ligado a uma base fraca que é parcialmente protonada em pH neutro. Penetra livremente pelas membranas celulares e concentra-se em organelas esféricas devido a um mecanismo de protonação das bases e retenção nestas organelas. Já o Mitotracker contém um motivo “clorometil medianamente reativo no grupamento tiol” para marcação de mitocôndria e também é capaz de se difundir livremente pela membrana plasmática acumulando-se em mitocôndrias ativas

(manual do fabricante de Lysotracker® e Mitotracker®, Molecular probes by Life Technologies-Invitrogen).

Tanto o Lysotracker® como o Mitotracker® estão disponíveis em diferentes cores de fluorescência, tornando essas sondas aplicáveis para diferentes experimentos dependentes da cor da fluorescência. Em nossas análises, optou-se pelo Lysotracker® red e Mitotracker® red uma vez que o comprimento de onda de emissão de fluorescência de ambos encontra-se em uma região do espectro eletromagnético diferente daquele apresentado pela BBR permitindo, portanto, a análise de fluorescência das sondas e de PS nas mesmas células.

Utilizou-se o protocolo fornecido pelo fabricante (Molecular probes) para marcação dos lisossomos e mitocôndrias. As células foram lavadas duas vezes com HBSS e incubadas durante 30 min com 200 nM e 50 nM de Lysotracker® red ou Mitotracker® red, respectivamente. Após incubação com as sondas as células foram lavadas novamente duas vezes com HBSS e incubadas durante 1h com BBR (1.10^{-6} M) complexadas ou não com LDL (1.10^{-8} M). Foram utilizadas células cultivadas com 10% de SFB e células cultivadas com 2% de Ultroserum para cada tratamento descrito. Ao término do período de incubação, as células foram observadas ao microscópio (Figura 70). As imagens de fluorescência, tratamentos dos dados e excitação da BBR foram feitas conforme descrito no item 3.6. Para observar a fluorescência do Mitotracker® red e Lysotracker® red utilizou-se filtros de excitação *band pass* de ~570 nm (TRITC, com espelho dicróico a 500nm) e a fluorescência foi coletada utilizando-se filtros de emissão *band pass* entre 600-620 nm. A aquisição das imagens (100 ms) e tratamento dos dados foi feito como descrito acima. O uso de diferentes filtros de excitação e de emissão permitiu uma boa separação da emissão de fluorescência verde da BBR e vermelha das sondas. Cabe ressaltar, que a banda de emissão de fluorescência das sondas cai em uma região do espectro luminoso sem absorção significativa pela BBR

tornando improvável qualquer transferência de energia não radiativa da sonda para a BBR nos ensaios de colocalização.

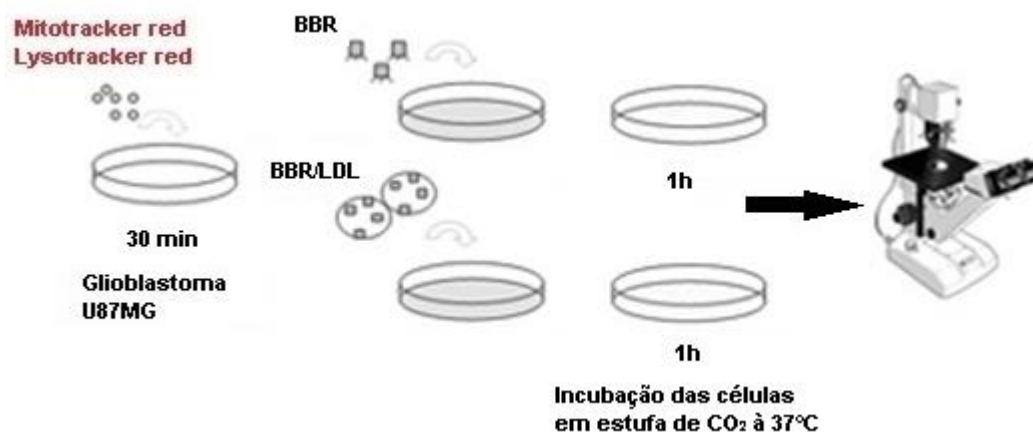


Figura 70. Esquema do protocolo de preparação das amostras para observação em microscópio de fluorescência.

A autofluorescência das amostras controle incubadas com HBSS ou com LDL sozinhos foi significativamente inferior em relação ao sinal emitido pela BBR, Lysotracker e Mitotracker.

3.9. Avaliação da Peroxidação lipídica

A dosagem do ácido barbitúrico (teste de dosagem de substâncias reativas do ácido barbitúrico, do inglês, *thiobarbituric acid reactive substances-TBARS*) é um método indireto de análise da peroxidação lipídica *in vivo*. O malondialdeído (MDA), produto secundário da peroxidação lipídica, reage com o ácido tiobarbitúrico para formar, em temperatura elevada, e

meio ácido, um produto colorido que pode ser quantificado por espectrofluorimetria (Halliwell & Gutteridge, 1989). Esta dosagem pode ser feita no dia que se segue a irradiação desde que o meio de cultura que banha as células durante a irradiação (sobrenadante) e o extrato celular sejam armazenados no escuro à -20°C.

Assim, para avaliação da peroxidação lipídica as células foram cultivadas conforme indicado no item 3.6 e após a irradiação celular (item 3.4.), 900 µL do sobrenadante celular de cada tratamento foram recuperados e acrescidos de 100 µL de uma solução de butilhidroxitolueno (BHT a 2%) em etanol. As células foram lavadas duas vezes com 1 mL de HBSS e em seguida lisadas acrescentando-se 100 µL de SDS 10% e 900 µL de água destilada. Recuperou-se 100 µL deste extrato celular para fazer a dosagem de proteínas e os 900 µL restantes foram acrescidos de 100 µL de BHT. O extrato celular e o sobrenadante celular foram então congelados a -20°C. O reativo TBA deve ser preparado no mesmo dia das análises das amostras uma vez que ele precipita ao longo do tempo e perde sua capacidade de reação. Trata-se de uma solução de ácido 2-tiobarbitúrico a 0,375%, m/v e de ácido tricloroacético a 15% m/v em HCl 0,25N.

Para preparar o padrão tetra-etoxi-propano, fez-se inicialmente uma solução denominada TPE1, adicionando-se 75 µL de tetraetoxi-propano puro em 10 mL de uma solução de etanol a 95%: água (40:60, v/v). Em seguida preparou-se a solução TPE2 adicionando-se 50 µL de TPE1 em 10 mL de tampão Hank's, ou seja, mesmo meio em que as células foram irradiadas (desta forma TPE2 contém 157 pmol de tetraetoxi-propano).

Em seguida prepararam-se os tubos com as amostras a serem analisadas:

- Os tubos da curva padrão consistiram de: 1 mL de TPE2 + 200 µL de BHT

- Os tubos de controle negativo (branco) consistiram de: 1 mL de HBSS + 200 μ L de BHT (o valor dado por estas amostras será subtraído das demais, padrão e amostras celulares e de sobrenadante)

- Os tubos com amostras consistiram de: 1 mL de extrato celular ou de sobrenadante + 100 μ L de BHT

Cada tubo (branco, padrão, amostra) foi acrescido de 1 mL de reativo TBA e incubado por 15 min em banho maria a 80°C. Em seguida os tubos foram resfriados em gelo em então acrescidos com 1 mL de butanol e agitados por 2 min em vórtex. Após separação das fases, a fase orgânica foi recuperada e centrifugada durante 5 min. a 10000 rpm. A intensidade de fluorescência foi então determinada em espectrofluorímetro (comprimento de onda de excitação a 515 nm e de emissão a 550 nm). A qualidade absoluta de TBA foi avaliada por calibração, uma vez que o tetraetoxi-propano se decompõe de maneira específica e quantitativa em MDA. Os resultados foram então normalizados em relação à quantidade de proteína celular dosada da amostra (total da placa de petri). Cada determinação foi realizada em triplicata sendo que o experimento foi realizado duas vezes, em dois dias diferentes ($n_{\text{total}}=6$).

4. Resultados e Discussão

A fim de facilitar a compreensão e discussão dos dados obtidos, os resultados foram divididos em duas partes. Na primeira, apresentamos todos os resultados obtidos com a BBR e na segunda parte, aqueles obtidos com GB1.

4.1. Berberina

4.1.1. Propriedades espectroscópicas de absorção e fluorescência da Berberina em diferentes meios de solubilização

Apesar de já existirem diversos trabalhos na literatura descrevendo as propriedades espectroscópicas da BBR em estado estacionário (absorção e fluorescência) em todos eles, os resultados obtidos, em diferentes meios de solubilização e nas concentrações utilizadas, não forneceram informações suficientes para estabelecimento de um delineamento experimental apropriado para realização do estudo de interação entre BBR e LDL, por meio de técnicas de espectroscopia e microscopia de fluorescência. Por isso, estas propriedades foram novamente estudadas com vistas ao estudo de interação complexação com LDL.

Avaliou-se o comportamento da BBR em solventes com propriedades físico-químicas diferentes tais como DMSO, etanol (ETOH) e tampão fosfato (PBS) a partir da obtenção de espectros de absorção e fluorescência de soluções em diferentes concentrações. A Figura 71 apresenta os espectros de absorção do alcaloide em DMSO e ETOH. Devido a sua alta hidrofobicidade, não foi possível solubilizar a BBR em tampão fosfato com pH 7,2. A

solubilização da BBR em PBS só foi possível após preparar-se uma solução estoque em ETOH e utilizá-la para diluir em PBS em concentrações inferiores a 10^{-4}M . Optou-se pelo ETOH ao invés do DMSO para preparo de uma solução estoque de LDL, uma vez que aquele solvente interfere com menos intensidade na integridade da partícula de LDL que o DMSO (Bonneau, 2009) e desta forma nos ensaios de interação entre BBR/LDL, os resultados obtidos seriam mais confiáveis.

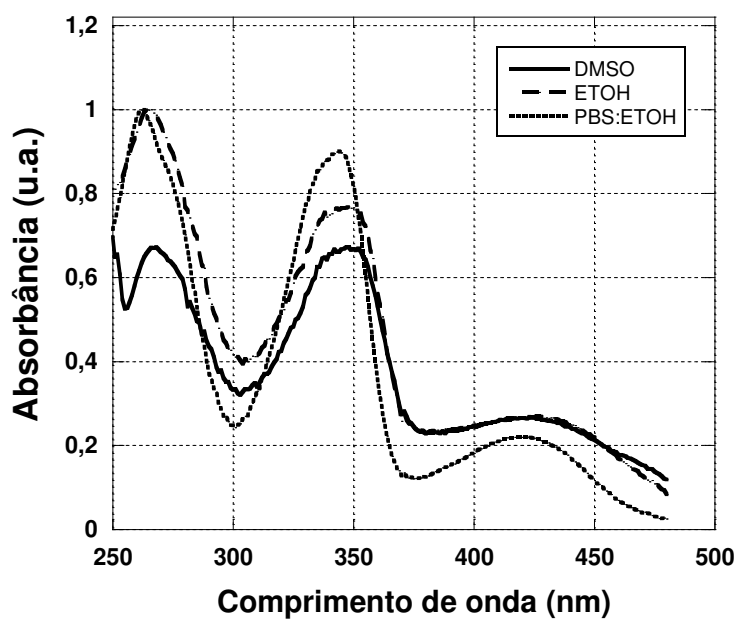


Figura 71. Espectro normalizado de absorção da BBR (1 µM) solubilizada em DMSO, ETOH e PBS:ETOH (99,5:0,5, v/v).

Observou-se que o perfil de absorção da BBR alterou dependendo do solvente de solubilização, havendo um deslocamento dos picos máximos de absorção para menores comprimentos de onda quanto mais polar o solvente. A intensidade de absorção também não é a mesma sendo mais intensa em PBS:ETOH (Figura 72). Os picos máximos de absorção foram 281/352/424 nm, 268/352/433 nm e 262/340/420 nm em DMSO, Etanol e PBS:ETOH, respectivamente.

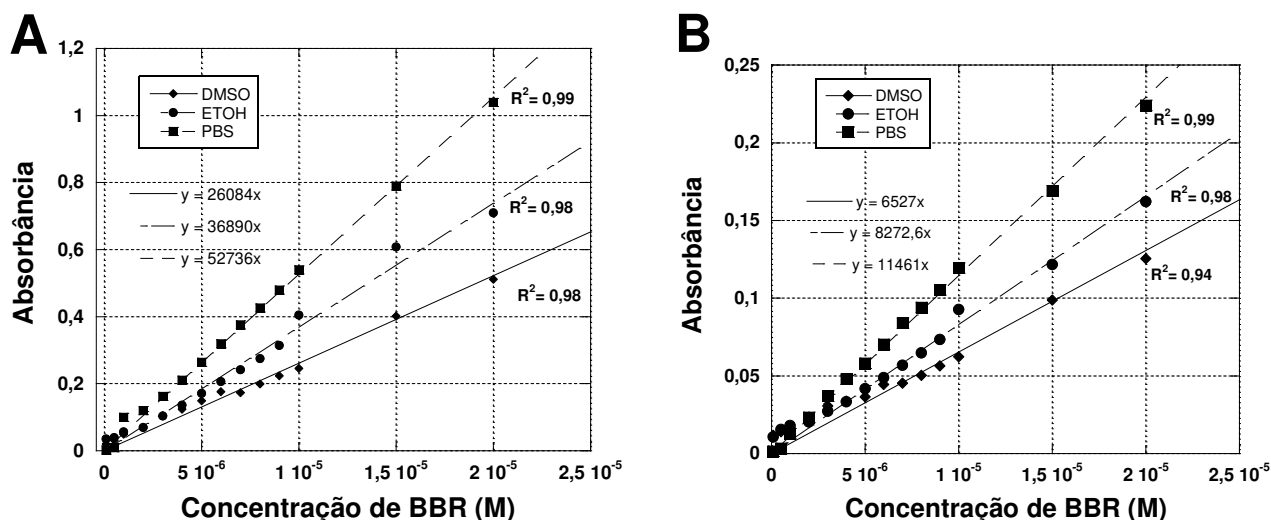


Figura 72. Absorbância dos picos em torno de 350 nm (A) e 420 nm (B) em função da concentração de BBR (1-20 μ M) nos diferentes meios de solubilização.

A partir destes dados foi possível calcular o coeficiente de extinção molar (ϵ) da BBR nos diferentes meios para os comprimentos de onda de 350 nm (relevante para os ensaios de interação com LDL e microscopia) e 420 nm (relevante para os ensaios biológicos). A boa solubilidade do alcaloide em etanol foi mais um fator que levou-nos a utilizá-lo como solvente para preparo da solução estoque nos ensaios com LDL.

Tabela 21. Coeficiente de extinção molar (ϵ) da berberina em diferentes meios de solubilização

	BBR-DMSO	BBR-ETOH	BBR-PBS:ETOH
ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)	26084 ($\lambda = 350$ nm)	36890 ($\lambda = 350$ nm)	52736 ($\lambda = 350$ nm)
	6527 ($\lambda = 420$ nm)	8272 ($\lambda = 428$ nm)	11461 ($\lambda = 424$ nm)

Na Figura 73, observa-se os espectros de fluorescência da BBR nos diferentes meios de solubilização estudados, dentro de uma mesma concentração. Observou-se que não só a intensidade de fluorescência variou (maior em solventes menos polares), mas também o pico máximo de emissão conforme se aumentou a polaridade do solvente. Em DMSO, ETOH e PBS observou-se emissão máxima a 500, 520 e 544 nm.

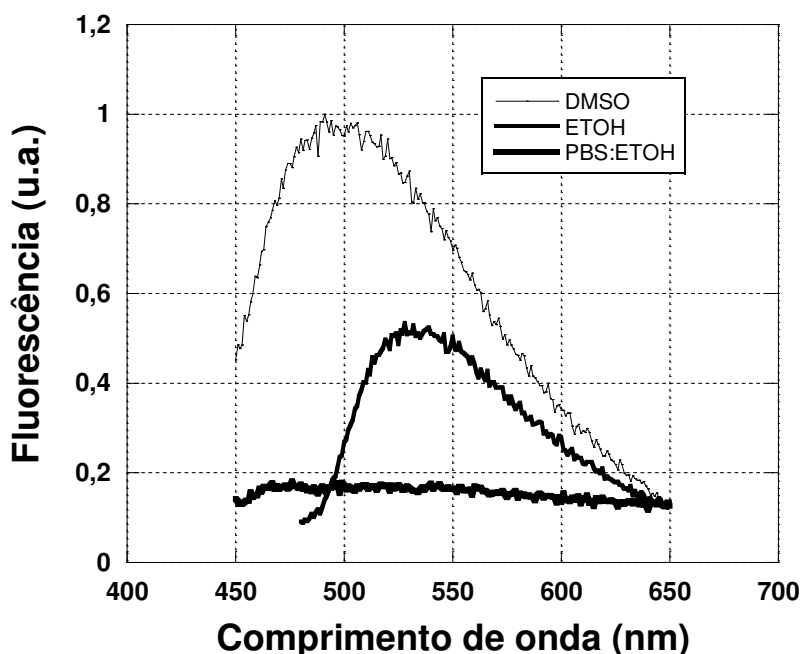


Figura 73. Espectros de fluorescência normalizados da BBR nos diferentes meios de solubilização. Concentração da BBR: 1 μ M, excitação: 350 nm (DMSO e ETOH) e 340 nm em PBS:ETOH.

A intensidade de fluorescência em função da concentração da BBR nos diferentes meios de solubilização é apresentada na Figura 74. Nesta representação observou-se que em ETOH e DMSO a fluorescência atingiu um ponto máximo em uma concentração a de cerca de 5.10⁻⁵M. e, a partir desta concentração a fluorescência começou a decrescer. Em concentrações elevadas pode ocorrer a formação de dímeros ou polímeros maiores, o que

resulta em uma diminuição da eficiência quântica da substância e alteração de seus espectros de absorção e fluorescência, culminando em uma redução na intensidade deste último. A intensidade de fluorescência é proporcional à concentração do fluoróforo em soluções muito diluídas (absorbância muito baixa). Para concentrações suficientemente baixas (absorbância $< 0,1$) a luz incidente é ligeiramente atenuada ao longo da cubeta (caminho óptico). Já em concentrações altas, uma parte significativa da luz incidente é absorvida antes de chegar ao ponto onde a fluorescência é observada (efeito de filtro interno). Outra parte significativa da luz emitida também é reabsorvida antes de sair da cubeta (efeito de filtro interno secundário), levando a um aparente decréscimo da intensidade de fluorescência. A intensidade de fluorescência medida vai depender da densidade ótica do fluoróforo no comprimento de onda de excitação e emissão. Consequentemente a intensidade de fluorescência de um composto é proporcional à concentração apenas para uma gama restrita de densidades óticas (Lakowicz, 2006). Frente aos nossos resultados, para a BBR esta gama estaria entre as concentrações de 10^{-7} a 10^{-5} M quando em etanol ou DMSO.

Já em PBS:ETOH fez-se a medida de amostras até a concentração de $2 \cdot 10^{-5}$ M para manter a concentração de etanol inferior a 0,5%. Observou-se que a intensidade de fluorescência continuou aumentando. Contudo em relação aos outros solventes, nas mesmas concentrações, ela foi muito inferior.

Curiosamente, mesmo sendo menos solúvel em DMSO que em PBS: ETOH (99,5:0,5, v/v), como evidenciado pelos valores de ϵ nestes dois solventes, a fluorescência da BBR no primeiro mostrou-se muito mais intensa que no segundo. Isto pode estar relacionado ao arranjo das moléculas de BBR, água (PBS) e etanol na solução da BBR em PBS:ETOH (99,5:0,5, v/v), além da possibilidade de interferência dos sais do tampão PBS na absorção da luz e emissão de fluorescência pela BBR.

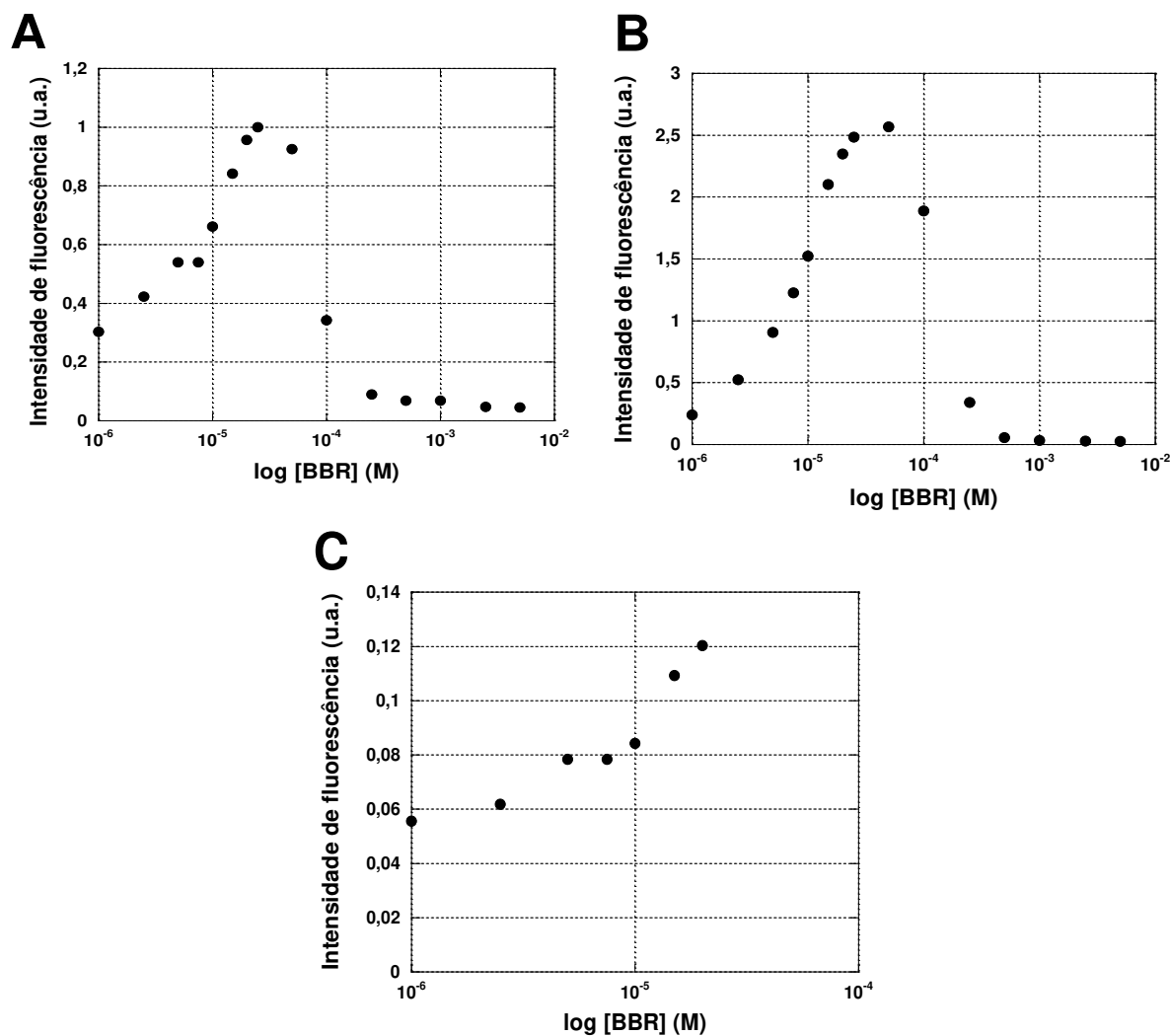


Figura 74. Intensidade de fluorescência da BBR normalizada (540nm) em função de sua concentração (logarítimo) nos três solventes estudados, DMSO (A), ETOH (B) e PBS:ETOH (C).

Os dados de espectroscopia quanto aos picos de absorção e fluorescência da BBR estão coerentes com dados já descritos na literatura. Trabalhando com a mesma forma deste alcaloide (cloreto de berberina) Brezová *et al.* (2004) e Jantova *et al.* (2006), verificaram que quando este alcaloide é solubilizado em DMSO ou ETOH apresentava picos de absorção em

torno de 352/423 nm e 350/430, respectivamente, e quando excitado nestes comprimentos de onda possuía fluorescência verde com pico em torno de 520 nm.

4.1.2. Estudo de equilíbrio: quantificação da fixação da Berberina ao LDL

Uma vez associada ao LDL, acredita-se, assim como outros PSs, que a BBR pode se repartir entre as três porções desta partícula, na apoproteína (apoB-100), nos fosfolipídios de superfície e no núcleo hidrofóbico. Esta distribuição, bem como o número total de moléculas que se relacionam com LDL, são elementos fundamentais que influenciam no transporte do PS pelo LDL para o interior das células uma vez que alteram suas propriedades físicas e químicas como, por exemplo, a carga total da partícula. No caso de se ligarem a apoB-100, o local de reconhecimento por receptores apo B/E LDL específicos da superfície celular, a internalização da partícula estaria prejudicada (Bonneau *et al.*, 2004).

Portanto, conhecer o número total de moléculas do fotossensibilizador e sua distribuição entre os diferentes componentes do LDL são parâmetros importantes para entender como funciona o transporte de substâncias por meio desta partícula.

4.1.2.1. Extinção da fluorescência dos triptofanos (fixação na apoproteína B-100).

O espectro de emissão da fluorescência do LDL associado à berberina tem um pico a 330 nm correspondente ao máximo de excitação da dupla de aminoácidos tirosina/triptofano da apoB-100 a 278 nm. Uma vez que a berberina não fluoresce quando excitada neste comprimento de onda, o pico observado corresponde necessariamente à transferência de

energia destes dois aminoácidos excitados. Este fenômeno indica que existem sítios de fixação da BBR na apoB-100 ou diretamente na interface proteína- lipídeos.

A fim de melhor caracterizar esta fixação, foram adicionados a uma solução de LDL concentrações crescentes de BBR e obtivemos os espectros de emissão de fluorescência excitando a apoB-100 a 278nm. Como podemos observar na Figura 75, a associação da BBR ao LDL induz efetivamente uma diminuição na intensidade de fluorescência intrínseca da apoB-100 e esta diminuição é uma função da concentração de BBR adicionada à solução de LDL.

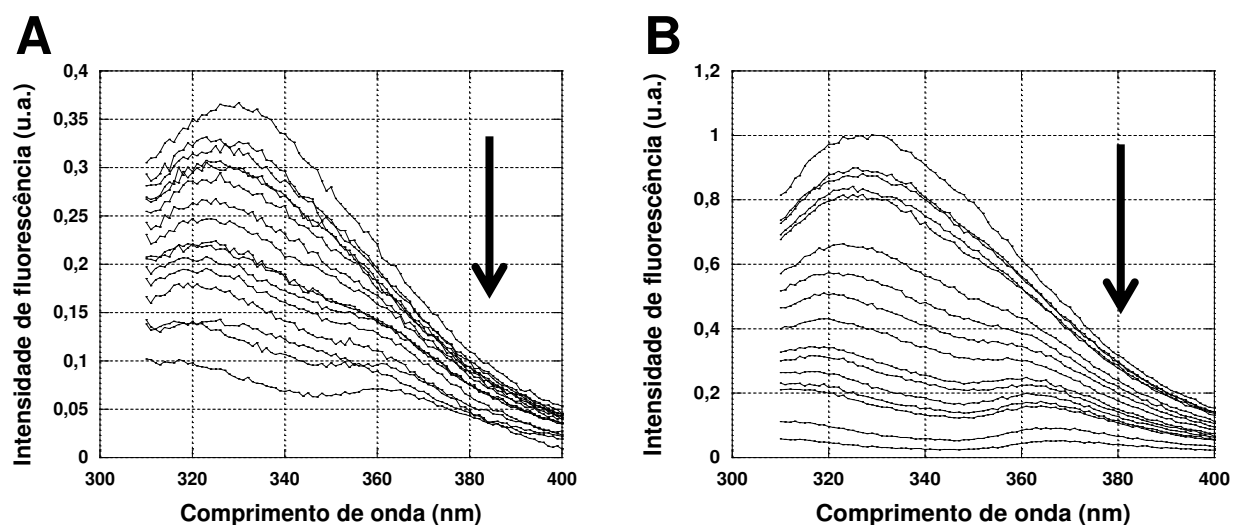


Figura 75. Extinção da fluorescência intrínseca do LDL ($\lambda_{exc}= 278$ nm) induzida pela fixação de BBR. Espectro de fluorescência do LDL, $[LDL] = 2.10^{-8}M$ (A) e $[LDL] = 6.10^{-8}M$ em função de quantidades crescentes de berberina adicionada, sendo a concentração total de BBR definida como P_T . $P_T/[LDL] = 0, 5, 25, 35, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000$ no sentido da flecha.

A Figura 76 mostra a progressão da diminuição dos valores F/F_0 (F = fluorescência do LDL a uma determinada concentração de BBR; F_0 = fluorescência do LDL puro). Conforme adicionou-se concentrações baixas de BBR e ficou clara a existência de sítios de fixação de

forte afinidade entre a BBR e a porção proteica do LDL. Estes tipos de sítios de fixação foram denominados sítios de classe P.

Contudo, cabe ressaltar que a diminuição na intensidade de fluorescência observada não foi necessariamente proporcional somente à quantidade de BBR associada ao LDL. Com efeito, para cada molécula fixada, a eficiência de transferência de energia de fluorescência depende não apenas da distância que separa esta molécula do resíduo de triptofano mais próximo, mas também da sua orientação relativa. Estes dois parâmetros resultaram no estabelecimento de um acoplamento dipolo-dipolo sobre qual repousa o FRET (transferência de energia), mais ou menos fácil, do LDL para a BBR.

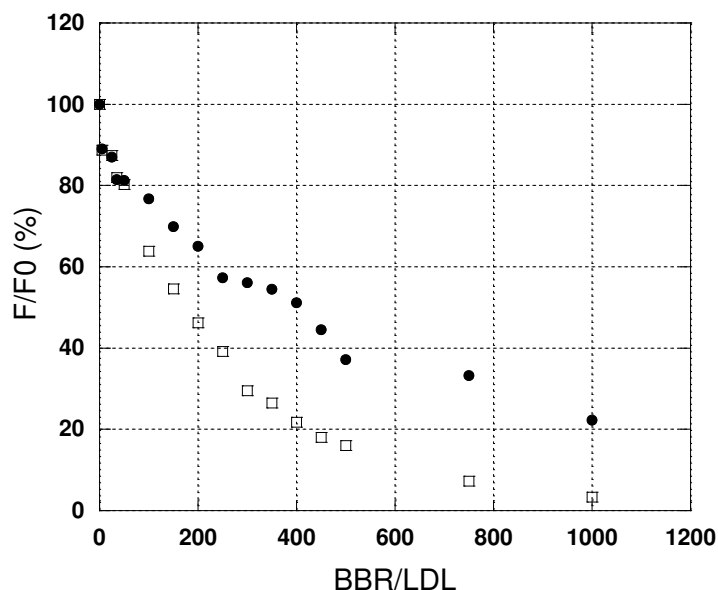


Figura 76. Intensidade relativa da fluorescência (F/F_0 , %) à 330nm em função de P_T /LDL. ●: $[LDL] = 2.10^{-8}M$; □: $[LDL] = 6.10^{-8} M$. A intensidade de fluorescência para $P_T = 0$ esta normalizada a 100% (representação de Halfman & Nishida, 1972).

Os parâmetros desta interação BBR-LDL foram determinados utilizando-se um método desenvolvido por Nishida (Halfman & Nishida, 1972). Para tanto, fez-se o experimento descritos acima utilizando duas concentrações de LDL suficientemente próximas

para realização dos cálculos. De fato, a medição da extinção de fluorescência da apoB-100 nos dá somente uma indicação indireta quanto à fixação da BBR. Efetuar as medidas em duas concentrações diferentes de LDL permite, trabalhando-se com o deslocamento no equilíbrio de ligação que esta mudança de concentração implica, que nos livrassemos de todos os parâmetros ligados às propriedades da apoB-100, em especial dos efeitos de orientação dos sítios e de suas distâncias aos triptofanos. Este método pode ser resumido como a seguir:

Por definição, qualquer que seja a concentração de LDL, a conservação de matéria implica:

Equação 1.

$$P_F = LDL \times \left(\frac{P_T}{LDL} - v \right)$$

na qual, P_F é igual a quantidade de BBR livre na solução, v é o número de moléculas de BBR fixas por molécula de LDL, P_T é a concentração total de BBR utilizada experimentalmente e LDL representa nesta equação a concentração em lipoproteína.

O método baseia-se no fato de que existem pares (P_T , LDL), obtidos a partir da representação proposta por Halfman & Nishida (Figura 76) que conduzem a um mesmo valor de v . Para dois pares denominados a e b , as equações (2) e (3) permitem, então, definir que:

Equação 2.

$$v = \frac{\frac{P_{T_a}}{LDL_a} - \frac{LDL_b}{LDL_a} \left(\frac{P_{T_b}}{LDL_b} \right)}{1 - \frac{LDL_b}{LDL_a}}$$

Equação 3.

$$P_F = \frac{LDL_a \times LDL_b}{LDL_a - LDL_b} \left[\left(\frac{P_{T_b}}{LDL_b} \right) - \left(\frac{P_{T_a}}{LDL_a} \right) \right]$$

Se considerarmos que a fixação de um mesmo número de moléculas por LDL (o mesmo valor de ν) se traduz pelas mesmas mudanças das propriedades de fluorescência da apoB-100, estes dois pares corresponderão ao mesmo $\Delta(F/F_0)$.

Concretamente, os pares (P_T , LDL) que correspondem ao mesmo $\Delta(F/F_0)$ são selecionados. As equações precedentes permitem calcular os valores de ν e P_F correspondentes e estes dados são representados de acordo com o método de Scatchard (1949 e 1950). Esta representação resultou em uma gráfico (Figura 77) que nos permite verificar que cerca de 250 moléculas de BBR se ligam a uma molécula de LDL e a constante de associação (K_p) correspondente a este primeiro tipo de fixação foi igual a $1,05 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$.

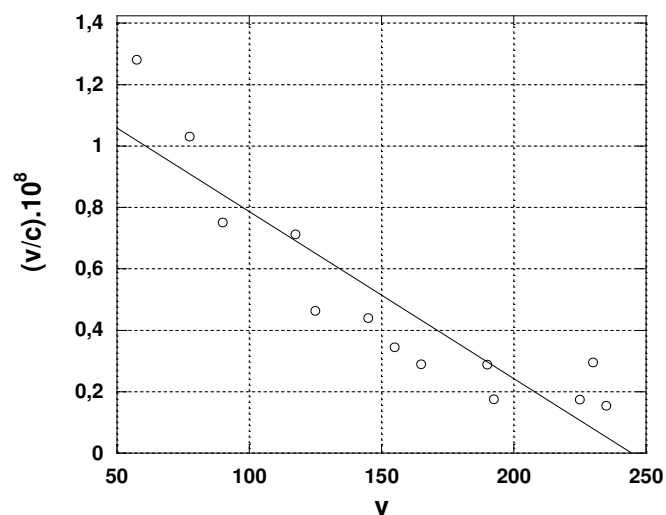


Figura 77. Quantificação da associação da BBR ao LDL segundo as mudanças na fluorescência deste último a 330 nm, excitação a 278 nm. Os pontos foram calculados segundo o método definido por Hafman & Nishida (1972) e representados de acordo com o método clássico de Scatchard (1949 e 1950).

Para levantar mais indícios de que extinção de fluorescência do LDL pela BBR é iniciada pela formação de um complexo no estado fundamental, obtiveram-se espectros de absorção do LDL, da BBR sozinha e dela associada ao LDL em diferentes concentrações. Subtraindo-se o espectro da BBR sozinha do espectro resultante da associação BBR-LDL obteve-se um novo espectro. Observa-se (Figura 78) que não houve uma superposição perfeita entre os espectros do LDL sozinha e do espectro resultante da subtração da BBR, o que indicou que o mecanismo de extinção de fluorescência do LDL pela berberina se deu por um processo de extinção estático (Lakowicz, 2006), no qual ocorre uma transferência de energia do LDL para a BBR.

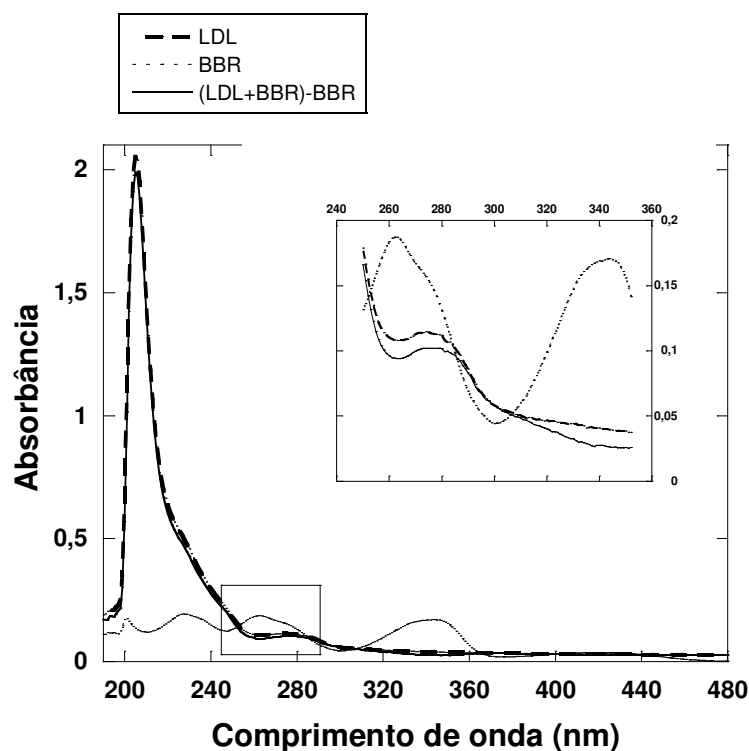


Figura 78. Espectro de absorção do LDL na presença de BBR. Espectro de absorção do LDL sozinho (---); espectro de absorção da BBR sozinha (....); diferença no espectro de absorção entre BBR-LDL e BBR na mesma concentração (—). [BBR]= $3 \cdot 10^{-6}$ M e [LDL]= $6 \cdot 10^{-8}$ M. O espectro de absorção nos comprimentos de onda entre 250-350 nm estão representados no inserto.

4.1.2.2. Mudança no perfil de fluorescência da berberina (esquema de fixação global).

A fixação da berberina na lipoproteína também evidencia um segundo tipo de fixação que não induz a extinção de fluorescência à 330nm da apoB-100 e que ocorre na porção lipídica (superfície de fosfolipídios/colesterol e núcleo de triglicerídeos e ésteres) do LDL, aqui definida como fixação de classe L. Cabe ressaltar, no entanto que, as interações de classe L, nos lipídeos, não correspondem a uma fixação de moléculas de BBR em sítios pontuais e materiais, ou seja a BBR estaria localizada no ambiente criado pela porção lipídica da

partícula de LDL. Este tipo de fixação é melhor entendida como um fenômeno de partição das moléculas de BBR entre a fase lipídica e fase aquosa do LDL.

Neste contexto, determinando-se a constante de associação global (K_{LDL}) de ligação deste alcaloide ao LDL (ou seja, referente à interação da BBR a todas as porções da partícula), a diferença entre esta constante e a constante de associação à ApoB-100 nos forneceria o valor da constante de associação com a porção lipídica (K_L).

Para tanto, mesmo que com sinal muito fraco, a associação da BBR com o LDL conduziu uma mudança de seu espectro de emissão de fluorescência sob excitação de 350 nm. Assim, para melhor entender esta mudança, fez-se um delineamento experimental, no qual acompanhou-se a evolução do espectro de emissão de fluorescência desta substância ao acrescentar-se quantidades crescentes de LDL (Figura 79).

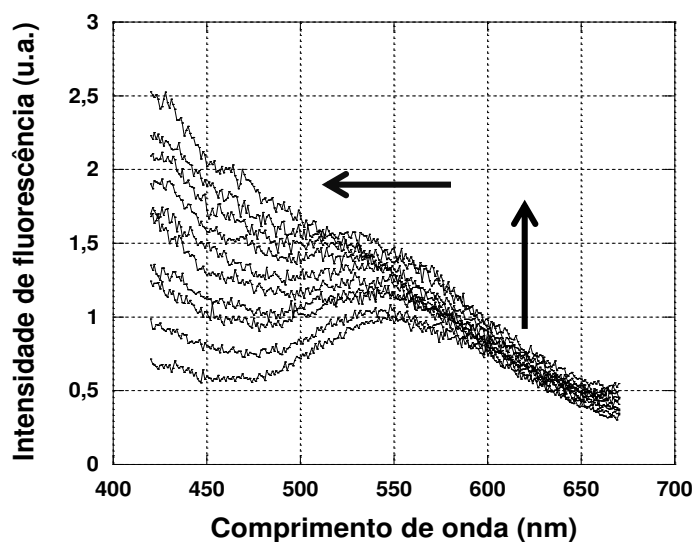


Figura 79. Espectros de fluorescência da berberina (1 μ M) em presença de diferentes quantidades de LDL. Comprimento de onda de excitação: 350 nm. Concentração em LDL : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10⁻⁹ M (sentido flecha vertical). A flecha horizontal indica a direção de mudança no perfil do espectro em função do aumento da quantidade em LDL.

Neste ensaio, a concentração de BBR utilizada foi suficientemente fraca para que nenhum efeito de filtro fosse produzido. A um determinado comprimento de onda, a fluorescência da solução correspondeu então à combinação linear de cada forma da BBR (livre ou fixada). A BBR livre apresentou um máximo de emissão a 544 nm e a berberina ligada ao LDL apresentou uma emissão máxima a 531nm (emissão de fluorescência da solução de BBR/LDL com a maior concentração de LDL utilizado experimentalmente).

A evolução de P_B (fixada ao LDL) obedece à equação abaixo, que define a constante de afinidade global da BBR para o LDL

Equação 4.

$$K_{LDL} = \frac{P_B}{P_F \times LDL}$$

Definindo-se que F_0 e F_∞ como as intensidades de fluorescência a 531 nm correspondendo, respectivamente, a 0% (sem LDL na solução) e 100% (LDL em excesso) de moléculas associadas ao LDL, esta relação pode ser escrita:

Equação 5.

$$K_{LDL} = \frac{(F - F_0)}{(F_\infty - F)LDL}$$

na qual, F é a intensidade de fluorescência a 531 nm de uma solução obtida a partir do acréscimo de uma determinada quantidade em LDL.

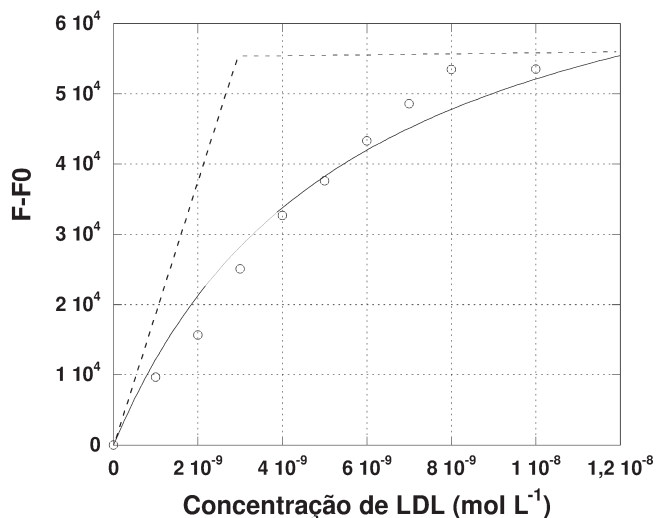


Figura 80. Evolução da fluorescência da solução de BBR (1 μ M) em função da concentração em LDL, calculados a partir dos espectros da Figura 79. A curva corresponde ao melhor ajuste (hiperbólico) dos valores experimentais pela equação (6). O valor de K_{LDL} obtido foi de $1,76 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$.

Na Figura 80 fica ainda mais evidente que a fluorescência aumenta conforme aumentou-se a quantidade de LDL na solução. A intersecção entre o nível do platô (extrapolado) e o declive inicial da curva indica que, aproximadamente, $3 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ de LDL pode incorporar aproximadamente $1 \cdot 10^{-6} \text{ molar}$ de berberinade BBR (concentração utilizada no ensaio), o que significa que cada partícula pode fixar cerca de 330 moléculas de berberina. Relembrando que cerca de 250 moléculas de BBR fixam-se à apo B-100, cerca de 80 moléculas de BBR não participam da extinção de fluorescência do triptofano que compõem a proteína e estariam repartidas entre a porção lipídica ou aquosa na partícula de LDL

A equação (5) pode igualmente ser escrita na forma :

Equação 6.
$$\frac{1}{F_0 - F} = \frac{1}{F_0 - F_\infty} + \frac{1}{K_{LDL} \cdot [LDL] \cdot (F_0 - F_\infty)}$$

A representação duplamente inversa $1/(F_0-F) = f([LDL])$ forneceu um resultado direto do valor de K_{LDL} , ao fazer a razão entre o declive obtido e do seu valor na origem (Figura 81). A boa linearidade dos pontos em representação inversa e o valor da constante obtido confirma a validade do ajuste dos pontos mostrado na Figura 79. O valor da constante obtido foi igual a $1,76 \cdot 10^8 M^{-1}$.

Contudo, cabe ressaltar que o tipo de análise realizada a partir das equações (6) e (7) implica que o LDL esteja em excesso em relação à BBR. Os resultados obtidos indicaram que o nosso delineamento experimental não atende a essa condição (LDL em excesso), uma vez que o platô da curva não foi, de fato, atingido (vide Figura 79). No entanto, as condições experimentais (sensibilidade) nos impediram de diminuir a concentração da BBR ou de aumentar a de LDL. O valor da constante de associação global está, portanto, subestimado.

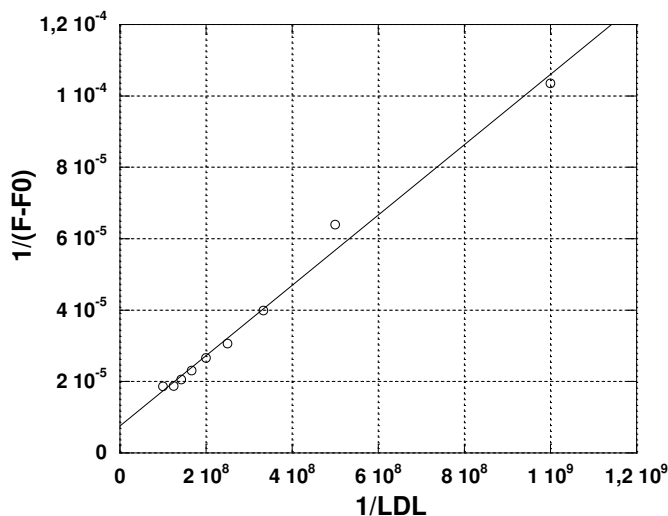


Figura 81. Determinação da constante de afinidade global da berberina ao LDL. As intensidades de fluorescência são derivadas dos espectros da Figura 79 e o ajuste linear corresponde à equação (7). A constante deduzida corresponde à $K_{LDL} \approx 1,76 \cdot 10^8 M^{-1}$.

O equilíbrio de interação entre a Berberina e o LDL

Os ensaios realizados a partir de observações de fluorescência da BBR, mesmo que muito fraca, assim como dos triptofanos, da apoB-100, nos permitiu caracterizar dois tipos de fixação da BBR no LDL, evidenciando que o alcaloide possui forte afinidade por esta partícula. O primeiro tipo de fixação, denominado de classe P, resultou em uma extinção da fluorescência dos resíduos de triptofano da apoB-100 e envolve a participação de cerca de 250 moléculas de BBR. Este número elevado de moléculas de BBR ligadas ao LDL levanta a hipótese de que de fato apenas algumas moléculas estão efetivamente ligadas à apoB-100, enquanto que outras moléculas ligam-se a estas formando agregados ao redor da proteína ou nas suas imediações, ou seja, na interface ApoB-100/lipídeos. O valor de constante de associação determinado para este tipo de ligação foi $K_p = 1,05 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$

Outras moléculas de BBR podem também associar-se a partícula, sem participar deste fenômeno de FRET (transferência de energia do LDL para a BBR pelos resíduos de triptofano). Trata-se de uma fixação denominada de classe L (com constante K_L), na qual a BBR encontra-se repartida entre a fase lipídica e fase aquosa do LDL. Uma vez que a constante de associação entre a BBR e a partícula de LDL como um todo foi de $1,76 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ e a constante de associação entre a BBR e a apoB-100 foi de $1,05 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$, o valor de K_L , é dado pela diferença entre as constantes sendo igual a $7,10 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$.

Assim, o processo predominante de interação da BBR com o LDL é a fixação de classe P, sendo a sua repartição na porção lipídica, minoritária. A alta hidrofobicidade da molécula de BBR nos levava a supor que a sua afinidade com a porção lipídica seria maior, contudo cabe lembrar que a apoB-100 é uma proteína constituída de resíduos de aminoácidos altamente hidrofóbicos, que favorecem a sua interação com moléculas de mesma natureza.

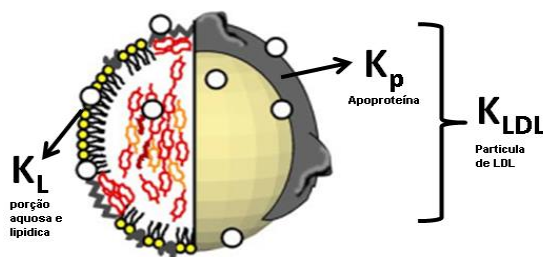


Figura 82. Esquema de repartição das moléculas de BBR (círculos vazados) nas diferentes porções da partícula de LDL.

Nas etapas seguintes do trabalho, procurou-se evidenciar se a interação BBR-LDL poderia interferir no reconhecimento do LDL pelos receptores apoB/C da superfície celular e, portanto, na incorporação desta partícula pelas células, assim como na influência desta interação na localização celular do alcaloide e, por fim, na sua eficiência como fotossensibilizador.

4.1.3. Absorção de berberina pelas células U87MG associadas ou não ao LDL.

A internalização celular de moléculas exógenas pode ser feita por diferentes vias. Geralmente moléculas pequenas podem atravessar a bicamada lipídica da membrana e entrar por difusão passiva (quando suficientemente lipofílicas para atravessar as longas cadeias lipídicas dos fosfolipídios) quando não, podem ser transportadas para o interior celular pelas proteínas membranares pelos processos denominados difusão facilitada ou pelo transporte ativo dependente de energia. Para macromoléculas e algumas substâncias particulares, a membrana plasmática é impermeável e assim são internalizadas pelo processo de endocitose (Alberts, 2007).

A via de internalização celular de PSs assim como a sua distribuição celular são controladas por seus parâmetros físico-químicos, como por exemplo, tamanho e polaridade. Não há nenhum dado na literatura que evidencia a existência de um transporte ativo para entrada de PSs nas células. Assim, acredita-se que estas moléculas quando lipofílicas e suficientemente pequenas, podem atravessar a barreira hidrofóbica da membrana plasmática e entrar nas células por difusão passiva. Em contraste, moléculas hidrofílicas, grandes ou ambos, não solúveis no meio membranar, seriam internalizadas com o líquido intersticial por endocitose (Mojzisova *et al.*, 2007a e b). No caso em que os PSs são complexados a proteínas plasmáticas (LDL, HSA) ou a vetores exógenos (lipossomas ou microesferas) sua internalização dependerá fortemente da interação destas proteínas/vetores com a membrana plasmática celular (Hu *et al.*, 2010; Huntsova *et al.*, 2010). Assim, o balanço entre esses dois modos de internalização é governado, a princípio, pela dinâmica de cruzamento dos fotossensibilizadores nas membranas plasmáticas.

Na difusão passiva, geralmente a entrada da molécula na célula, ocorre a partir da inserção de sua porção mais hidrofóbica no núcleo centro, também hidrofóbico, da folha mais externa da bicamada lipídica da membrana celular e seus grupos polares orientados em direção ao meio extracelular aquoso. Em seguida, a molécula passa para a folha mais interna da bicamada por flip-flop. Durante este processo, a molécula se reorienta até reencontrar uma posição estável do outro lado da membrana. A etapa mais limitante da difusão é a passagem dos grupos polares da molécula na parte hidrofóbica da membrana (Alberts, 2007).

Por outro lado, a endocitose dita específica (requer uma interação do tipo ligante-receptor na superfície celular. Os receptores específicos estão geralmente concentrados em regiões da membrana recoberta por uma proteína, a clatrina, denominados “pontos recobertos de clatrina” (do inglês *Coated Pit*). Durante a internalização estes “pontos de clatrina” se

invaginam para formar uma vesícula (do inglês *Clathrin Coated Vesicle-CCV*). Em seguida estas vesículas soltam o sua cobertura proteica e transformam-se em vacúolos lisos com diâmetro entre 0,1-1 μM que fusionam então com os endossomos precoces. Este modo de internalização é relativamente eficaz. Trata-se de um mecanismo de concentração seletiva que aumenta significativamente a eficácia de internalização de um ligante. Um “ponto recoberto de clatrina” pode acomodar até 1000 receptores de natureza diferente. Desta maneira, moléculas pouco concentradas no líquido intersticial podem ser internalizadas sem que haja incorporação de um grande volume deste fluido (Pearse, 1978).

A endocitose do LDL pelos receptores apo B/E é um exemplo de endocitose específica (May *et al.*, 2007). O papel fisiológico do LDL consiste no transporte do colesterol, um dos principais constituintes das membranas celulares. Em tecidos tumorais, em função da sua necessidade crescente por colesterol, as células aumentam a síntese de receptores de LDL que são então transportados até a membrana plasmática onde se concentram nos “pontos recobertos por clatrina”. Seguida à ligação do LDL nestes receptores, os complexos formados são rapidamente internalizados pelas vesículas recobertas por clatrina. No citosol, elas fusionam-se aos lisossomos que contém hidrolases. Assim, os ésteres de colesterol são hidrolisados e o colesterol livre torna-se disponível para a síntese da membrana plasmática. Os receptores de LDL são reciclados e retransportados para a membrana plasmática, enquanto que as partículas de LDL são degradadas nos lisossomos (May *et al.*, 2007).

No item 4.1.2 mostrou-se que a BBR possui boa afinidade com o LDL, uma vez que a partir da constante de afinidade encontrada, cerca de 90% da BBR utilizada (1 μM) estaria complexada a LDL. Isto levanta a possibilidade de sua internalização associada a esta partícula. Assim, nos itens seguintes, serão apresentados os resultados obtidos dos estudos de

internalização de BBR, associada ou não a LDL, e o papel deste último na sua internalização pela via de endocitose específica dependente de receptores apo B/E.

Neste ensaio trabalhou-se como uma linhagem celular cancerígena humana de glioblastoma denominada U87MG (Figura 83).

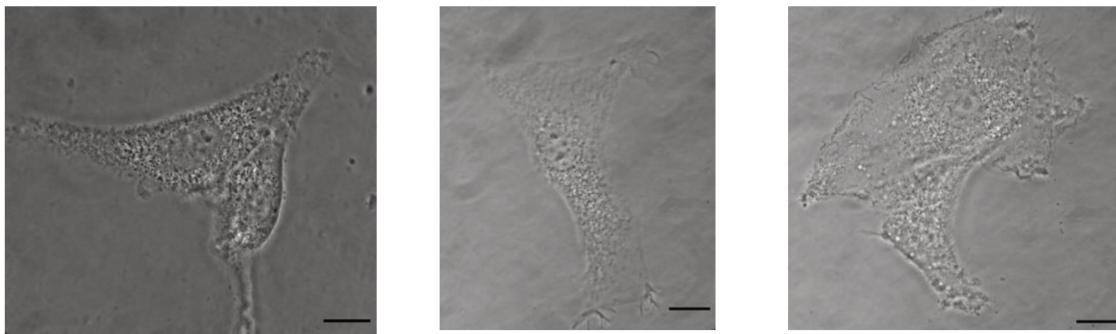


Figura 83. Microscopia por contraste de fase de células da linhagem U87MG. Escala = 5 μ M.

Em um primeiro momento trabalhou-se com células cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. Desta forma a expressão de receptores apo B/E estaria normal. O protocolo de incubação das células com BBR, associada ou não com a LDL, assim como o preparo das amostras (extrato celular) para análise no fluorímetro foram descritos no item 3.2. As soluções extraídas apresentaram um sinal de fluorescência com um máximo de emissão em 544 nm. Este máximo corresponde àquele de uma solução de BBR em Triton X-100 (0,3%).

A Figura 84 mostra a relação entre a concentração de BBR internalizada, livre ou complexada ao LDL, e o do tempo de incubação. Nesta figura é possível observar que absorção do alcaloide quando incubada nestas duas condições foi praticamente linear até 30 min de incubação. A partir deste tempo, para ambas as condições a sua concentração

intracelular atingiu um máximo e, então, a partir de duas horas de incubação, começa a decair indicando um possível processo de catabolização da molécula.

Nas células incubadas com BBR complexada, o acúmulo do alcaloide começa mais rápido (concentração em 15 min é maior que nas células incubadas com BBR livre), contudo, após 3 h de incubação sua concentração na célula é um pouco menor que aquele observado nas células incubadas com o alcaloide livre. Assim, de maneira geral, em células com expressões normais de receptores para LDL, a complexação da BBR ao LDL não proporcionou um maior incorporação do alcaloide.

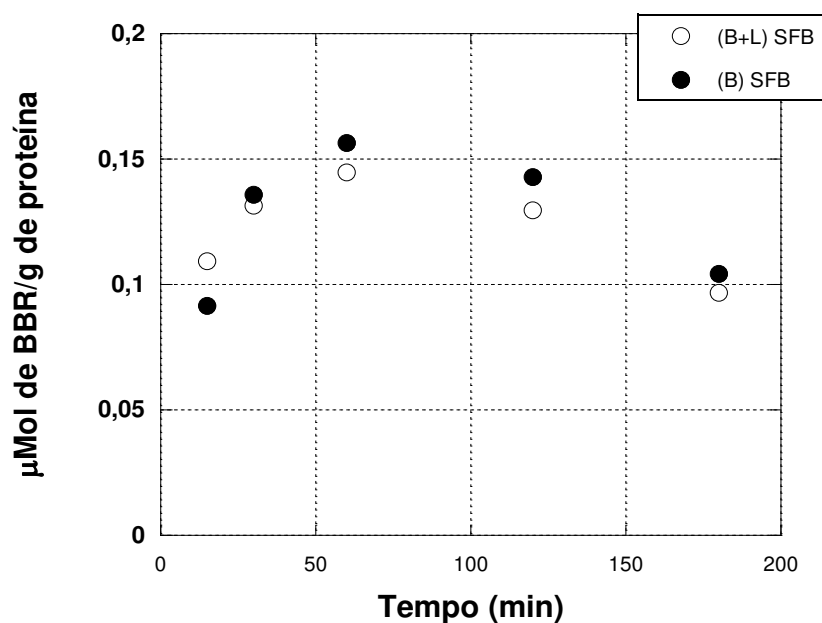


Figura 84. Internalização da BBR livre ((B) SFB) ou complexada ao LDL ((B+L) SFB) pelas célula U87MG (cultivadas em meio suplementado com SFB a 10%) em função do tempo.

Em um segundo momento avaliou-se a absorção de BBR livre ou complexada ao LDL em células cultivadas em meio DMEM suplementado com Ultroserum (2%). Este substituinte de sêrum desprovido de lipoproteínas induz um aumento de expressão de receptores apo B/E

pela célula em sua membrana plasmática (Kaskakova *et al.*, 2005, 2008). Desta forma, acredita-se que mais moléculas de LDL seriam absorvidas pelas células em um menor período de tempo e, conseqüentemente, por estar carreando moléculas de BBR, o transporte desta para dentro da célula também seria otimizado levando a um aumento de sua concentração no meio intracelular. A Figura 85 mostra que esta hipótese pode ser confirmada uma vez que a concentração celular de BBR nas células tratadas com BBR associada ao LDL é maior que nas células tratadas com BBR livre após 1h de incubação (platô da curva).

Nestas condições, houve também uma diminuição da concentração de BBR intracelular a partir de 2h de incubação, assim como foi verificado nas células cultivadas em meio suplementado com 10% de SFB incubadas com o alcaloide livre ou complexado. No entanto, quando as células são cultivadas em Ultroserum a 2%, verificou-se uma inversão na relação taxa de absorção/taxa de catabolização, sendo que a taxa de absorção da BBR foi maior que a taxa de catabolização da mesma nas células incubadas com BBR complexada com LDL, levando a um decaimento mais lento de concentração de BBR na célula após 3h de incubação em relação às células incubadas com BBR livre. Naquelas células, após 3h de incubação a concentração de BBR foi maior que nas células incubadas com BBR livre após 2h de incubação.

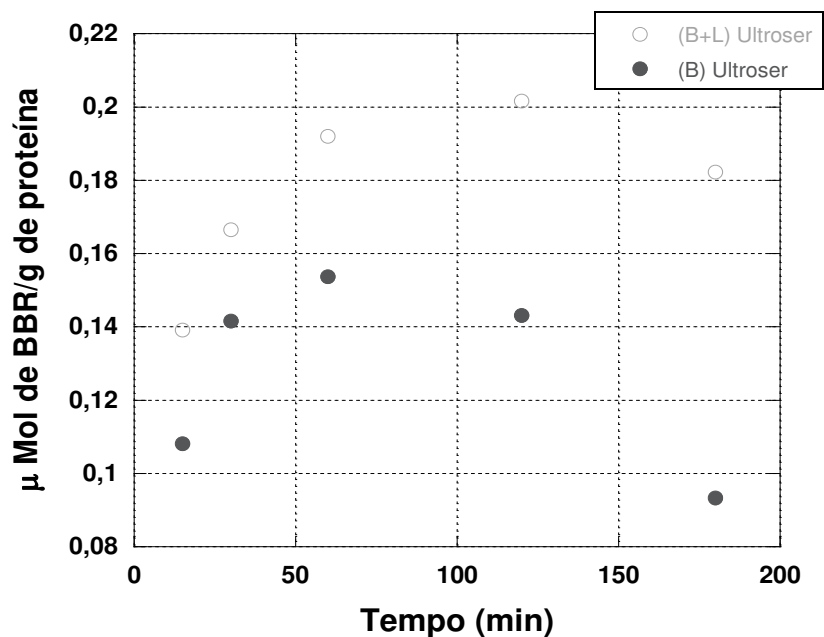


Figura 85. Internalização da BBR livre ((B) Ultroser) ou complexada ao LDL ((B+L) Ultroser) pelas célula U87MG (cultivadas em meio suplementado com Ultroserum a 2%) em função do tempo.

Comparando-se os dois dados, os resultados apresentados, na Figura 86, mostram que a estimulação da expressão de receptores de LDL na superfície membranar induziu a um aumento na taxa de incorporação da BBR quando complexada ao LDL em cerca de 29% em relação as células não estimuladas (cultivadas em SFB) após duas horas de incubação. No entanto, este estímulo não teve efeito sob o acúmulo da BBR não complexada.

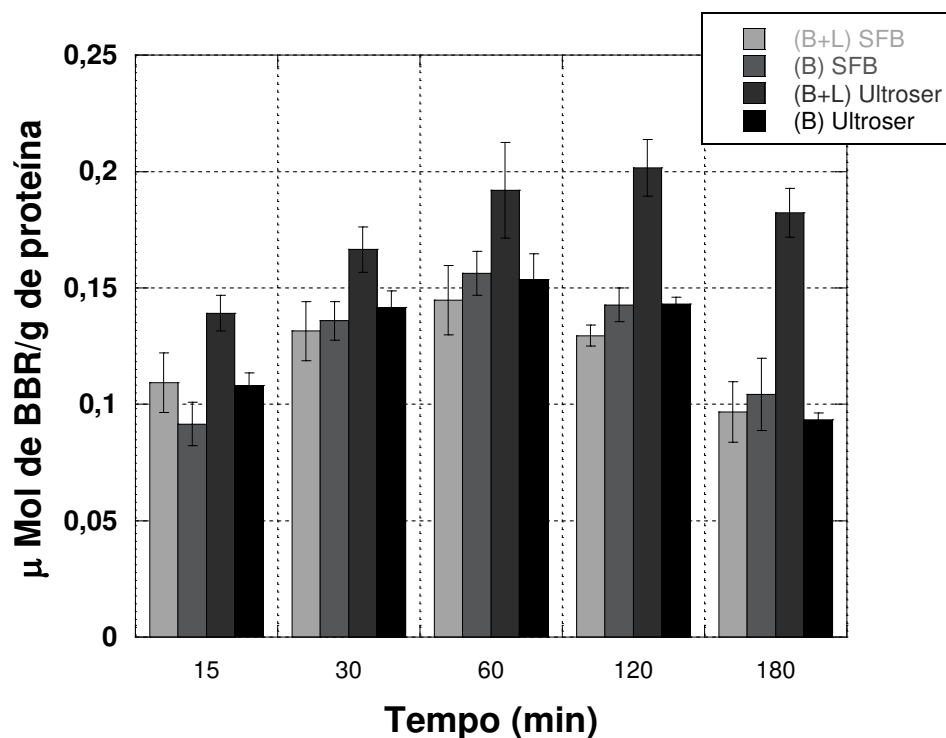


Figura 86. Internalização da BBR livre (B) ou complexada ao LDL (B+L) pelas células U87MG cultivadas em meio suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10% ou com Ultroserum a 2% (Ultroser), em função do tempo.

A partir destes dados pode inferir-se que: a complexação da BBR com o LDL não prejudicou o reconhecimento da partícula pelos receptores apo B/E da superfície membranas das células U87MG e que a sua internalização pode ocorrer associada às lipoproteínas pela via de endocitose específica dependente de LDL. Contudo, a maneira como a BBR livre ou complexada, incubada em células cultivadas em FBS 10% ou a BBR livre incubada em células cultivadas em Ultroserum 2% penetraram a célula pode ocorrer por outros mecanismos de absorção não discutidos aqui.

4.1.4. Microscopia de fluorescência

A fim de conhecer o melhor tempo de incubação das células com o alcaloide para observação por microscopia de fluorescência, para os ensaios de colocalização, descritos a seguir, sua permanência dentro da célula e também seu local de acúmulo, realizou-se ensaio de microscopia de fluorescência com células cultivadas em lamínulas de vidro apropriadas para observação em microscópio.

Uma boa resolução de imagem do local de emissão de fluorescência da BBR foi obtida utilizando-se uma lente objetiva com 100 vezes de aumento, grande abertura numérica (1,4) e imersa em óleo.

Tendo como referência observações em outros trabalhos descritos na literatura (Ma et al., 2013) e os estudos de incorporação celular da BBR discutido no item 4.1.3., a priori esperava-se observar sinais de fluorescência nas células tratadas com BBR livre, vinda da mitocôndria e núcleo celular e, nas células tratadas com BBR complexada sinais de fluorescência vindo de lisossomos, retículo liso e complexo de Golgi (considerando-se a entrada da BBR nas células pela via de endocitose específica). Contudo, uma primeira observação mostrou que a BBR livre ou complexada marcava as células como um todo, mais especificamente a rede mitocondrial celular (Figura 87). O mesmo resultado foi verificado inclusive nas células cultivadas em Ultroserum a 2% (Figura 88).

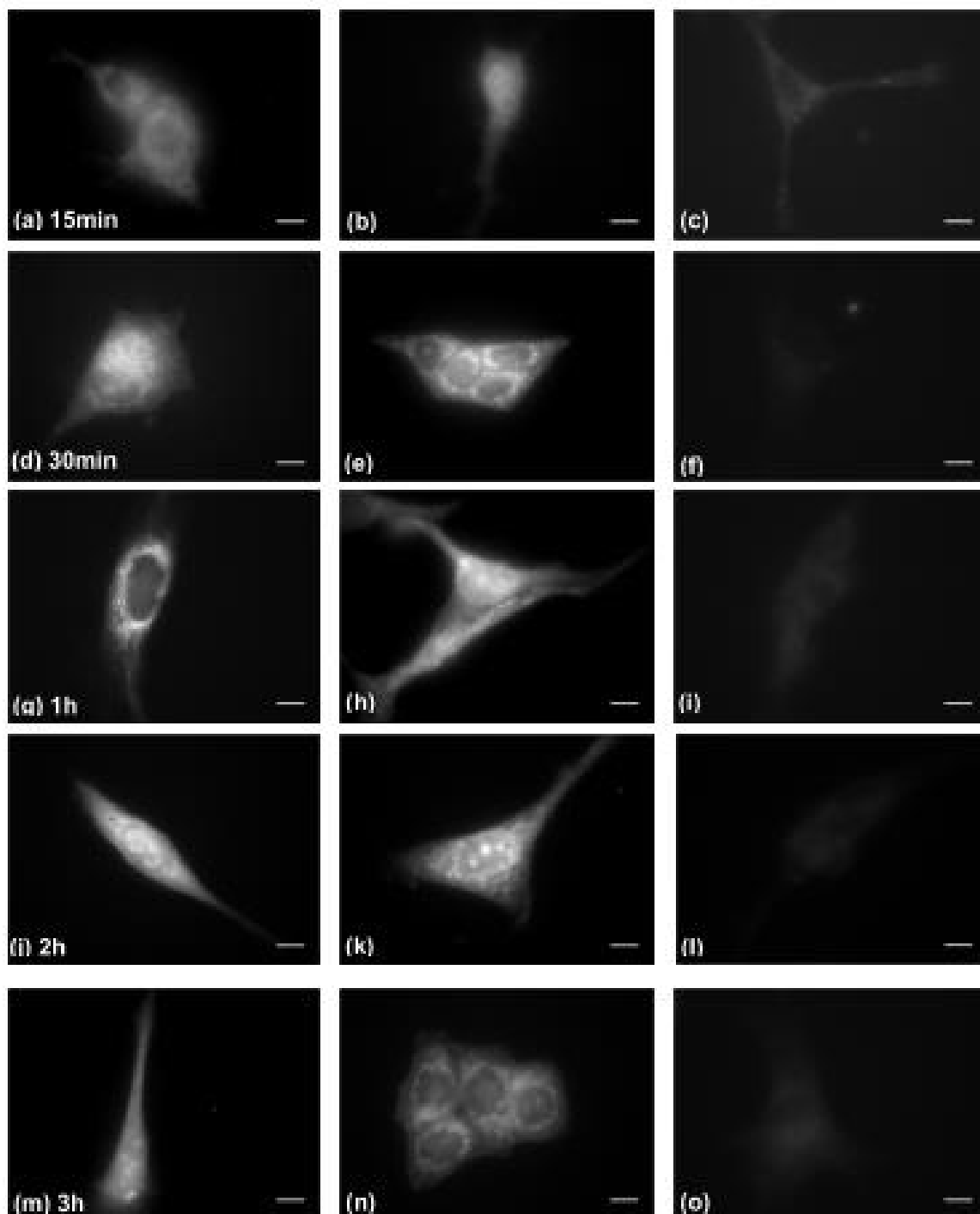


Figura 87. Microscopia de fluorescência em células U87MG cultivadas em meio suplementado com SFB a 2%. Primeira coluna (a, d, g, j) representa a emissão de fluorescência da BBR, [BBR]=1 μ M; segunda coluna (b, e, h, k) representa a emissão de fluorescência da BBR complexada com LDL, [BBR]=1 μ M e [LDL]= 0,1 μ M; terceira coluna representa emissão de fluorescência intrínseca das células U87MG. (a, b, c) células incubadas durante 15 min; (d, e, f) 30 min; (g, h, i) 1 h; (j, k, l) 2 h e (m, n, o) 3 h. Escala = 5 μ M.

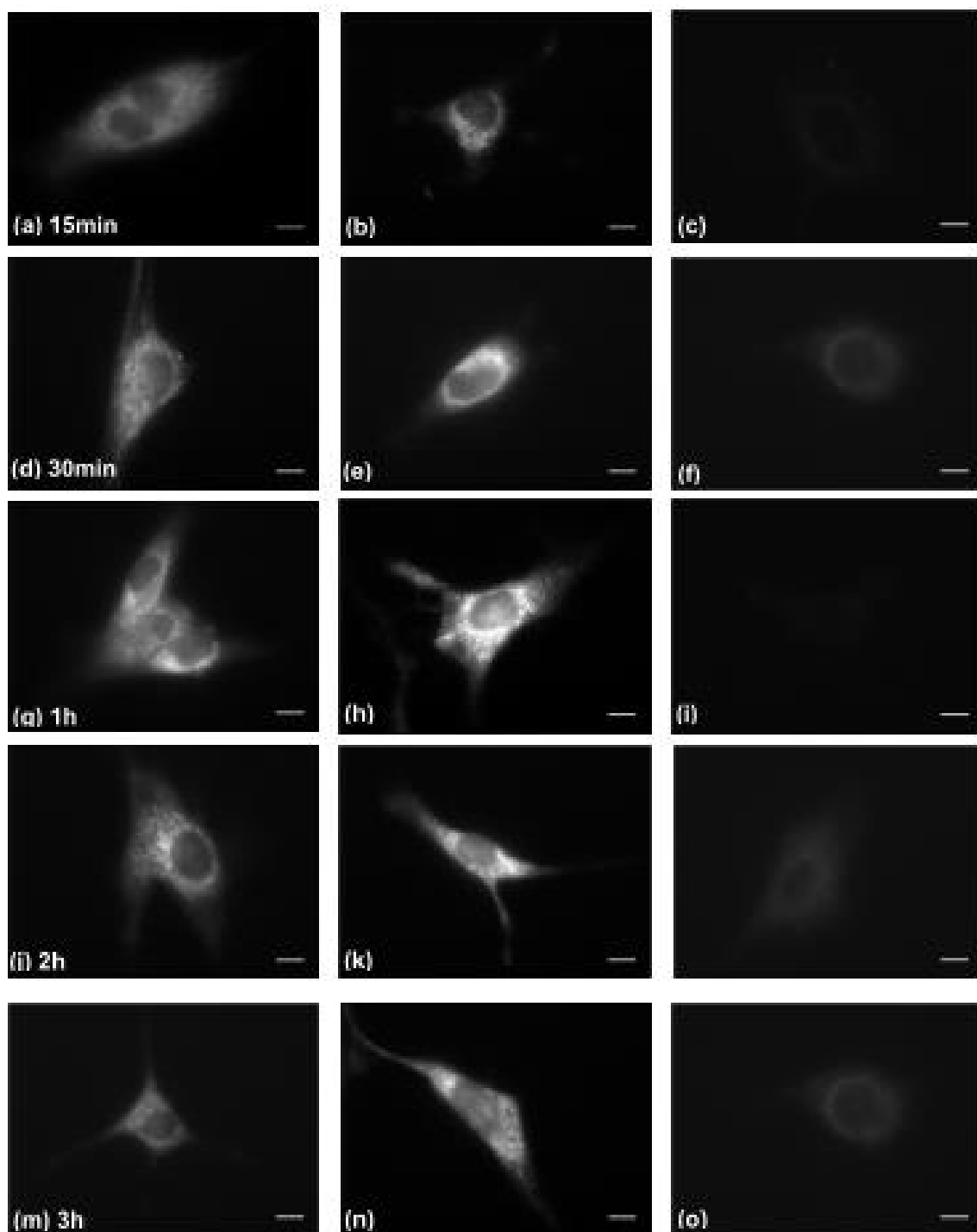


Figura 88. Microscopia de fluorescência em células U87MG cultivadas em meio suplementado com Ultrosérum a 2%. Primeira coluna (a, d, g, j) representa a emissão de fluorescência da BBR, [BBR]=1 μ M; segunda coluna (b, e, h, k) representa a emissão de fluorescência da BBR complexada com LDL, [BBR]=1 μ M e [LDL]= 0,1 μ M; terceira coluna representa emissão de fluorescência intrínseca das células U87MG. (a, b, c) células incubadas durante 15 min; (d, e, f) 30 min; (g, h, i) 1 h; (j, k, l) 2 h e (m, n, o) 3 h. Escala = 5 μ M.

Para obtenção de evidências mais concretas da localização deste alcaloide nas células, ensaios de colocalização foram realizados utilizando-se sondas específicas para mitocôndria, Mitotracker Red[®] (MT) e para Lisossomos, Lisotracker Red[®](LT).

Quanto à intensidade de fluorescência detectada, para cada tempo de incubação, observou-se que nas células cultivadas em SFB 10%, incubadas com BBR livre, a maior intensidade foi emitida pelas células após 1 h de incubação, seguidas das células incubadas por 2 h e 30 min e por fim células incubadas por 15 min e 3 h. Resultados semelhantes foram encontrados para células incubadas com BBR complexada, divergindo somente no período de incubação de 30 min que foi semelhante ao encontrado para 15 min e 3 h. Já nas células cultivadas em Ultroserum a 2% e incubadas com BBR livre, a intensidade de fluorescência para cada tempo de incubação foi igual a encontrada nas células cultivadas em SFB a 10% (exceto para incubação de 30 min que apresentou intensidade semelhante à de 15 min e de 3 h). Nas células incubadas com BBR complexada, a intensidade de fluorescência em 1h foi a mais alta em comparação a todos os outros tratamentos descritos. Nos tratamentos com 2 e 3 h de incubação, a intensidade também foi maior em relação aos respectivos tempos de incubação das células incubadas com BBR livre, cultivadas em Ultroserum ou SFB.

Estes resultados, de maneira geral, estão de acordo com aqueles encontrados nos ensaios de incorporação da BBR, nos quais a intensidade de fluorescência da BBR foi verificada por extração do meio intracelular e medição em fluorímetro. A Tabela 22 recapitula os resultados obtidos por microscopia e extração.

Tabela 22. Comparação de intensidade de fluorescência nos diferentes meios de cultivos e tempo de incubação, obtidos por microscopia (□) e extração (■)

Microscopia	FBS 10% BBR	FBS 10% BBR-LDL	Ultroserum 2% BBR	Ultroserum 2% BBR-LDL
15 min	+	+	+	++
30 min	++	+	+	++
1h	+++	+++	+++	++++
2h	++	++	++	+++
3h	+	+	+	++
Extração	FBS 10% BBR	FBS 10% BBR-LDL	Ultroserum 2% BBR	Ultroserum 2% BBR-LDL
15 min	+	++	++	+++
30 min	++	++	++	+++
1h	+++	+++	+++	+++++
2h	++	++	++	+++
3h	+	+	+	+++

4.1.5. Localização subcelular da berberina

A distribuição subcelular da BBR foi observada por microscopia de fluorescência. As células foram incubadas durante 1 h com uma solução de BBR (10^{-6} M) livre ou previamente associada ao LDL (10^{-7} M), como esquematizado na figura 10. Células incubadas somente com tampão e também com LDL foram analisadas como controles negativos. Cabe ressaltar que a fluorescência intrínseca observada nestes tratamentos, devido à presença de substâncias endógenas fluorescentes (coenzimas e porfirinas endógenas) foi largamente inferior à fluorescência emitida pela BBR.

Na Figura 89 podemos observar as imagens de microscopia de fluorescência da distribuição da BBR e da sonda Mitotracker® red. A primeira linha representa a fluorescência do alcaloide e a segunda a emitida pelo MT red. A sobreposição das duas imagens (terceira linha) mostra em amarelo-alaranjado a colocalização da BBR (verde) e do MT red (vermelho). Observou-se em todos os tratamentos, sendo as células incubadas com BBR livre

ou complexada ao LDL, uma marcação bastante clara da rede mitocondrial celular. Não observou-se marcação específica de outras organelas citossólicas ou da membrana plasmática. Da mesma forma, nas células cultivadas em 2% de Ultroserum, em todas as condições de incubação, a colocalização revelou um acúmulo da BBR nas mitocôndrias.

O tratamento das imagens foi feito utilizando-se o software Image J que nos permitiu calcular o Coeficiente de Pearson (CP). Trata-se de uma medida de correlação linear entre duas variáveis que nos dá um valor entre 1 e -1 (Zinchuck & Grossenbacher-Zinchuk, 2009). Para o tipo de análise aqui pretendida, as variáveis eram as fluorescências da BBR e da sonda e quanto mais próximo de 1 o valor deste coeficiente, mais colocalizada estaria à origem do sinal de fluorescência das variáveis. Para todos os tratamentos, 15 figuras foram analisadas e a média dos CP obtidos foi de 0,94 para células cultivadas em SFB e 0,95 para células cultivadas em Ultroserum, seja para a incubação com BBR livre ou complexada.

Já na Figura 90 podemos observar as imagens de microscopia de fluorescência da distribuição da BBR e da sonda LysoTracker® red. A primeira linha também representa a fluorescência da BBR e a segunda a emitida pela sonda. Na terceira linha, observa-se o resultado da sobreposição das imagens das duas colunas anteriores e nota-se claramente que não houve uma colocalização da fluorescência do marcador (LysoTracker) destacado em vermelho e do alcaloide, destacado em verde. Isto ocorre para todos os tratamentos, em ambos os meios de cultivo das células.

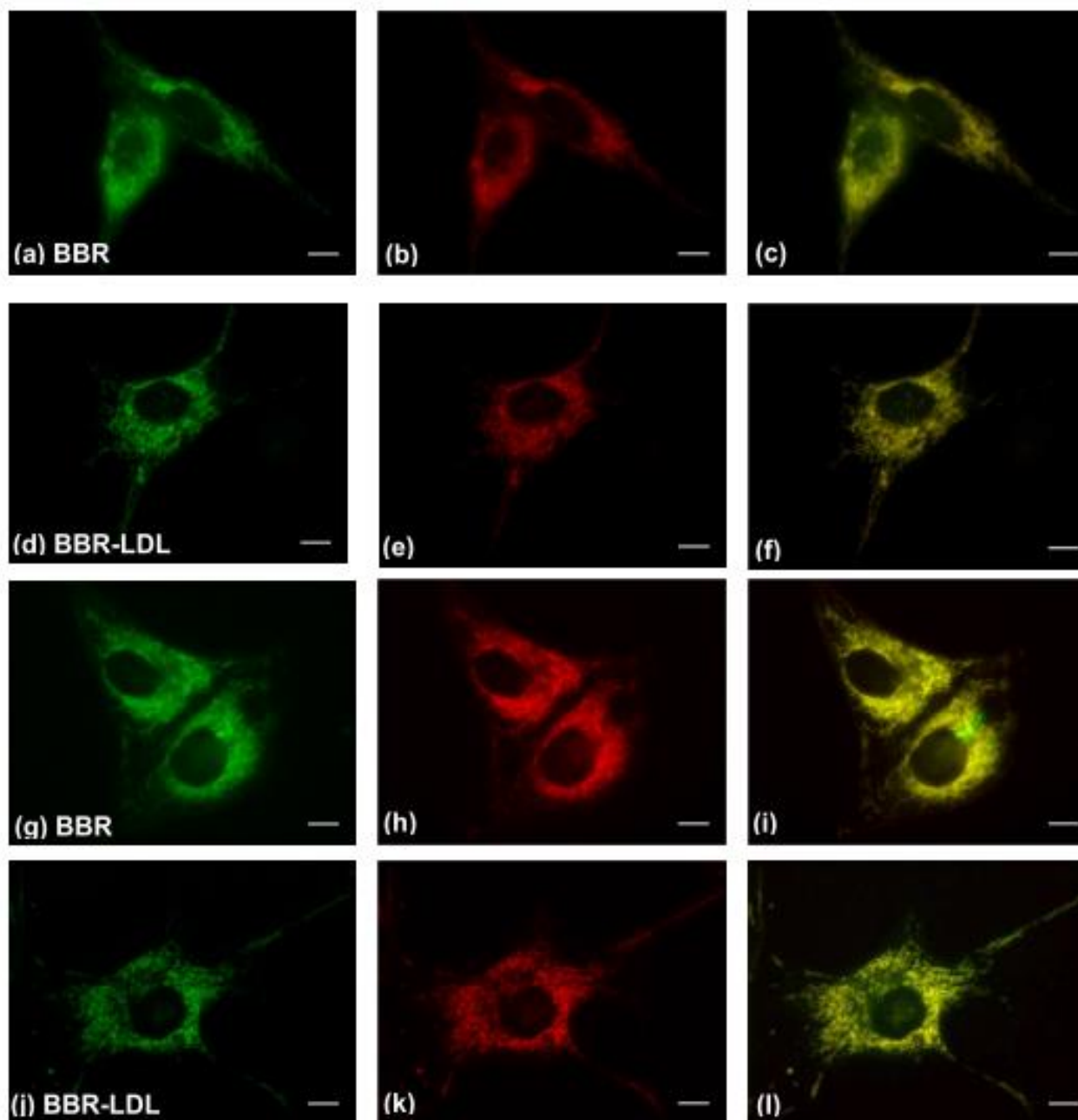


Figura 89. Microscopia de fluorescência em células U87MG. Primeira coluna (a, d, g, j) representa a emissão de fluorescência da BBR (verde, 1 μ M), segunda coluna (b, e, h, k) representa marcação do Mitotracker® red (vermelho, 50 nM) e a terceira coluna (c, f, i, l) representa a sobreposição de fluorescência da BBR e do Mitotracker® red. (a, b, c) células incubadas com BBR e cultivadas em meio DMEM complementado com SFB a 10%. (g, h, i) células incubadas com BBR e cultivadas em meio DMEM complementado com Ultrosol a 2%. Escala= 5 μ M.

O cálculo do coeficiente de Pearson entre as variáveis revelou um valor de 0,67 para as células cultivadas em meio enriquecido com SFB, incubadas com BBR livre ou complexada e de 0,71 para as células cultivadas em meio suplementado com Ultroserum em ambos os meios de incubação.

Estes valores são baixos e confirmaram o que se observa na Figura 90, na qual um número praticamente nulo de vesículas são marcadas tanto pela BBR como pelo Lysotracker. Mesmo com a vetorização com LDL, o alcaloide não se acumula nos lisossomos.

Estas observações nos levam a supor que a BBR internalizada junto com o LDL pela via de endocitose específica (como discutido no item 4.3.1) deve rapidamente sofrer um processo de redistribuição celular que resultam no seu transporte para as mitocôndrias e acúmulo nesta organela. Além disso, não se pode descartar a possibilidade de haver uma liberação parcial da BBR do LDL durante o processo de endocitose, uma vez que frente aos resultados obtidos nos estudos de interação entre elas, acredita-se que grande parte da BBR associada, estaria na verdade ligada, na forma de agregados a uma molécula de BBR que está efetivamente associada à apoB-100 do LDL. Como este tipo de associação é muito fraca, a sua dissociação é provável.

Destas observações pode-se concluir, portanto, que a complexação do alcaloide com o LDL não resultou em uma compartimentalização do alcalóide em lisossomos, mas sim em mitocôndria.

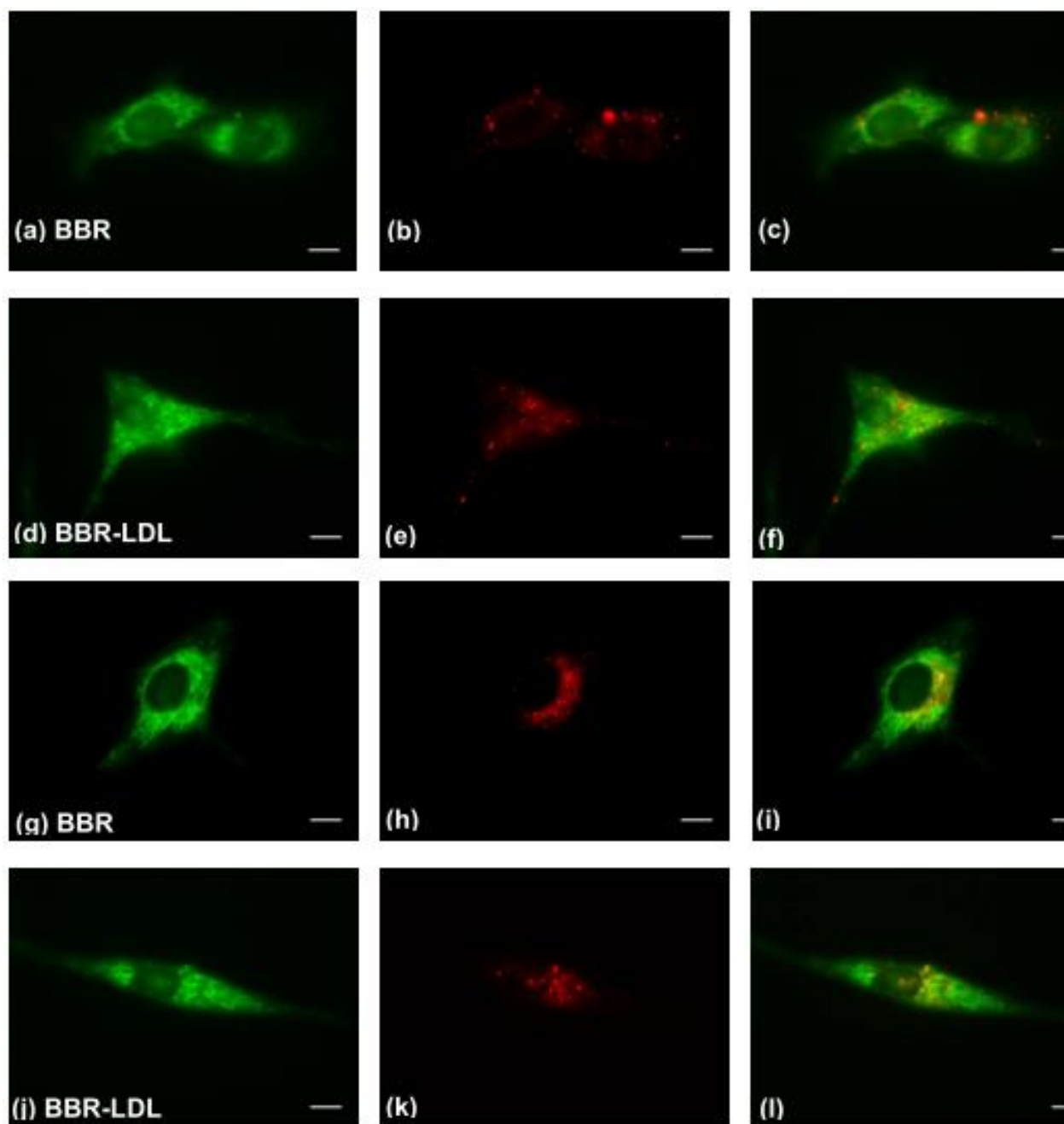


Figura 90. Microscopia de fluorescência em células U87MG. Primeira coluna (a, d, g, j) representa a emissão de fluorescência da BBR (verde, 1 μ M), segunda coluna (b, e, h, k) representa a marcação do Lysotracker® red (vermelho, 200nM) e a terceira coluna (c, f, i, l) representa a sobreposição de fluorescência da BBR e do Lysotracker® red. (a, b, c) células incubadas com BBR e cultivadas em meio DMEM complementado com 10% de SFB. (g, h, i) células incubadas com BBR e cultivadas em meio DMEM complementado com 2% de Ultrosol. Escala= 5 μ M.

4.1.6. Peroxidação lipídica.

A peroxidação lipídica foi avaliada pela dosagem de *TBARS*. Esta dosagem permite medir as substâncias que reagem nas condições de dosagem com o ácido tiobarbitúrico. Entre estas substâncias pode-se citar os produtos primários da peroxidação, assim como hidro e endoperóxidos e também os produtos secundários, sendo o principal o malondialdeído (MDA).

As células foram irradiadas após um período de incubação de 1h em apenas uma concentração de BBR livre (10^{-6} M) ou complexada ao LDL (10^{-7} M). Foram utilizadas diferentes doses de irradiação, 10, 25, 50 e 100 J cm⁻². Como controle positivo utilizou-se o fotossensibilizador Clorina (Cl₆) na mesma concentração da BBR. Placas testemunho (controles negativos) também foram feitas (incubação com HBSS ou HBSS somente com LDL) permitindo-nos comparar os resultados obtidos com células não incubadas, incubadas e não irradiadas e incubadas e irradiadas nas diferentes doses de irradiação. Os valores obtidos foram normalizados em relação à quantidade de proteínas celulares. Como não foi observada diferença estatística significativa na produção de MDA entre as células não incubadas, irradiadas ou não e células incubadas e não irradiadas representou-se no gráfico os valores obtidos para células não incubadas e irradiadas nas diferentes doses.

As Figuras 91 e 92 expressam os valores de MDA detectados no extrato celular (A) e sobrenadante (B) de células cultivadas em SFB a 10% e Ultroserum a 2%, respectivamente. Os resultados evidenciam que a BBR induziu a peroxidação lipídica dependente da dose de irradiação, uma vez que a concentração de MDA detectada cresce conforme a dose de

irradiação aumenta. De maneira geral, a concentração deste composto no extrato celular foi maior que no sobrenadante celular para todos os tratamentos nas duas condições de cultivo.

Nas células cultivadas em SFB a 10%, não observou-se diferença estatística significativa entre as incubadas com BBR livre e BBR complexada. A produção de MDA pelo controle positivo (Cl₆) também foi detectada, sendo cerca de 3 vezes superior ao verificado para BBR dentro de cada dose de irradiação.

Em contrapartida, nas células cultivadas com Ultroserum a 2%, nas doses de irradiação de 50 e 100 J/cm², a produção de MDA foi significativamente maior nas células incubadas com BBR complexada que nas células cultivadas com este alcaloide livre (Figura 92). Isto provavelmente está relacionado ao maior acúmulo intracelular de BBR complexada nesta condição de cultivo como discutido nos ensaios de incorporação celular (item 5.3.1.). Havendo maior acúmulo da substância, por um período de tempo mais prolongado, associado a uma maior dose de irradiação é esperado que o efeito fototóxico do composto também seja maior e, portanto, cause uma maior peroxidação lipídica celular evidenciada pela maior produção de MDA.

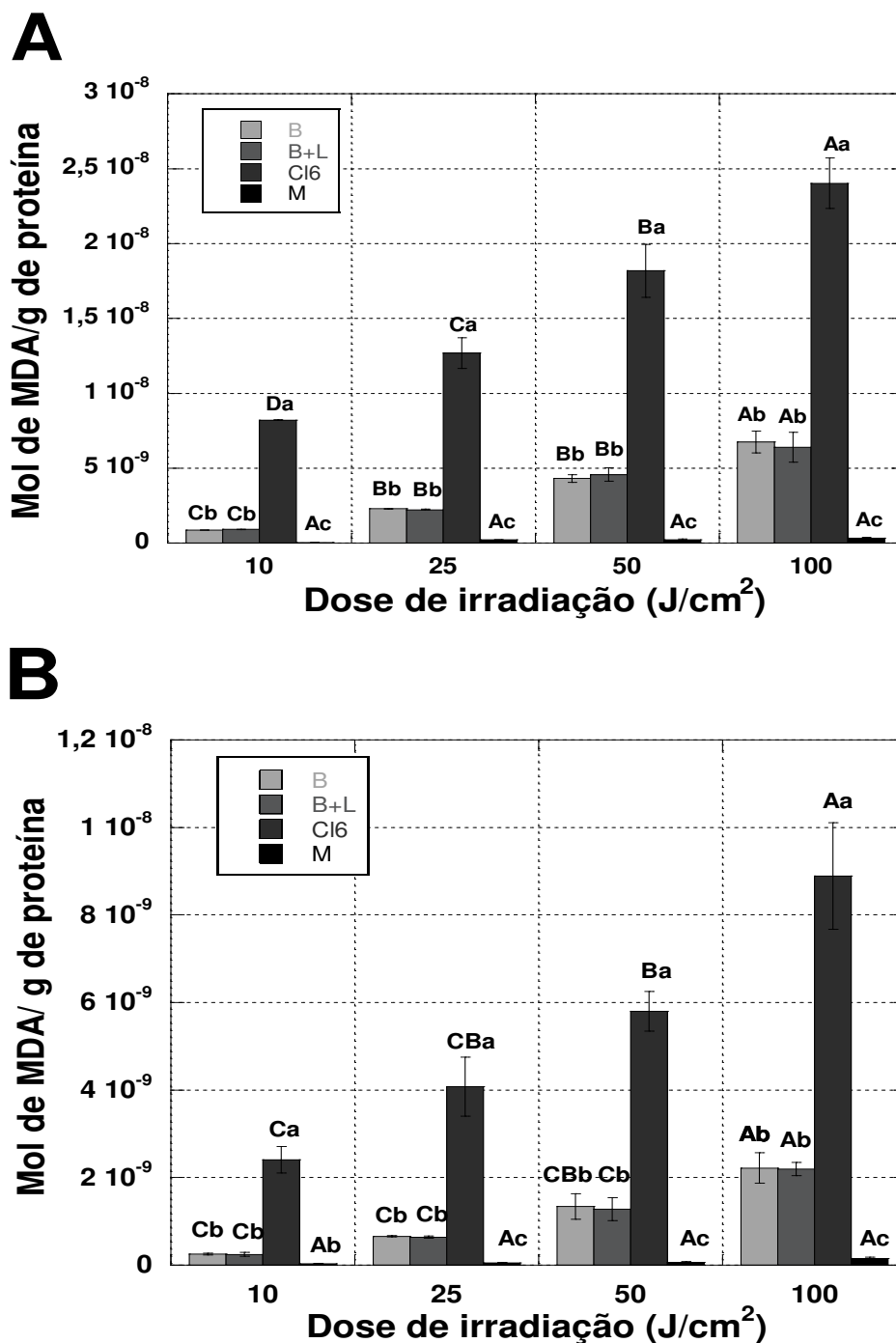


Figura 91. Reação de peroxidação em células cultivadas em SFB a 10%. Quantidade de MDA (em mol por grama de proteína) medido no extrato celular (A) e sobrenadante (B) de células incubadas com BBR livre (B) ou complexadas com LDL (B+L), clorina (Cl₆) ou somente com HBSS (M). Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos dentro de uma mesma dose de irradiação e letras maiúsculas, de um mesmo tratamento em cada dose de irradiação (ambas as análises foram realizadas por one-way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$). Os valores representam a média ± erro padrão de seis repetições.

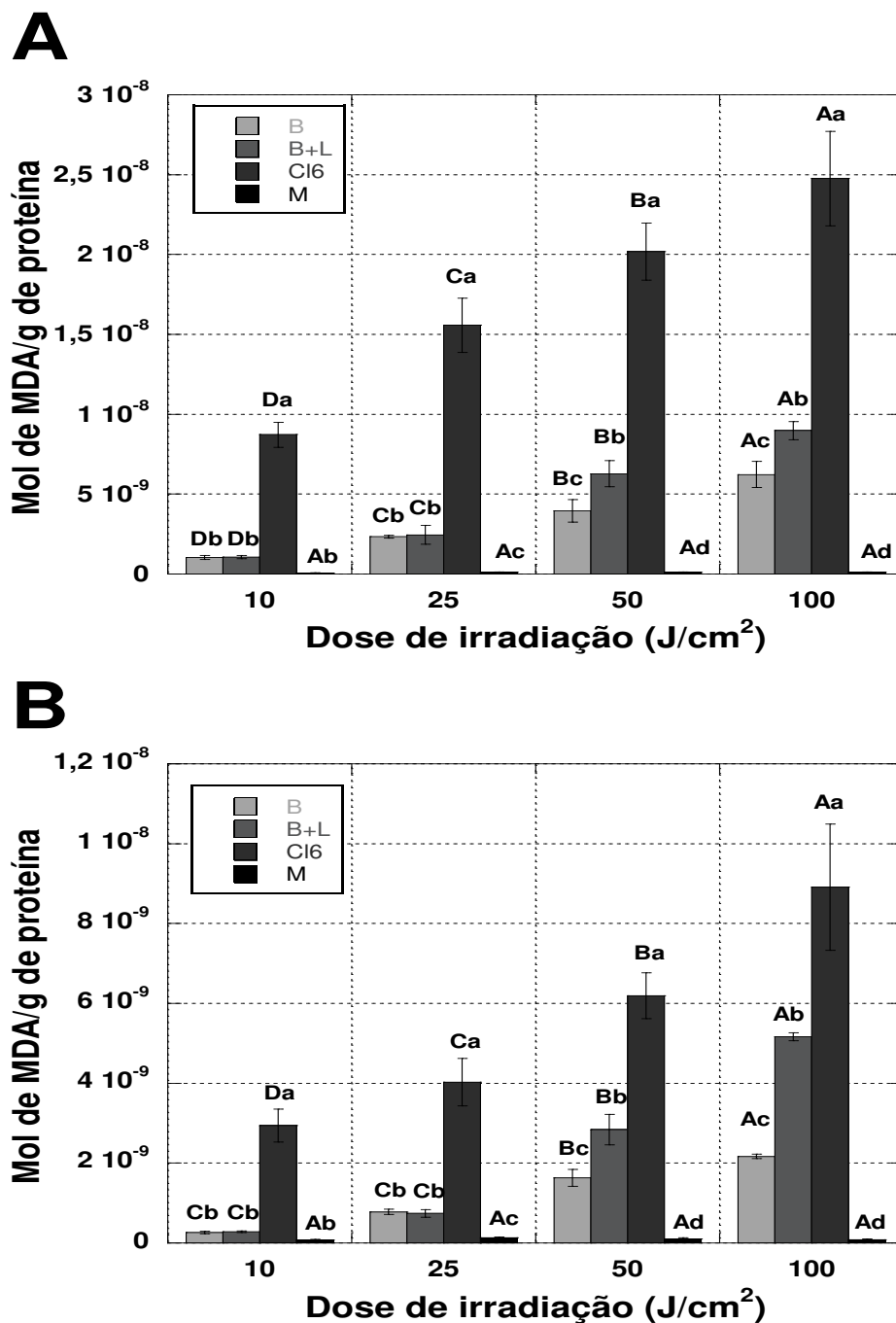


Figura 92. Reação de peroxidação em células cultivadas em Ultroserum 2%. Quantidade de MDA (em mol por grama de proteína) medido no extrato celular (A) e sobrenadante (B) de células incubadas com BBR livre (B) ou complexadas com LDL (B+L), clorina (Cl₆) ou somente com HBSS (M). Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos dentro de uma mesma dose de irradiação e letras maiúsculas, de um mesmo tratamento em cada dose de irradiação (ambas as análises foram realizadas por one-way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão de seis repetições.

4.2. Isomoschatolina

4.2.1. Propriedades espectroscópicas de absorção e fluorescência da Isomoschatolina em diferentes meios de solubilização

Assim como para BBR a solubilidade da GB1 foi avaliada, sendo solúvel nos três solventes utilizados, nas concentrações avaliadas. A Figura 93 apresenta os espectros de absorção normalizado do alcaloide em DMSO, ETOH e PSB. Em cada um destes solventes o perfil de absorção variou consideravelmente. Quanto mais polar o solvente menor o comprimento de onda dos picos de absorção. Em DMSO os picos de absorção já foram descritos no Capítulo 1 e correspondem aos comprimentos de onda 660 e 320 nm. Também foram observados ombros em 287, 380 e 470 nm. Em ETOH, houve um deslocamento para 606, 310 e 203 nm e o pico a 287 nm foi mantido. Já em PBS, observaram-se picos a 593 nm, 307 nm e 203nm. Além disso, cabe ressaltar que em ETOH e PBS observou-se um leve ombro em torno de 470 nm.

A determinação dos espectros de absorção em diferentes concentrações nos permitiu calcular os coeficientes de extinção molar (ϵ) da GB1 resumidos na Tabela 23. Os valores de (ϵ) indicam maior solubilidade deste composto em tampões mais polares.

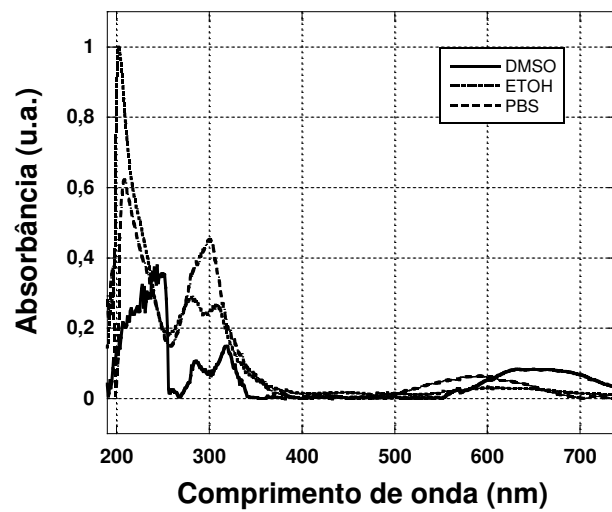


Figura 93. Espectro normalizado de absorção da GB1 (2 µM) solubilizada em DMSO, ETOH e PBS. Absorbância

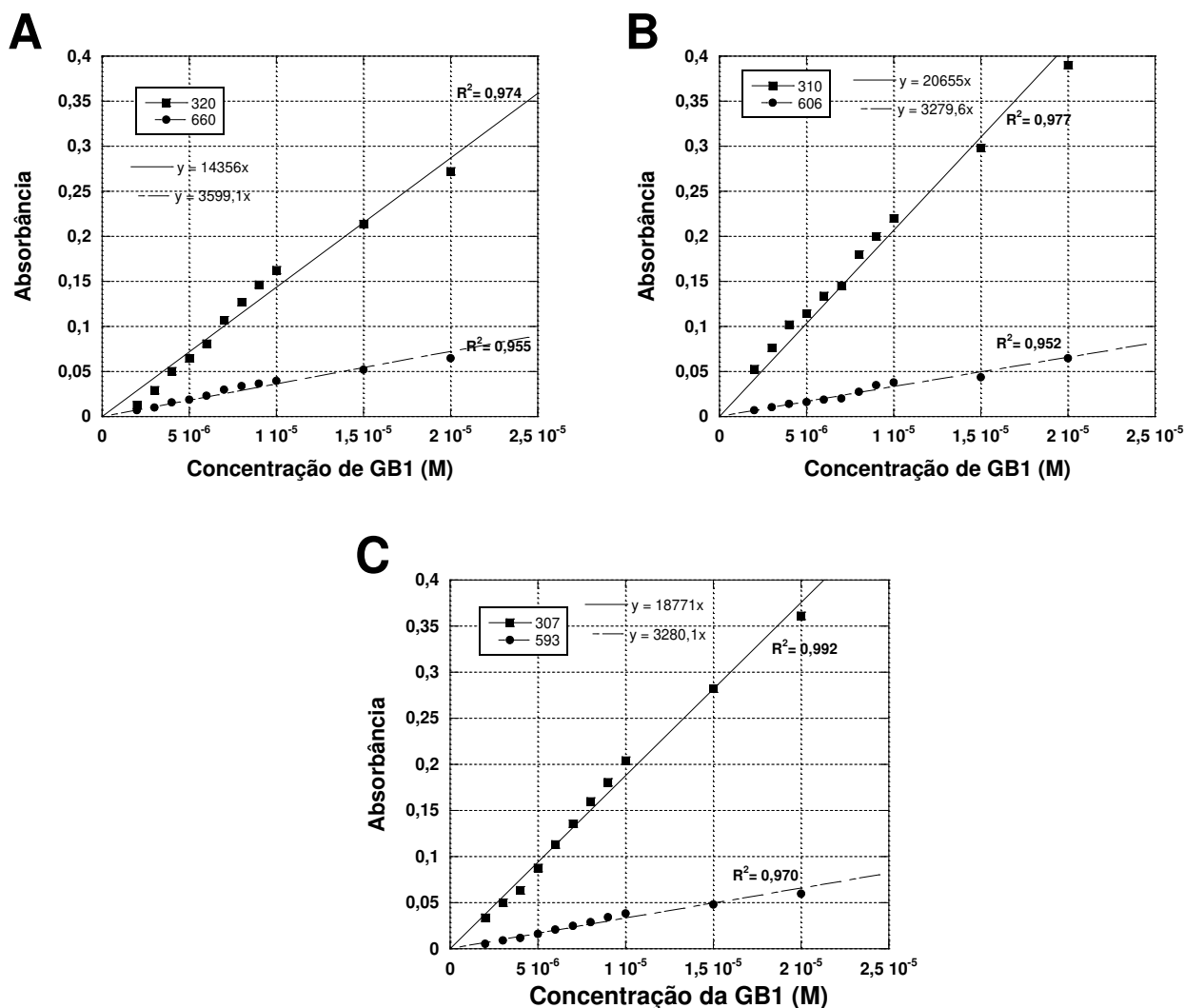


Figura 94. Absorbância em função da concentração da GB1 (2-20 μM) em DMSO, 320 e 660nm (A), ETOH, 310 e 606 nm (B) e PBS, 307 e 593 nm (C).

Tabela 23. Coeficiente de extinção molar (ϵ) da GB1 em diferentes meios de solubilização.

	ISO-DMSO	ISO-ETOH	ISO-PBS
ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	14356 ($\lambda = 320$ nm)	20655 ($\lambda = 310$ nm)	18771 ($\lambda = 307$ nm)
	3599 ($\lambda = 660$ nm)	3279 ($\lambda = 606$ nm)	3280 ($\lambda = 593$ nm)

A fluorescência da GB1 foi avaliada com excitação em 320/470/660, 310/470/606 e 307/470/593, em DMSO, ETOH e PBS, respectivamente. Nos comprimentos de onda em torno de 600 nm não foi detectado sinal de emissão. Na Figura 95 podemos observar que a

intensidade de fluorescência foi semelhante nos três solventes testados quando excitados em λ em torno de 300 nm, com picos de emissão à 400 nm em DMSO e ETOH e 420 nm em PBS.

Para os solventes DMSO e ETOH também foi verificada emissão de fluorescência em $\lambda_{exc}= 470$ nm, apresentando pico máximo em 540 e 515 nm, respectivamente (aqui representamos somente os resultados para etanol uma vez que para DMSO o gráfico já foi exposto no Capítulo 1). Em PBS a emissão foi completamente suprimida com excitação neste tampão. A excitação em 470 nm já foi discutida no capítulo 1 e tem relações com a formação sodiada deste composto. Apesar de aparentemente mostrar-se solúvel em tampão aquoso, a supressão da fluorescência quando em PBS revelou a formação de agregados da molécula e alteração de suas propriedades fotofísicas e, conseqüentemente, fotoquímicas.

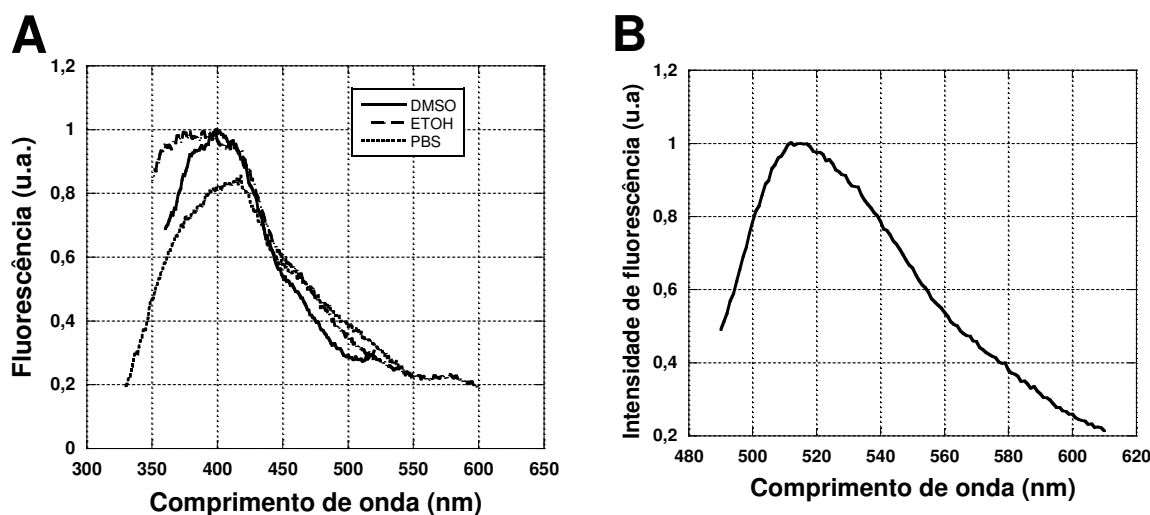


Figura 95. Espectros de fluorescência normalizados da GB1 nos diferentes meios de solubilização. Concentração da GB1: 20 μ M, excitação: 320 nm em DMSO, 310 nm em Etanol e 307 nm em PBS. Emissão de fluorescência à 400 nm para DMSO e ETOH e 420 nm para PBS (A). Espectro de fluorescência normalizado de GB1 em etanol, excitação à 470 nm com emissão em 515 nm (B).

As intensidades de fluorescência (comprimento de onda de excitação de 320, 310 e 307 nm para DMSO, ETOH e PBS respectivamente) em função da concentração da GB1

estão apresentadas na Figura 96. Observa-se que quanto menor o coeficiente de absorvidade molar da GB em determinado solvente, no comprimento de onda avaliado, menor a concentração na qual o máximo de fluorescência foi atingido, sendo igual a $2,5 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-5}$ e $1 \cdot 10^{-4}$, para o DMSO, PBS e ETOH, respectivamente. Assim como discutido anteriormente, altas concentrações podem resultar na agregação das moléculas, perda da luz incidente na solução e, conseqüentemente, na diminuição no número de moléculas excitadas com redução na intensidade do sinal de fluorescência.

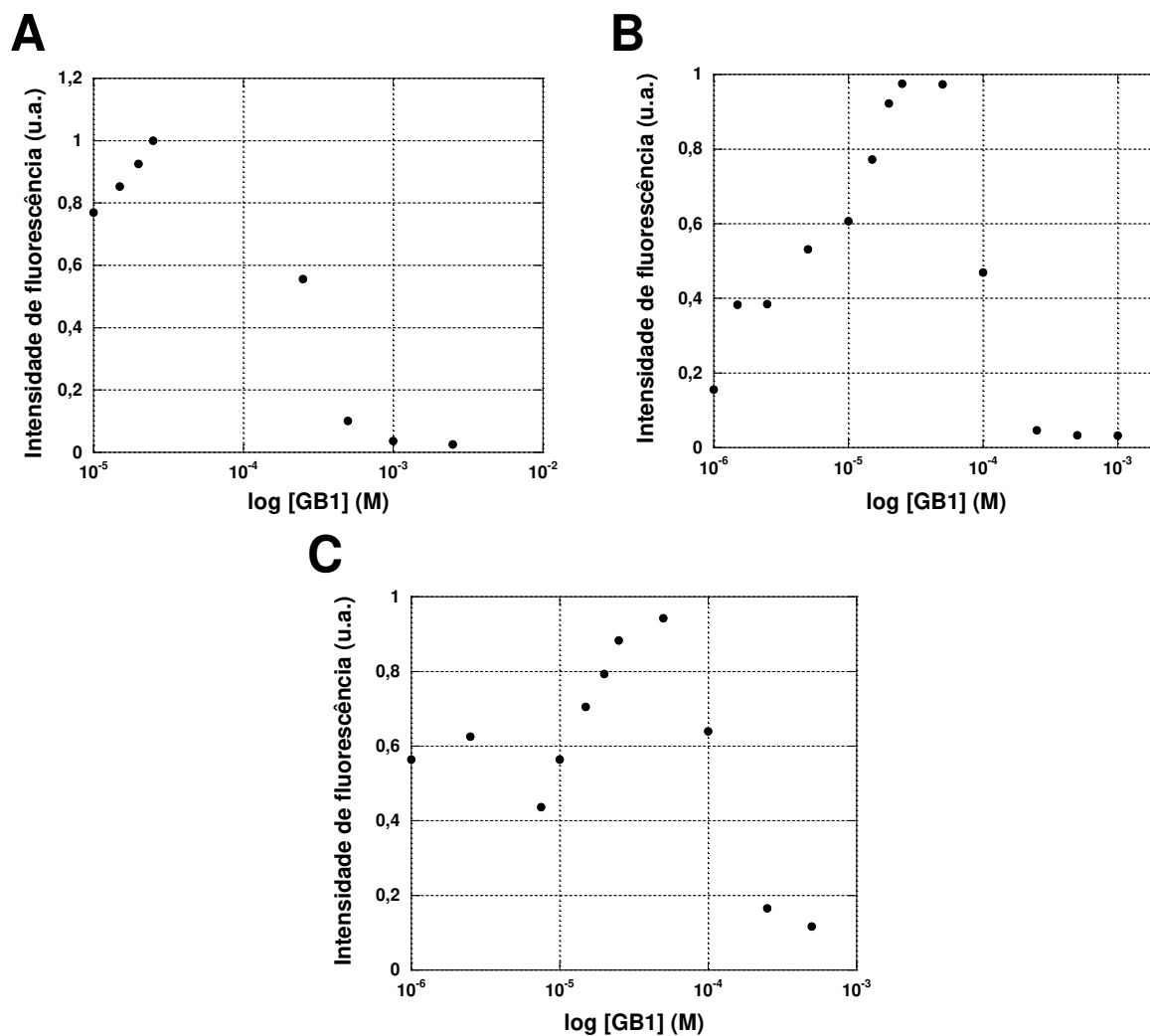


Figura 96. Intensidade de fluorescência de GB1 em função de sua concentração (logarítmo). Excitação: 320nm em DMSO (A), 310 em ETOH (B) e 307nm em PBS (C). Emissão de fluorescência à 400 nm para DMSO e ETOH e 420 nm para PBS.

4.2.2. Estudo de equilíbrio: quantificação da fixação da Isomoschatolina ao LDL

No estudo de interação da GB1 com o LDL avaliou-se somente os parâmetros de interação deste composto com a apoB-100 que compõem a partícula. Apesar da GB1 apresentar fluorescência quando excitada a 307 nm, em tampão fosfato, não foi possível

prosseguir com os ensaios de avaliação das mudanças no seu perfil de fluorescência (esquema global de fixação e determinação de K_{KLD}), pois neste mesmo comprimento de onda a molécula de LDL também é fracamente excitada, mas suficientemente para impedir a distinção dos sinais e consequentemente, a interpretação dos dados.

4.2.2.1. Extinção (*quenching*) de fluorescência do triptofanos (fixação na Apoproteína B-100).

A análise de fixação da GB1 na partícula de LDL foi feita da mesma maneira como descrita para a BBR, no item 4.1.2. As intensidades das emissões de fluorescência de duas soluções de LDL ($2 \cdot 10^{-6}$ e $6 \cdot 10^{-6}$ M) foram medida na presença do alcaloide em diferentes concentrações, sendo que a razão $[GB1]/[LDL]$ variou entre 5 e 1000 em ambas as concentrações de LDL. O comprimento de onda de excitação foi igual a 278 nm.

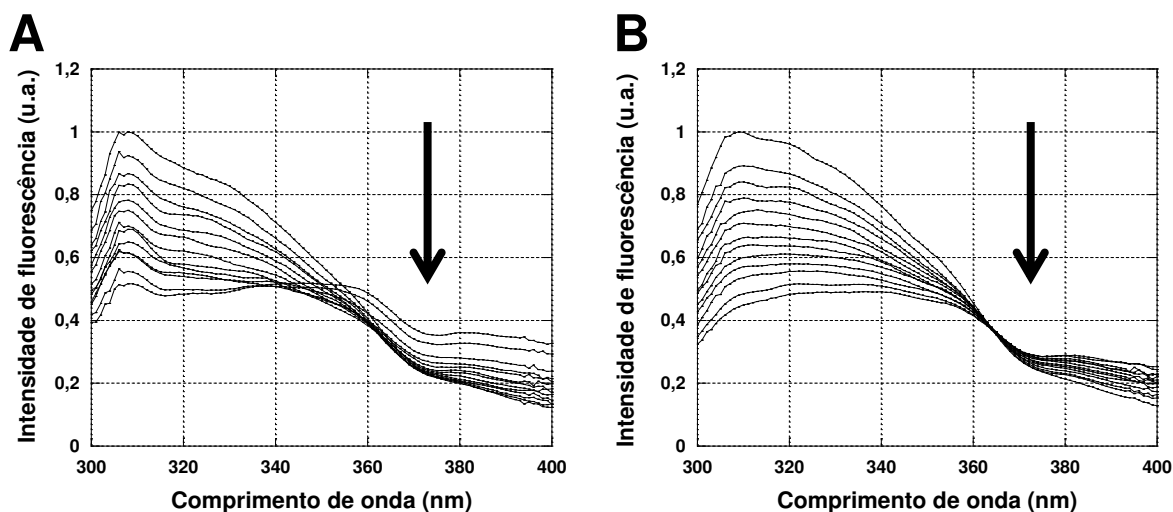


Figura 97. Extinção da fluorescência intrínseca do LDL ($\lambda_{ex} = 2780\text{nm}$) induzida pela fixação de GB1. Espectro de fluorescência do LDL, $[LDL] = 2 \cdot 10^{-8}$ M (A) e $[LDL] = 6 \cdot 10^{-8}$ M em função de quantidades crescentes de isoschatoiline adicionada, isto é, a concentração total de isoschatoiline (P_T). $P_T/LDL = 0, 5, 25, 35, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000$ no sentido da flecha.

Como mostra a Figura 97, a fixação da GB1 no LDL induz a uma diminuição de sua fluorescência. Isto confirma a presença de sítios de fixação sobre a apoB-100 e arredores. Para ambas as concentrações de LDL utilizadas, os pontos experimentais atingem um platô quando a intensidade de fluorescência diminui em cerca de 40%.

A partir do método desenvolvido por Nishida (Halfman & Nishida, 1972), determinaram-se os parâmetros da interação entre GB1-LDL a partir na análise dos dados do gráfico da Figura 98 e com auxílio das equações (1), (2) e (3), descritas no item 4.1.2 do capítulo 1. Calcularam-se os valores de ν e P_F correspondentes aos dados experimentais, que foram então representados pelo método de Scatchard (Figura 99).

Nesta representação observou-se, portanto, que cerca de 135 moléculas de GB1 se fixam a uma molécula de LDL e a constante de associação (K_p) correspondente a este tipo de fixação (Tipo P) foi igual a $5,06.10^7 \text{ M}^{-1}$.

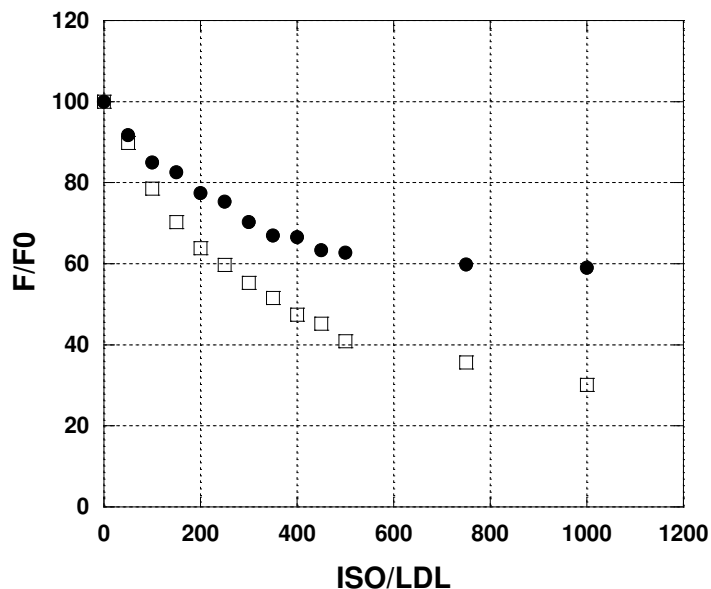


Figura 98. Intensidade relativa da fluorescência (F/F_0 , %) à 330nm em função de P_T/LDL . ●: $[LDL] = 2.10^{-8}M$; □: $[LDL] = 6 \times 10^{-8} M$. A intensidade de fluorescência para $P_T = 0$ esta normalizada a 100% (representação de Halfman & Nishida, 1972).

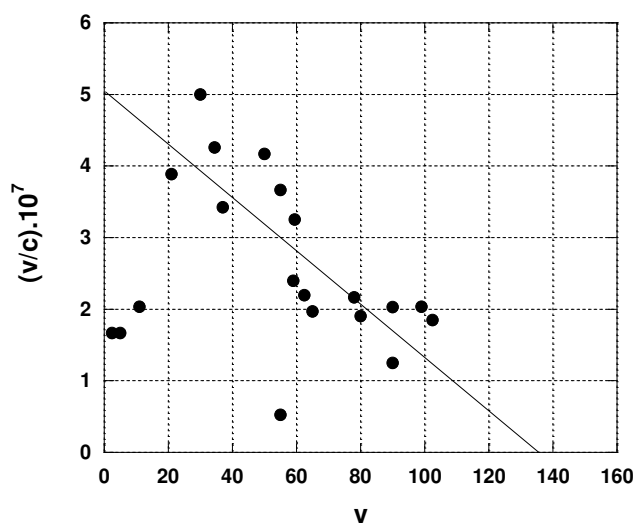


Figura 99. Quantificação da associação da GB1 ao LDL segundo as mudanças na fluorescência deste último à 330nm, excitação a 278nm. Os pontos foram calculados segundo o método definido por Hafman & Nishida (1972) e representados de acordo com o método clássico de Scatchard.

A berberina possui propriedades fotofísicas (Jantová *et al.*, 2006) que nos permitiu estudá-la por fluorescência e que, por sua vez, são a base de sua atividade fotossensibilizante na PDT (capacidade de produção de oxigênio singlete e radicais livres, quando excitada em

comprimento de onda adequado). Para GB1, as propriedades fotofísica e fotoquímicas são pouco conhecidas, mas as propriedades fotossensibilizantes já foram verificadas em ensaios biológicos frente a linhagens de células tumorais e cepas bacterianas e fúngicas, como descrito no Capítulo 1.

Para ambas as moléculas, a transposição destas propriedades para sistemas biológicos reais coloca uma série de perguntas, especialmente tendo em conta que a propensão dessas moléculas formarem dímeros e agregados. No caso da maioria dos fotossensibilizadores, o papel destas estruturas agregadas nos mecanismos de fotossensibilidade não é conhecido. Mais especificamente, a localização intracelular do fotossensibilizador parece determinar a maneira pela qual a célula será comprometida, necrose ou apoptose (Castanho, Demidova, Hamblin, 2005). Assim, a compreensão da dinâmica de repartição do fotossensibilizador, tanto em nível sistêmico, como celular, é de particular importância para PDT devido ao intervalo existente entre administração de medicamentos e de irradiação. A determinação precisa da duração ótima deste intervalo permite, portanto, garantir que as células patogênicas sejam marcadas pelo fotossensibilizador e por isso consiste um fator de eficácia fundamental da terapia.

Na PDT, o LDL desempenha um papel de transportador-alvo para muitos fotossensibilizadores já estudados (Bonneau *et al.*, 2004, Kaskakova *et al.*, 2005 e 2008, Huntosova *et al.*, 2010) e promove o acúmulo destes agentes em tecidos proliferativos. Esta função de transportador foi, portanto avaliada para os alcaloides BBR e GB1 verificando-se que não somente o LDL tem uma forte afinidade para estas moléculas mas, no caso da BBR, ele também pode transportar quantidades relativamente grandes. Ainda para a BBR, esta associação não interfere no reconhecimento da partícula por seus receptores celulares específicos apo "B/ E". Por fim, a associação das moléculas com LDL resultou na entrada de

um número maior de moléculas de BBR nas células em comparação a quantidade incorporado do alcaloide quando este estava livre em solução.

A compreensão e, eventualmente, o controle da dinâmica de interação dessas moléculas com LDL, pode permitir um melhor direcionamento alvo destes agentes, até mesmo a concepção de novos fármacos e novos vetores, tais como moléculas LDL-like (Rensen *et al.*, 2001). Assim uma das perspectivas de trabalho consistiria em estudar a cinética de interação entre estes alcaloides e o LDL pela técnica de *stopped-flow* (detecção da variação de fluorescência resultante da associação entre as moléculas e a partícula de LDL, ao longo do tempo) e assim determinar as constantes de velocidade de dissociação para os dois tipos de fixação discutidos, classe P e classe L. A caracterização destes parâmetros contribuiriam para uma melhor compreensão da distribuição das moléculas de cada substância na partícula de LDL em condições dinâmicas.

Estudos similares ao aqui descrito, assim como os de *stopped-flow*, com variação de pH das soluções de trabalho, também ajudariam a compreender se esta variação interfere na dinâmica de interação entre os alcaloides e LDL e também na sua incorporação pelas células cancerosas. Cabe lembrar que o pH intersticial de células tumorais tende a ser mais ácido que de células saudáveis e isso resulta em mudanças significativas no micro-metabolismo ao redor do tumor e muitas vezes isso favorece a entrada de certos tipos de fotossensibilizadores nas células (Cunderlikova *et al.*, 2000).

Ainda, em estudo com modelo celular (linhagem U87MG), verificou-se o acúmulo do alcaloide BBR nas mitocôndrias e não nos lisossomos como esperado. Na PDT a mitocôndria consiste em um importante alvo a ser atingido, uma vez que uma das possíveis vias de apoptose, começa a partir da ação de uma família de proteases de cisteína chamadas caspases, mais especificamente a caspase 9 (Simon, Haj-Yehia, Levi-Schaffer, 2000). Ela reage com o

citocromo C, localizado da membrana que recobre esta organela e, que é liberado, quando ela sofre algum dano, como por exemplo, desestabilização estrutural por fototoxicidade. Como a meia vida do oxigênio singleto e dos radicais livres é curta, a localização do fotossensibilizador na mitocôndria é ideal, uma vez que estaria atuando e formando tais espécies em um local que afeta diretamente a viabilidade celular. Frente aos nossos resultados, a interação com o LDL estaria proporcionando somente uma entrada mais rápida e de maiores quantidades da BBR no interior celular pela via da endocitose específica e, rapidamente, uma vez no interior celular, o alcaloide se redistribui acumulando-se na rede mitocondrial.

A peroxidação lipídica celular causada pela BBR nos ensaios de irradiação com dose de 50 e 100 J/cm² foi evidente, comprovando a ação fotossensibilizante deste alcaloide. Diferentes ensaios de viabilidade celular devem ser realizados para confirmação da ação fototóxica do alcaloide. Associados a estes estudos, ensaios utilizando técnicas de biologia molecular e bioquímica que nos permitam verificar a participação das caspases na morte celular após tratamento com a BBR livre ou complexada com LDL, ajudariam a desvendar as vias de morte celular ativadas.

No caso da GB1 fazem-se necessários estudos mais detalhados quanto as suas propriedades fotofísicas e fotoquímicas, como já discutidos no Capítulo 1. Além disso, é preciso aprofundar os estudos de interação deste alcaloide com o LDL em sistemas dinâmicos (stopped-flow) e em modelos celulares com ensaios semelhantes aqueles realizados com a BBR. A insolubilidade destes alcaloides em meio aquoso sugere a possibilidade de estudos com outros tipos de nanopartículas, tais como lipossomas e nano partículas poliméricas que melhorem sua hidrossolubilidade e estabilidade química.

5. Conclusões

Os resultados obtidos possibilitaram as seguintes conclusões:

- ambos os alcaloides isoquinolínicos BBR e GB1 complexam-se ao LDL. Esta complexação não ocorre na forma de monômeros entre o alcaloide e a partícula, mas sim na forma de agregados devido à relativa insolubilidade destes alcaloides em meio aquoso.
- A berberina complexa-se tanto com a porção proteica (associação de classe P) como com a porção lipídica (associação de classe L) do LDL, sendo majoritária a associação de classe P.
- A complexação da BBR com o LDL não interfere no reconhecimento da apoB-100 pelos receptores apo B/E da membrana celular (linhagem tumoral U87MG) responsáveis pela incorporação celular do LDL.
- Os resultados obtidos indicam alta possibilidade da berberina complexada ao LDL penetrar nas células U87MG pela via de endocitose específica dependente de LDL.
- A quantidade de berberina complexada ao LDL absorvida pelas células U87MG com expressão aumentada de receptores membranares apo B/E da apoB-100 foi maior se comparada à quantidade de berberina livre (não complexada) absorvida.
- Uma vez dentro das células, a berberina sofre um processo rápido de redistribuição intracelular e os resultados são sugestivos de que este alcaloide acumula-se na mitocôndria.
- Nas células com expressão aumentada de receptores apo B/E, a complexação da berberina com o LDL, aumentou a sua fototoxicidade via peroxidação lipídica.

PERSPECTIVAS E TRABALHOS FUTUROS

Os resultados obtidos neste trabalho levantaram vários questionamentos que encorajam a realização de estudos mais detalhados, dentre os quais podemos citar:

- Avaliação dos efeitos de sazonalidade e de influência de fatores edáficos e de temperatura, luminosidade e umidade, que podem alterar a composição química dos extratos e frações e reprodutibilidade da atividade biológicas observada;
- Obtenção de maior quantidade em massa das substâncias isoladas para realização de estudos espectroscópicos mais detalhados que confirmem seu caráter fotossensibilizantes, tais como determinação dos rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_F), do tempo de vida de fluorescência (τ_F), dos rendimentos quânticos de produção de espécies transientes tripletes (Φ_T) e do rendimento quântico de produção de oxigênio singlete (Φ_Δ);
- Avaliação da atividade biológica das substâncias GB2, GB3, GB4 e GB5 na presença de irradiação *laser* em comprimento de onda correspondente ao seu perfil absorptivo;
- Estudos *in vitro* e *in vivo* (modelo animal) para avaliação da toxicidade e de risco das amostras- teste bioativas na ausência e presença de irradiação *laser*;
- Estudos *in vitro* e *in vivo* que permitam melhor caracterizar efeitos biológicos sistêmicos, a partir da determinação de uma curva dose resposta das amostras-teste bioativas, tanto no que se refere a concentração da droga, como quanto a fluência de luz e repetições de doses de irradiação. Nestes estudos, fatores como fonte de luz seriam alterados e diferentes micro-organismos e tipos celulares, testados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acroyd, R.; Kelty, C.; Brown, N.; Reed, M., 2001. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 74 (5): 656-669.
- Adhikary, R.; Mukherjee, P.; Kee, T.W.; Petrich, J.W. J., 2009. Effective Stabilization of Curcumin by Association to Plasma Proteins: Human Serum Albumin and Fibrinogen. *The Journal of Physical Chemistry B*, 25(10):5773–5777.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), Manual Clinical And Laboratory Standards Institute – CLSI (antigo NCCLS). <www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi.asp>. Acesso em: 19/06/2008.
- Akendengue, B. ; Roblot, F. ; Loiseau, P. M. ; Bories, C. ; Ngou-Milama, E. ; Laurens A. ; Hocquemiller, R., 2002. Klaivanolide, an antiprotozoal lactone from *Uvaria klaineana*. *Phytochemistry*, 59:885-888.
- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the cell*. 5^a ed. Oxford: Oxford University Press, 2007. 1599p.
- Alali, F. Q.; Liu, X.X.; McLaughlin, J. L., 1999. Annonaceous Acetogenins: Recent Progress. *Journal of Natural Products*, 62:504-540.
- Allison, R.R.; Mota, H.C.; Sibata, C.H., 2004. Clinical PD/PDT in North America: an history review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1:263-277.
- Allison, R. R.; Downie, G. H. ; Cuenca, R. ; Hu, X. H. ; Childs, C. J. ; Sibata, C. H., 2004. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 1(1):27-42.
- Allison, R.R.; Cuenca, R.E.; Downie, G.H., Camnitz, P.; Brodish, B.; Sibata, C.H., 2005. Clinical Photodynamic therapy of head and neck cancers- a review of applications and outcomes. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2:205-222.
- Allison, R.R.; Bagnato, V.S.; Cuenca, R.; Downie, G.H.; Sibata, C.H., 2006. The future of photodynamic therapy in oncology. *Future Oncology*, 2:53-71.
- Allison, R. R.; Bagnato, V. S.; Sibata, C. H., 2010. Future of oncologic photodynamic therapy. *Future Oncology*, 6(6): 929-940.
- Allison, R. R. ; Moghissi, K., 2013. Oncologic photodynamic therapy: Clinical strategies that modulate mechanisms of action. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 10(4):331-41.
- Almeida-Lopes, L.; Massini Jr., R., 2002. *Laseres e suas Aplicações: Manual do Usuário*. São Carlos: DMC Equipamentos, 2002. 30p.

Alves, E.; Costa, L.; Carvalho, C.M.B.; Tome, J.P.C.; Faustino, M.A.; Neves, M.G.P.M.S., Tome, A.C.; Cavaleiro, J.A.S.; Cunha, A.; Almeida A., 2009. Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative e Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins. BMC Microbiology, 9: 70-82.

Anand, S.; Honari, G.; Hasan, T., Elson, P.; Maytin, E. V., 2009. Low-dose methotrexate enhances aminolevulinate-based photodynamic therapy in skin carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. Clinical cancer research, 15(10):3333-3343.

Aoyama, K.; Kamio, T.; Nishizawa, M.; Ohchi, T.; Kameoka, S., 2011. Sentinel lymph node biopsy for breast cancer patients using fluorescence navigation with Indocyanina green. World Journal of Surgical Oncology, 9:157-180.

APG III- The Angiosperm Phylogeny Group, 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Botanical Journal of the Linnean Society, 161(2):115–121.

Atti, S. A. E.; Ammar, H. A.; Phoebe Jr, C. H., Schiff Jr, P. L.; Slatkin, D. J., 1982. Alkaloids of *Guatteria melosma* and *Cleistopholis patens*. Journal of Natural Products, 45(4): 476-480.

Auyeung, K.K.; Ko, J.K., 2009. *Coptis chinensis* inhibits hepatocellular carcinoma cell growth through nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene activation. International Journal of Molecular Medicine, 24(4):571–577.

Azevedo- Tozzi, A.M.G.; Moreira, J.L.A., 1997. Revista Brasileira de Botânica, 20:97-117.

Baas, P.; van Mansom, I.; van Tinteren, H.; Stewart, F.A.; van Zandwijk, N., 1995. Effect of N-acetylcysteine on Photofrin-induced skin photosensitivity in patients. Lasers Surg Med, 16:359-67.

Bachowski, G.J.; Korytowski, W., Girotti, A.W. Characterization of lipid hydroperoxides generated by photodynamic treatment of leukemia cells. Lipids 1994;29:449—59.

Banfi, S.; Caruso, E.; Buccafurni, L.; Battini, V.; Zazzaron, S.; Barbieri, P.; Orlandi, V., 2006. Antibacterial activity of tetraaryl-porphyrin photosensitizers: an in vitro study on Gram negative and Gram positive bacteria. Journal of photochemistry and photobiology B: Biology, 85(1):28-38.

Barros, G.M.C.C; Teixeira, S.P., 2008 Estudo farmacobotânico de duas espécies de Anileira (*Indigofera suffruticosa* e *Indigofera truxillensis*, Leguminosae) com propriedades farmacológicas. Revista Brasileira de Farmacognosia, 18(2): 287-294

Ben A. T.; Jori, G., 2000. Sunlight-activated insecticides: historical background and mechanisms of phototoxic activity. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 30(10): 915-925.

- Benko-Iseppon, A.M.; Crovella, S., 2011. Ethnobotanical bioprospection of candidates for potential antimicrobial drugs from Brazilian plants: state of art and perspectives. *Current Protein and Peptide Science*, 11(3):189-94
- Bentham, O.A., Leguminosaeae 1. *In* Flora Brasiliensis (C.F. von Martius, S. Endlicher & I. Urban, eds.) Frid Fleischer Manachii Lipsiae, 1859; V.15.
- Berg, K., Moan, J. Lysosomes as photochemical targets. *International Journal of Cancer*, 1994, 59:814-822.
- Berg, K.; Madslien, K.; Bommer, J.C.; Oftebro, R.; Winkelman, J.W.; Moan, J., 1991. Light induced relocalization of sulfonated meso-tetraphenylporphines in NHIK 3025 cells and effects of dose fractionation. *Photochemistry and Photobiology*, 53:203-210.
- Bertolini, G.; Rossi, F.; Valduga, G.; Jori, G.; Lier, J.V., 1990. Photosensitizing activity of water- and lipid-soluble phthalocyanines on *Escherichia coli*, *FEMS Microbiol. Lett.* 71:149–156.
- Bhatti, M.; MacRobert, A.; Meghji, S.; Henderson, B.; Wilson, M., 1998. A study of uptake of toluidine blue O by *Porphyromonas gingivalis* and the mechanism of lethal photosensitization. *Photochemistry and Photobiology*, 68:370-376.
- Bhowmik, D.; Das, S.; Hossain, M.; Haq, L.; Kumar, G. S., 2012. Biophysical Characterization of the Strong Stabilization of the RNA Triplex poly (U)• poly (A)* poly (U) by 9-O-(ω -amino) Alkyl Ether Berberine Analogs. *PloS one*, 7(5): e37939.
- Bilski P, Motten AG, Bilaska M, Chignell CF., 1993 The photooxidation of diethylhydroxylamine by rose bengal in micellar and nonmicellar aqueous solutions. *Photochemistry and Photobiology*, 58:11-8.
- Bjornson, L.K., Kayden, H.J., Miller, E., Moshell, A.N., 1976. The transport of alpha-tocopherol and beta-carotene in human blood. *Journal of Lipid Research*, 17(4):343-52.
- Bliss, J. M.; Bigelow, C. E. ; Foster, T. H.; Haidaris, C. G., 2004 Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of photofrin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 (6): 2000-2006.
- Bonneau, S.; Vever-Bizet, C.; Morlière, P.; Mazière, J. C.; Brault, D., 2002. Equilibrium and kinetic studies of the interactions of a porphyrin with low-density lipoproteins. *Biophysical Journal*, 83(6): 3470-3481.
- Bonneau, S.; Morlière, P.; Brault, D., 2004. Dynamics of interactions of photosensitizers with lipoproteins and membrane-models: correlation with cellular incorporation and subcellular distribution. *Biochemical Pharmacology*, 68:1443-01452.
- Bonnett, R., 2000. Chemical aspects of photodynamic therapy (Vol. 1). CRC Press. Gordon and Breach Science publishers, Amsterdam.

- Boyom, F.F.; Ngouana, V.; Zollo, P.H.A.; Menut, C.; Bessiere, J.M.; Gut, J.; Rosenthal, P.J., 2003. Composition and anti-plasmodial activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants. *Phytochemistry*, 64:1269-1275.
- Brezová, V.; Dvoranová, D.; Kost'álová, D., 2004. Oxygen activation by photoexcited protoberberinium alkaloids from *Mahonia aquifolium*. *Phytotherapy Research*, 18(8):640-646.
- Brown, M.S., J.L. Goldstein, and M.D. Siperstein, 1973. Regulation of cholesterol synthesis in normal and malignant tissue. *Federation Proceedings*, 32(12):2168-73.
- Brugnera Jr, A.; Pinheiro, A.L.B., 1998. *Lasers na Odontologia Moderna*. São Paulo: Pancast, 1998. 356p.
- Brugnera Jr, A., 2003. *Atlas de Laserterapia aplicada a Clínica Odontológica*. São Paulo: Santos, 2003, 119p.
- Burgeiro, A.; Gajate, C.; Dakir, E. H.; Villa-Pulgarín, J. A.; Oliveira, P. J.; Mollinedo, F., 2011. Involvement of mitochondrial and B-RAF/ERK signaling pathways in berberine-induced apoptosis in human melanoma cells. *Anti-Cancer Drugs*, 22(6):507-518.
- Butler, M.S., 2008. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. *Natural Product Report*, 25: 475–516
- Caetano, L. C.; Dadoun, H., 1987. Pallidine and aporphinoid alkaloids from *Rollinia mucosa*. *Journal of Natural Products*, 50(2):330-330.
- Calvo, T. R.; Cardoso, C. R. P.; da Silva Moura, A. C.; dos Santos, L. C.; Colus, I. M. S.; Vilegas, W.; Varanda, E. A., 2009. Mutagenic activity of *Indigofera truxillensis* and *I. suffruticosa* aerial parts. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011: 55-63.
- Carvalho, C.M.B.; Gomes, A.T.P.C.; Fernandes, S.C.D.; Prata, A.C.B.; Almeida, M.A.; Cunha, M.A.; Tomé, J.P.C.; Faustino, M.A.F.; Neves, M.G.P.M.S.; Tomé, A.C.; Cavaleiro, J.A.S.; Lin, Z.; Raindo, J.P.R.; Rocha, J., 2007. Photoinactivation of bacteria in wastewater by porphyrins: Bacterial b-galactosidase activity and leucine-uptake as methods to monitor the process. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 88: 112–118.
- Castanho, A.P.; Demidova, T.N.; Hamblin, M.R., 2004. Mechanisms in photodynamic therapy: part one- photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1 (4): 279-293.
- Castanho, A.P.; Demidova, T.N.; Hamblin, M.R., 2005. Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2:1-23.

- Chatrou, L. W.; Rainer, H.; Maas, P. J. M., 2004. *In: Annonaceae (Soursop Family):* Smith N. et al. (eds.). *Flowering Plants of the Geotropism*, p. 18-20. New York Botanical Garden, New York.
- Chen, J.; Tan, L.; Li, W.; Li, G., 2007. Study on the preparation process of berberine hydrochloride liposomes by orthogonal design. *Journal of Practical Medical Techniques*, 14(14):1868-1870.
- Cheng, L.L; Wang, M.; Zhao, P.; Zhu, H.; Zhu, R.; Sun, X.; Yao, S.; Wang, S., 2009a. The examination of berberine excited state by laser flash photolysis. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 73(2): 268-272.
- Cheng, L. L.; Wang, M. ; Zhu, H. ; Li, K. ; Zhu, R. R. ; Sun, X. Y. ; Yao, Si-De; Wu, Q-S.; Wang, S. L., 2009b. Characterization of the transient species generated by the photoionization of Berberine: A laser flash photolysis study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 73(5): 955-959.
- Chin, Y.-W.; Balunas, M.J.; Chai, H.B.; Kinghorn, A.D., 2006. Drug discovery from natural sources. *AAPS J.* 8: E239–E253
- Christina, A. J. M.; Josea, M. A.; Robert, S. J. H.; Kothaia, V.; Chidambaranathana, N.; Muthumanib, P., 2003. Effect of *Indigofera aspalathoides* against Dalton's ascitic lymphoma. *Fitoterapia*, 74:280–283.
- Choi, M.S.; Yuk, D.Y.; OH, J.H.; Jung, H.Y.; Han, S.B., Moon, D.C., Hong, J.T., 2008. Berberine inhibits human neuroblastoma cell growth through induction of p53-dependent apoptosis. *Anticancer Research*, 28(6A):3777–3784.
- Christodoulides, N.; Nikolidakis, D.; Chondros, P.; Becker, J.; Schwarz, F.; Rössler, R.; Sculean, A., 2008. Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized, controlled clinical trial. *Journal of periodontology*, 79(9):1638-1644.
- Clark, M.J.; Homer, N.; O'Connor, B.D.; Chen, Z.; Eskin, A.; Lee, H.; Merriman, B.; Nelson, S.N., 2010. U87MG Decoded: The Genomic Sequence of a Cytogenetically Aberrant Human Cancer Cell Line. *PLoS Genetics*, 6(1): e1000832
- Clennan, E. L.; Sram, J. P., 2000. Photochemical reactions in the interior of a zeolite. Part 5: the origin of the zeolite induced regioselectivity in the singlet oxygen ene reaction. *Tetrahedron*, 56(36): 6945-6950.
- Cola- Miranda, M.; Barbastefano, V.; Hiruma-Lima, C.A.; Calvo, T.R.; Vilegas, W; Brito, A.R.M.S., 2006. Atividade antiulcerogênica de *Indigofera trixillensis* Kunth. *Biota Neotrop.* Advance Online Publication; June 2006: doi: ISSN 1676-0603.
- Collin, B; Clacy, C.J.; Nguyen, M.H., 1999. Antifungal resistance in non-albicans *Candida*. *Drug resistance updates*, 2(1):9-14.

- Comini, L.R.; Nunez Montoya, S.C.; Samiento, M.; Cabrera, J.L.; Arguello, G.A., 2007. Characterizing some photophysical, photochemical and photobiological properties of photosensitizing anthraquinones. *Journal of Photochemistry and Photobiology. A: Chemistry*, 188: 185-191.
- Costa, E.V.; Pinheiro, M.L.B.; Xavier, C.M.; Silva, J.R.A.; Amaral, A.C. F.; Souza, A.D.L., Barison, A.; Campos, F. R.; Ferreira, A.G.; Machado, G.M.C.; Leon, L.L.P.J., 2006. A Pyrimidine- β -carboline and other alkaloids from *Annona foetida* with antileishmanial activity. *Journal of Natural Products*, 69, 292-294.
- Costa, E.V.; Teixeira, S.D.; Marques, F.A.; Duarte, M. C. T.; Delarmelina, C.; Pinheiro, M. L. B.; Trigo, J. R.; Maia, B. H. L. N. S., 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of the Amazon *Guatteriopsis* species. *Phytochemistry* 69, 1895-1899.
- Costa, E.V., Pinheiro, M.L.B., Marques, F.A., Braga, R.M., Sales-Maia, B.H.L.N., 2009a. First report of alkaloids in the genus *Guatteriopsis* (Annonaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 37:43–45.
- Costa, E.V., Marques, F.A., Pinheiro, M.L.B., Vaz, N.P., Duarte, C.D., Braga, R.M., Sales-Maia, B.H.L.N., 2009b. 7,7-Dimethylporphine Alkaloids from the Stem of *Guatteriopsis friesiana*. *Journal of Natural Products*, 72:1516–1519.
- Costa, E. V. Estudo fitoquímico e atividades biológicas de *Guatteriopsis blepharophylla*, *Guatteriopsis friesiana* e *Guatteriopsis hispida* (ANNONACEAE). 2009. 380f. Tese (Doutorado em Química)- Universidade Estadual do Paraná. Instituto de Química, Curitiba, PR, 2009.
- Costa, E.; Pinheiro, M.L.; Barison, A.; Campos, F.; Salvador, M.J.; Maia, B.H.; Cabral, E.; Eberlin, M.N., 2010. Alkaloids from the Bark of *Guatteria hispida* and their Evaluation as Antioxidant and Antimicrobial Agents. *Journal of Natural Products*, 73: 1180-1183.
- Costa, E. V.; Marques, F. D. A.; Pinheiro, M. L. B.; Braga, R. M.; Delarmelina, C.; Duarte, M. C. T., Ruiz, A.L.T.G.; Carvalho, J.E.; Maia, B.H.L.N.S., 2011. Chemical constituents isolated from the bark of *Guatteria blepharophylla* (Annonaceae) and their antiproliferative and antimicrobial activities. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22(6):1111-1117.
- Coutinho, H.D.M.; Costa, J.G.M.; Lima, E.O.; Siqueira Junior, J.P., 2009. *In vitro* phototoxic activity of *Eugenia jambolana* L. and *Hyptis martiusii* Benth. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 96:63–65.
- Cunderlikova, B.;Kongshaug, M.; Gangeskar, L.; Moan, J. 2000. Increased binding of chlorin e(6) to lipoproteins at low pH values. *Int. J. Biochem.Cell. Biol.*, 32(7):759-68.
- Dai, T.; Huang, Y. Y.; Hamblin, M. R., 2009. Photodynamic therapy for localized infections—state of the art. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 6(3):170-188.

Dairou J.; Vever-Bizet, C.; Brault, D., 2002. Self-association of disulfonated deuteroporphyrin and its esters in aqueous solution and photosensitized production of singlet oxygen by the dimers. *Photochemistry and Photobiology*, 75:229–236.

Darlenski, R.; Fluhr, J. W., 2013. Photodynamic therapy in dermatology: past, present, and future. *Journal of biomedical optics*, 18(6), 061208-061208.

Demidova, T. N.; Hamblin, M. R., 2004. Photodynamic therapy targeted to pathogens. *International journal of immunopathology and pharmacology*, 17(3): 245.

Demidova, T. N.; Hamblin, M. R., 2005. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(6): 2329-2335.

De Paula Eduardo, C.; de Freitas, P. M.; Esteves-Oliveira, M.; Aranha, A. C. C.; Ramalho, K. M.; Simões, A.; Bello-Silva, M.S.; Tunér, J., 2010. Laser phototherapy in the treatment of periodontal disease. A review. *Lasers in Medical Science*, 25(6):781-792.

Detty, M.R.; Gibson, S.J.; Wagner, J., 2004. Current Clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Journal of Medical Chemistry*, 47(16):3897-3915.

Diagnani, M.C.; Solomkin, J.S.; Anaissie, E., 2003. Candida. In : Anaissie, E.; McGinnis, M.R.; Pfaller, M.A. (eds.). *Medical Microbiology*. 1. ed. Filadélfia: Churchill Livingstone, 2003. P. 195-239.

Dickerson, M.; Bae, Y., 2013. Block copolymer nanoassemblies for photodynamic therapy and diagnosis. *Therapeutic delivery*, 4(11):1431-1441.

Dickson, E.F.G.; Goyan, R.L.; Pottier, R.H., 2003. New directions in Photodynamic Therapy. *Cellular and Molecular Biology*, 48:939-954.

Di Stasi, L.C. *Plantas Medicinais: Arte e Ciência. Um Guia de Estudo Interdisciplinar*. São Paulo: Editora UNESP, 1996. 230p.

Donnelly, R. F.; McCarron, P. A.; Tunney, M. M.; David Woolfson, A., 2007. Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 86(1):59-69.

Dougherty, T.J.; Gomer, C.J.; Hendersen, B.W.; Jori, G.; Kessel, D.; Korbelick, M., 1998. Photodynamic Therapy- *Journal of the National Cancer Institute*, 90:889-905.

Dougherty, T. J.; Grindey, G. B.; Fiel, R.; Weishaupt, K. R.; Boyle, D. G., 1975. Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. *Journal of the National Cancer Institute*, 55(1):115-121.

- Dummin, H.; Cernay, T.; Zimmermann, H.W., 1997. Selective photosensitization of mitochondria in HeLa cells by cationic Zn (II) phthalocyanines with lipophilic side-chains. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 37:219-329.
- Eduardo, C.P.; Freitas, P.M.; Esteves-Oliveira, M.; Aranha, M.C.C.; Ramalho, C.M.; Simões, A.; Stella Bello-Silva, M.S.; Tunér, J., 2010. Laser phototherapy in the treatment of periodontal disease. A review. *Lasers Medical Science*, 25:781-792.
- Eisinger, S.M., 1987. O gênero *Indigofera* L. (Leguminosae- Papilionoideae- Indigofereae) no Rio Grande do Sul- Brasil. *Acta. Bot. Bras.* 1:123-140.
- El Khoury, D. & Anderson, G. H., 2013. Recent advances in dietary proteins and lipid metabolism. *Current opinion in lipidology*, 24(3), 207-213.
- Erkens, R. H. J.; Chatrou, L. W.; Koek-Noorman, J.; Maas, J. W.; Maas, P. J. M. 2007. Classification of a large and widespread genus of Neotropical trees, *Guatteria* (Annonaceae) and its three satellite genera *Guatterella*, *Guatteropsis* and *Heteropetalum*. *Táxon*, 56:757-774.
- Erkens, R. H. J.; Maas, P. J. M. 2008. The *Guatteria* group disentangled: sinking *Guatteropsis*, *Guatterella*, and *Heteropetalum* into *Guatteria*. *Rodriguésia*, 59:401-406.
- Esser, P.; Pohlmann, B.; Scharf, H.D., 1994. The photochemical-synthesis of fine chemicals with sunlight. *Angewandte Chemie International Edition*, 33:2009-2023.
- Espinel-Ingroff, A.; Dawson, K.; Pfaller, M.; Anaissie, E.; Breslin, B.; Dixon, D.; Fothergill, A.; Paetznick, V.; Peter, J.; Rinaldi, M.; Walsh, T., 1995. Comparative and collaborative evaluation of standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39:314-319.
- Faria-Silva, E.; Cola, M.; Calvo, T.R.; Barbastefano, V.; Ferreira, A.L.; Michelatto, D.P.; Almeida, A.C.A.; Hiruma-Lima, C.A.; Vilegas, W.; Brito, A.R.M.S., 2007. Antioxidative Activity of Indigo and its Preventive Effects against Ethanol-induced DNA damage in rat gastric mucosa. *Planta Medica*, 73:1241-1246.
- Fielding, C.J., 1992. Lipoprotein receptors, plasma cholesterol metabolism, and the regulation of cellular free cholesterol concentration. *FASEB Journal*, 6(13):3162-8.
- Firn, R. D.; Jones, C.G., 2009. A Darwinian view of metabolism: molecular properties determine fitness. *Journal of Experimental Botany*, 70(3): 7191-726
- Fleischer, T. C.; Waigh, R. D.; Waterman, P. G., 1998. A novel retroroid hydrochalcone from the stem bark of *Uvaria mocoili*. *Phytochemistry*, 47(7):1387-1391.
- Finsen, N.F. Phototherapy. London: Arnold; 1901.

Fuchs, J.; Thiele, J., 1998. The role of oxygen in cutaneous photodynamic therapy Free Radical Biology & Medicine, 24(5):835-847.

Gad, F.; Zahra, T.; Francis, K.P.; Hasan, T.; Hamblin, M.R., 2004. Targeted photodynamic therapy of established soft-tissue interactions in mice. Photochemical & Photobiological Sciences, 3:451-458.

Gal, D. ; Mac Donald, P.C.; Porter, J.C.; Simpson, E.R., 1981. Cholesterol metabolism in cancer cells in monolayer culture. III. Low- density lipoprotein metabolism. International Journal of Cancer, 28(3):315-319.

Gal., D.; Ohashi, M; MacDonald, P.C.; Buchsbaum, H.J.; Simpson, E.R. Low-density lipoprotein as a potential vehicle for chemotherapeutic agents and radionucleotides in the management of gynecologic neoplasms. Am. J. Obstet. Gynecol., 139:877-885, 1981.

Ganesan, A., 2008. The impact of natural products upon modern drug discovery. Current Opinion in Chemical Biology, 12:306–317.

Gandra, N.; Frank, A.T.; Le Gendre, O.; Sawwan, N.; Aebisher, D.; Liebman, J. F. ; Houk, K.N. ; Greer, A.; Gao, R., 2006. Possible singlet oxygen generation from the photolysis of indigo dyes in methanol, DMSO, water, and ionic liquid, 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate. Tetrahedron, 62(46): 10771-10776.

Garcez, A.A.; Ribeiro, M.S.; Nunez, S.C.; Souza, F.R., 2003. Terapia fotodinâmica em odontologia laser de baixa potencia para redução microbiana. Revista da Associação Paulista de Cirurgiões e Dentistas, 57(3):223-226.

Gasparetto, A. *Alternanthera maritima*: preparo de extratos e formulações tópicas e avaliação do seu efeito como fotossensibilizador em terapia fotodinâmica antimicrobiana. 2008. 122p. Mestrado (Mestrado em Engenharia Biomédica), Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos (SP).

Gasparetto, A.; Lapinski, T.; Zamuner, S.; Khour, S.; Alves, L.P.; Munin,; Salvador, M.J., 2010. Extracts from *Alternanthera maritima* as natural photosensitizers in photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 99:15–20.

Genovese, W.J., 2000. Laser de baixa intensidade: aplicações terapêuticas em odontologia; Low level laser: therapic applications in dentistry. Lovise.

Gerdes, R.; Bartels, O.; Schneider, G.; Woehrl, D.; Schulz-Ekloff, G., 2001. Photooxidations of phenol, cyclopentadiene and citronellol with photosensitizers ionically bound at a polymeric ion exchanger. Polymers for Advanced Technologies, 12(3-4):152-160.

Geze, M.; Morliere, P.; Maziere, J.C.; Smith, K.M.; Santus, R., 1993. Lysosomes, a key target of hydrophobic photosensitizers proposed for photochemotherapeutic applications. Journal of Photochemistry and Photobiology B, 20:23-35.

- Girotti, A.W., 1985. Mechanisms of lipid peroxidation. *Journal of Free Radicals. Biol Med*; 1:87—95.
- Giuliette, A.M.; Harley, R.M.; Queiroz, L.P.; Wanderley, M.G.L.; Berg, C.V.D., 2005. Biodiversity and conservation of plants in Brazil. *Conservation Biology*, 19(3):632-639.
- Gong, G. Q.; Zong, Z. X.; Song, Y. M., 1999. Spectrofluorometric determination of DNA and RNA with berberine. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 55(9), 1903-1907.
- González-Trujano, M. E.; Navarrete, A.; Reyes, B.; Cedillo-Portugal, E.; Hong, E., 2001. Anticonvulsant properties and bio-guided isolation of palmitone from leaves of *Annona diversifolia*. *Planta Medica*, 67, 136-141.
- Goulart, M.O.F.; Santana, A.E.G. ; De Oliveira, A.B.; De Oliveira, G.G.; Maia, G.S., 1986. Azafluorenones and azaanthraquinone from *Guatteria dielsiana*. *Phytochemistry*, v. 25, n. 7, p. 1691-1695, 1986.
- Graham, P. H.; Vance, C. P., 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, 131: 872-877
- Grove, D.C.; Randall, W.A. Assay methods of antibiotics: a laboratory manual (Antibiotics monographs, 2). New York: Medical Encyclopedia Inc., 1955.
- Grummer, R. R., & Carroll, D. J. (1988). A review of lipoprotein cholesterol metabolism: importance to ovarian function. *Journal of Animal Science*, 66(12): 3160.
- Grune, T.; Klotz, L.O.; Gieche, J.; Rudeck, M.; Sies, H., 2001. Protein oxidation and proteolysis by the nonradical oxidants singlet oxygen or peroxynitrite. *Free Radic Biol Med*, 30:1243-53.
- Grycová, L.; Dostál, J.; Marek, R., 2005. Quaternary protoberberine alkaloids. *Phytochemistry*, 68:150-175.
- Gu, Y.; Zhang, Y.; Shi, X., 2010. Effect of traditional Chinese medicine berberine on type 2 diabetes based on comprehensive metabonomics. *Talanta*, 81(3): 766–72
- Guinaudeau, H.; Leboeuf, M.; Cavé, A., 1975. Aporphine alkaloids. *Lloydia* 38, 275-338.
- Guinaudeau, H.; Leboeuf, M.; Cavé, A., 1979. Aporphine alkaloids II. *Journal of Natural Products* 42, 325-360.
- Guinaudeau, H.; Leboeuf, M.; Cavé, A., 1983. Aporphine alkaloids III. *Journal of Natural Products* 46, 761-835.

Guinaudeau, H.; Leboeuf, M.; Cavé, A., 1988. Aporphine alkaloids IV. *Journal of Natural Products* 51, 389-474.

Guinaudeau, H.; Leboeuf, M.; Cavé, A., 1994. Aporphine alkaloids V. *Journal of Natural Products* 57, 1033-1135.

Gu, Y.; Zhang, Y.; Shi, X., 2010. Effect of traditional Chinese medicine berberine on type 2 diabetes based on comprehensive metabonomics. *Talanta*, 81(3): 766–72

Halfman, C.J.; T. Nishida., 1972. Method for measuring the binding of small molecules to proteins from binding-induced alterations of physical-chemical properties. *Biochemistry*, 11(18):3493-8.

Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*. Clarendon Press ed. 1989, Oxford. 218-233.

Halliwell, B., 2000. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? *Cardiovascular Research*., 47:410-418. ATUALIZAR

Hamblin, M.R.; O'Donnell, D.A.; Murthy, N.; Rajagopalan, K.; Michaud, N.; Sherwood, M.E.; Hasan, T., 2002. Polycationic photosensitizer conjugates: effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria. *J. Antimicrob Chemother.*, 49:941

Hamblin, M.R.; Hasan, T., 2004. Photodynamic therapy: A new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochemical & Photobiological Sciences*, 3:436-450.

Harbone, J. B. 1988. *Introduction to ecological biochemistry*, 3^a ed., London, Academic Press.

Hastings, R.B., 1900. Medicinal legumes of Mexico: Fabaceae, Papilonoideae, part one,” *Economic Botany*, 44:336–348.

Haupt, S.; Malik, Z.; Ehrenberg B., 2014. Comparative kinetics of damage to the plasma and mitochondrial membranes by intra-cellularly synthesized and externally-provided photosensitizers using multi-color FACS. *Photochemistry and Photobiology Science*, 12;13(1):38-47.

Hausmann, W., 1911. The effect of hematoporphyrins in mice. *Biochemie Zeitung*, 30:276-316.

Hevonoja, T.; Pentikäinen, .O; Hyvönen, M.T; Kovanen, P.T; Ala-Korpela, M., 2000. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: Basis for understanding molecular changes in modified LDL, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1488: 189-210.

- Ho, Y.K.; Smith, R.G.; Brown, M.S.; Goldstein, J.L., 1978. Low-density lipoprotein (LDL) receptor activity in human acute myelogenous leukemia cells. *Blood*, 52:1099-1114.
- Ho, Y.T.; Lu, C.C.; Yang, J.S.; Chiang, J-H.; Li, T-C.; IP, S-W.; Hsia, T-C.; Liao, C-L; Lin, J-G.; Wood, W.G.; Chung, J-G., 2009. Berberine induced apoptosis via promoting the expression of caspase-8, -9 and -3, apoptosis-inducing factor and endonuclease G in SCC-4 human tongue squamous carcinoma cancer cells. *Anticancer Research*, 29(10): 4063–4070.
- Hongcharu, W. ; Taylor, C.R.; Chang, Y.; Aghassi, D.; Suthamjariya, K.; Anderson, R.R., 2000. Topical ALA-photodynamic therapy for the treatment of acne vulgaris. *Journal of Investigative Dermatology*, 115:183.
- Hopper, C., 1996. The role of photodynamic therapy in the management of oral cancer and precancer. *European Journal of Cancer Part B: Oral Oncology*, 32:71-72.
- Hopper, C., 2000. Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer. *The Lancet Oncology*, 1:212-219.
- Hu, Y. J.; Ou-Yang, Y.; Dai, C. M.; Liu, Y. ; Xiao, X. H., 2010. Binding of berberine to bovine serum albumin: spectroscopic approach. *Molecular Biology Reports*, 37(8):3827-3832.
- Huang, Z., 2005. A review of progress in clinical photodynamic therapy. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 4 (3): 283-293
- Huang Y.Y.; Vecchio, D.; Avci, P.; Yin, R.; Garcia-Diaz, M.; Hamblin, M.R., 2013. Melanoma resistance to photodynamic therapy: new insights. *Biological Chemistry*, 394(2):11-20.
- Huntosova, V.; Alvarez, L.; Bryndzova, L.; Nadova, Z.; Jancura, D.; Buriankova, L.; Bonneau, B.; Brault, D.; Miskovsky, P.; Sureau, F., 2010, Interaction dynamics of hypericin with low-density lipoproteins and U87-MG cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 389:32–40.
- Hsu, W.H.; Hsieh, Y.S.; Kuo, H.C.; Teng, C.Y.; Huang, H.I.; Wang, C.J.; Yang, S.F.; Liou, Y.S.; Kuo, W.H., 2007. Berberine induces apoptosis in SW620 human colonic carcinoma cells through generation of reactive oxygen species and activation of JNK/p38 MAPK and FasL. *Archives of Toxicology*, 81(10):719–728.
- Inbaraj, J. J.; Kukielczak, B. M.; Bilski, P.; Sandvik, S. L.; Chignell, C. F., 2001. Photochemistry and photocytotoxicity of alkaloids from Goldenseal (*Hydrastis canadensis* L.) 1. Berberine. *Chemical research in toxicology*, 14(11): 1529-1534.
- Ishikawa, S., Suzuki, K., Fukuda, E., Arihara, K., Yamamoto, Y., Y. Mukai, Y., ITOH, M., 2010. Photodynamic antimicrobial activity of avian eggshell pigments. *FEBS Letters*, 584:770–774.

Itoh, Y.; Ninomiya, Y.; Tajima, S.; Ishibashi, A., 2001. Photodynamic therapy of acne vulgaris with topical delta-aminolaevulinic acid and incoherent light in Japanese patients. *British Journal of Dermatology*, 144:575.

Jang, M.S.; Doh, K.S.; Kang, J.S.; Jeon, Y.S.; Suh, K.S.; Kim, S.T., 2011. A comparative split-face study of photodynamic therapy with indocyanine green and indole- 3 -acetic acid for the treatment of *acne vulgaris*. *British Journal of Dermatology*, 165:1095-1100.

Jantová, S.; Letasiová, S.; Brezová, V.; Cipák, L.; Lábaj, J., 2006. Photochemical and phototoxic activity of berberine on murine fibroblast NIH-3T3 and Ehrlich ascites carcinoma cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B.*, 85(3):163-176.

Jori, G; Beltramini, M.; Reddi, E.; Salvato, B.; Pagnan, A.; Ziron, L.; Tomio, L.; Tsanov, L.T., 1984. Evidence for a major role of plasma lipoproteins as hematoporphyrin carriers *in vivo*. *Cancer Letters.*, 24 :291–297.

Ju, S.; Tan, L.; Su, W.; Rong, K., 2007. Interventional effect of berberine liposome on impaired glucose tolerance accompanied with hyperlipemia. *Journal of Practical Traditional Chinese Medicine*, 23(8):490–492.

Juzeniene, A.; Nielsen, K. P.; Moan, J., 2006. Biophysical Aspects of Photodynamic Therapy. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 25:7-28

Kajita, T.; Ohashi H.; Tateishi, Y.; Bailey C. D.; Doyle, J.J., 2001. *rbcL* and legume phylogeny, with particular reference to Phaseoleae, Millettieae, and allies. *Systematic Botany*, 26:515-536.

Kamal, R.; Mangla, M., 1993. *In vivo* and *in vitro* investigations on rotenoids from *Indigofera tinctoria* and their bioefficacy against the larvae of *Anopheles stephensi* and adults of *Callosobruchus chinensis*. *Journal of Biosciences*, 18(1): 93-101.

Karman, G. P.; McDonald, G. S.; New, G. H. C. ; Woerdman, J. P., 1999. Laser Optics: Fractal modes in unstable resonators. *Nature*, 402:138.

Karrer, S.; Kohl, E.; Feise, K.; Hiepe-Wegener D.; Lischner S.; Philipp-Dormston, W.; Podda M.; Prager, W.; Walker, T.; Szeimies, R.M., 2012. Photodynamic therapy for skin rejuvenation: review and summary of the literature - results of a consensus conference of an expert group for aesthetic photodynamic therapy. *Journal of German Society of Dermatology*, 11(2):137-148.

Kaskakova, S., Refregiers, M., Jancura, D., Sureau, F., Maurizot, J.-C., Miskovsky, P., 2005. Fluorescence spectroscopic study of hypericin-photosensitized oxidation of low-density lipoproteins. *Photochemistry and Photobiology*, 81:1395–1403.

Kaskakova, S.; Nadova, Z.; Mateasik, A.; Mikes, J.; Huntosova, V.; Refregiers, M.; Sureau, F.; Maurizot, J.-C.; Miskovsky, P.; Jancura, D., 2008. High Level of Low-density Lipoprotein

Receptors Enhance Hypericin Uptake by U-87 MG Cells in the Presence of LDL. Photochemistry and Photobiology, 84:120–127.

Kessel., D., 1986. Porphyrin-lipoprotein association as a factor in porphyrin localization. Cancer Letters, 33 :183–188.

Kessel, D.; Thompson, P., 1987. Purification and analysis of hematoporphyrin and hematoporphyrin derivative by gel exclusion and reverse-phase chromatography. Photochemistry and Photobiology, 46:1023-5.

Kessel, D.; Luo, Y.; Deng, Y.; Chang.C.K., 1997.The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy. Photochemistry and Photobiology, 65:422-426.

Kessel, D.; Luguya, R.; Vicente, M.G., 2003.Localized and photodynamic efficacy of two cationic porphyrins varying in charge distributions. Photochemistry and Photobiology, 78:431-435.

Kessler, P. J. A., 1993. Annonaceae. In: Kubitski, K., Rohwer, J. C., Bittrich, V. (eds.). The families and genera of vascular plants II: Flowering plants. Dicotyledons. Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid families, Springer-Verlag, Berlin, pp. 93-129.

Khan, M. R.; Kihara, M.; Omoloso, A. D., 2002. Antimicrobial activity of *Michelia champaca*. Fitoterapia, 73:744-748.

Kiesslich, T.; Gollmer, A.; Maisch, T.; Berneburg, M.; Plaetzer, K., 2013. A Comprehensive tutorial on *in vitro* characterization of new photosensitizers for photodynamic antitumor therapy and photodynamic inactivation of microorganisms. BioMed research international, v 2013, Article ID 840417, 17 pages.

Kim, H. S.; Kim, M. J.; Kim, E. J.; Yang, Y., Lee, M. S.; Lim, J. S., 2012. Berberine-induced AMPK activation inhibits the metastatic potential of melanoma cells via reduction of ERK activity and COX-2 protein expression. Biochemical Pharmacology, 83(3): 385-394.

Kömerik, N.; MacRobert, A.J., 2006. Photodynamic therapy as an alternative antimicrobial modality for oral infections. Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology, 25: 487-504.

Koon, H.; Leung, A.W.N.; Yue, K.K.M.; Mak, N.K., 2006. Photodynamic effect of curcumin on NPC/CNE2 cells. Journal of Environmental, Pathology, Toxicology and Oncology, 25:205-215.

Konapka, K., Goslinski, T., 2007. Photodynamic therapy in dentistry. Journal of Dental Research, 86(8):694-707.

Korbler, J., 1931. Investigations of cancer tissue in the fluorescence-exciting light. Strahlentherapie, 41:510-8.

- Kral, V.; Davis, J.; Andrievsky A, Kralová, J.; Synytsya A.; Poucková, P.; Sessler, J.L., 2002. Synthesis and biolocalization of water-soluble sapphyrins. *Journal of Medical Chemistry*, 45:1073-8.
- Krespi, Y. P.; Slatkine, M., Marchenko; M., Protic, J., 2005. Lethal photosensitization of oral pathogens via red-filtered halogen lamp. *Oral Diseases*, 11(s1): 92-95.
- Kumar GS, Debnath D, Sen A, Maiti M. 1993. Thermodynamics of the interaction of berberine with DNA. *Biochemical Pharmacology* 46: 1665–1667.
- Kunikata, T.; Tatefuji, T.; Aga H.; Iwaki, K.; Ikeda, M.; Kurimoto, M., 2000. Indirubin inhibits inflammatory reactions in delayed-type hypersensitivity,” *European Journal of Pharmacology*, 410(1): 93–100.
- Kuo CL, Chou CC, Yung BYM. 1995. Berberine complexes with DNA in the berberine-induced apoptosis in human leukemic HL-60 cells. *Cancer Lett* 93: 193–200.
- Kuo, C.L.; Chi, C.W.; Liu, T.Y., 2004. The anti-inflammatory potential of berberine *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Letters*, 203(2):127–137.
- Kuo, R.-Y.; Chang, F.-R.; Chen, C.-Y.; Teng, C.-M.; Yen, H.-F., Wu, Y.-C. 2001. Antiplatelet activity of N-methoxycarbonyl aporphines from *Rollinia mucosa*. *Phytochemistry*, 57:421-425.
- Küpel, E.; Koşar, M.; Yeşilada, E.; Başer, K. H. C.; Başer, C., 2002. A comparative study on the anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects of isoquinoline alkaloids from the roots of Turkish *Berberis* species. *Life Sciences*, 72(6):645-657.
- Lakowicz, J.R., 2006, *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3rd edn. Springer, New York.
- Lam, K.S., 2007. New aspects of natural products in drug discovery. *Trends Microbiology*, 15:279–289.
- Lapinski, T.F. Fotossensibilizadores naturais em em terapia fotodinâmica antimicrobiana: desenvolvimento de creme e gel creme contendo extratos de *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae). 2008. 112p. Mestrado (Mestrado em Engenharia Biomédica), Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos (SP).
- Lauro, F.M.; Pretto, P.; Covolo, L.; Jori, G.; Bertoloni, G., 2002. Photoinactivation of bacterial strains involved in periodontal diseases sensitized by porphycene-polylysine conjugates. *Photochemistry and Photobiology Science*, 1:468–470.
- Leboeuf, M.; Cavé, A.; Bhaumik, P.K.; Mukherjee, B.; Mukherjee, R., 1982. Phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry*, 12:2783-2913.

- Leclerc, S.; Garnier, M.; Hoessel, R.; Marko, D.; Bibb, J.A.; Snyder, G.L.; Greengard, P.; Biernati, J.; Wui, Y-Z.; Mandelkowi, E-M.; Eisenbrand, G.; Meijer, L., 2001. Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 β and CDK5/P25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease. A property common to most cyclindependent kinase inhibitors?" *Journal of Biological Chemistry*, 276(1) 251–260.
- Leite, S.P.; Vieira, J.R.C.; de Medeiros, P.L.; Leite, R. M. P.; de Menezes Lima, V. L.; Xavier, H. S.; de Oliveira Lima, E., 2006. Antimicrobial activity of *Indigofera suffruticosa*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 3(2), 261-265.
- Lerma, F.A.; Camerino, R.S.; Rocha, L.A.; Colomo, O.R., 2010. Política de antibióticos em pacientes críticos. *Medicina Intensiva*, 34(9):600-8
- Leonti M.; Casu, L., 2013. Traditional medicines and globalization: current and future perspectives in ethnopharmacology. *Frontiers in Pharmacology*, 25;4:92.
- Leung, M.H.; Kee, T.W., 2009. Effective stabilization of Curcumin by association to plasma proteins: human serum albumin and fibrinogen. *Langmuir*, 25(10):5773-5777.
- Lewis, G.P., 1987. Legumes of Bahia. Royal Botanical Gardens, Kew
- Lewis, G.; Schrire, B.; Mackinder, B.; Lock, M. 2005. Legumes of the World. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Liebert, A.D; Bicknell, B.T; Adams R.D., 2013. Protein conformational modulation by photons: A mechanism for laser treatment effects. *Med Hypotheses*, Dec 26, [Epub ahead of print].
- Lim, H.J.; OH, C.H., 2011. Indocyanine green-based photodynamic therapy with 785nm light emitting diode for oral squamous cancer cells. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 8(4):337-42.
- Lipson, R. L.; Baldes, E. J., 1960. The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative. *Archives of Dermatology*, 82(4): 508.
- Lipson, R.L.; Pratt, J.H.; Baldes, E.J.; Dockerty, M.B., 1964. Hematoporphyrin derivative for detection of cervical cancer. *Obstetrics and Gynecology*, 24:78.
- Liu, F.; Liang, H.L.; Xu, K.H.; Tong.L.L.; Tang.B., 2007. Supramolecular interaction of ethylenediamine linked beta-cyclodextrin dimer and berberine hydrochloride by spectrofluorimetry and its analytical application. *Talanta*, 74(1):140–145.
- Liu, X.; Xie, J.; Zhang, L.; Chen, H.; Gu, Y.; Zhao, J., 2009. A novel hypocrellin B derivative and synthesized by taking consideration to both drug delivery and biological photodynamic activity. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, 94: 171-178.

- Liu, L.; Zhang, Z.; Xing, D., 2011. Cell death via mitochondrial apoptotic pathway due to activation of Bax by lysosomal photodamage. *Free Radicals Biology and Medicine*, 51(1):53-68.
- López, D. S.; Hill, A. P.; Castro, H. V., 2002. Estudio químico en especies cubanas del género *Annona* II. *Annona sclerophylla* Safford. *Revista Cubana de Farmacia*, 36: 107-111.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193(1):265-275.
- Ma J, Jiang L., 2001. Photogeneration of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) and free radicals ($\text{Sen}\bullet^-$, $\text{O}_2\bullet^-$) by tetra-brominated hypocrellin B derivative. *Free Radicals Research*, 35:767-77.
- Maas, P. J. M.; Kamer, H. M.; Junikka, L.; Mello-Silva, R.; Rainer, H. 2001. Annonaceae from central-eastern Brazil. *Rodriguésia*, 52:61-94.
- Maas, P. J. M.; Maas, H.; Miralha, J. M. S.; Junikka, L. 2007. Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Annonaceae. *Rodriguésia*, 58:617-662.
- MacDonald, I.J.; Morgan, J.; Bellnier, D.A., Paszkiewicz, G.M.L.; Whitaker, J.E; Litchfield, D.J., Dougherty, T.J., 1999. Subcellular localization patterns and their relationship to photodynamic activity of pyropheophorbide-a derivatives. *Photochemistry and Photobiology*, 70:789-797.
- Maciel, M.A.M.; Pinto, A.C.; Veiga, V.F.; Grynderg, N.F.; Echevarria, A., 2002. Medicinal plants: the need for multidisciplinary scientific studies. *Quimica Nova*, 25: 429-438
- Maish, T., Szeimies, R.M., Jori, G., Abels, C., 2004. Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 3:907-917.
- Maisch T., 2007. A new strategy to destroy antibiotic resistance microorganisms: antimicrobial photodynamic treatment. *Mini Review in Medicinal Chemistry* 9(8):974-983.
- Maletinska, L.; Blakely, E.A.; Bjornstad, K.A; Deen, D.F; Knoff, L.J; Forte, T.M., 2000. Human glioma cell lines: levels of low density lipoprotein receptor related protein. *Cancer Research*, 60: 2300-2303.
- Malik, Z.; Faraggi, A.; Savion, N, 1992. Ultrastructural damage in photosensitized endothelial cells: dependence on hematoporphyrin delivery pathways. *J Photochem Photobiol B*, 14:359-368.
- Mares, M.A., 1992. Neotropical mammals and the myths of Amazonian biodiversity. *Science*, 255: 976.

- Mahiou, V.; Roblot, F.; Hocquemiller, R.; Cavé, A.; DE Aria, A.R.; Inchausti, A.; Yaluff, G.; Fournet, A.; Angelo, A., 1994. Alkaloids of the Annonaceae. New aporphine alkaloids from *Guatteria foliosa*. *Journal of Natural Products* 57: 890-895.
- Mak, N.K.; Leung, C.Y.; Wei, X.Y., 2004. Inhibition of RANTES expression by indirubin in influenza virus-infected human bronchial epithelial cells,” *Biochemical Pharmacology*, 67(1): 167–174.
- Maletínská, L.; Blakely, E. A.; Bjornstad, K. A.; Deen, D. F.; Knoff, L. J.; Forte, T. M., 2000. Human glioblastoma cell lines: levels of low-density lipoprotein receptor and low-density lipoprotein receptor-related protein. *Cancer research*, 60(8):2300-2303.
- Mang, T.S.; Mikulski, L.; Hall, R.E., 2010. Photodynamic inactivation of normal and antifungal resistant *Candida* species. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 7(2):98-105.
- Martínez-Vázquez, M.; Lozano, D. G De La Cueva; Estrada-Reyes, R.; González-Lugo, N. M.; Apan, T. R.; Heinze, G., 2005. Bio-guided isolation of the cytotoxic corytenchine and isocoreximine from roots of *Annona cherimolia*. *Fitoterapia*, 76: 733-736.
- Martínez, J.L., 2009. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Toxicology*, 1579(11):2893-902.
- May, P.; Woldt E.; Matz, R.L.; Boucher P., 2007. The LDL receptor-related protein (LRP) family: an old family of proteins with new physiological functions. *Annals of Medicine*, 39(3):219-28.
- Meisel, P.; Kocher, T., 2005. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 79:159-170
- Megyesi, M.; Biczók, L., 2007. Effect of ion pairing on the fluorescence of berberine, a natural isoquinoline alkaloid. *Chemical Physics Letters*, 447(4), 247-251.
- Menezes, S.; Capella, M.A.; Caldas, L.R., 1990. Photodynamic action of methylene blue: repair and mutation in *Escherichia coli*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 5:505 -517.
- Meyer-Betz, F., 1913. Investigations on the biological (photodynamic) action of haematoporphyrin and other derivatives of blood and bile pigments. *Dtsch. Arch. Klin. Med*, 112: 476-503.
- Mc Bridge, H.M.; Neuspiel, M.; Wasiak, S., 2006. Mitochondria: More than just a Powerhouse. *Current Biology*, 16: 551-560.
- Midden, W.R.; Dahl T.A., 1992. Biological inactivation by singlet oxygen: distinguishing O₂ (1 delta g) and O₂ (1 sigma g+). *Biochemistry and Biophysics Acta*, 1117:216—22.

Mielczarek-Badora, E.; Szulc, M., 2013. Photodynamic therapy and its role in periodontitis treatment. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* (Online),67:1058.

Mima, E.G.; Pavarina, A.C.; Dovigo, L.N.; Vergani, C.E.; Costa, C.A.; Kurachi, C.; Bagnato V.S.,2010. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology.*, 109(3):392-440.

Minnock, A., Vernon, D.I., Schofield, J., Griffiths, J., Parish, J.H., Brown, S.B., 2000. Mechanism of uptake of a cationic water-soluble pyridinium zinc phthalocyanine across the outer membrane of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*, 44:522–527.

Moan, J.; Berg, K., 1991. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochemistry and Photobiology*,53:549-53.

Mojzisova, H.; Bonneau, S.; Vever-Bizet, C.; Brault, D., 2007a The pH-dependent distribution of the photosensitizer chlorin e6 among plasma proteins and membranes: a physico-chemical approach. *Biochimica et Biophysica Acta- Biomembranes*, 1768(2):366-374.

Mojzisova, H.; Bonneau, S.; Vever-Bizet, C.; Brault, D., 2007b. Cellular uptake and subcellular distribution of chlorin e6 as functions of pH and interactions with membranes and lipoproteins. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1768(11): 2748-2756.

Monks, A., Scudeiro, D., Skehan, P., Shoemaker, R. Paull, R., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J., Boyd, M., 1991. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. *Journal of National Cancer Institute*, 83: 757–766.

Montenegro, H.; Gutiérrez, M.; Romero, L. I.; Ortega-Barria, E.; Capson, T. L.; Rios, L. C., 2003. Aporphine alkaloids from *Guatteria* spp. with leishmanicidal activity. *Planta Medica*, 69:677-679.

Morawetz, W.; Waha, M., 1985. A new pollentype, C-banded and fluorochrome counterstained chromosomes, and evolution in *Guatteria* and related genera (Annonaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 150: 119-141.

Morgan, J.; Oseroff, A.R., 2001. Mitochondria-based photodynamic anti-cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 49:71-86.

Morris, R.L.; Azizuddin, K.; Lam, M.; Berlin, J.; Nieminen, A.; Kenney, M.E.; Samia, A.C.S.; Burda, C.; Oleinick, N.L., 2003. Fluorescence resonance energy transfer reveals a binding site of a photosensitizer for photodynamic therapy. *Cancer Research*, 63:5194-5197.

- Muhammad, I.; Dunbar, D. C.; Takamatsu, S.; Walker, L. A.; Clark, A. M., 2001. Journal of Natural Products, 64:559–562.
- Murilo, J.; Restrepo, D. 2000. Las anonáceas de la región de Araracuara. Estudios en La LAmazónía Colombiana XX Soporte Editorial, Bogotá, 218p.
- Myers, N.; Mittermeier, R. A.; Mittermeier, C. G.; Da Fonseca, G. A.; Kent, J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature, 403(6772): 853-858.
- Na, J. I.; Kim, S. Y.; Kim, J. H.; Youn, S. W.; Huh, C. H.; Park, K. C., 2011. Indole-3-acetic acid: A potential new photosensitizer for photodynamic therapy of acne vulgaris. Lasers in Surgery and Medicine, 43(3), 200-205.
- Narita, M.; Holtzman, D. M.; Schwartz, A. L.; Bu, G., 1997. α 2-macroglobulin complexes with and mediates the endocytosis of β -amyloid peptide via cell surface low-density lipoprotein receptor-related protein. Journal of neurochemistry, 69(5):1904-1911.
- Newman, D.J. and Cragg, G.M., 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. Journal of. Natural Products. 70, 461–477
- Newman, D.J., 2008. Natural products as Leads to Potencial Drugs: An old process or the New hope for drug Discovery? Journal of Medicinal Chemistry, 51:2589-2599.
- Nitzan, Y.; Gutterman, M.; Malik, Z.; Ehrenberg, B., 1992. Inactivation of Gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins, Photochemistry and Photobiology, 59:149–155.
- Nodari, R.O.; Guerra, M.P., 2000. Implicações dos transgênicos na sustentabilidade ambiental e agrícola. História, Ciências, Saúde. Manguinhos, Rio de Janeiro, 7(2): .481-491.
- Nowak-Stepniowska, A.; Pergoł, P.; Padzik-Graczyk, A., 2012. Photodynamic method of cancer diagnosis and therapy--mechanisms and applications. Postepy Biochemii, 59(1):53-63.
- Nunez Montoya, S.C.; Agnese, A.M.; Perez, C.; Tiraboschi, I.N.; Cabrera, J.L., 2003. Pharmacological and toxicological activity of *Heterophyllaea pustulata* anthraquinone extracts. Phytomedicine, 10:569-574.
- Nunez Montoya, S.C.; Comini, L.R.; Sarmiento, M.; Becerra, C.; Albasa, I.; Arguello, G.A.; Cabrera, J.L., 2005. Natural anthraquinones probed as type I and type II photosensitizers singlet oxygen and superoxide anion production. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 78: 77-83.
- Nyman, E.S.; Hynninen, P.H., 2004. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 73 (1-2): 1-28.

- Ooi, E. M., Ng, T. W., Watts, G. F., & Barrett, P. H. R. (2013). Dietary fatty acids and lipoprotein metabolism: new insights and updates. *Current opinion in lipidology*, 24(3), 192-197.
- Okeke, M.J., Iroegbu, C.U.; Eze, E.N., Okoli, A.S., Esimone, C.O., 2001. Evaluation of extracts of the root of *Landolphia owerrience* for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 78:119-127.
- Oliaei, S.; Nelson, J. S.; Fitzpatrick, R., & Wong; B. J., 2011. Use of lasers in acute management of surgical and traumatic incisions on the face. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, 19(3): 543-550.
- Oleinick, N.L.; Morris, R.L.; Belichenko, I., 2002. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochemistry and Photobiology Science*, 1(1):1-21.
- Oliveira, C.S.; Turchiello, R.; Kowaltowski, A.J.; Indig, G.L.; Baptista, M.S., 2011. Major determinants of photoinduced cell death: Subcellular localization versus photosensitization efficiency. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 51(4):824-33.
- Orenstein, A.; Kostenich, G. ; Roitman, L., et al., 1996. A comparative study of tissue distribution and photodynamic therapy selectivity of chlorin e6, Photofrin II and ALA-induced protoporphyrin IX in a colon carcinoma model. *British Journal of Cancer*, 73:937-44.
- O’Riordan, K.; Akilov, O.E.; Hasan, T., 2005. The potencial for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2:247-262
- Orlova, E.V.; Sherman, M.B.; Chiu, W.; Mowri, H., Smith, L.C. Jr Gotto, M., 1999. Three-dimensional structure of low density lipoproteins by electron cryomicroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(15):8420-5.
- Osório, E.D.; Montoya, G.P.; Muñoz, K.D.; Arango, G.A., 2006. Antiplasmodial activity of aporphine alkaloids from *Rollinia pittieri* and *Pseudomalmea boyacana* (Annonaceae). *Vitae*, 13(1): 49-54.
- Park, K.; Lee, J.H., 2007. Photosensitizer effect of curcumin on UVB-irradiated HaCaT cells through activation of caspase pathways. *Oncology Reports*, 17:537-540.
- Paschotta, R. *Encyclopedia of laser physics and technology*. Vol. 1. Berlin: Wiley-VCH, 2008.
- Patil, J.B.; Kim, J.; Jayaprakasha, G.K., 2010. Berberine induces apoptosis in breast cancer cells (MCF-7) through mitochondrial-dependent pathway. *European Journal of Pharmacology*, 645(1-3):70-78.

Paulo, M. De Q.; Barbosa-Filho, J. M.; Lima, E.O.; Maia, R. F.; Barbosa, R. De C. B. B.C.; Kaplan, M. A. C., 1991. Antimicrobial activity, of benzyloisoquinoline alkaloids from *Annona salzmanii*. D. C. Journal of Ethnopharmacology, 36:39-41.

Pease, B. M. F., 1978. On the structural and functional components of coated vesicles. Journal of Molecular Biology, 126(4): 803-812.

Pelletier, S. W. Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives, Vol. 5; John Wiley & Sons: New York, Chapter 3, 1987.

Peng, Q.; Farrants, G.W.; Madslien, K.; Bommer, J.C.; Moan, J.; Danielsen, H.E.; Nesland, J.M., 1991. Subcellular localization, redistribution and photobleaching of sulfonated aluminum phthalocyanines in a human melanoma cell line. International Journal of Cancer, 49:290-295.

Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares em Saúde (PNPIC), <<http://dab.saude.gov.br/portaldab/pnpic.php>>, Acessado em 03/02/2014.

Peng, Q.; Warloe, T.; Berg, K.; Moan, J.; Kongshaug, M.; Giercksky, K.E.; Nesland, J.M. 1997. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Clinical research and future challenges. Cancer, 79:2282-2308.

Perussi, J. R. 2007. Inativação fotodinâmica de microorganismos. Química Nova, 30 (4): 1-7.

Pichersky, E; Lewinsohn, E., 2011. Convergent evolution in plant specialized metabolism. Annual Review of Plant Biology, 62:549-566

Pinto, A.C.; Silva, D.H.S.; Bozani, V.S.; Lopes, N.P.; Epifanio, R.A., 2002. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. Química Nova, 25: 45-61.

Polansky, R.; Haas, M.; Heschl, A.; Wimmer, G., 2009. Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis. Journal of Clinical Periodontology, 36(7):575-580.

Policard, A., 1924. Etudes sur les aspects offert par des tumeurs experimentales examinees a la lumiere de wood. C.R.Soc.Biol, 91 :1423-1428.

Polhill, R. M.; Raven, P. H. (eds). 1981. Advances in Legume Systematics - Part 1. Royal Botanic Gardens. Kew.

Prates, R.A. Verde de malaquita como fotossensibilizador em terapia fotodinâmica: ação bacteriana sobre actinomyces comitans um estudo in vitro. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Odontologia de São Paulo, Universidade de São Paulo; 2005.

Primo, F.L; Bentley, M.V.L.B.; Tedesco, A.C., 2008. Photophysical Studies and *in vitro* skin permeation/Retention of Foscan/ nanoemulsion (NE) applicable to PDT Skin Cancer treatment. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 8:340-347.

Qin, C.; Clark, A.E., 2007. Dft characterization of the optical and redox properties of natural pigments relevant to dye-sensitized solar cells. *Chemical Physics Letters*, 438:26-30.

Queiroz, E. F.; Roblot, F.; Cavé, A.; Paulo, M. Q.; Fournet, A. 1996. Pessoine and spinosine, two catecholic berberines from *Annona spinescens*. *Journal of Natural Products*, 59:438-440.

Raab, O., 1900. Über die Wirkung fluorisierender Stoffe auf Infusorien. *Zeitschrift für Biologie*, 39:524-546.

Radzi, R.; Osaki, T.; Tsuka, T.; Imagawa, T.; Minami, S.; Nakayama, Y.; Okamoto, Y., 2012. Photodynamic hyperthermal therapy with indocyanine green (ICG) induces Apoptosis 3 and cell cycle arrest in B16F10 murine melanoma cells. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 74(5):545-551.

Rashid, F.; Horobin, R.W., 1990. Interaction of molecular probes with living cells and tissues. Part 2. A structure-activity analysis of mitochondrial staining by cationic probes, and a discussion of the synergistic nature of image-based and biochemical approaches. *Histochemistry*, 94:303-308.

Rahman, M. M.; Lopa, S. S.; Sadik, G.; Harun-OR-Rashid; Islam, R.; Khondkar, P.; Alam, A. H. M. K.; Rashid, M. A. 2005. Antibacterial and cytotoxic compounds from the bark of *Cananga odorata*. *Fitoterapia* 76: 758-761.

Ravanat, J.L. ; Cadet J., 1995. Reaction of singlet oxygen with 2'-deoxyguanosine and DNA. Isolation and characterization of the main oxidation products. *Chemical Research in Toxicology*, 8:379-88.

Raghavendra, M.; Koregol, A.; Bhola, S., 2009. Photodynamic therapy: a targeted therapy in periodontics. *Australian Dental Journal*, 54(s1), S102-S109.

Remppis, A.; Bea, F.; Greten, H.J.; Buttler, A.; Wang, H.; Zhou, Q.; Preusch, M.R., Enk, R.; Eehalt, R.; Katus, H., Blessing, E., 2010. Rhizoma coptidis inhibits LPS-induced MCP-1/CCL2 production in murine macrophages via an AP-1 and NFκB-dependent pathway. *Mediators in Inflammation*, volume 2010, Article ID 194896, 8 pages.

Rensen, P.C.N.; Vrueth, R.L.A. ; Kuiper, J. ; Bijsterbosch, M.K. ; Biessen, E.A.L. ; van Berkel, T.J.C. 2001. Recombinant lipoproteins: lipoprotein-like lipid particles for drug targeting. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47(2-3):251-76.

Reyftmann, J.P.; Morliere, P.; Goldstein, S.; Satus, R.; Dubertret, L.; Lagrange, D., 1984. Interaction of human serum low density lipoproteins with porphyrins : a spectroscopic and photochemical study. *Photochemistry and Photobiology*, 40 :721-729.

Ribeiro, M.S., Groth, E. B. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana. In: Livro virtual, 23^o CIOSP, São Paulo, 2005, 26p. Disponível em <<http://www.netodonto.com.br/ciosp/index.php>>. Acesso em: 10 nov. 2005.

Robertson, C.A.; Hawkins Evans, D; Abrahamse, H., 2009. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 96:1-8.

Robertson, P.K.J., Black, K.D., Adams, M., Willis, K., Buchan, F., Orr, H., Lawton, L., McCullagh, C., 2009. A new generation of biocides for control of crustacea in fish farms. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 95: 58–63.

Ronsein G.E.; Miyamoto S.; Bechara S.; Di Mascio P.; Martinez, G.R., 2006. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. *Química Nova*, 29(3):563-568

Rupprecht, J.K.; Hui, Y.H.; MacLaughlin, J.L., 1990. Annonaceus acetogenins: a review. *Journal. Natural Products*, 53:237-278.

Sadasivam, M.; Avci, P.; Gupta, G. K.; Lakshmanan, S.; Chandran, R.; Huang, Y. Y.; Kumar, R.; Hamblin, M. R., 2013. Self-assembled liposomal nanoparticles in photodynamic therapy. *European Journal of Nanomedicine*, 5(3):115-129.

Saini, R. & Poh, C. F., 2012. Photodynamic therapy: a review and its prospective role in the management of oral potentially malignant disorders. *Oral Diseases*, 19(5):440-51.

Saito, S.; Shimizu, N., 1997. Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 111(5): 525-532.

Sánchez, M. 1997. Catálogo preliminar comentado de la flora Del Medio Coquetá. *Estudios en la Amazônia Colombiana XII Impreandes Presencia*, Bogotá, 557p.

Salvador, M.J. Estudo fitoquímico, caracterização dos elementos inorgânicos por espectrometria de raios X e atividades biológicas de *Alternanthera maritima* (Mart.) St. Hil. 2002a. 228p. Dissertação. Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Área Fármacos e Medicamentos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Salvador, M.J.; Pereira, P.S.; França, S.C.; Candido, R.C.; Ito, I.Y.; Dias, D.A., 2003. Comparative study of antibacterial and antifungal activity of callus culture and adults plants extracts from *Alternanthera maritima* (Amaranthaceae). *Brazilian Journal of Microbiology*, 34:131-136.

Sarna, L.K.; Wu, N.; Hwang, S.Y.; Siow, Y.L., 2010. Berberine inhibits NADPH oxidase mediated superoxide anion production in macrophages. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 88 (3): 369–378.

Scatchard, G. 1949. The attraction of proteins for small molecules and ions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 51:660-672.

Scatchard, G.; Scheinberg, I.H.; Armstrong, S.H. 1950. Physical Chemistry of Protein Solutions. IV. The Combination of Human Serum Albumin with Chloride Ion¹. Journal of American Chemistry. Society, 72:535-540.

Schaffer, M.; Schmitz, C.; Horneck, G, 1998. High sensitivity of *Deinococcus radiodurans* to photodynamically-produced singlet oxygen. International Journal of Radiation Biology, 74:249 – 253

Schaffer, M.; Schmitz, C.; Facius, R.; Horneck, G.; Milow, B.; Funken, K.H.; Ortner, J., 2000 Systematic study of parameters influencing the action of Rose Bengal with visible light on bacterial cells: comparison between the biological effect and singlet-oxygen production. Photochemistry and Photobiology, 71:514.

Schaffer, M.; Ertl-Wagner, B.; Schaffer, P. A.; Kulka, U.; Jori, G.; Duhmke, E.; Hofstetter, A., 2005. The Application of Photofrin II as a Sensitizing Agent for Ionizing Radiation-A New Approach in Tumor Therapy? Current medicinal chemistry, 12(10): 1209-1215.

Schrire, B.D., 2005. Tribe Indigofereae. In: Lewis, G. Schrire, B., Mackinder, B., Lock, M (Eds.), Legumes of the World. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 361-366

Schumaker, V.N.; Phillips, M.L.; Chatterton, J.E., 1994. Apolipoprotein B and low-density lipoprotein structure: implications for biosynthesis of triglyceride-rich lipoproteins. Advances in Protein Chemistry, 45:205-48.

Schultz, E.W.; Krueger, A.P., 1928. Inactivation of Staphylococcus bacteriophage by methylene blue. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 26:100-1.

Schwesinger, W.H.; Hunter, J.G., 1992. Laser in General Surgery. Surgical Clinics of North America, 73(3): 531-742

Scorzoni, L.; Benaducci, T.; Almeida, A. M. F.; Silva, D. H. S.; Bolzani, V. S.; Giannini, M J S M. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida* spp and *Cryptococcus* sp. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 28:25-34.

Scorzoni, L.; Benaducci, T.; Almeida, A. M. F.; Silva, D. H. S.; Bolzani, V. S.; Gianinni, M. J. S. M., 2007. The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp. Brazilian Journal of Microbiology, 38:391-397.

Seixas de Melo, J.; Moura, A. P.; Melo, M. J., 2004. Photophysical and spectroscopic studies of indigo derivatives in their keto and leuco forms. The Journal of Physical Chemistry A, 108(34):6975-6981.

Segrest, J.P.; Jones, M.K.; De Loof, H.; Dashti, N., 2001. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *Journal of Lipid Research*., 42(9):1346-67.

Seigler, D.S., 2001. *Plant secondary metabolism*. Springer. p. 628.

Shamma, M.; Guinaudeau, H. 1984. Biogenetic pathways for the aporphinoid alkaloids. *Tetrahedron* 40: 4795-4822.

Sharg L.; Yu, A.B, 1999, 4th edition, *Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics* New York, Mc Graw-Hi.

Sharma, S.K.; Mroz, P., Dai, T., Huang, Y.Y., St Denis T.G., Hamblin, M.R., 2012. Photodynamic Therapy for Cancer and for Infections: What Is the Difference? *Israel Journal of Chemistry*, 52(8-9):691-705.

Sharman, W. M.; Allen, C. M.;van Lier, J. E., 1999. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discovery Today*, 4(11):507-517.

Sharman, W. M.; Allen, C.M.; Vandier, J.E., 2000. Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. *Methods in Enzymology*, 319:376-400.

Sharwani A.; Jerjes, W.; Salih, V.; MacRoberts, A.J.; El-Maaytah, M.; Khalil, H.S.M., 2006. Fluorescence spectroscopy combined with 5-aminolevulinic acid- induced protoporphyrin IX fluorescence in detecting oral premalignancy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 83:27-33

Shen, L.; Ji, H.F., 2010. The mechanisms of ROS-photogeneration by berberine, a natural isoquinoline alkaloid. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 99(3):154-156.

Simioni, A.R.; Primo,F.L; Rodrigues, M.A.M.; Lacava, Z.G.M.; Morais, P.C.; Tedesco, A.C., 2007. Preparation, characterization and *in vitro* toxicity test of magnetic nanoparticles-based drug delivery system to hyperthermia of biological tissues. *IEEE Transactions on Magnetics*, 43:2459-2461.

Simões, C.M.O; Guerra, M.P...[et al.]. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5^a ed. rev. ampl., primeira reimpressão – Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 1102p, 2004.

Simon, H.U.; Haj-Yehia, A.; Levi-Schaffer, F., 2000. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*, 5(5): 4415-418

Simplicio, F, I.; Maionchi, F.; HioKa, N., 2001. *Terapia Fotodinâmica: Aspectos Farmacológicos, Aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de Medicamentos*. *Química Nova*, 25(5): 801-807.

Da Silva, D.B.; Tulli, E.C.O.; Militão, G.C.G.; Costa-Lotufo, L. V.; Pessoa, C.; de Moraes, M.O.; Albuquerque, S.; de Siqueira, J. M., 2009. "The antitumoral, trypanocidal and

antileishmanial activities of extract and alkaloids isolated from *Duguetia furfuracea*. *Phytomedicine* 16(11): 1059-1063.

Sinha, R.; Kumar, G. S., 2009. Interaction of isoquinoline alkaloids with an RNA triplex: Structural and thermodynamic studies of berberine, palmatine, and coralyne binding to poly (U). poly (A)* poly (U). *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(40): 13410-13420.

Smith A.W., 2005. Biofilms and antibiotic therapy: is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57:1539-1550.

Sneader, W., 1996. *Drug Prototypes and Their Exploitation*. John Wiley & Son Ltd, UK, pp788.

Sobbarzo-Sánchez, E.; Soto, P.G.; Valdés- Rivera, C.; Sánchez, G.; Hidalgo, M.E., 2012. Applied biological and physicochemical activity of isoquinoline alkaloids: oxoisoaporphine and boldine. *Molecules*, 17(9): 10958-70

Souza, S.C.; Junqueira, J.C.; Balducci, I.; Koga-Ito, C.Y., Munin, E., Jorge, A.O.C., 2006. Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 83(1): 34-38.

Soukos, N.S.; Wilson, N.; Burns, T.; Speight, P.M., 1996. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated *in vitro*. *Lasers in Surgery and Medicine*, 18(1):253-259.

Spikes, J.D. The historical development of ideas on application of photosensitized reactions in health sciences. *In*: BERGASSON, R.; JORI, G.; LAND, E.J.; TRUSCOTT, T.G. *Primary photoprocess in Biology and medicine*. New York: 1985 p. 209-227.

Spikes, J.D., 1990. Chlorins as photosensitizers in biology and medicine. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 6:259-74.

Stévigny, C.; Bailly, C.; Quetin-Laclercq, J., 2005. Cytotoxic and antitumor potentialities of aporphinoid alkaloids. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 5: 173-182.

Stupakova, V.; Varinska, L.; Mirossay, A. Šarišský, M.; Mojžiš, J.; Dankovčík, R.; Urdzík, P.; Ostró, A.; Mirossay, L. 2009. Photodynamic effect of Hypericin in primary cultures of human umbilical endothelial cells and glioma cell lines. *Phytotherapy Research*, 23 (6): 827-832.

Su, Y. ; Sun, J. ; Rai, S. ; Cai, Y. ; Yang, Y., 2011. Photodynamic antimicrobial activity of hypocrellin A. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 103:29–34.

Sullivan, D. J.; Westerneng, T. J.; Haynes, K. A.; Bennett, D. E.; Coleman, D. C., 1995. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology*, 141(7):1507-1521.

Sun, H.; Ouyang, W., 2007. Preparation and physicochemical characteristics of berberine hydrochloric nanoemulsion. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*. 38(10):1476–1480.

Szeimes, R.M.; Karrer, S.; Sauerward, A.; Landthaler, M., 1996. Photodynamic therapy with topical application of 5-aminolaevulinic acid in the treatment of actinic keratoses: as initial clinical study. *Dermatology*, 192:246-251.

Szeimies, R.M.; Karrer, S.; Abels, Steinbach, P.; Fickweiler, S.; Messmann, H.; Bäumler, W.; Landthaler, M., 1996. 9-Acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(beta-methoxyethyl)-porphycene (ATMPn), a novel photosensitizer for photodynamic therapy: uptake kinetics and intracellular localization. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 34:67-72.

Tan, L.; Li, G.; Chen, J.; Su, W.; Rong, K., 2007. Application of uniform design for preparation of berberine hydrochloride liposomes. *Journal of Practical Medical Techniques*, 14(11):1385–1386.

Tan, W.; Li, Y.; Chen, M.; Wang., 2011. Berberine hydrochloride: anticancer activity and nanoparticulate delivery system. *International Journal of Nanomedicine*, 6:1773-1777.

Teichert, M. C. ; Jones, J. W. ; Usacheva, M. N. ; Biel, M. A., 2002. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 93(2):155-160.

Tierney E.; Barker, A.; Ahdout J.; Hanke, C.W.; Moy, R.L.; Kouba, D.J., 2009. Photodynamic therapy for the treatment of cutaneous neoplasia, inflammatory disorders and photoaging. *Dermatologic Surgery*. 35(5): 725-746.

Topaloglu, N.; Gulsoy, M.; Yuksel, S., 2013. Antimicrobial Photodynamic Therapy of Resistant Bacterial Strains by Indocyanine Green and 809-nm Diode Laser. *Photomedicine and laser surgery*, 31(4):55-162.

Turro, N.J. *Modern Molecular Photochemistry*. Mill Valey, CA: University Science books, 1991.

Usacheva, M.N.; Teichert, M.C.; Biel, M.A., 2001. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers in Surgery and Medicine*, 29:165.

Usacheva, M. N., 2006. Effect of Ca²⁺ on the photobacterial efficacy of methylene blue and toluidine blue against gram-negative bacteria and the dye affinity for lipopolysaccharides. *Lasers in Surgery and Medicine*, 29:165-173.

Valduga, G.; Bertoloni, G.; Reddi, E.; Jori, G., 1993. Effect of extracellularly generated singlet oxygen on Gram-positive and Gram negative bacteria, *Journal of Photochemistry and Photobiology. B: Biology*, 21:81–86.

Vance, J.E.; Vance, D.E., 2002. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes. Amsterdam: Elsevier.

Velez-Montoya, R.; Oliver, S.C.; Olson, J.L.; Fine, S.L.; Mandava, N.; Quiroz-Mercado, H. Current Knowledge and trends in age-related macular degeneration: Today's and Future Treatments. Retina, 2012 Dec 5. [Epub ahead of print].

Vieira, J. R. C.; De Souza, I.A.; Do Nascimento, S.C. Leite, S.P., 2007. *Indigofera suffruticosa*: an alternative anti-cancer therapy,” Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 4(3): 355–359, 2007.

Von Tappeiner, H.; Jesionek, A., 1903). Therapeutic tests with fluorescent materials. Münch Med Wochenschr, 47: 2042-2044.

Von Tappeiner H, Jodlbauer A., 1904. On the effect of photodynamic (fluorescent) substances on protozoa and enzymes. Arch Klin Med 1904;80:427-87.

Von Tappeiner, H. ; Jodlbauer, A., 1907. The sensitising action of fluorescent substance. An overall account of investigations on Photodynamic phenomena. Leipzig, FCW Vogel.

Wade L., 2013. Biodiversity. The Amazon in 4D. Science., 341(6143):234-5

Waechter, A.I.; Yaluff, G.; Inchausti, A.; Arias, A.R.; Hocquemiller, R.; Cavé, A.; Fournet, A., 1999. Leishmanicidal and Trypanocidal activities of Acetogenins isolated from *Annona glauca*. Phytotherapy Research, 12(8): 541–544

Wainwright, M.; Crossley, K.M., 2004. Photosensitizing agents- circumventing resistance and breaking down biofilms: a review. International Biodeterioration & Biodegradation, 53:119-126.

Wainwright, M., 1998. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 42:13-28.

Wainwright, M., 2009. Photosensitisers in Biomedicine. A John Wiley & Sons Ltd. Publication. The Atrium Southern Gate, Chichester, West Sussex , PO198SQ, UK, pp. 281.

Wang, Y-W; Wang, Y-P; Zhang, H; Kong, W-J; Li, Y-H; Liu, F; Gao, R-M; Liu, Ting., 2009. Synthesis and biological evaluation of berberine analogues as novel up-regulators for both low-density-lipoprotein receptor and insulin receptor. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 19 (21): 6004–6008.

Wang, Y-W; Wang, Y-P; Zhang, H; Kong, W-J; Li, Y-H; Liu, F; Gao, R-M; Liu, Ting., 2012. Synthesis and biological evaluation of berberine analogues as novel up-regulators for both low-density-lipoprotein receptor and insulin receptor. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 20:6552–6558.

Wijeratne, E. M. K.; Hatanaka, Y; Tohru, K.; Tezuka, Y.; Gunatilaka, A. A. L. 1996. A dioxoaporphine and alkaloids of two annonaceous plants of Sri Lanka. *Phytochemistry*, 42:1703-1706.

Wilson, B.C.; Olivo, M.; Singh, G., 1997. Subcellular localization of Photofrin and aminolevulinic acid and photodynamic cross resistance in vitro in radiation-induced fibrosarcoma cells sensitive or resistant to Photofrin-mediated photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 65:166-76.

Wilson, M.; Pratten, J., 1994. Lethal photosensitization of *Staphylococcus aureus*. *Microbios*, 78(1):163-168.

Wood, S., Nattress B., Kirkhan, J., Shore, R., Brookes, S., Griffiths, J., 1999. An in vitro study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed in vivo. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 50:1-7.

Wood, S., Metcalf, D., Devine, D., Robinson C., 2006. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57:680-684.

Wojciechowski, M. F.; Lavin, M.; Sanderson, M. J., 2004. "A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid matK gene resolves many well-supported subclades within the family". *American Journal of Botany*, 91(11): 1846–62.

Wu, L. M.; Yang, Y. P.; Zhu, Z.H., 1979. Studies on the activity principles of Indigofera tinctoria in the treatment of CML. *Communications of Chinese Herbal Medicine*, 9: 6–8.

Wu, G. Y.; Fang, F. D.; Liu J. Z.; Chang, A.; Ho, Y.H., 1980. Study on the mechanism of action of indirubin in the treatment of chronic granulocytic leukemia. I. Effect on nucleic acid and protein synthesis in human leukemic cells. *Chinese Medical Journal*, 60: 451–454.

Wu, Y.-C.; Chang, G.-Y.; Duth, C.-Y.; Wang, S.-K. 1993. Cytotoxic alkaloids of *Annona montana*. *Phytochemistry*, 33:497-500.

Wu, M.; Wang, J.; Liu, L.T., 2010. Advance of studies on anti-atherosclerosis mechanism of berberine. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 16(2):188–192.

Yao, M., 2013. Antimicrobial photodynamic therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *BioMed research international*, 2013.

Yin, J.; Xing, H.; Ye, J., 2008. Efficacy of berberine in patients with type 2 diabetes metabolism, 57(5):712–717.

Zand, V.; Milani, A. S.; Amini, M.; Barhaghi, M. H. S.; Lotfi, M., Rikhtegaran, S.; Sohrabi, A., 2013. Antimicrobial Efficacy of Photodynamic Therapy and Sodium Hypochlorite on Monoculture Biofilms of *Enterococcus faecalis* at Different Stages of Development. *Photomedicine and laser surgery*. Dec 5. [Epub ahead of print]

Zeina, B. 2001. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. *British Journal of Dermatology*, 44:274-278.

Zhang, Z.; Elsohly, H. N.; Jacob, M. R.; Pasco, D. S.; Walker, L. A.; Clark, A. M., 2002. New sesquiterpenoids from the root of *Guatteria multivenia*. *Journal of Natural Products* 65: 856-859.

Zhang, F.; Na, X., 2006. Study on preparation of berberine hydrochloride liposomes. *Journal of Nanjing Normal University (Natural Science)*, 29(1):56–58.

Zhang, D.; Lamier, S.M.; Downing, J.A.; Avent, J.L.; Lum, J.; Mc Hale, J.L., 2008. Betalain pigments for dye-sensitized solar cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 195: 72-80.

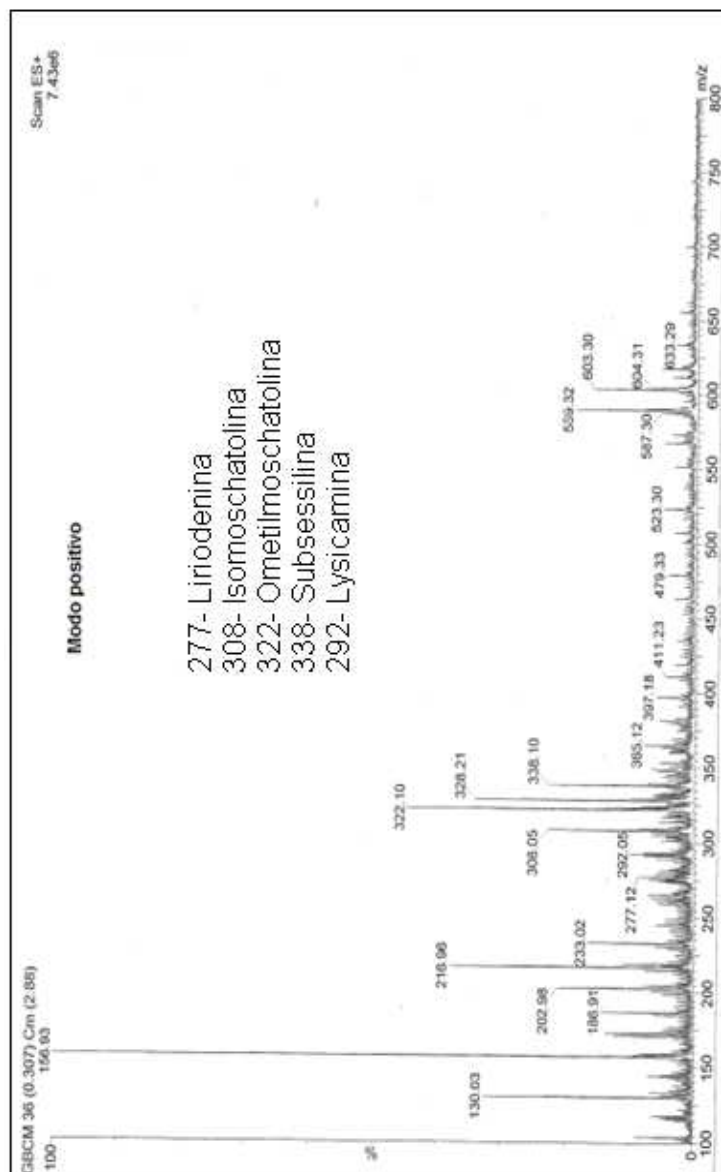
Zhu, B.; Liu, Q.; Wang, Y.; Wang, X.; Wang, P.; Zhang, L., Su, S., 2010. Comparison of accumulation, subcellular location, and sonodynamic cytotoxicity between hematoporphyrin and protoporphyrin IX in L1210 cells. *Chemotherapy*, 56(5):403-410.

Zhu, F.; Qian, C., 2009. Berberine chloride can ameliorate the spatial memory impairment and increase the expression of interleukin-1 β and inducible nitric oxide synthase in the rat model of Alzheimer's disease. *BMC Neuroscience*, 7:78-87.

Zinchuk, V.; Grossenbacher-Zinchuk, O., 2009. Recent advances in quantitative colocalization analysis: Focus on neuroscience. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 44:125-172

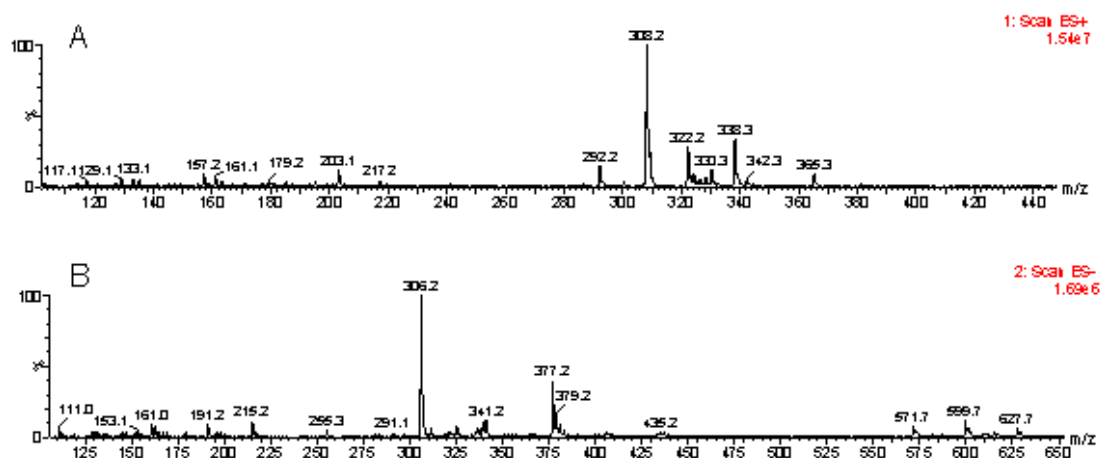
ANEXOS

1. Extrato metanólico *Guatteria blepharophylla* (GBCM)



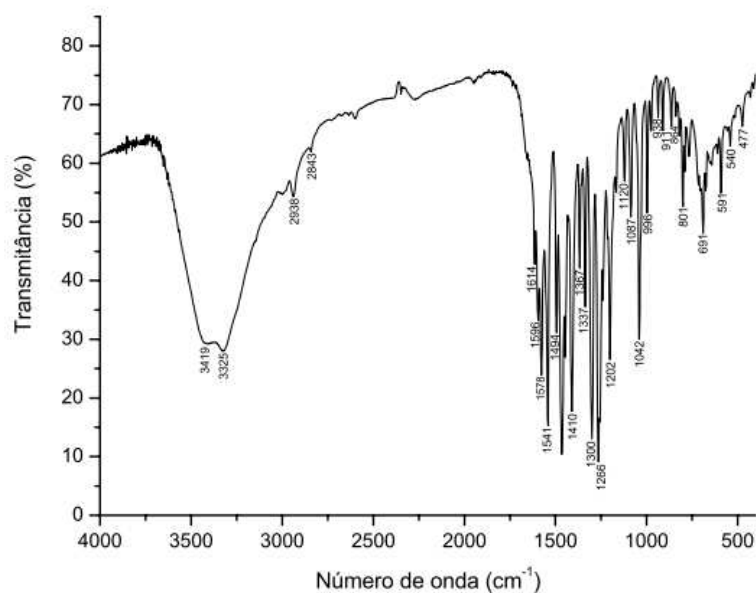
Anexo 1. Espectro de massa ESI-MS, modo positivo, 15 eV da amostra GBCM . Presença dos picos de massas corresponde às massas das substâncias isoladas.

2. Fração alcaloídica *Guatteria blepharophylla* (GBFA)

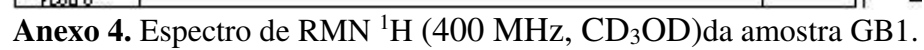


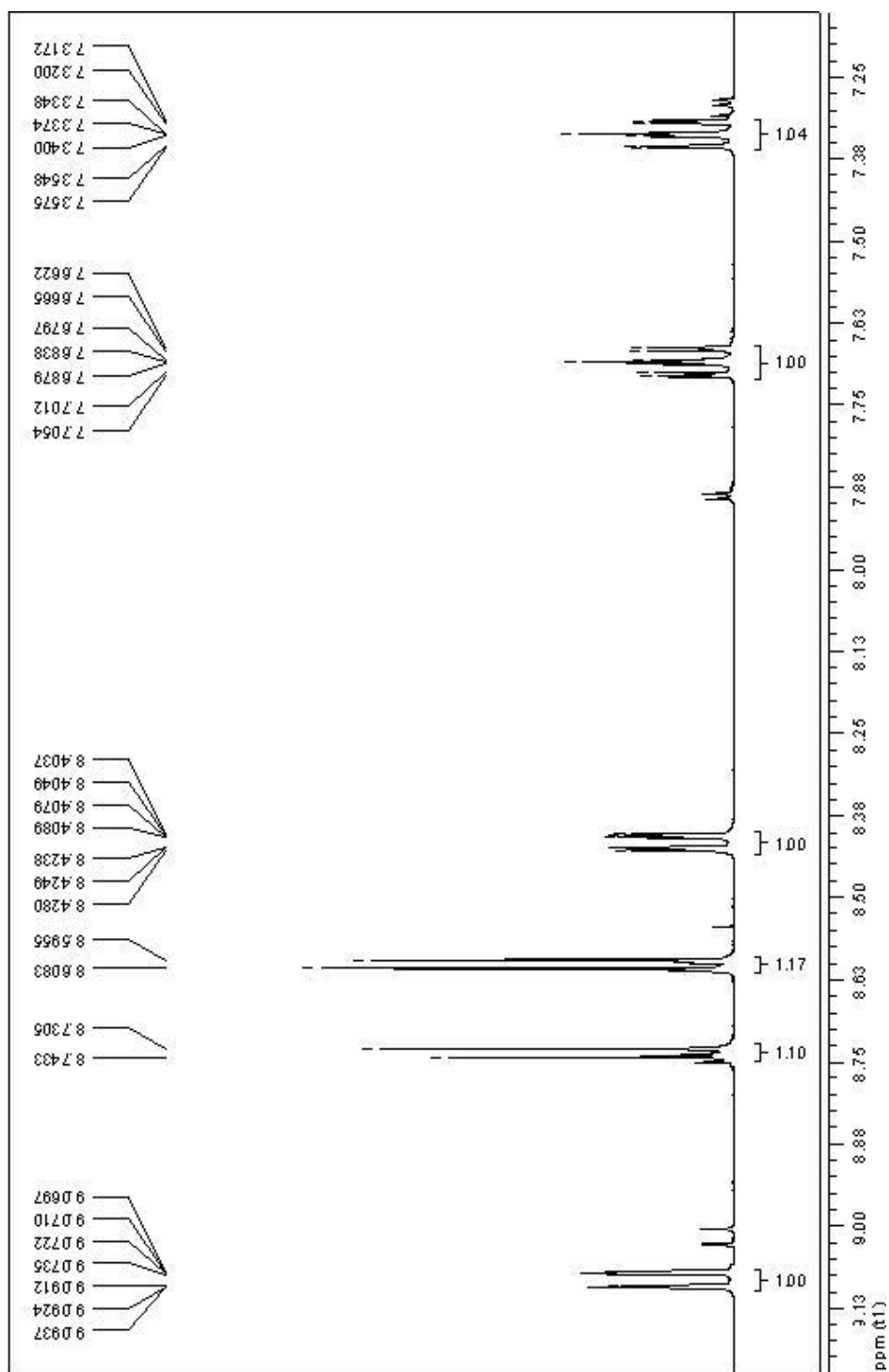
Anexo 2. Espectro de massa ESI-MS, modo positivo (A) e modo negativo (B), 15 eV da amostra GBFA . Presença dos picos de massas corresponde às massas das substâncias isoladas.

3. Substância GB1- Isomoschatolina

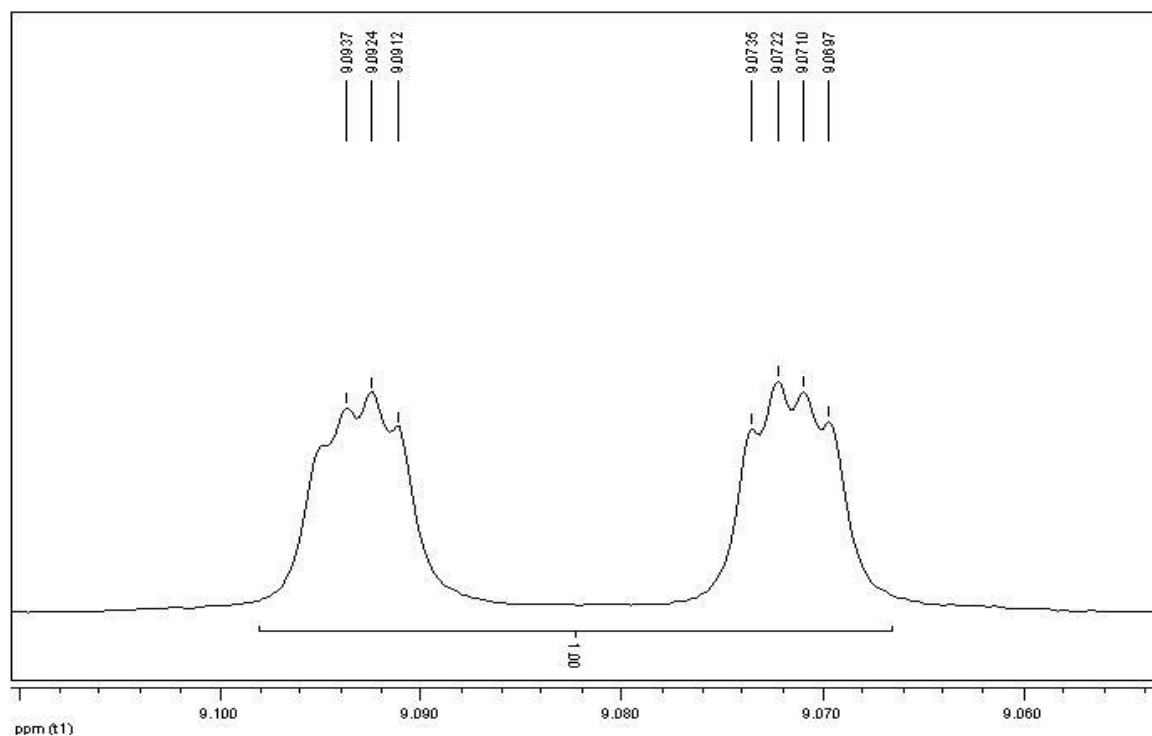


Anexo 3. Espectro de absorção na região do IV (KBr) de GB1.

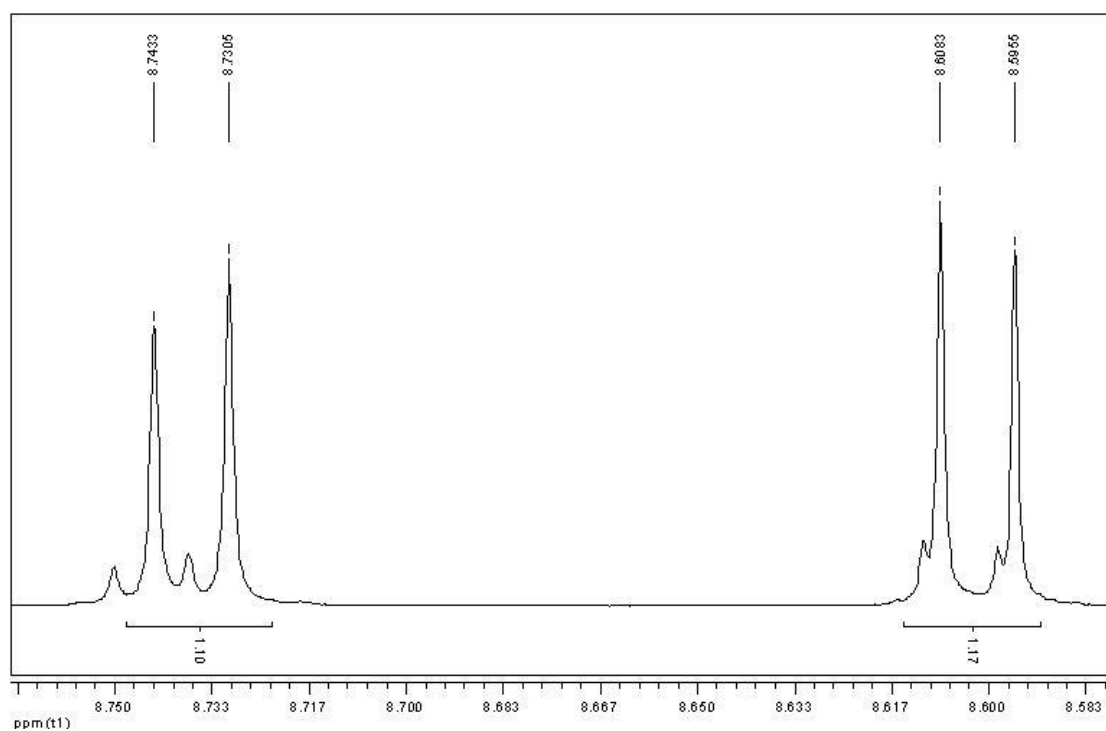




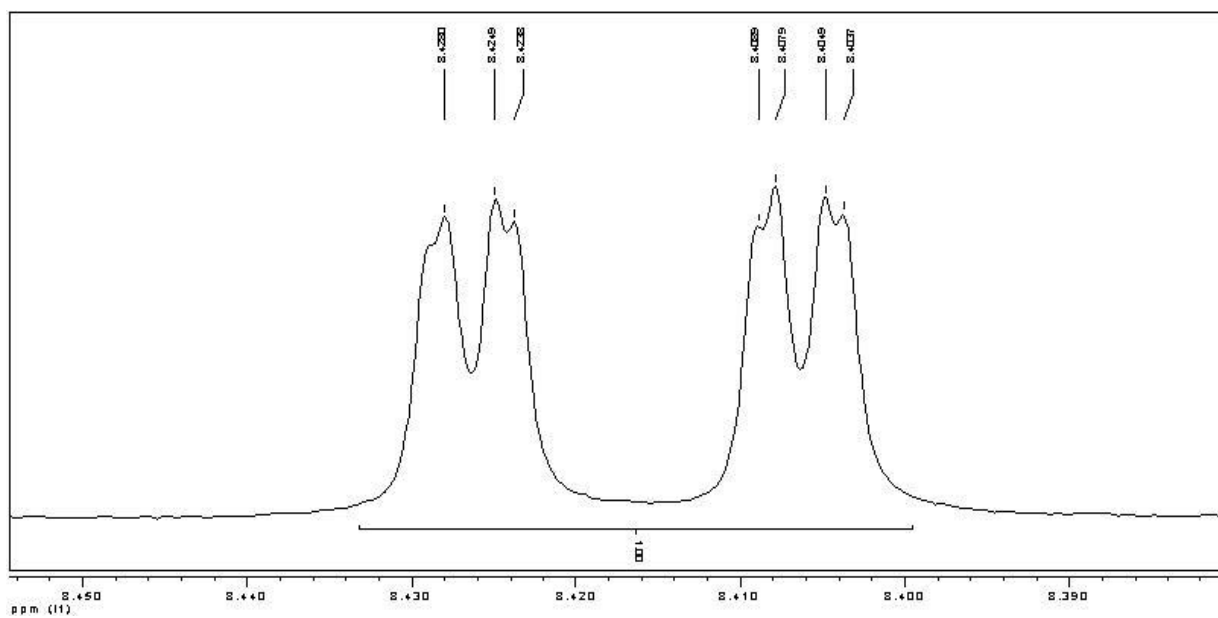
Anexo 5. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) da amostra GB1 – ampliação.



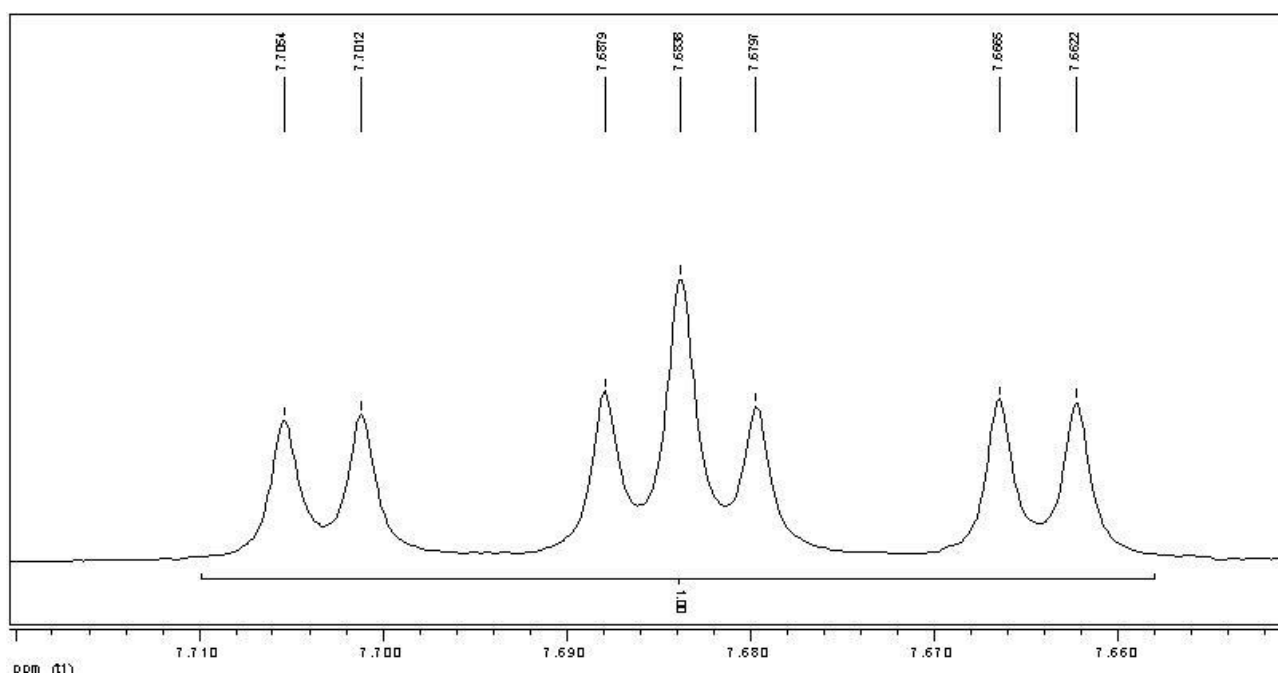
Anexo 6. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) da amostra GB1 – ampliação.



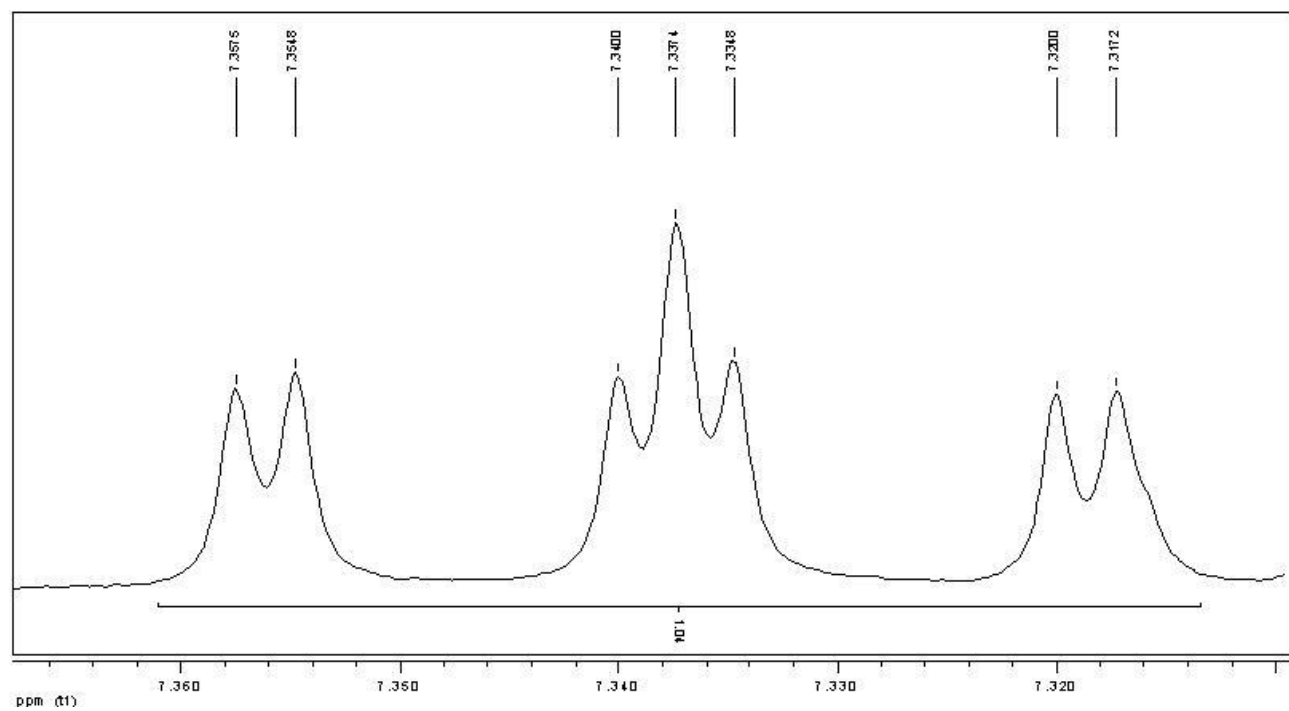
Anexo 7. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) da amostra GB1 – ampliação.



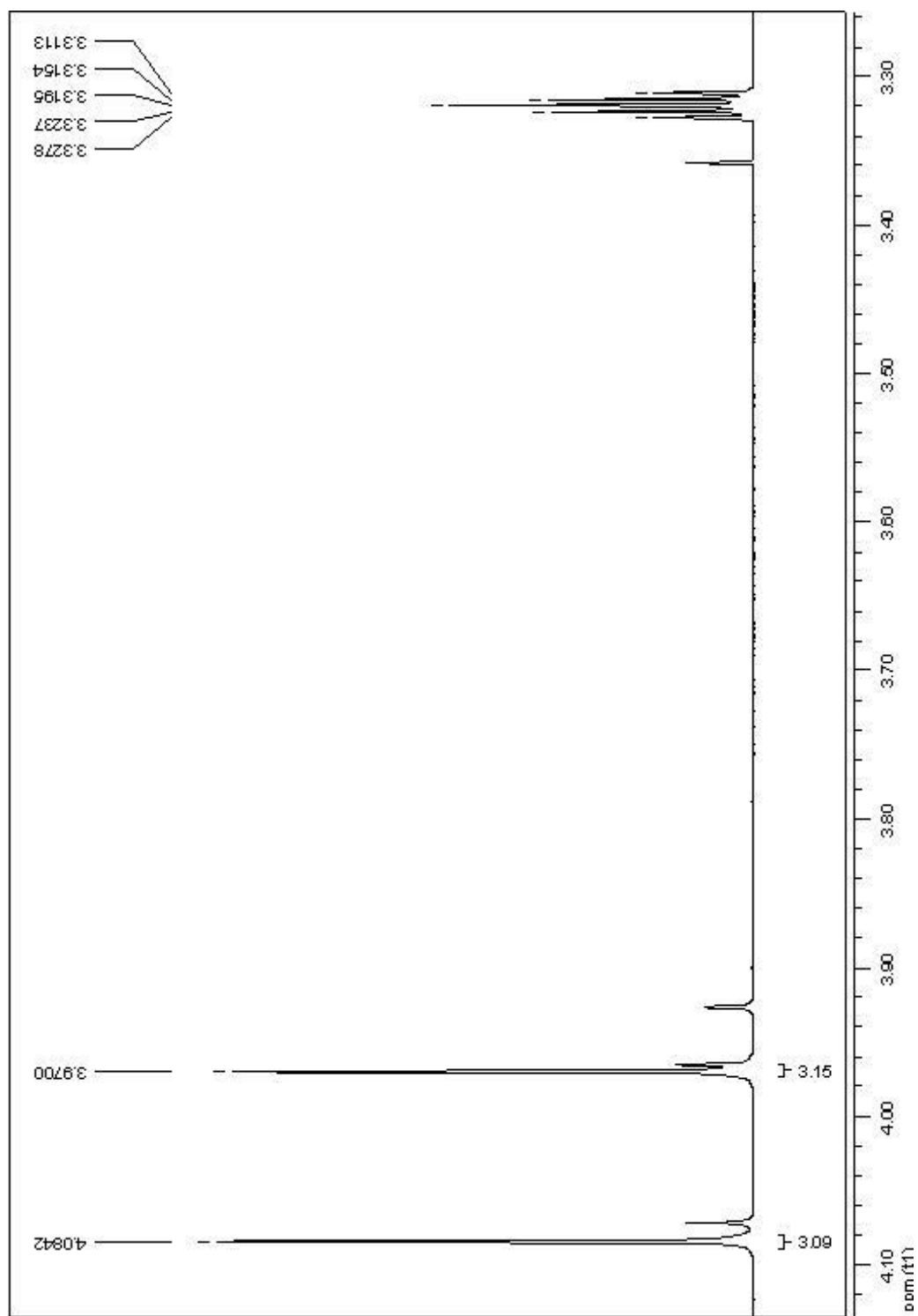
Anexo 8. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) da amostra GB1 – ampliação.



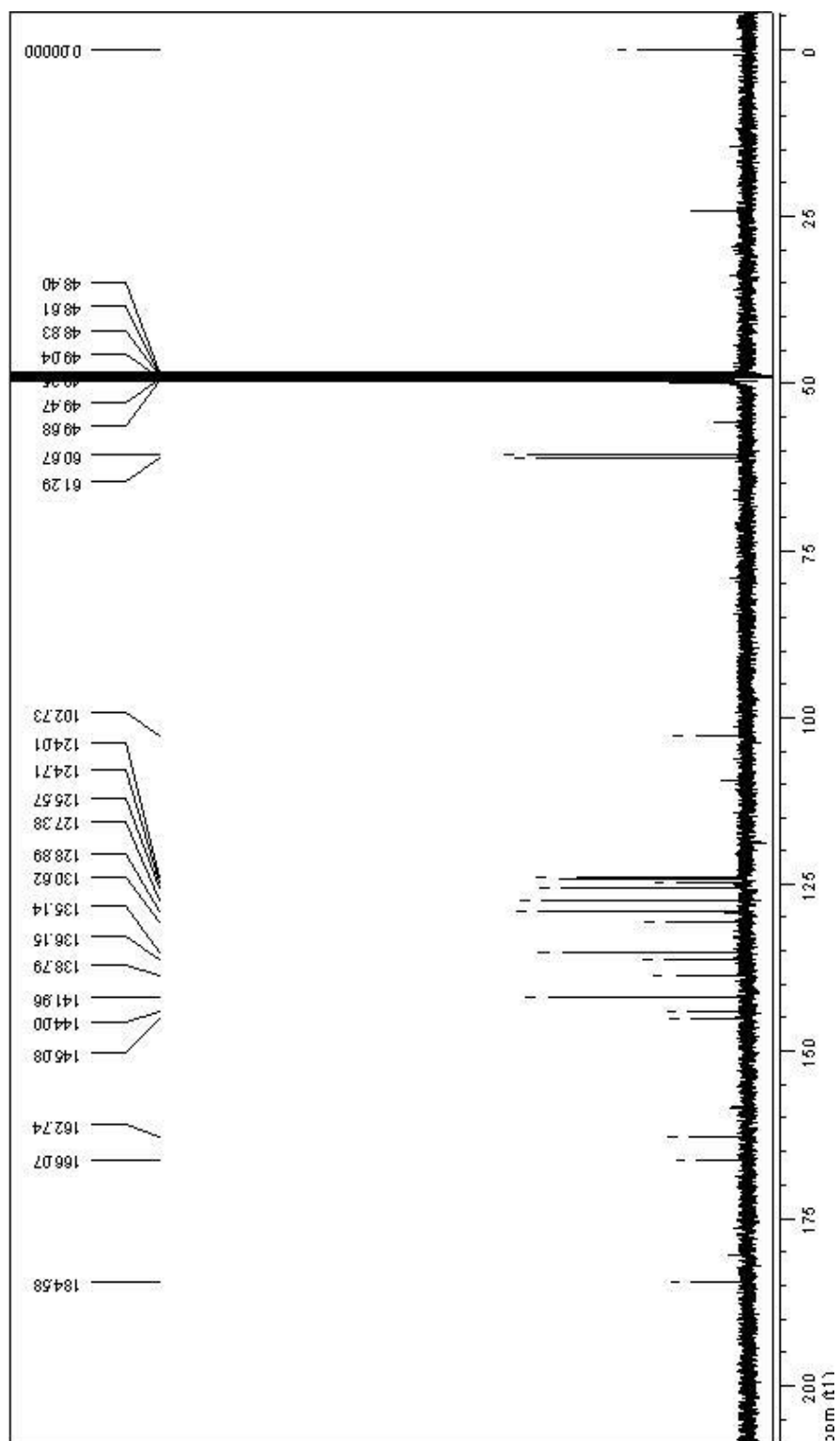
Anexo 9. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) da amostra GB1 – ampliação.



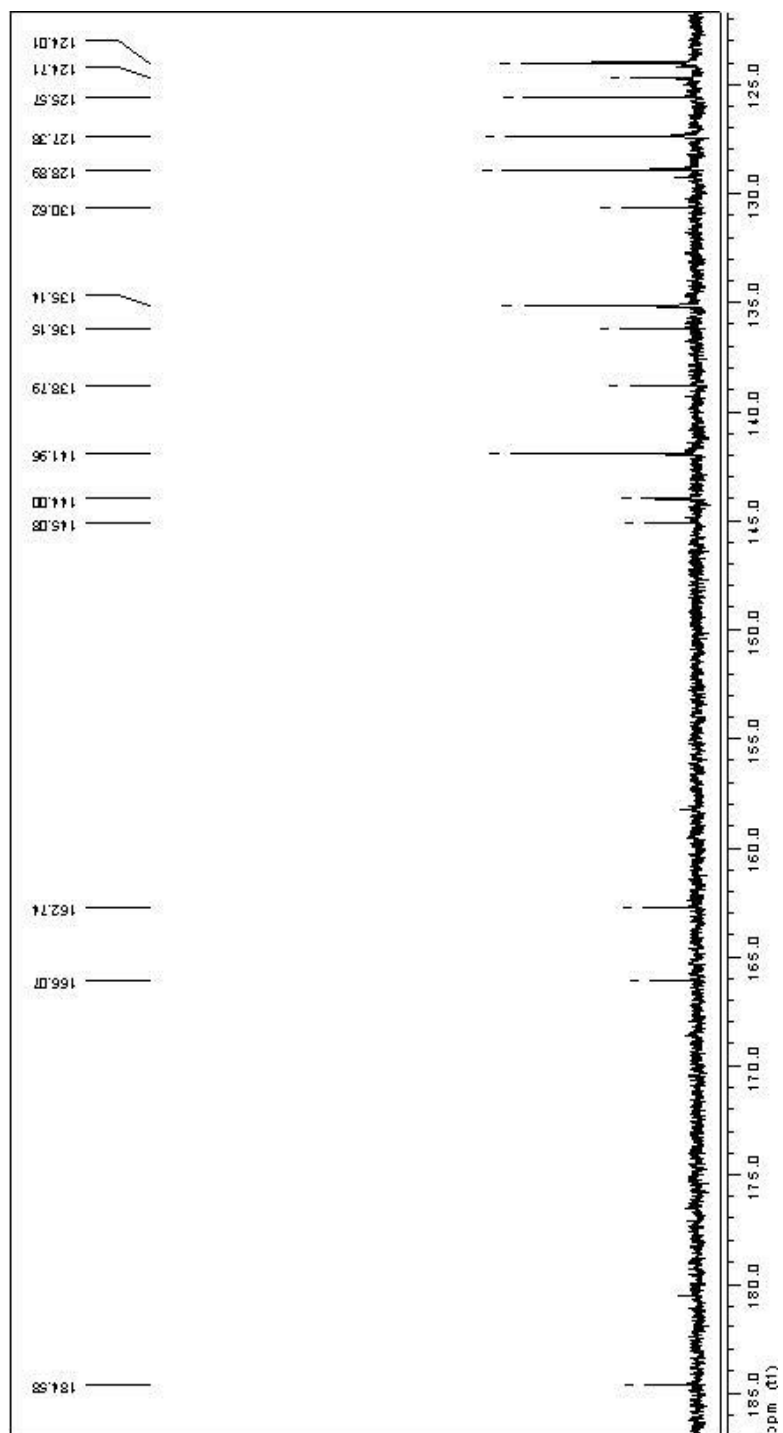
Anexo 10. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) da amostra GB1 – ampliação.



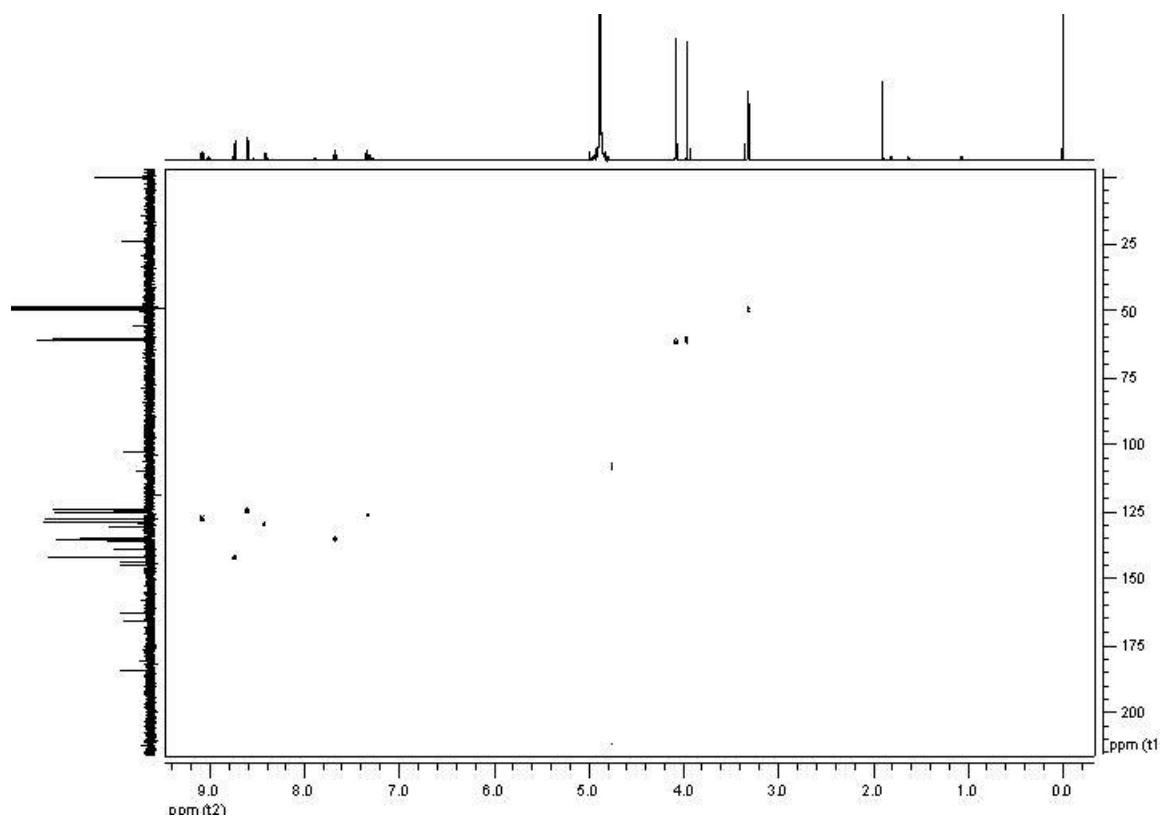
Anexo 11. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) da amostra GB1 – ampliação.



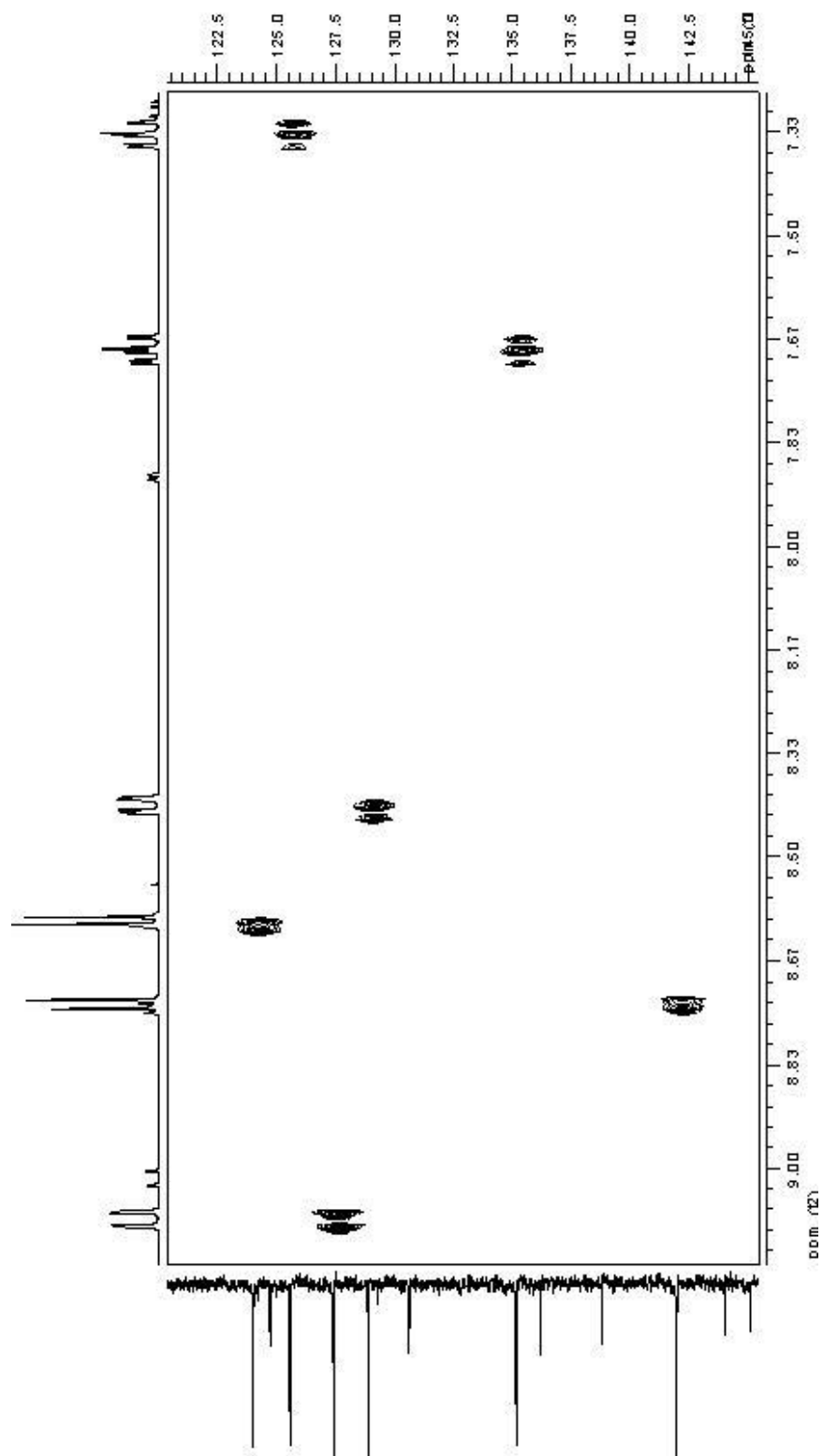
Anexo 12. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) da amostra GB1.



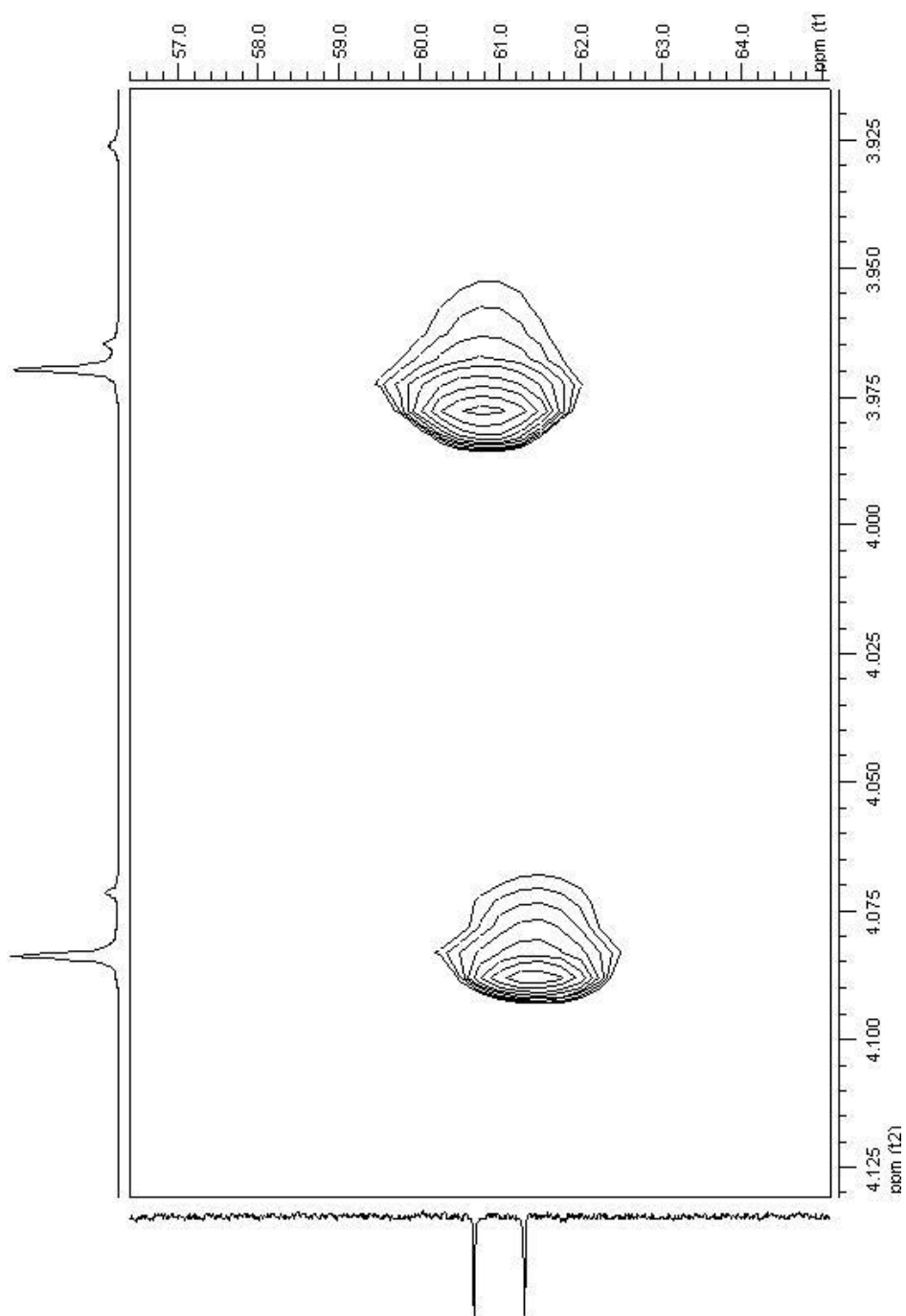
Anexo 13. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) da amostra GB1 – ampliação.



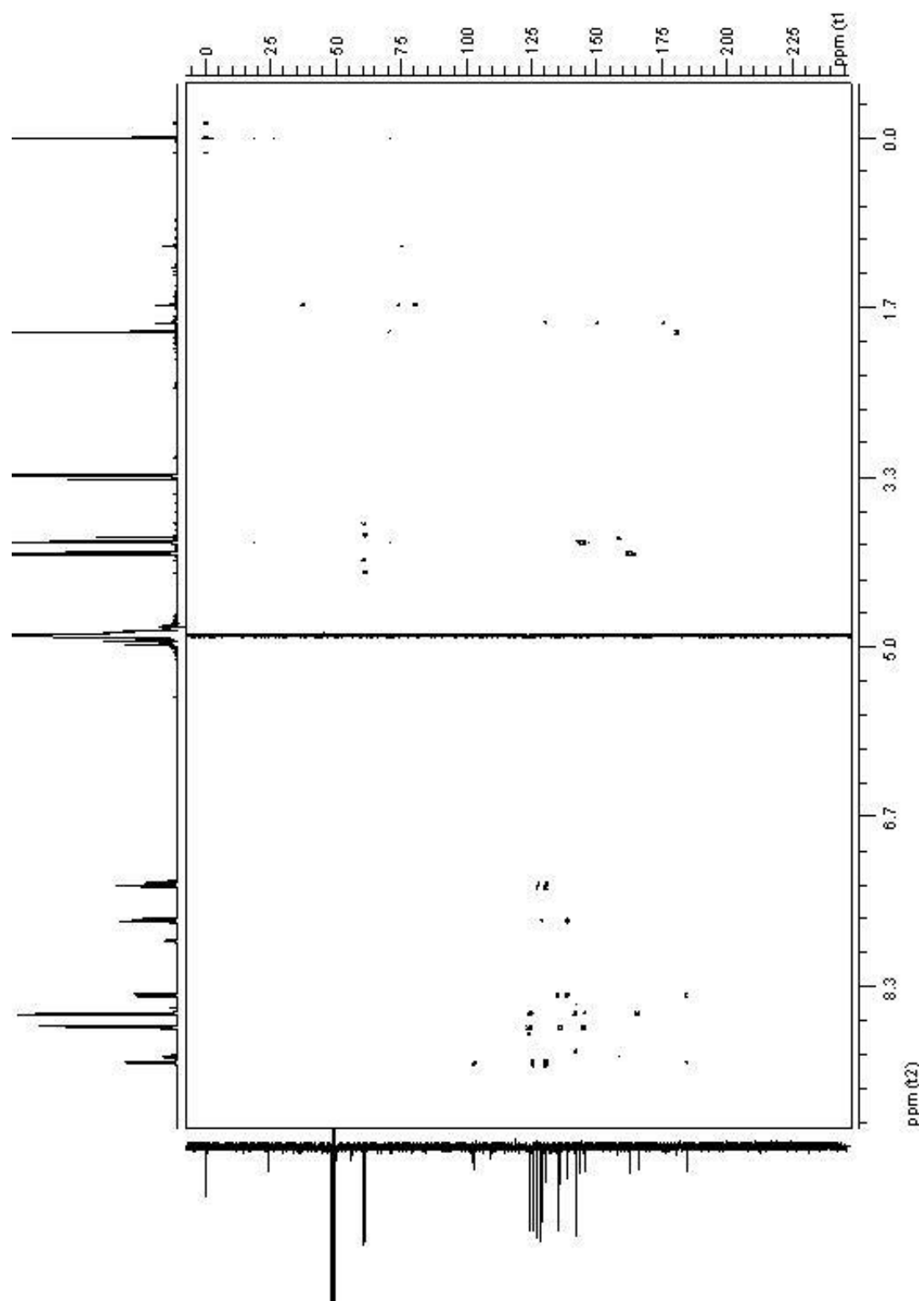
Anexo 14. Espectro HSQC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CD_3OD) da amostra GB1.



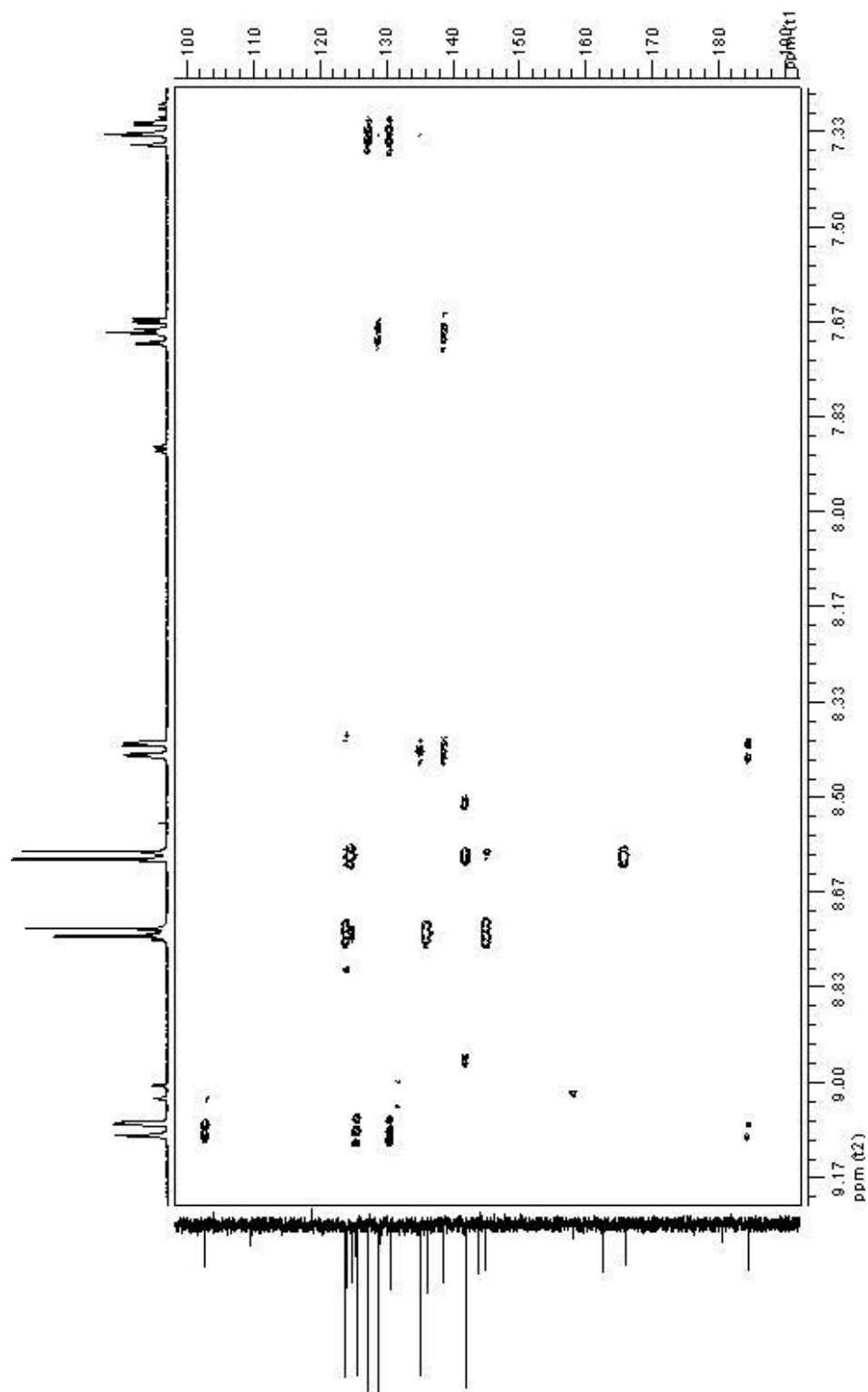
Anexo 15. Espectro HSQC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CD_3OD) da amostra GB1 – ampliação.



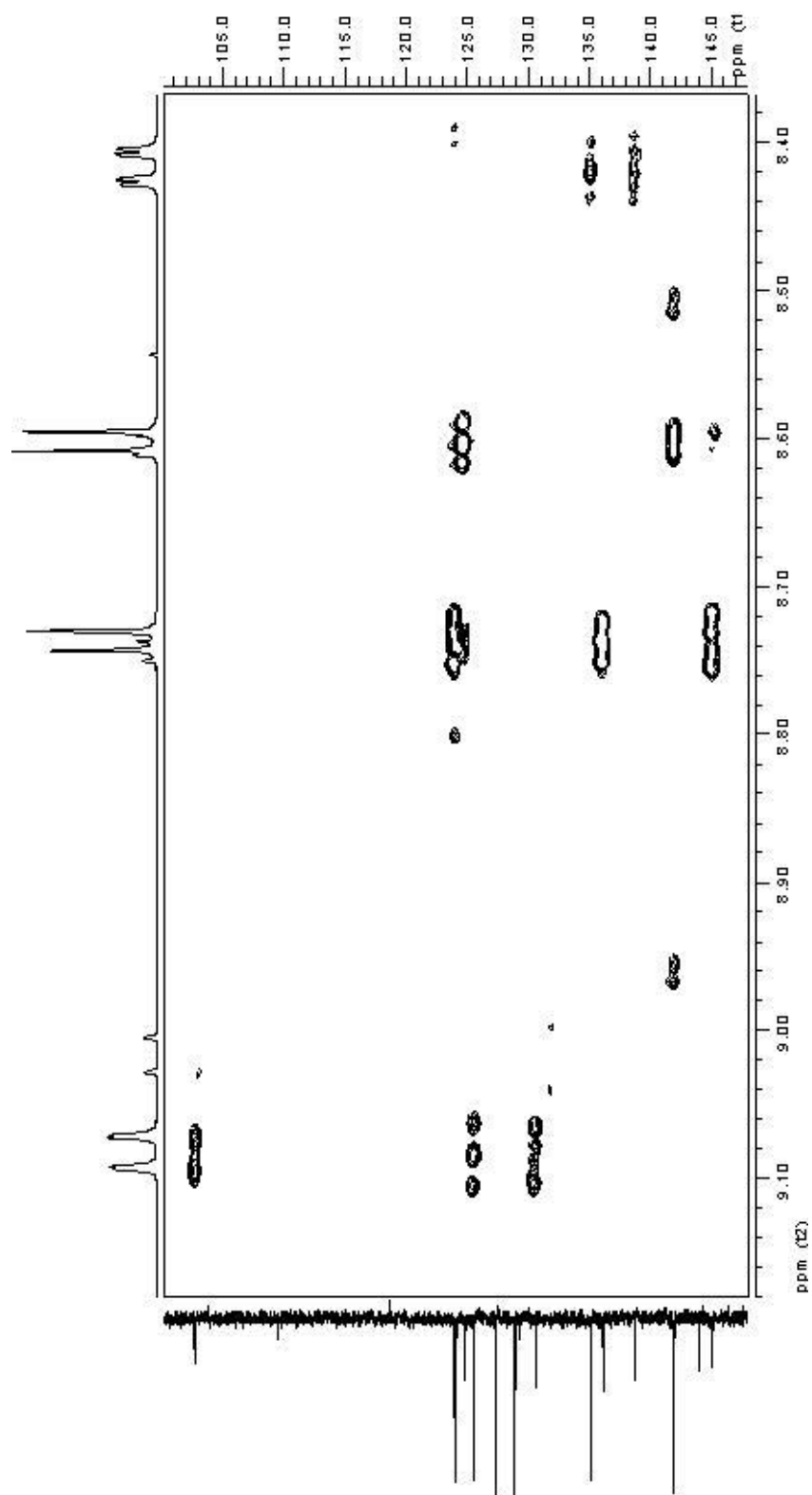
Anexo 16. Espectro HSQC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CD_3OD) da amostra GB1 – ampliação.



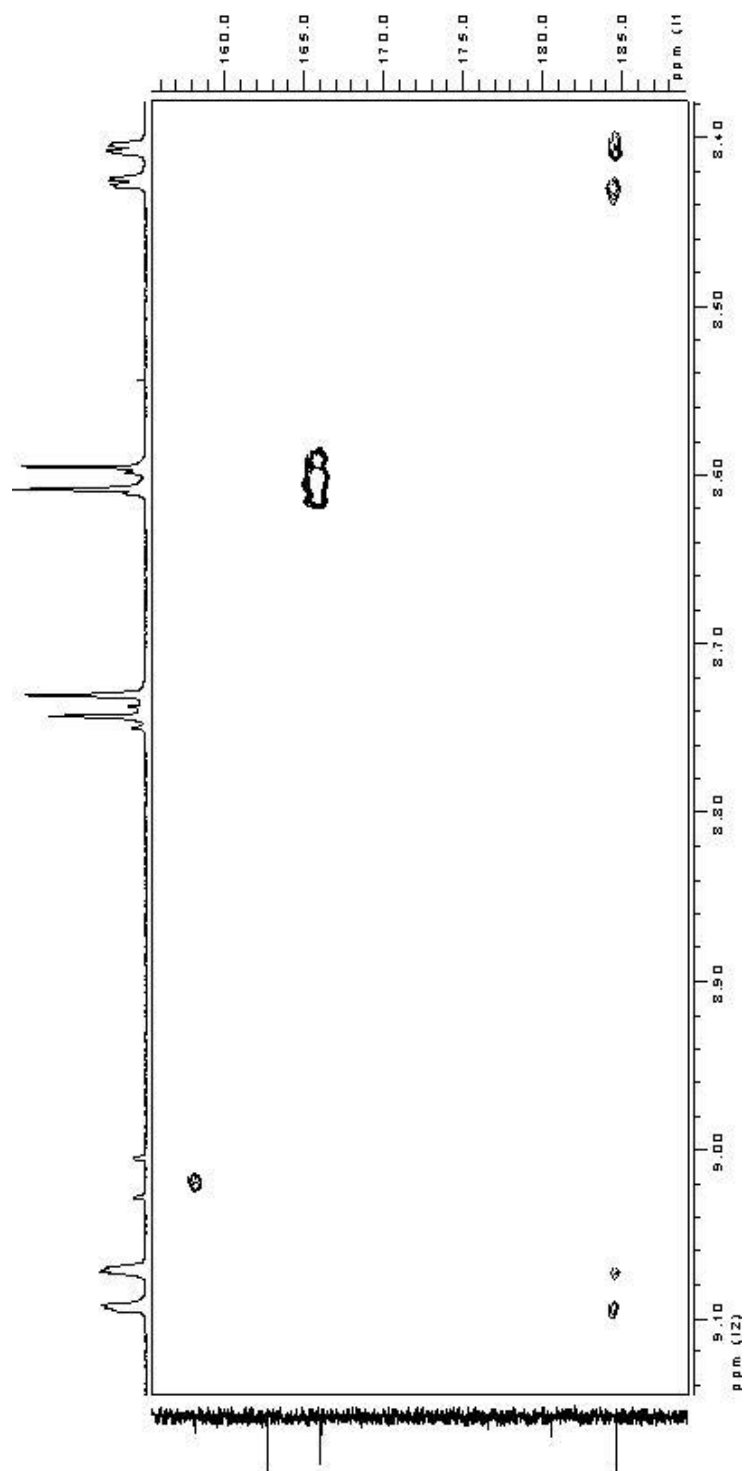
Anexo 17. Espectro HMBC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CD_3OD) da amostra GB1.



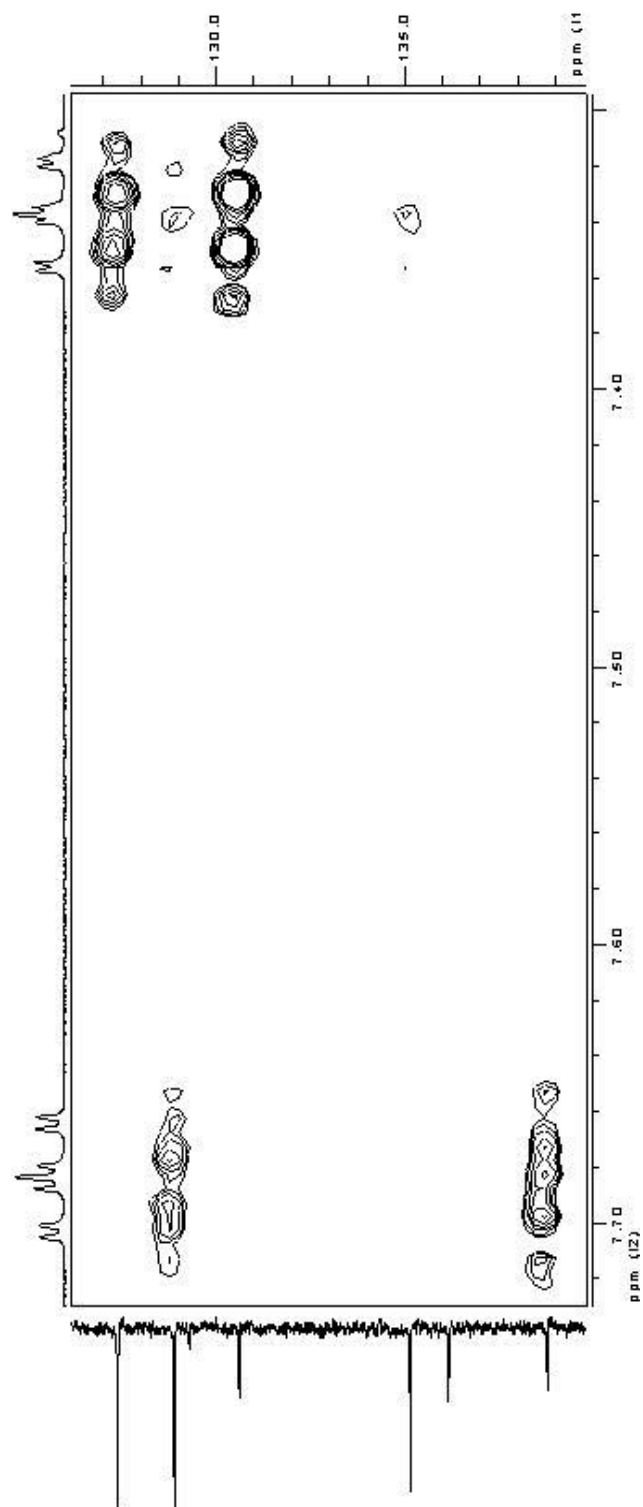
Anexo 18. Espectro HMBC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CD_3OD) da amostra GB1 – ampliação.



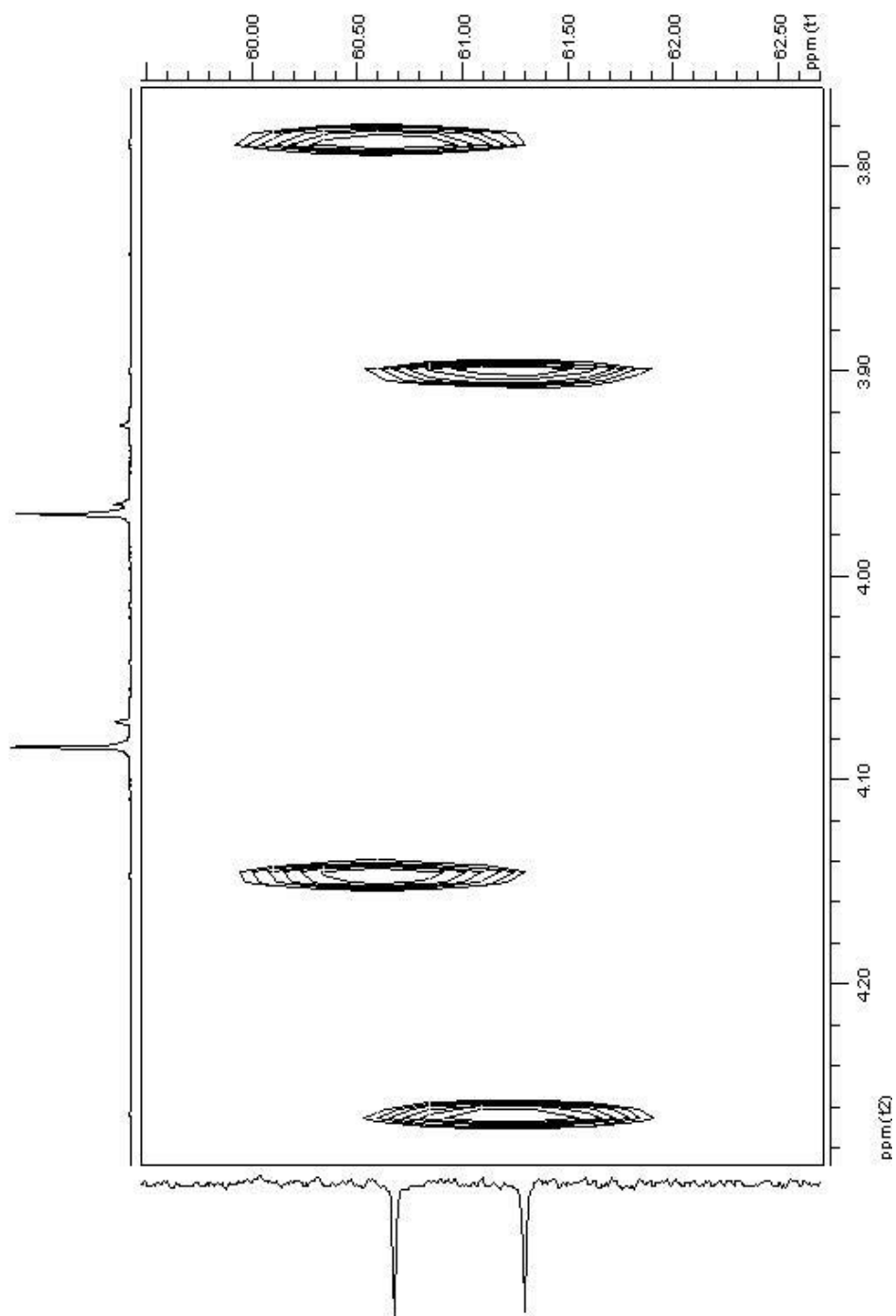
Anexo 19. Espectro HMBC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CD_3OD) da amostra GB1 – ampliação.



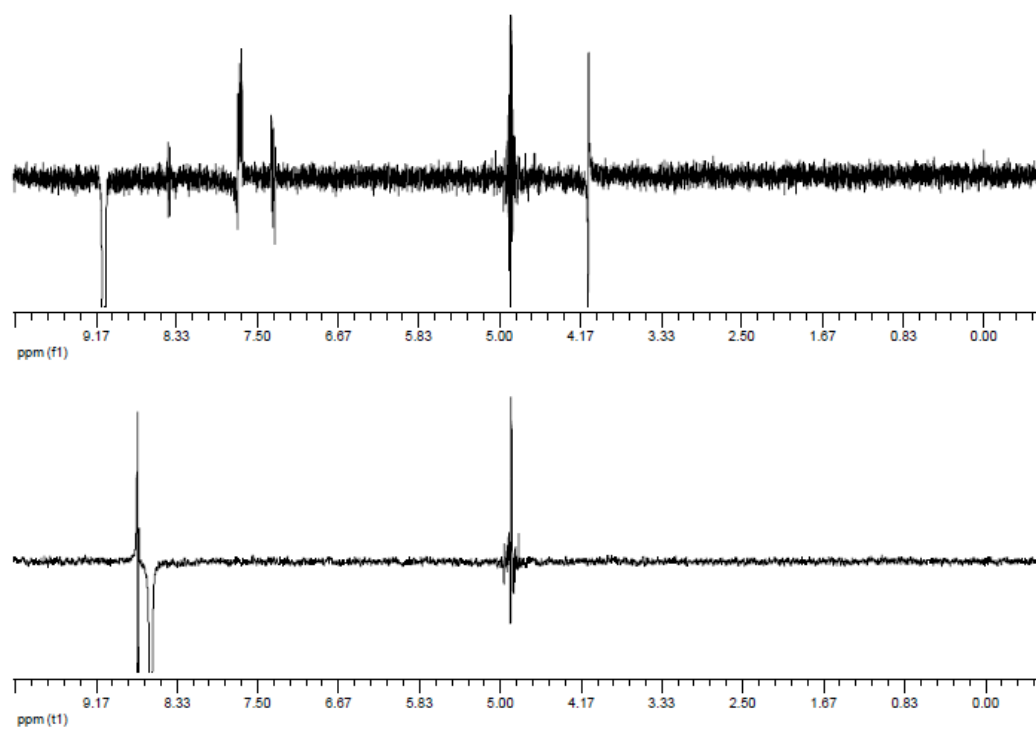
Anexo 20. Espectro HMBC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CD_3OD) da amostra GB1 – ampliação.



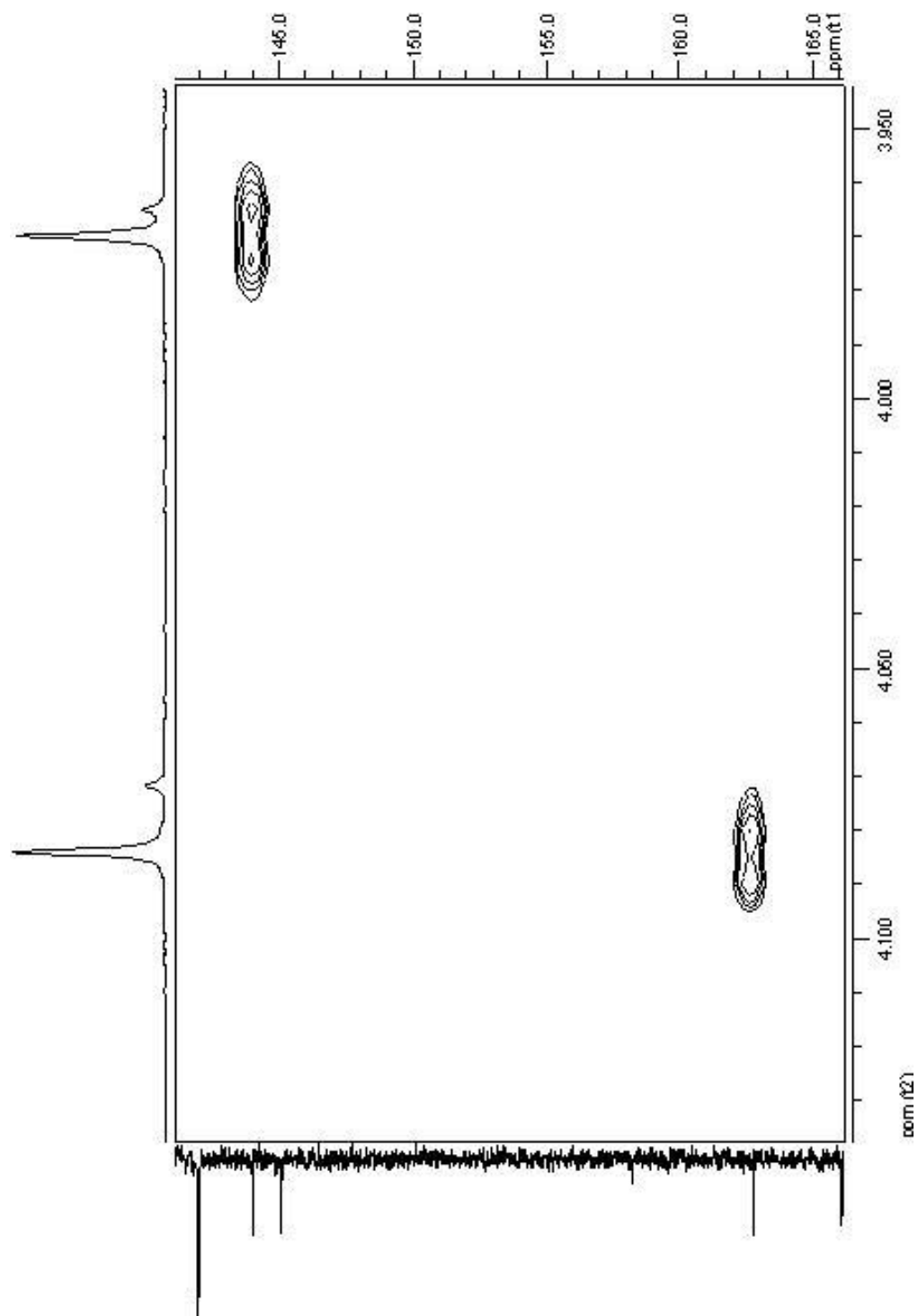
Anexo 21. Espectro HMBC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CD_3OD) da amostra GB1 – ampliação.



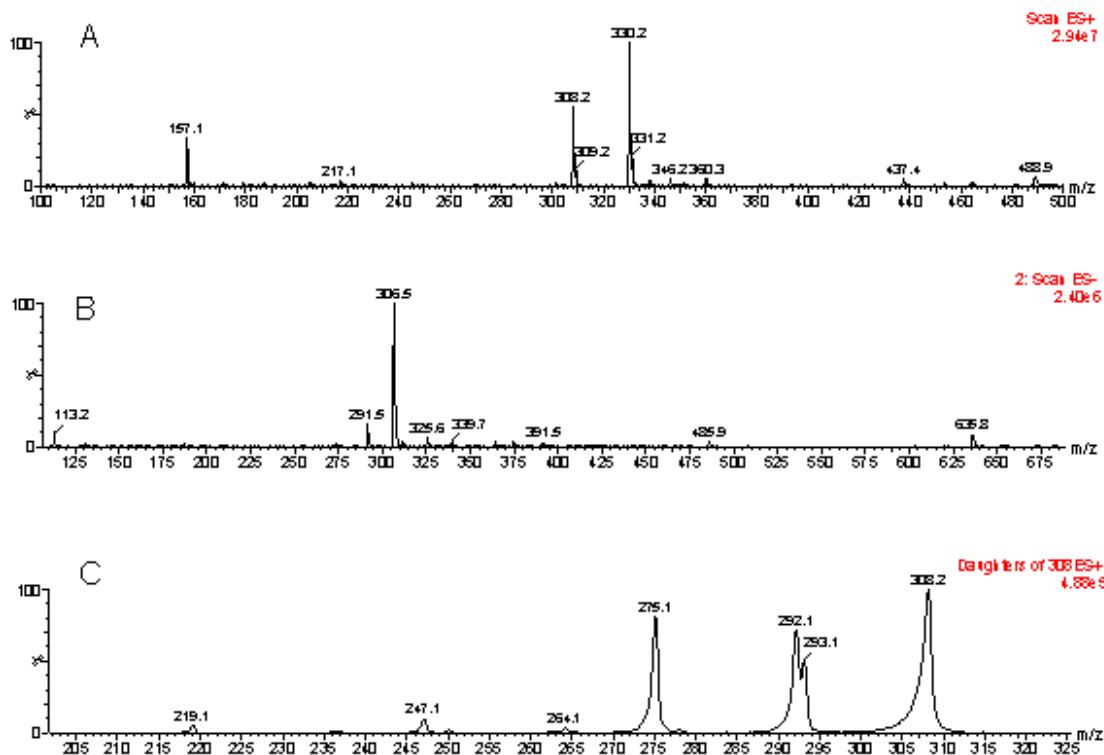
Anexo 22. Espectro HMBC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CD_3OD) da amostra GB1 – ampliação.



Anexo 23. Experimentos NOE 1D (400 MHz, CD₃OD) de GB1.

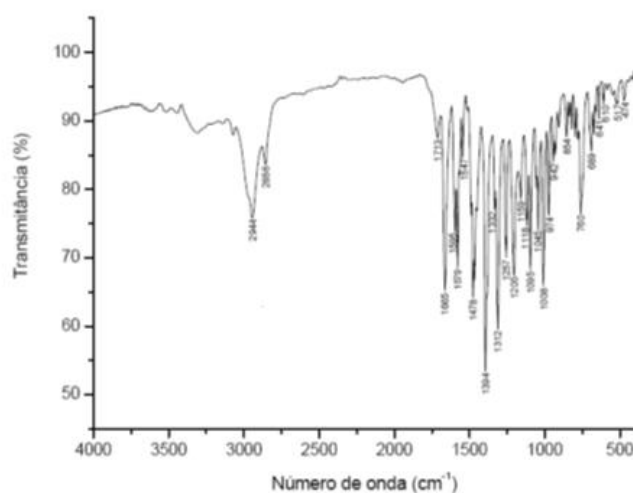


Anexo 24. Espectro HMBC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CD_3OD) da amostra GB1 – ampliação.

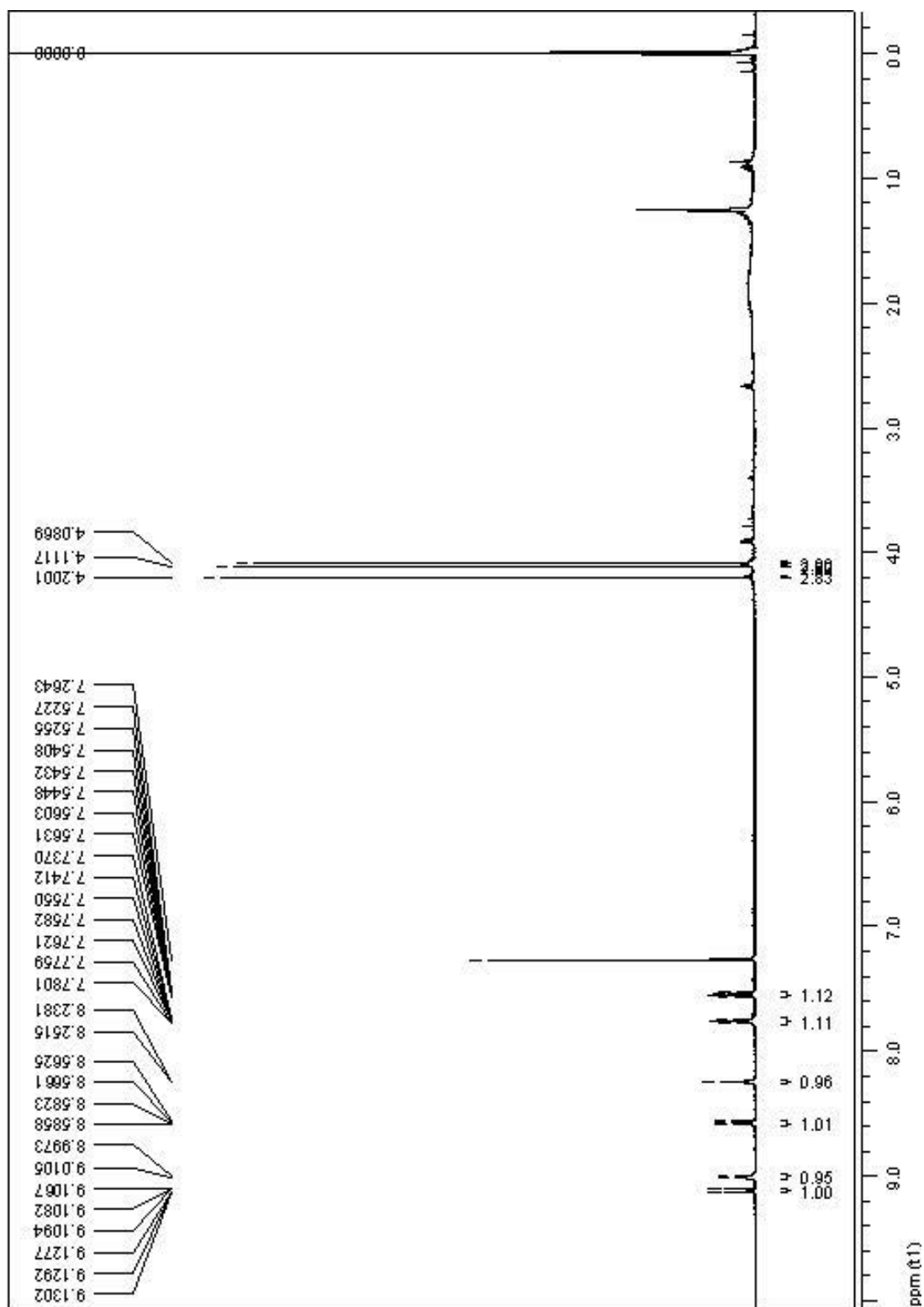


Anexo 25. Espectro de massa ESI-MS, modo positivo (A) e negativo (B) 15 eV da amostra GB1 em metanol. Espectro MS/MS do m/z 308,2 em modo positivo, 15 eV em metanol (C).

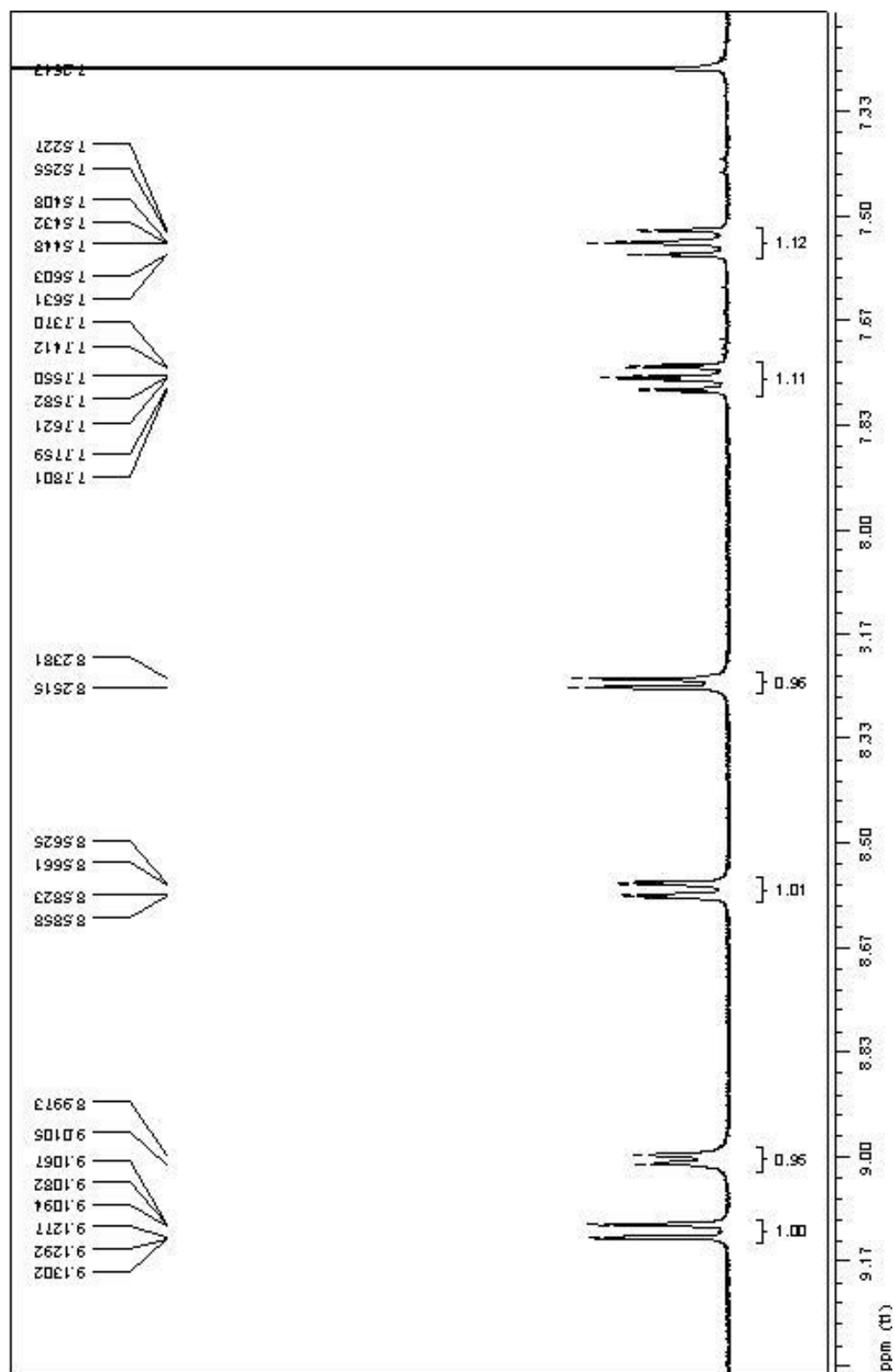
4. Substância GB2- O-metilmoschatolina



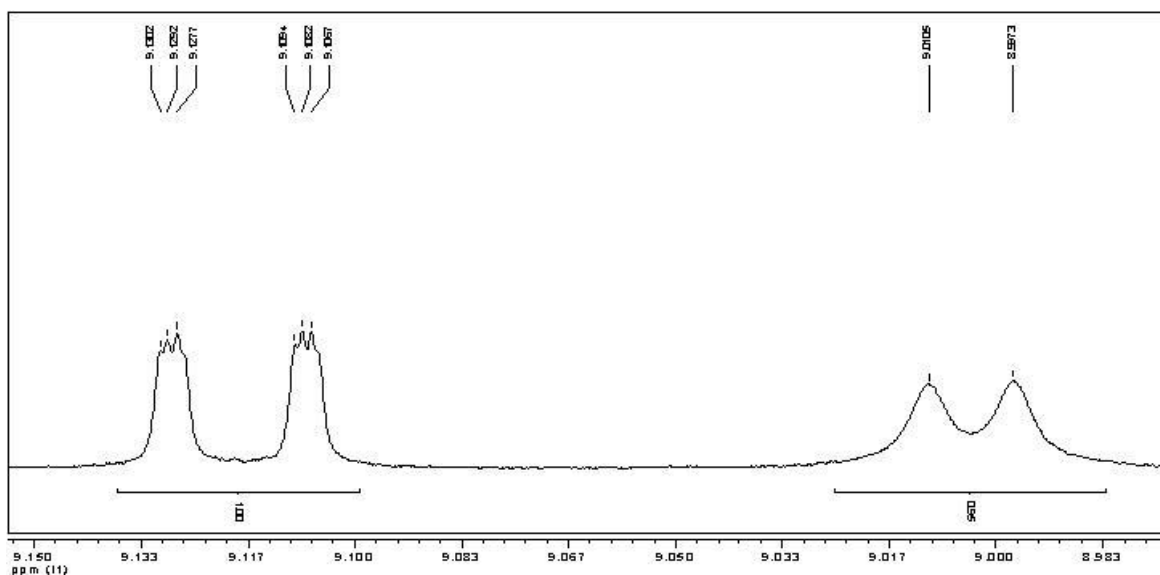
Anexo 26. Espectro de absorção na região do IV (Filme, CHCl_3) de GB2



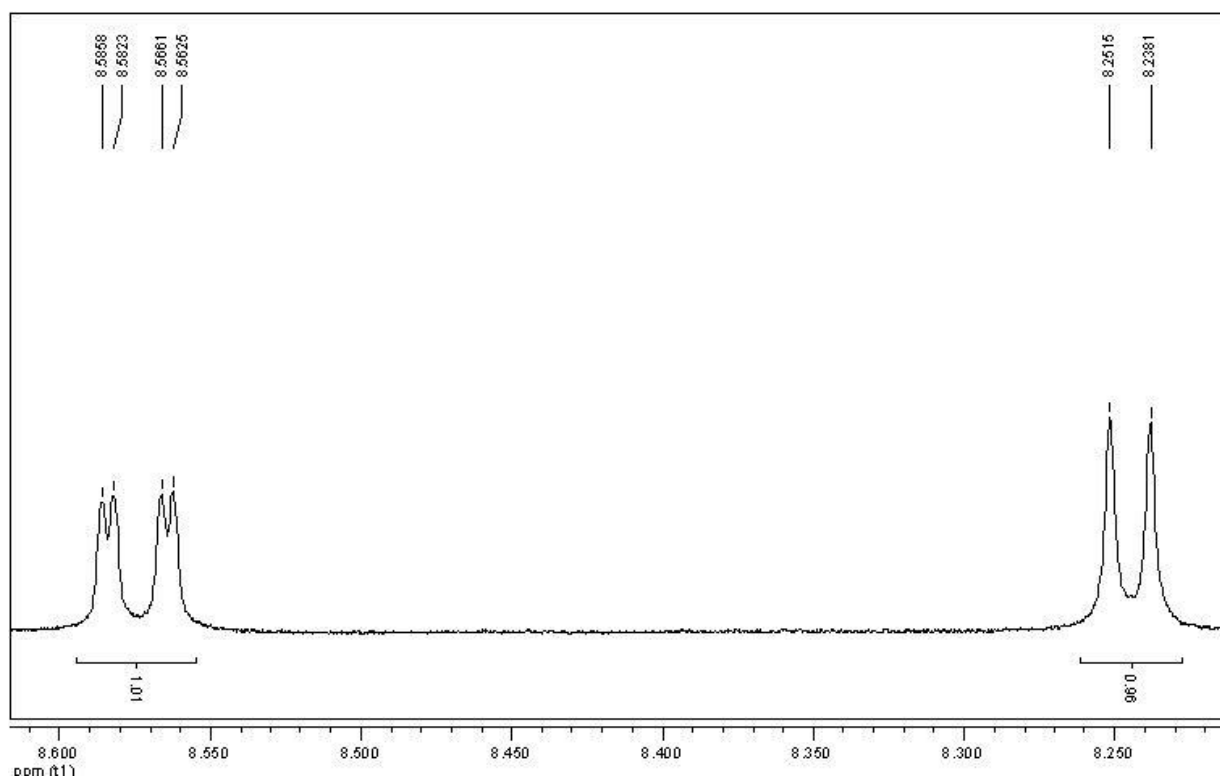
Anexo 27. Espectro de RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) da amostra GB2.



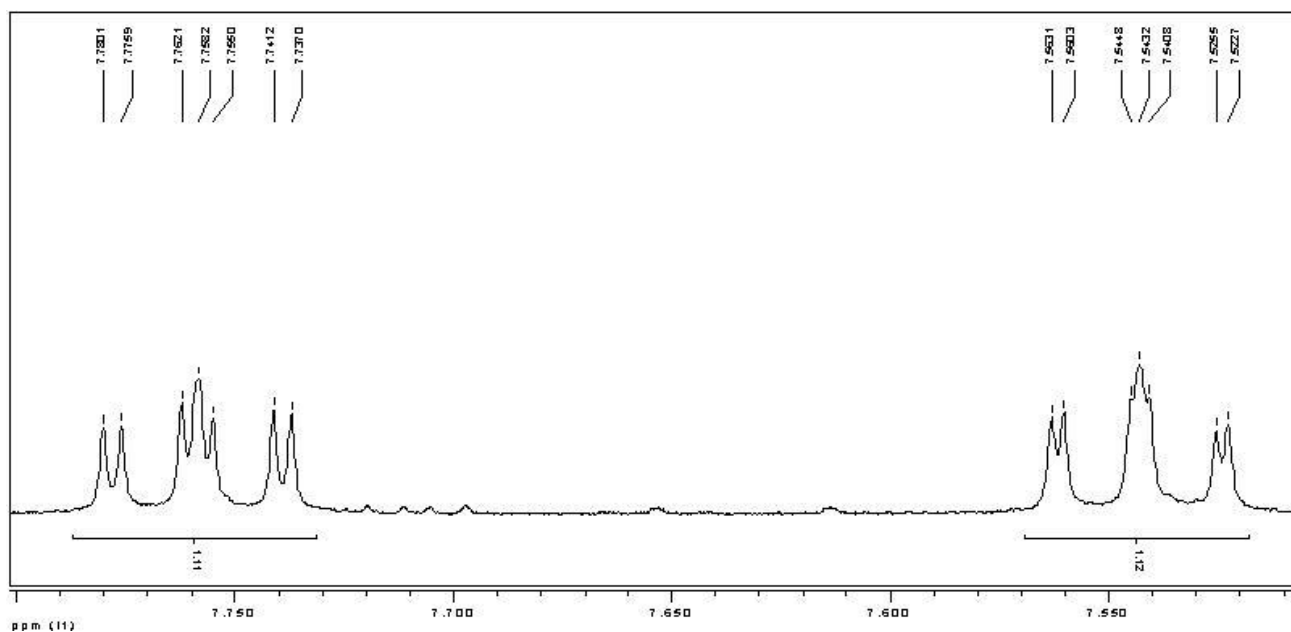
Anexo 28. Espectro de RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) da amostra GB2 – ampliação.



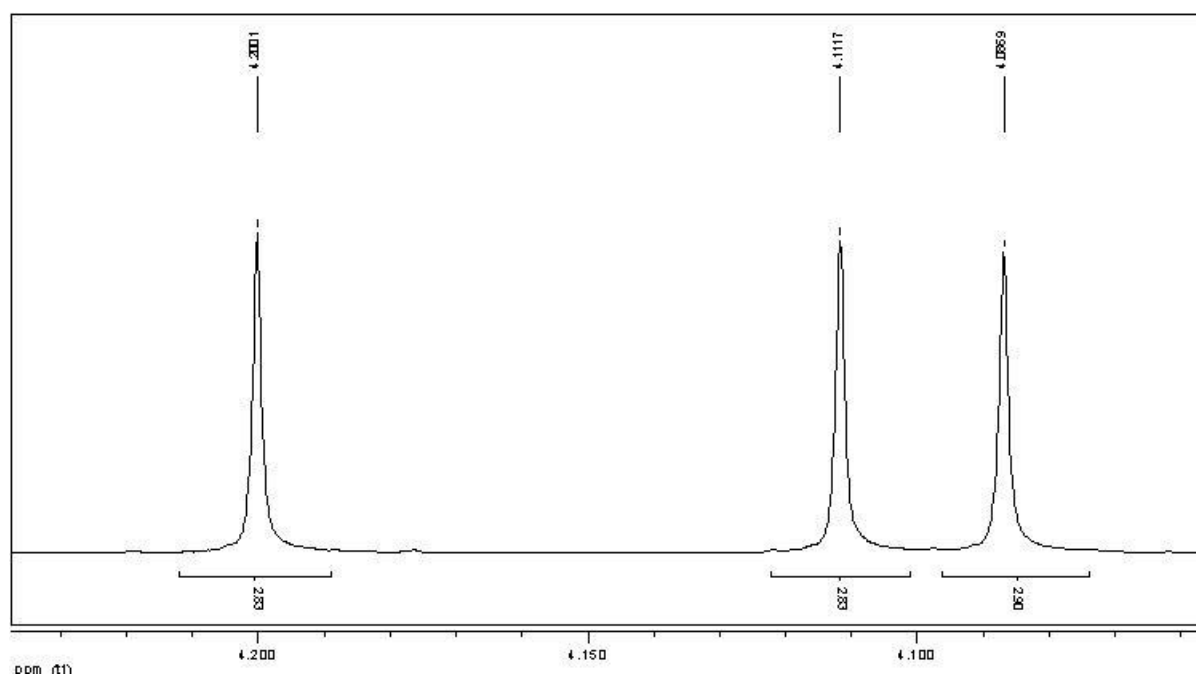
Anexo 29. Espectro de RMN ¹H (400MHz, CDCl₃) da amostra GB2 – ampliação.



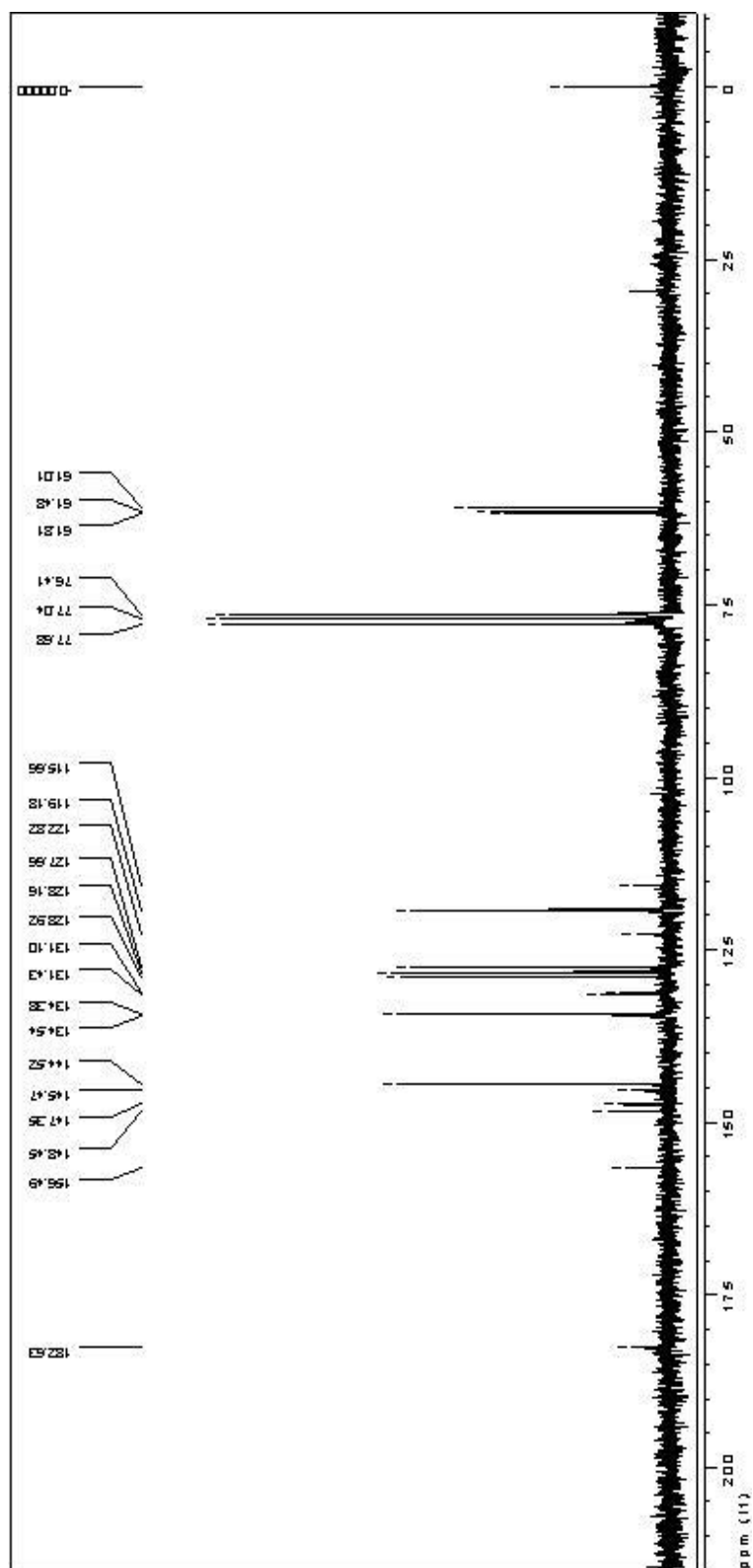
Anexo 30. Espectro de RMN ¹H (400MHz, CDCl₃) da amostra GB2 – ampliação.



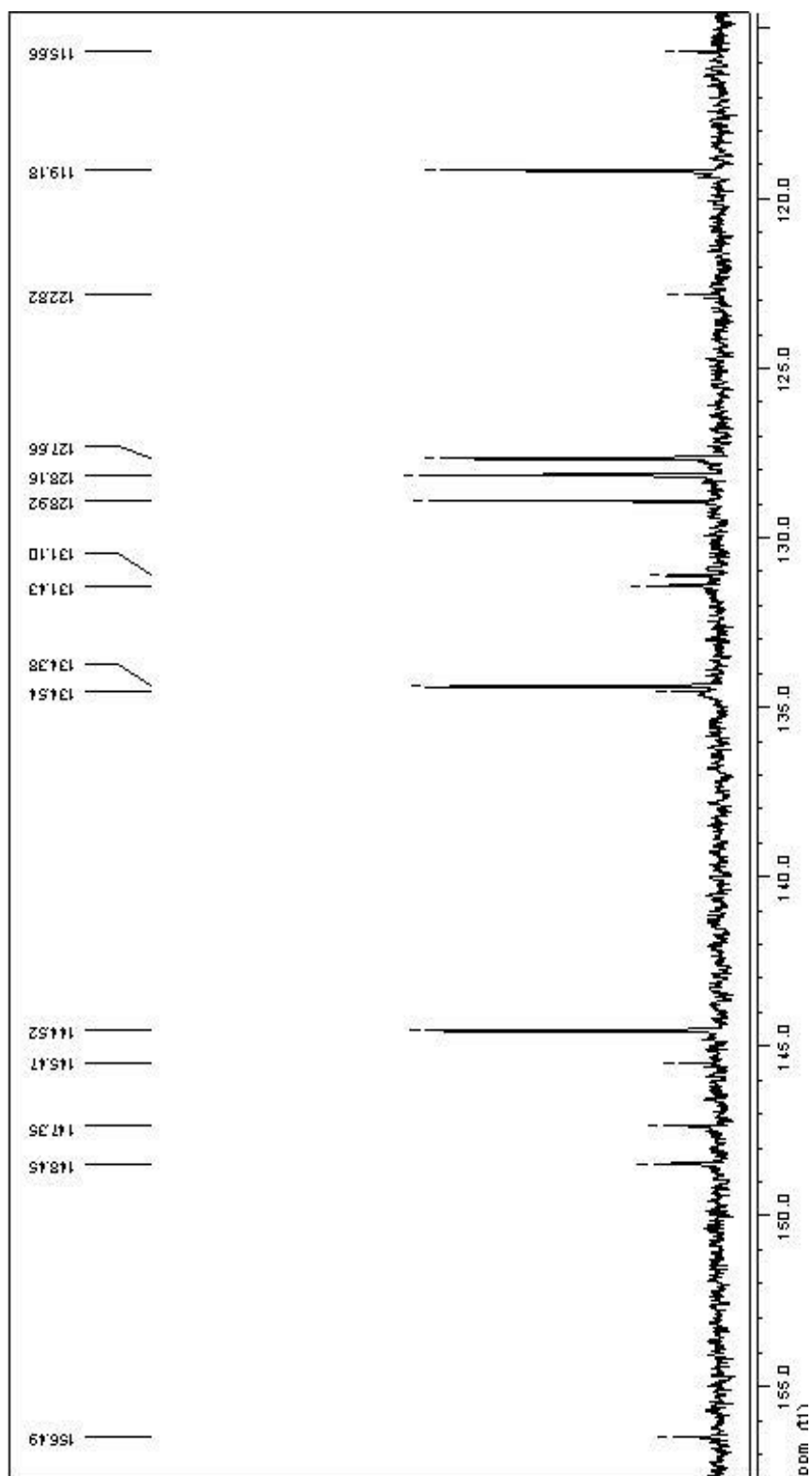
Anexo 31. Espectro de RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) da amostra GB2 – ampliação.



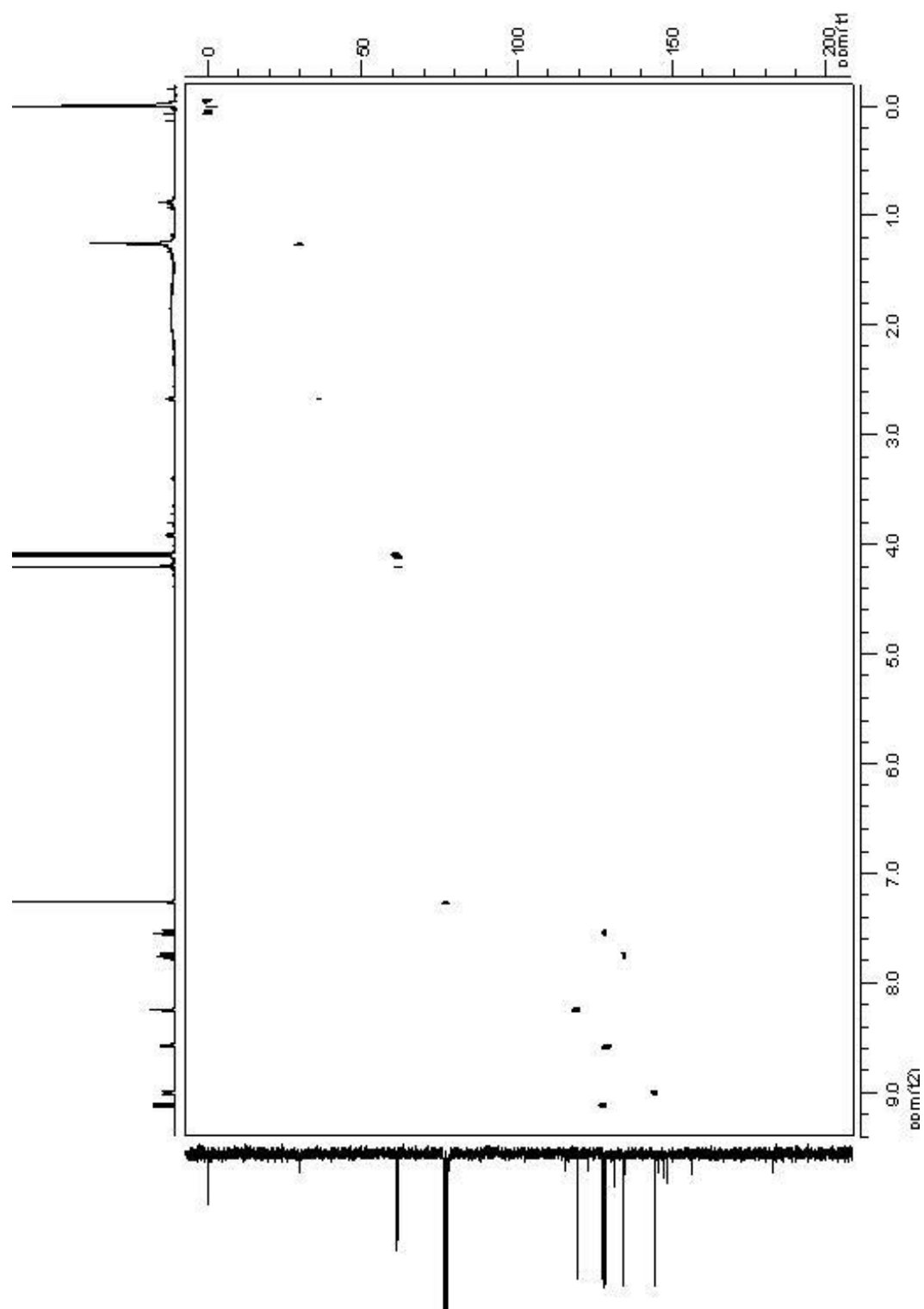
Anexo 32. Espectro de RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) da amostra GB2 – ampliação.



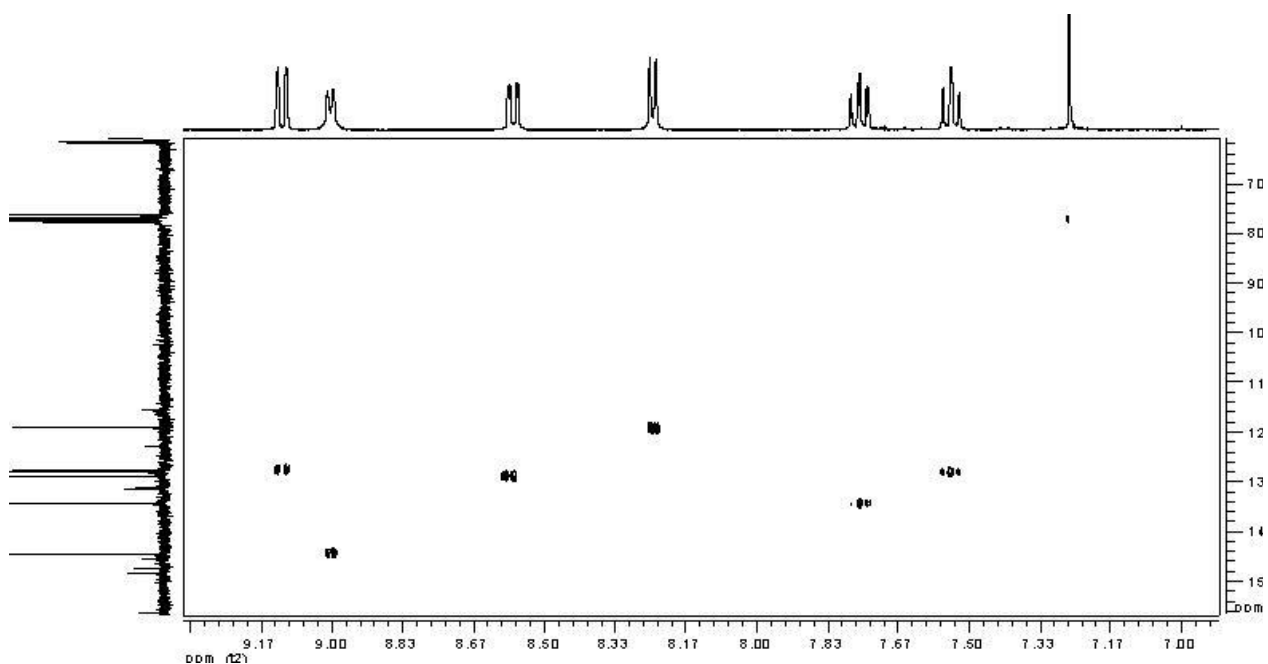
Anexo 33. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da amostra GB2.



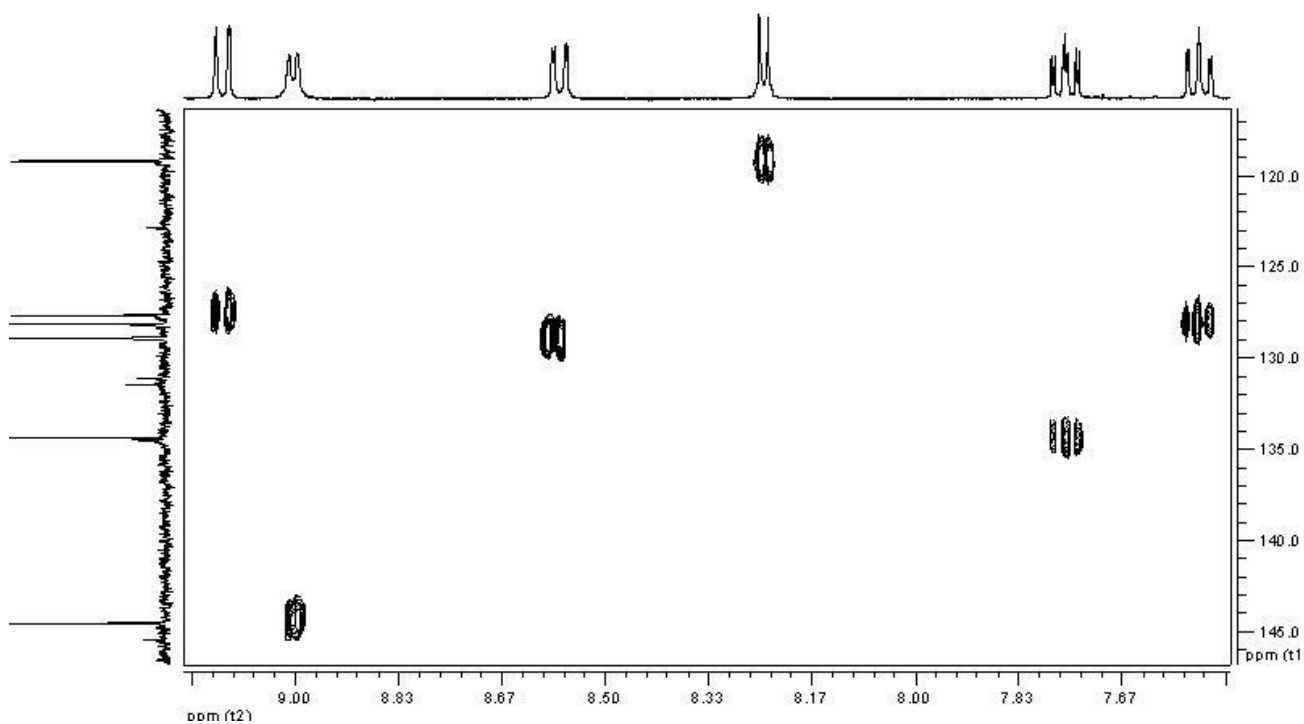
Anexo 34. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da amostra GB2– ampliação.



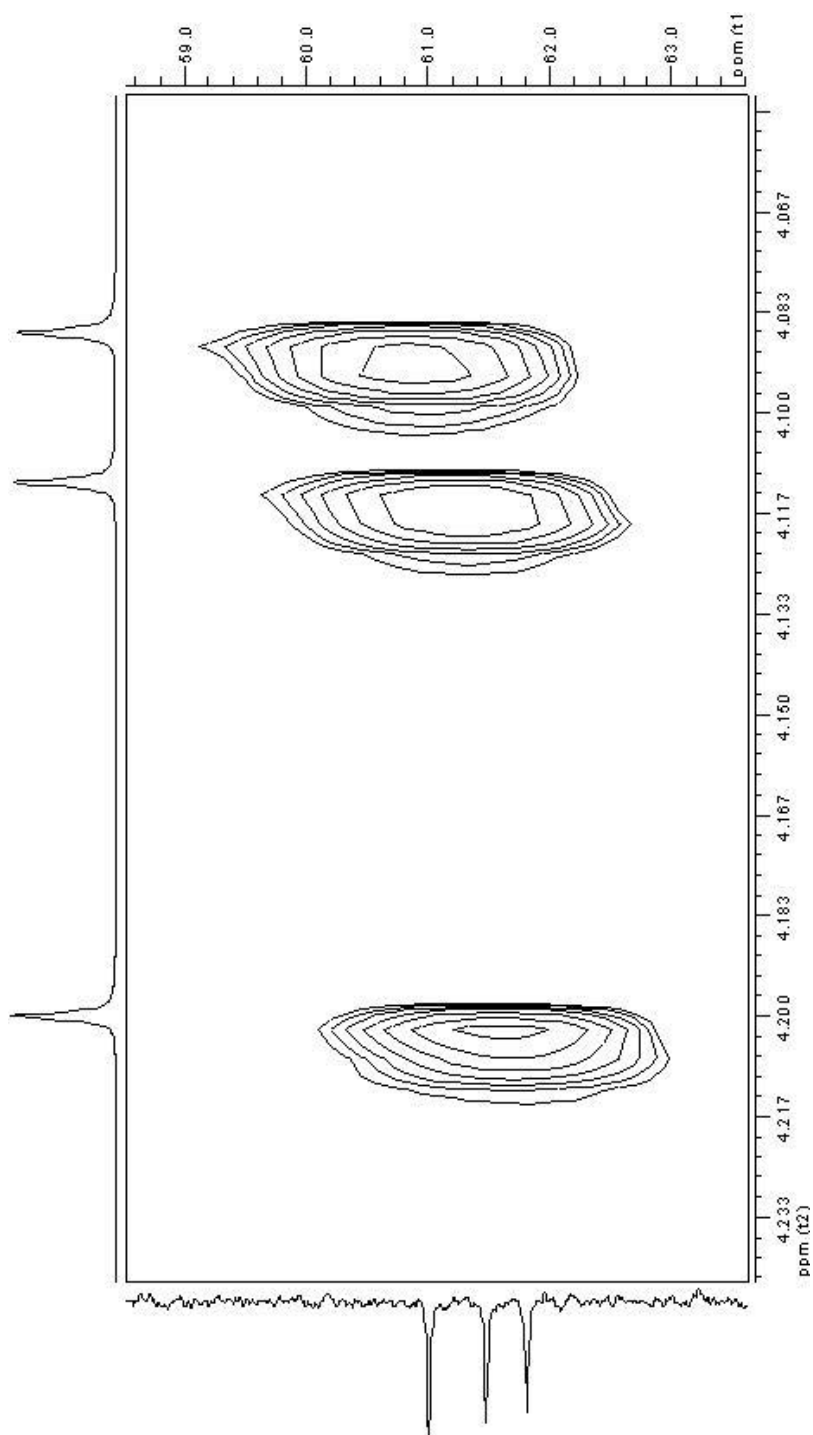
Anexo 35. Espectro HSQC (400 MHz para H^1 e 100 MHz para C^{13} , CDCl_3) da amostra GB2.



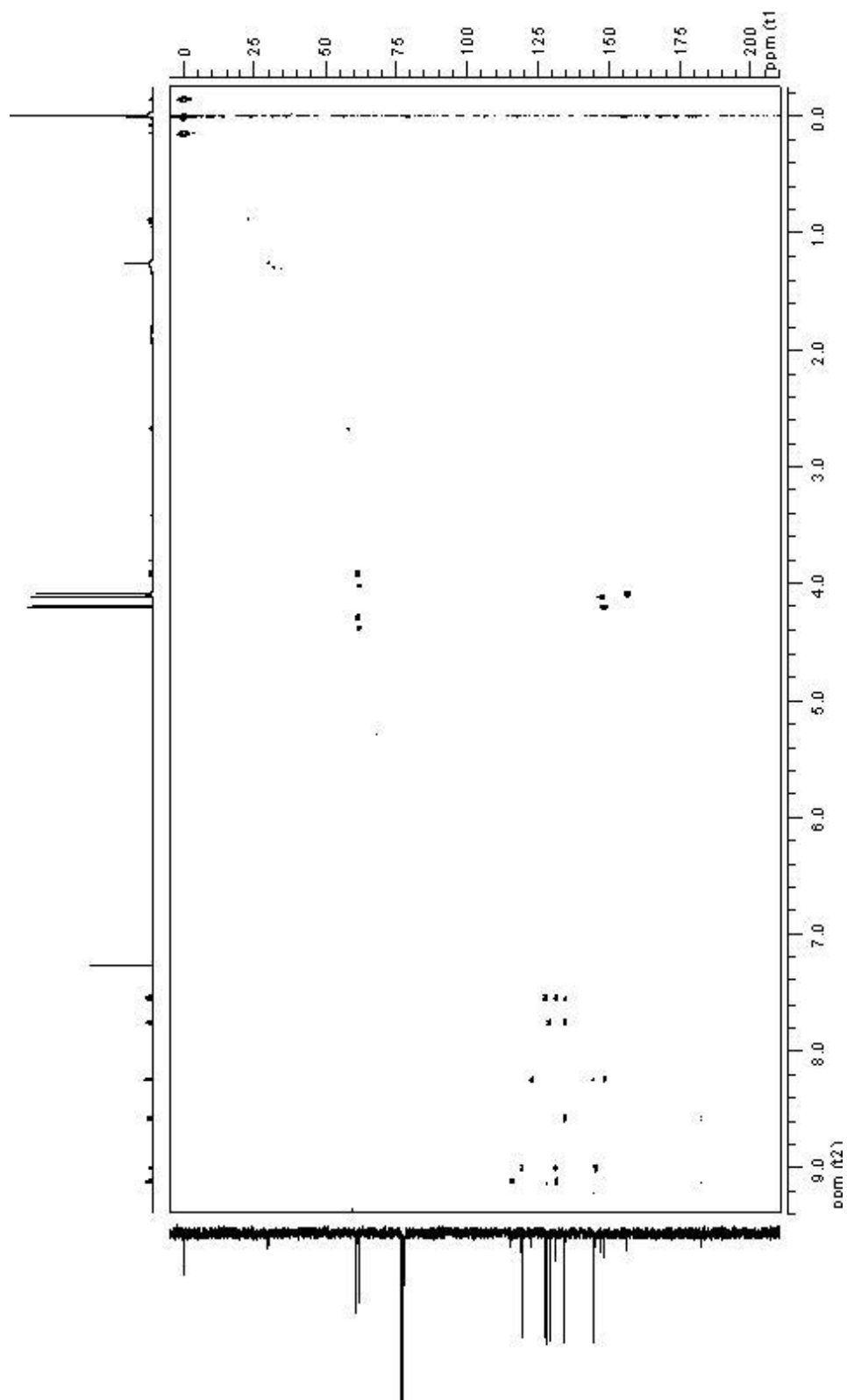
Anexo 36. Espectro HSQC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CDCl_3) da amostra GB2—ampliação.



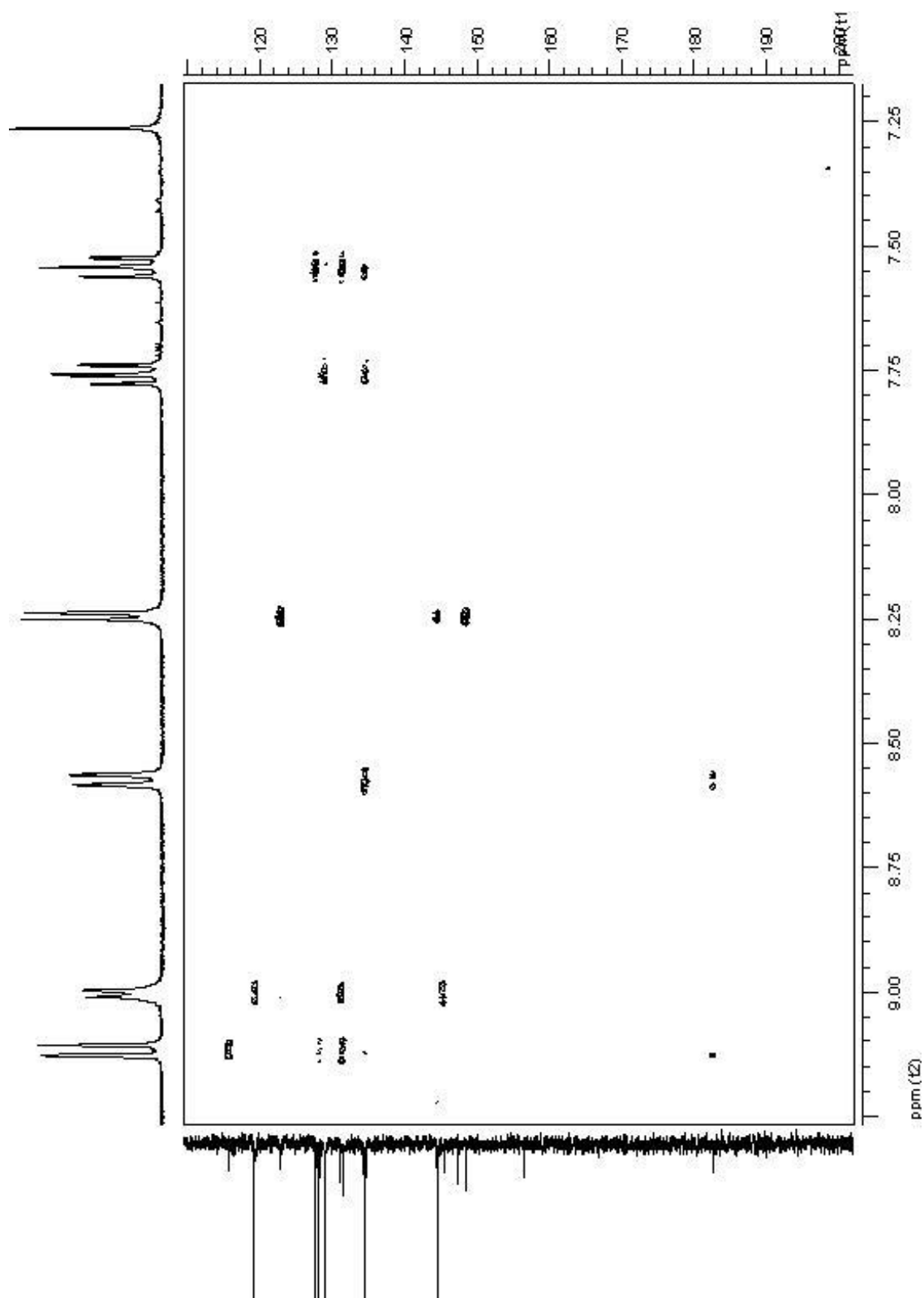
Anexo 37. Espectro HSQC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CDCl_3) da amostra GB2—ampliação.



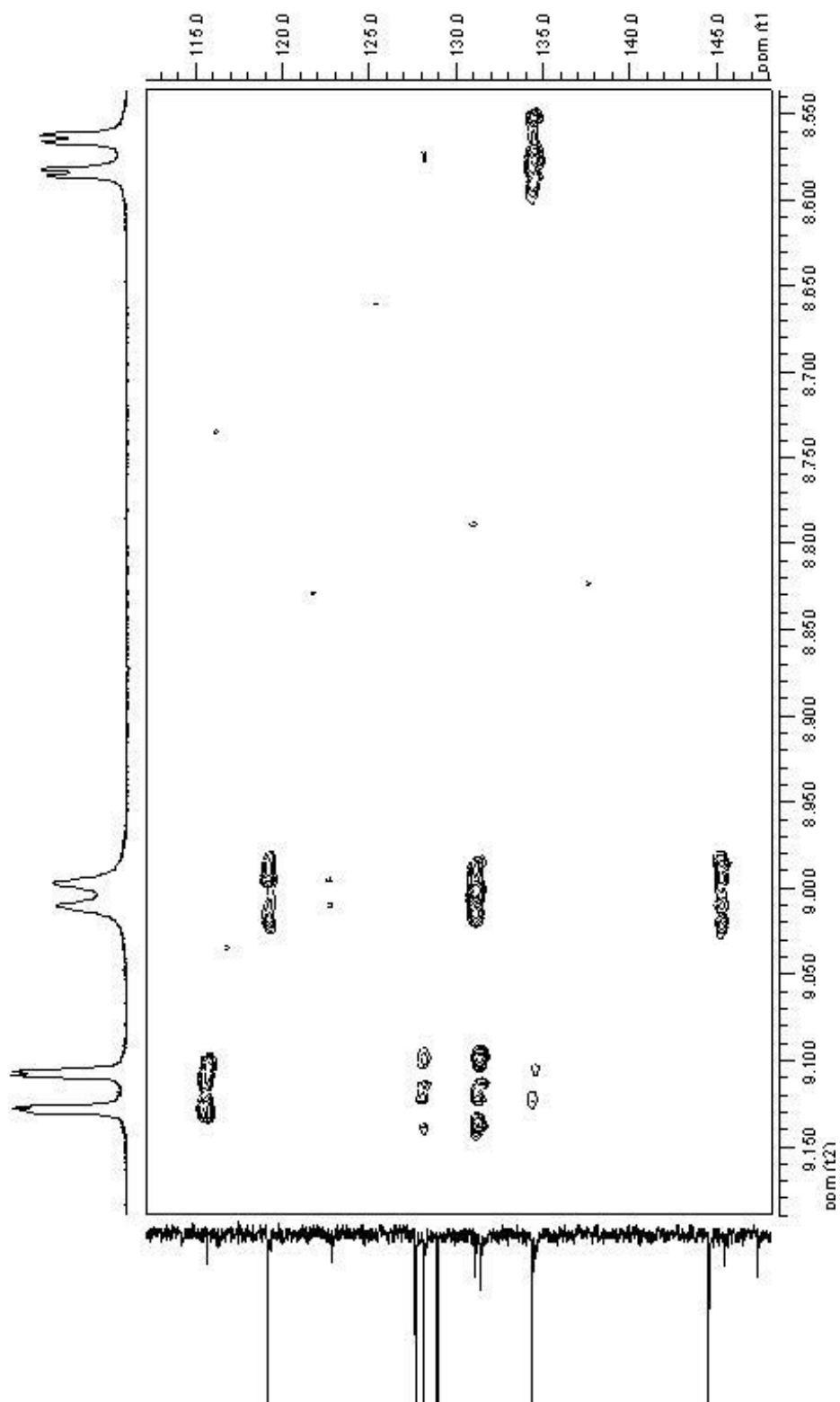
Anexo 38. Espectro HSQC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CDCl_3) da amostra GB2—ampliação.



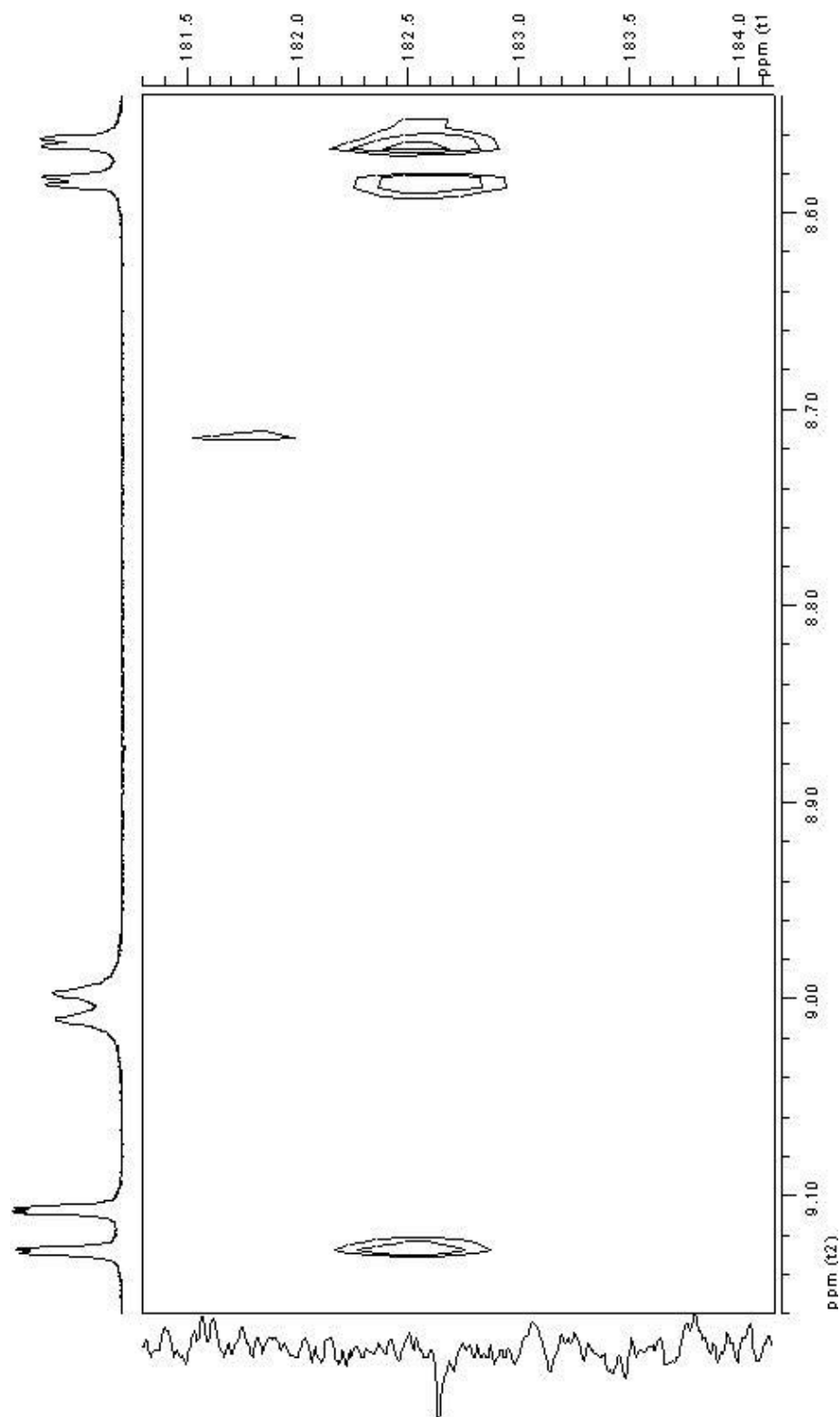
Anexo 39. Espectro HMBC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CDCl_3) da amostra GB2.



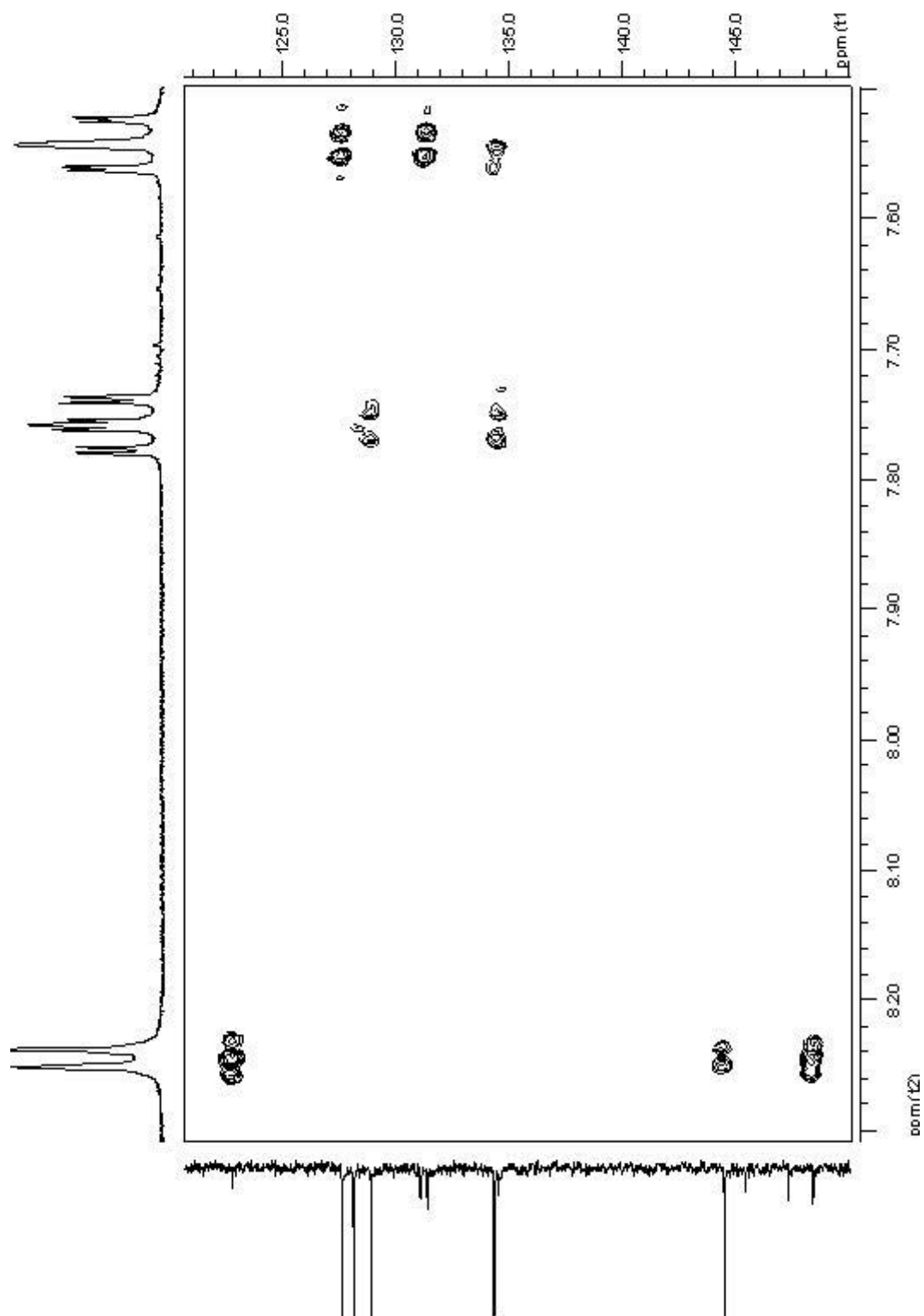
Anexo 40. Espectro HMBC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CDCl_3) da amostra GB2 – ampliação.



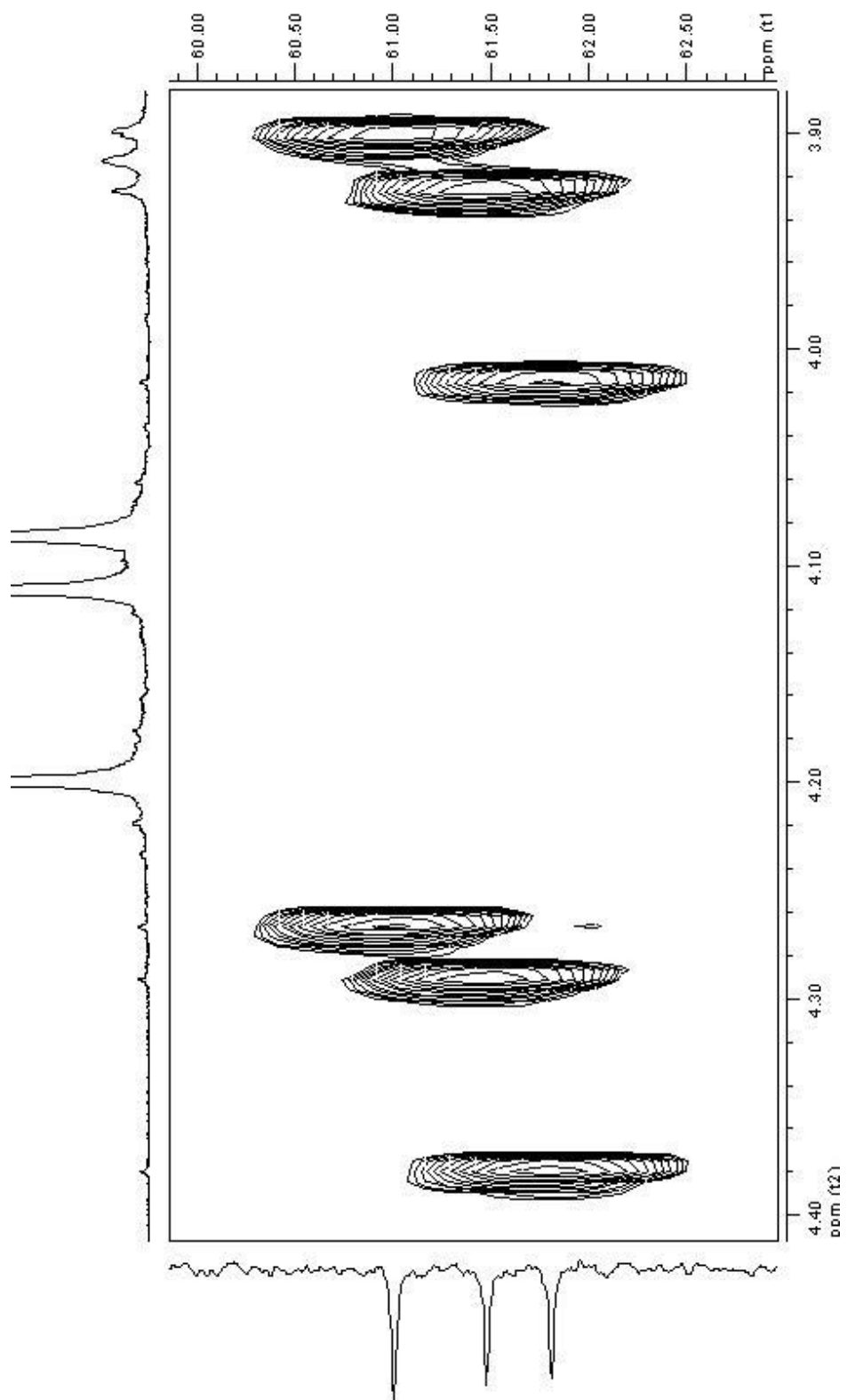
Anexo 41. Espectro HMBC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CDCl_3) da amostra GB2 – ampliação.



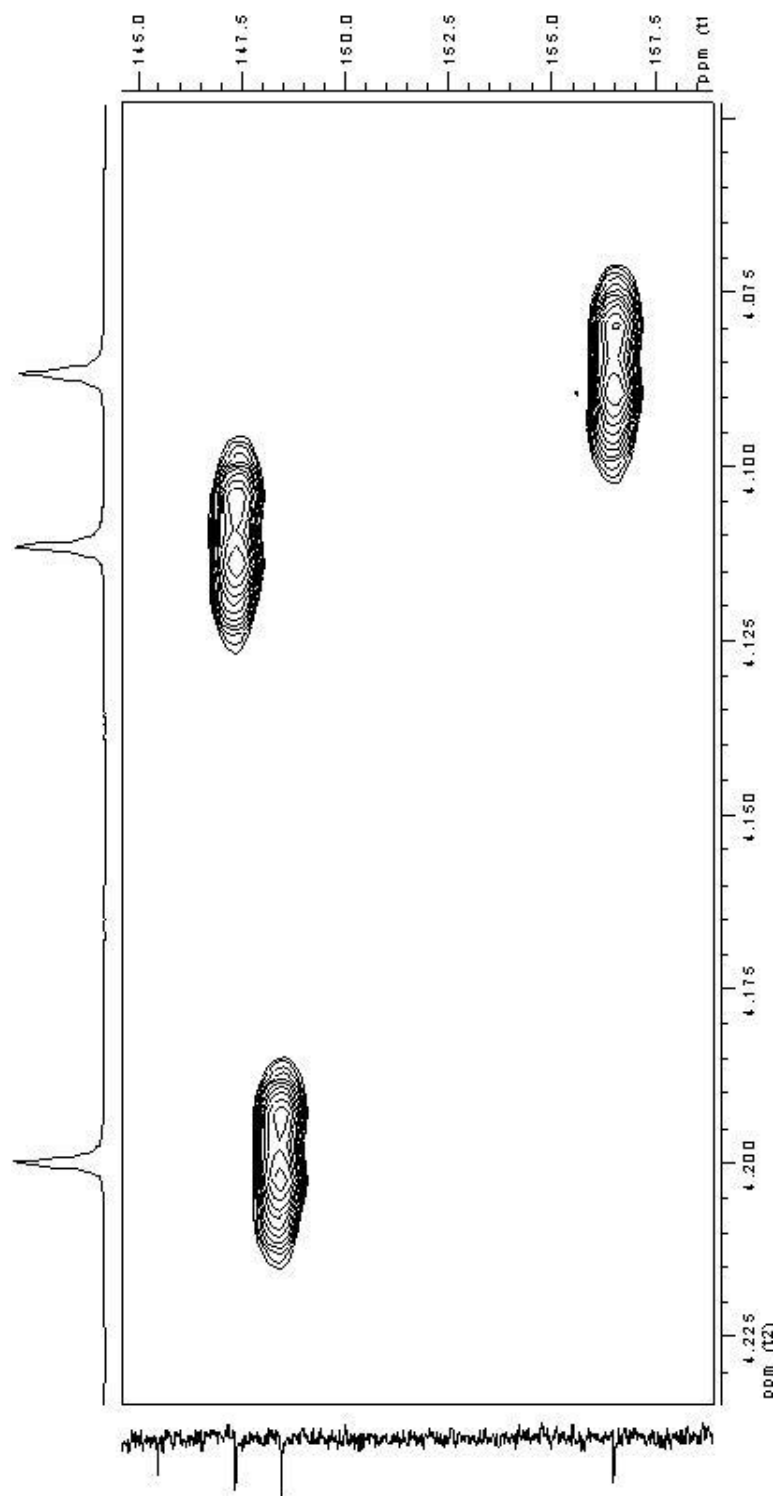
Anexo 42. Espectro HMBC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CDCl_3) da amostra GB2 – ampliação.



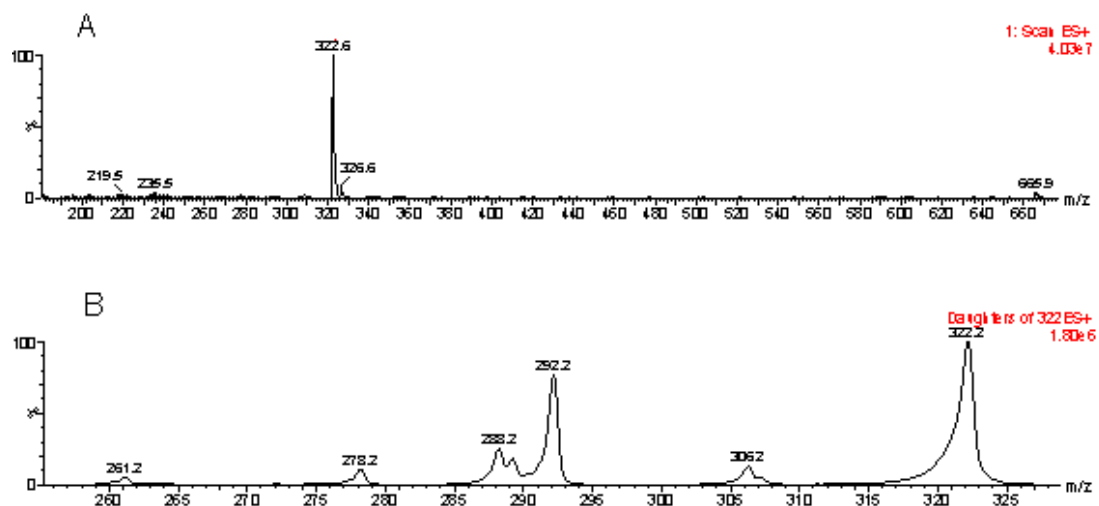
Anexo 43. Espectro HMBC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CDCl_3) da amostra GB2 – ampliação.



Anexo 44. Espectro HMBC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CDCl_3) da amostra GB2 – ampliação.

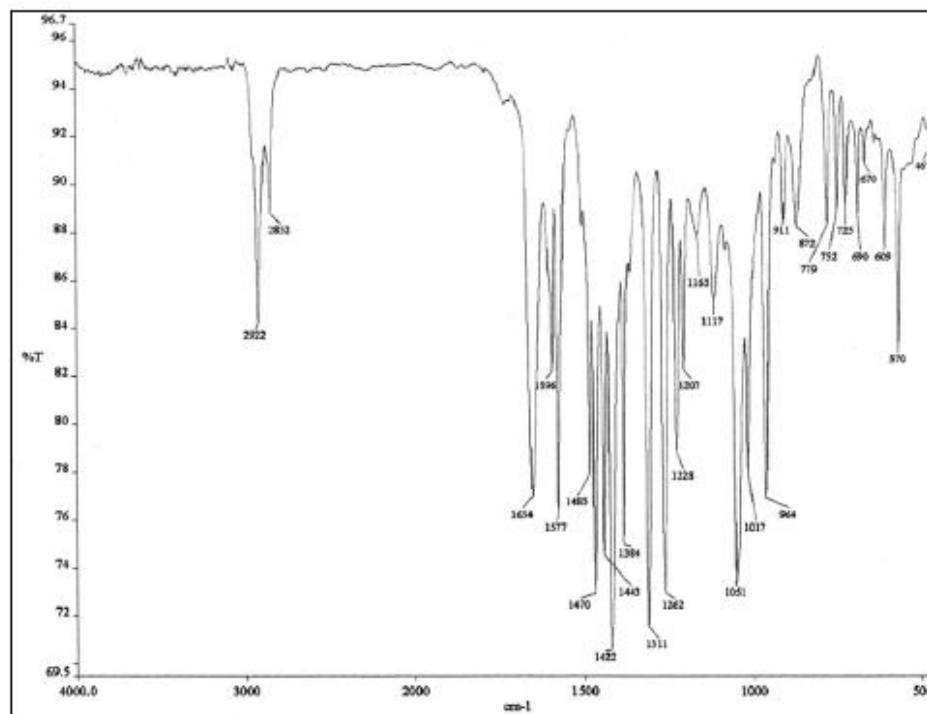


Anexo 45. Espectro HMBC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CDCl_3) da amostra GB2 – ampliação.

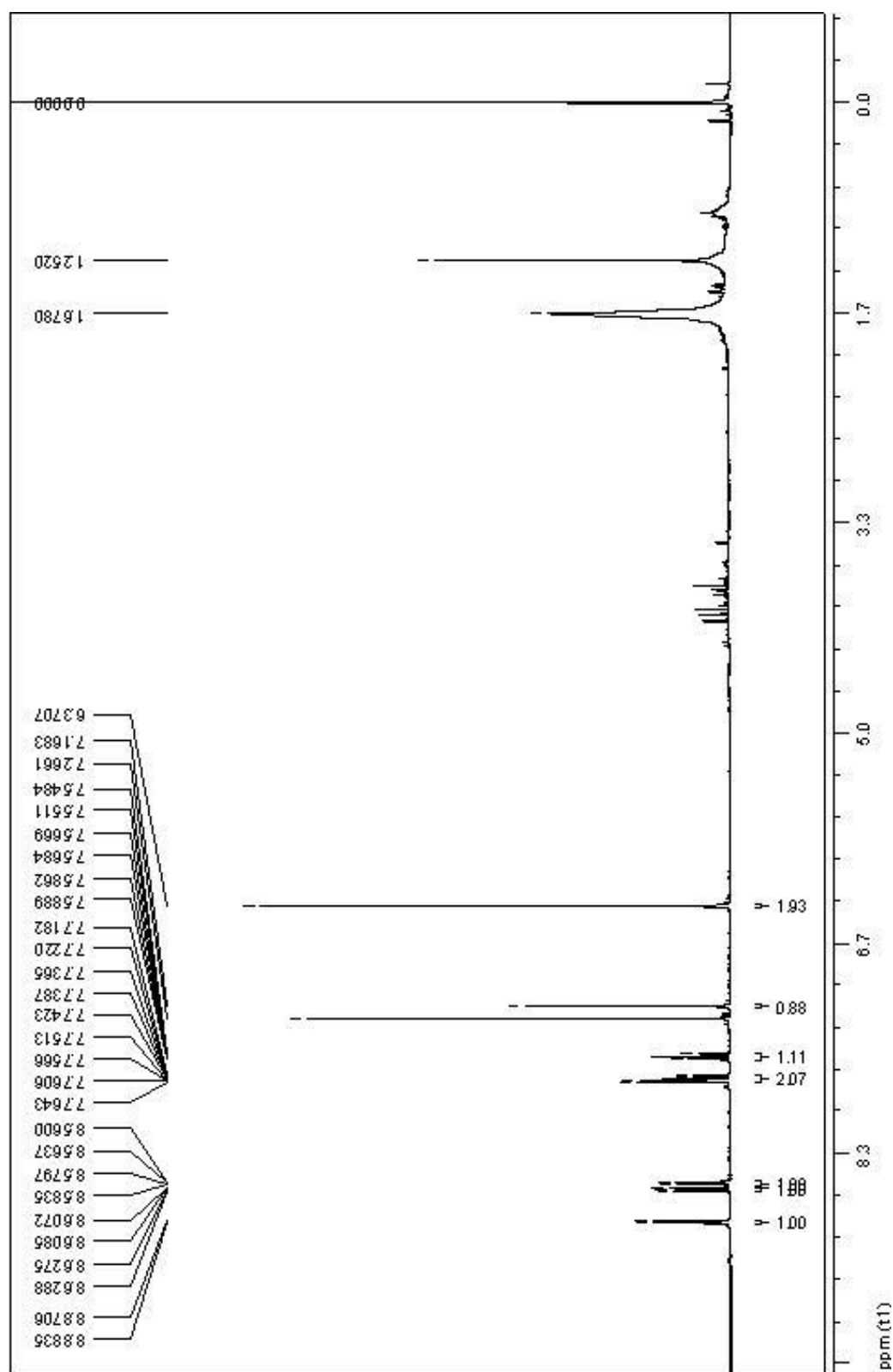


Anexo 46. Espectro de massa ESI-MS, modo positivo, 30eV da amostra GB2 em metanol (A) e espectro do MS/MS do m/z 322,2, modo positivo, 30 eV, em metanol.

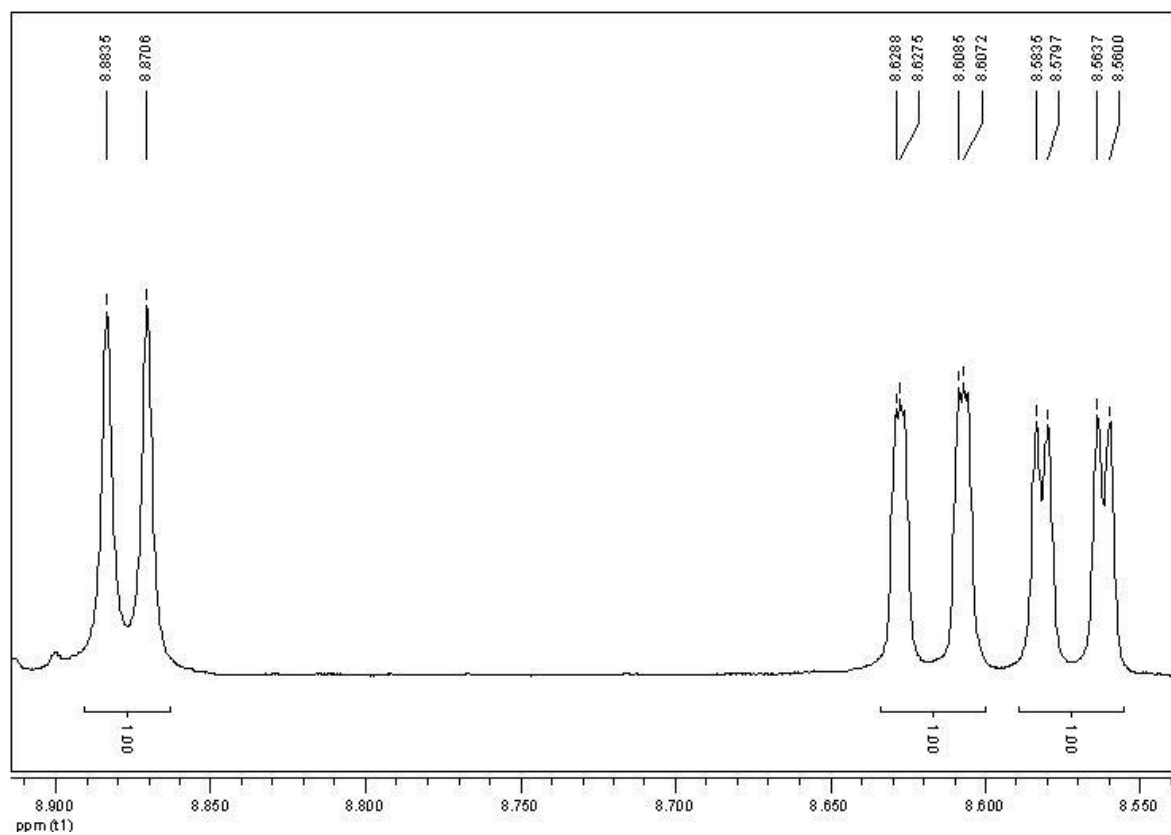
5. Substância GB3- Liriodenina



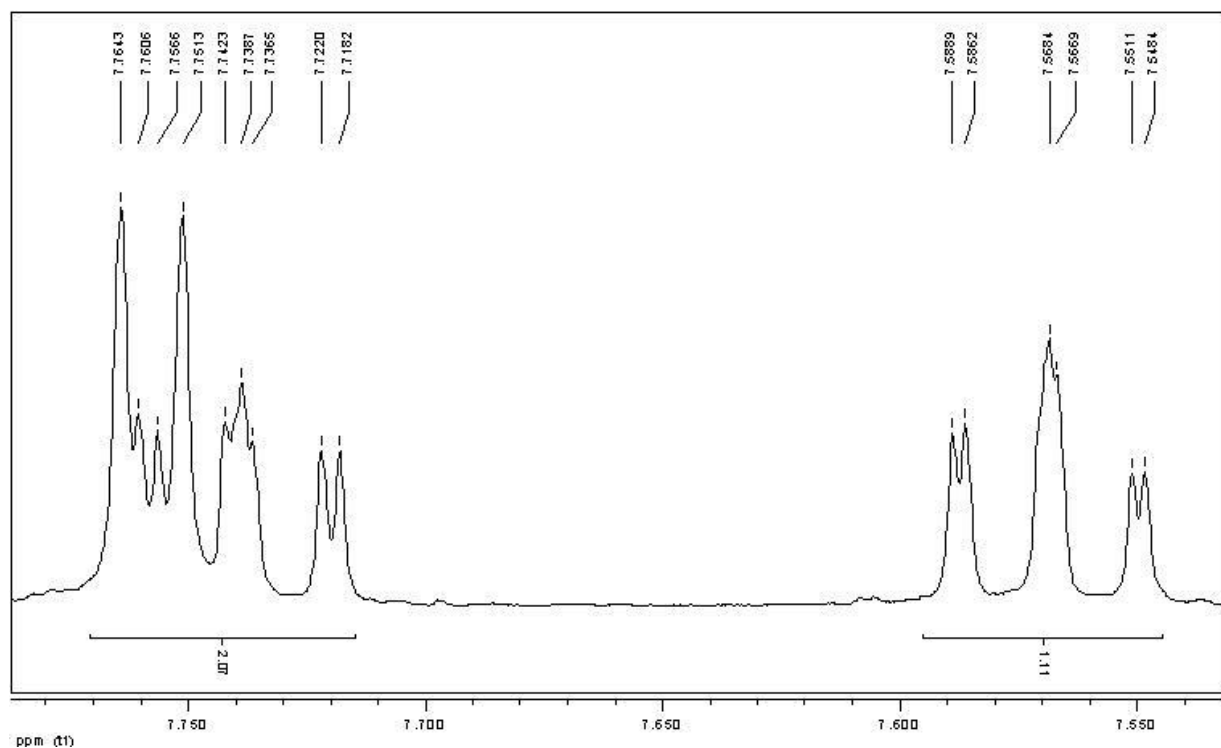
Anexo 47. Espectro de absorção na região do IV (Filme, CHCl_3) de GB3.



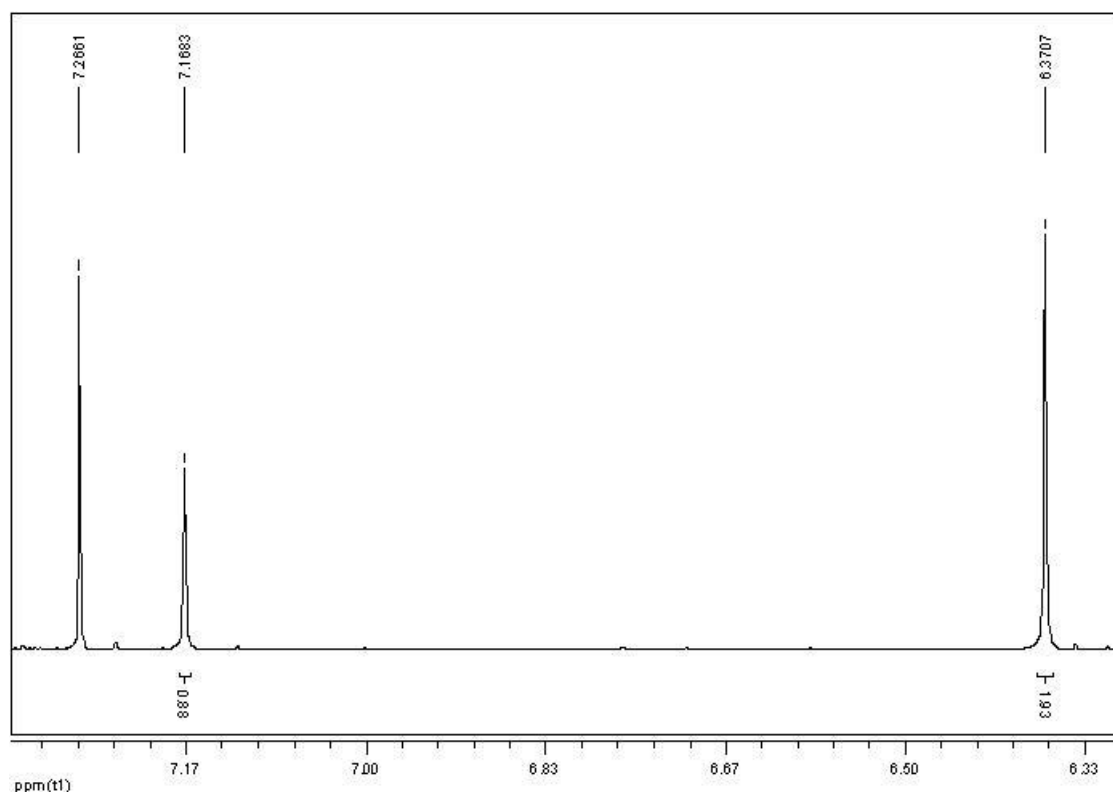
Anexo 48. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da amostra GB3.



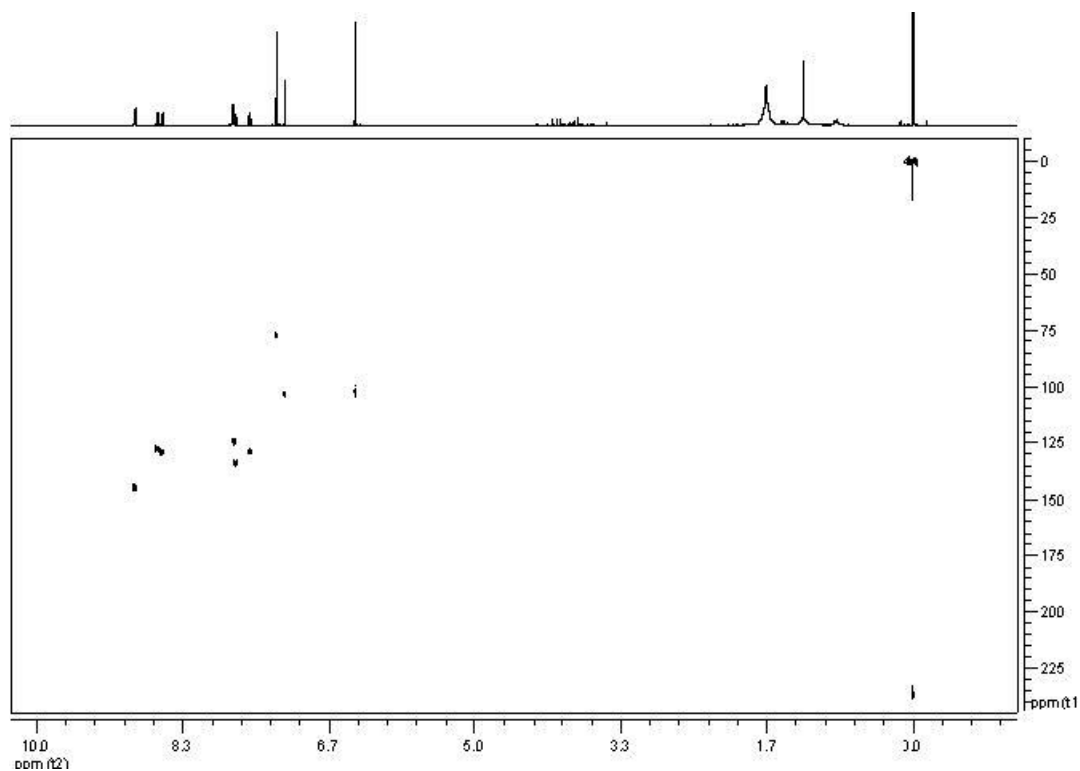
Anexo 49. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da amostra GB3 – ampliação.



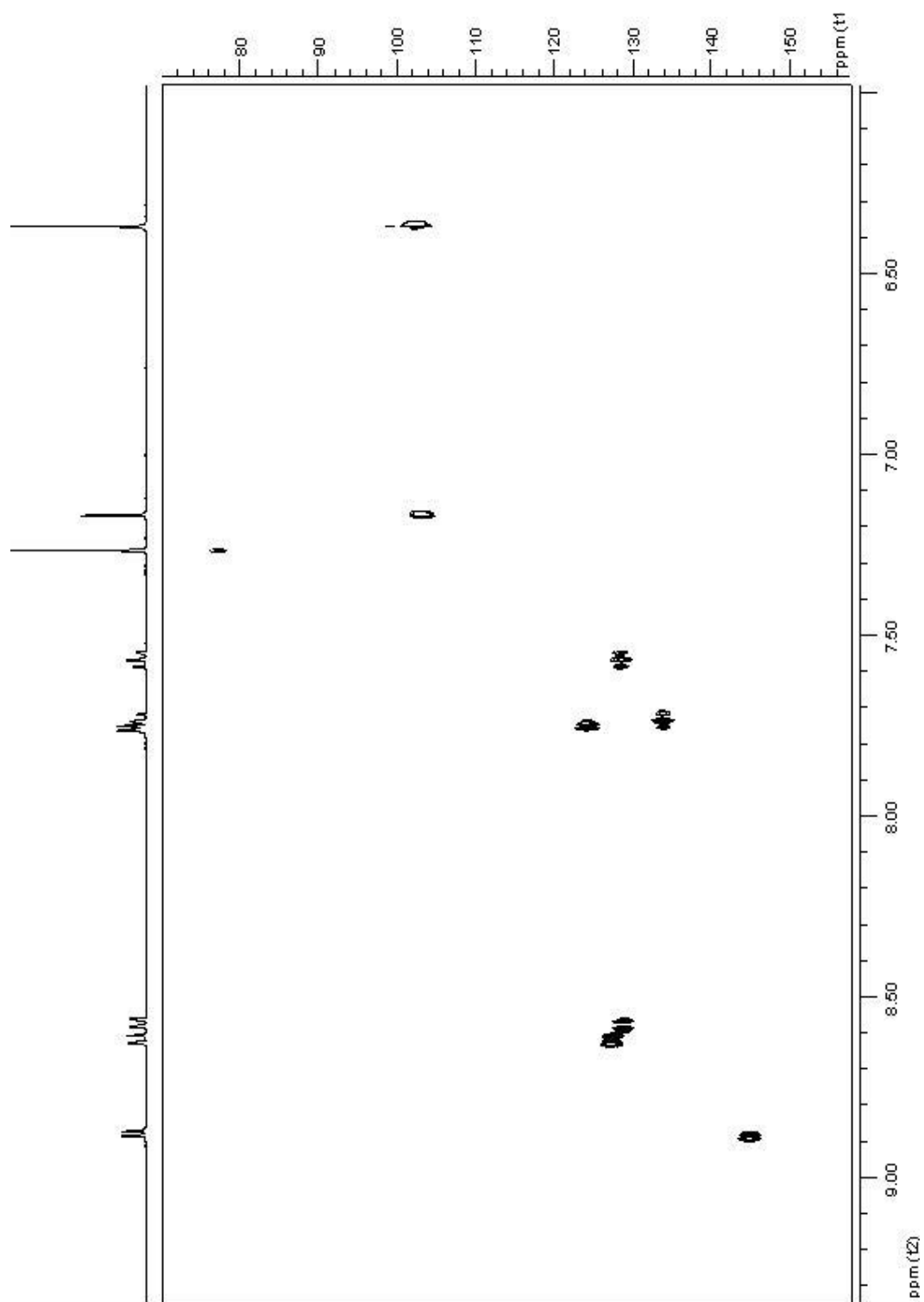
Anexo 50. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) da amostra GB3 – ampliação.



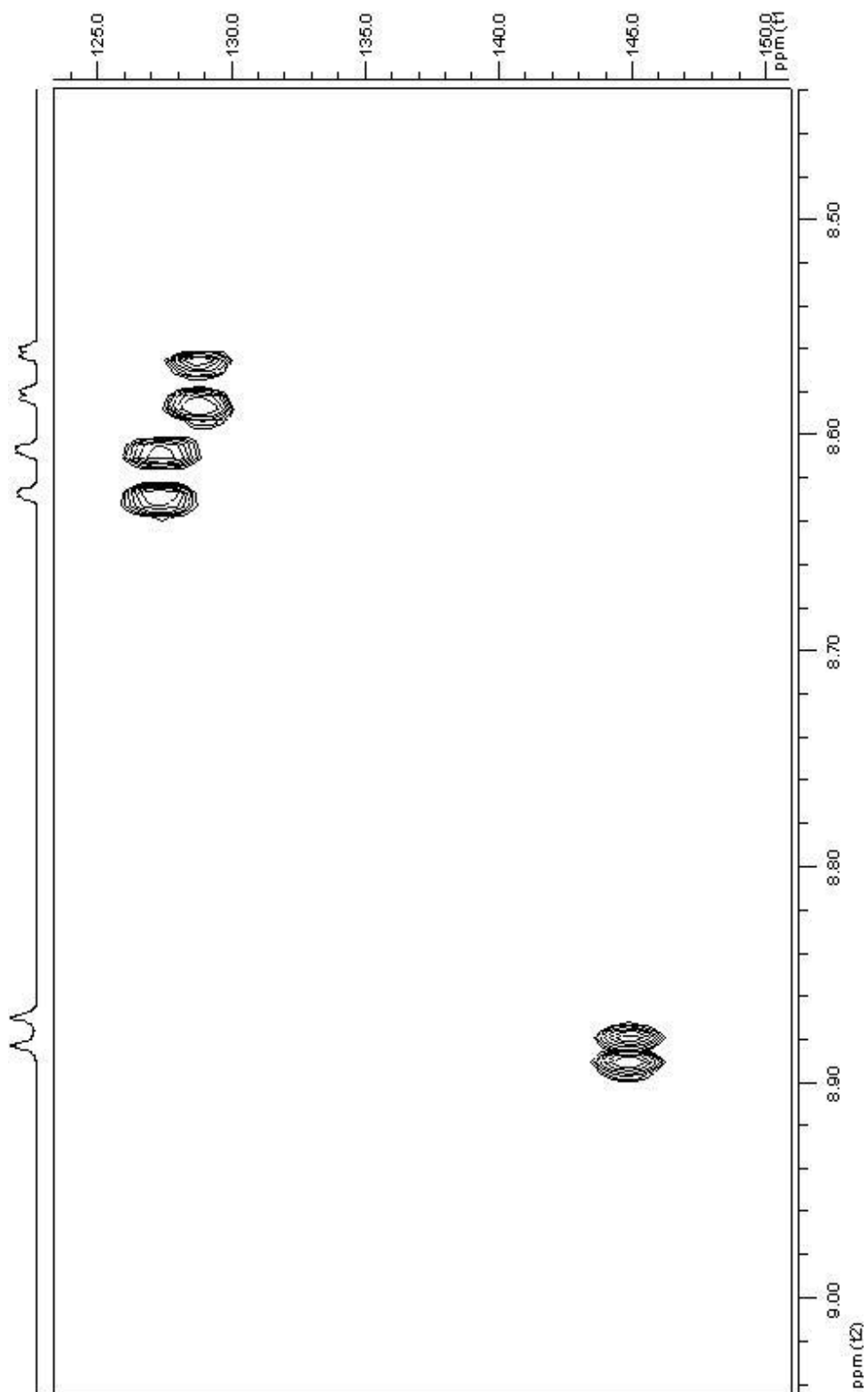
Anexo 51. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da amostra GB3 – ampliação.



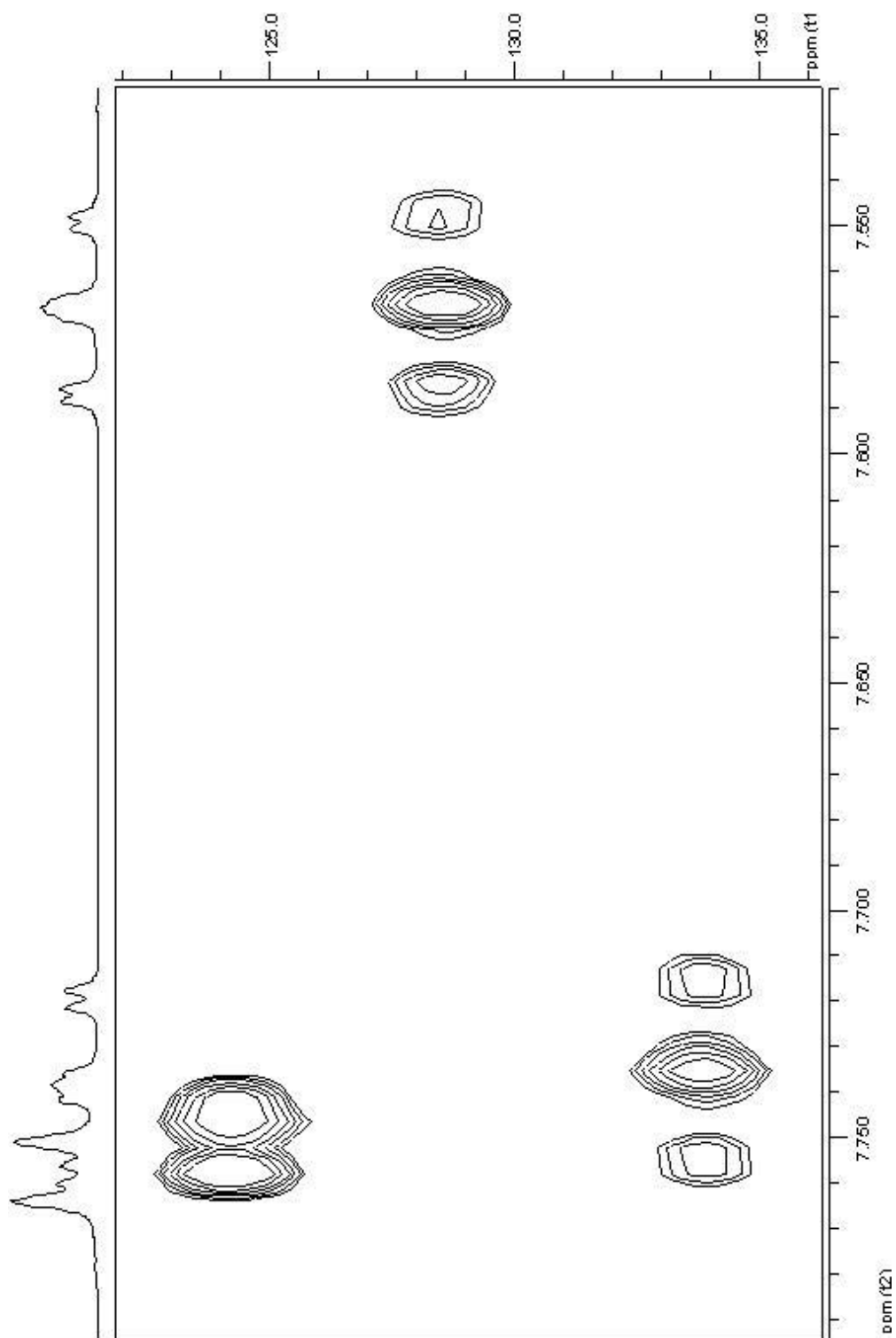
Anexo 52. Espectro HSQC (^1H - ^{13}C , H 400; C 100 MHz, CDCl_3) da amostra GB3.



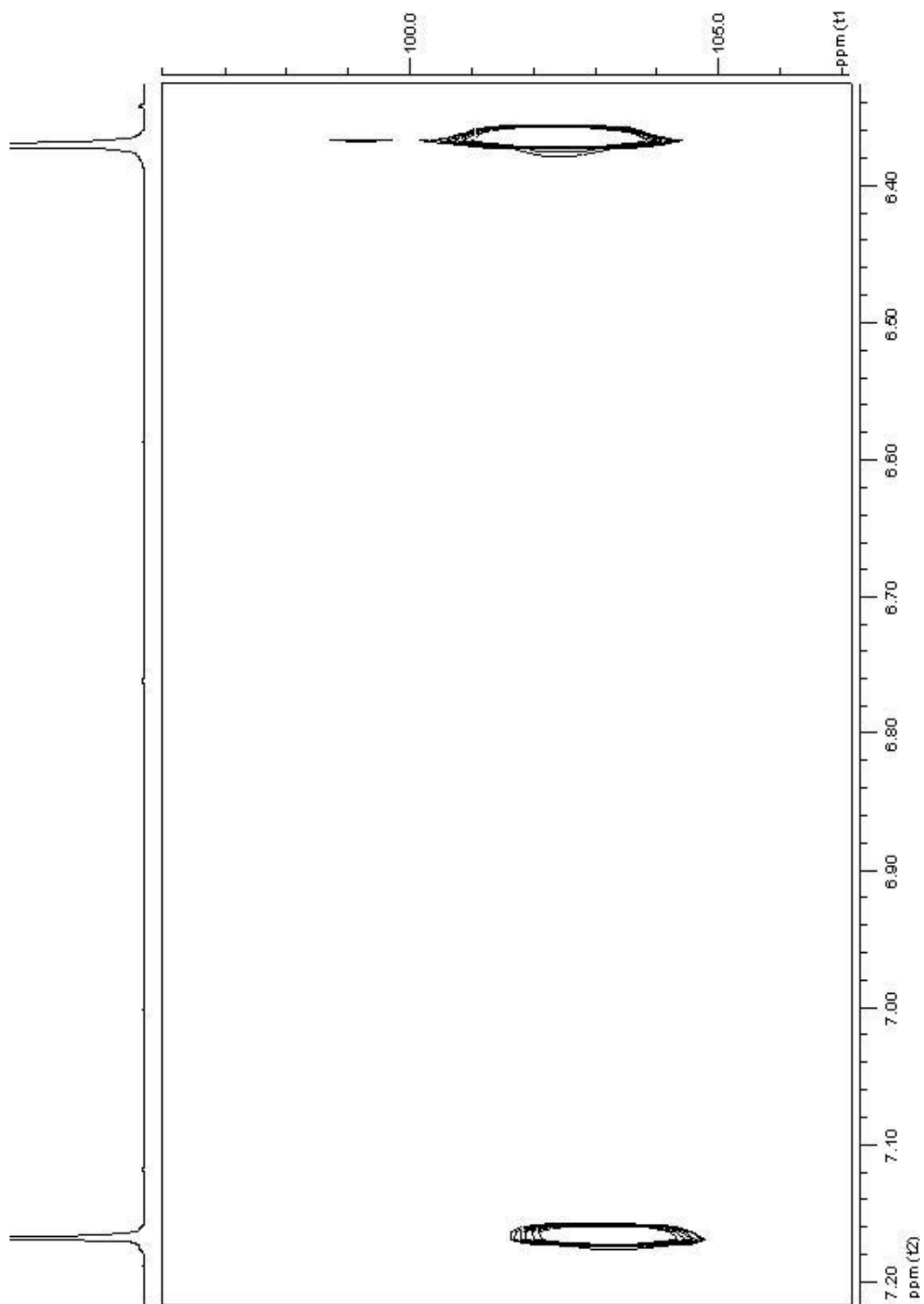
Anexo 53. Espectro HSQC (^1H - ^{13}C , H 400; C 100 MHz, CDCl_3) da amostra GB3– ampliação.



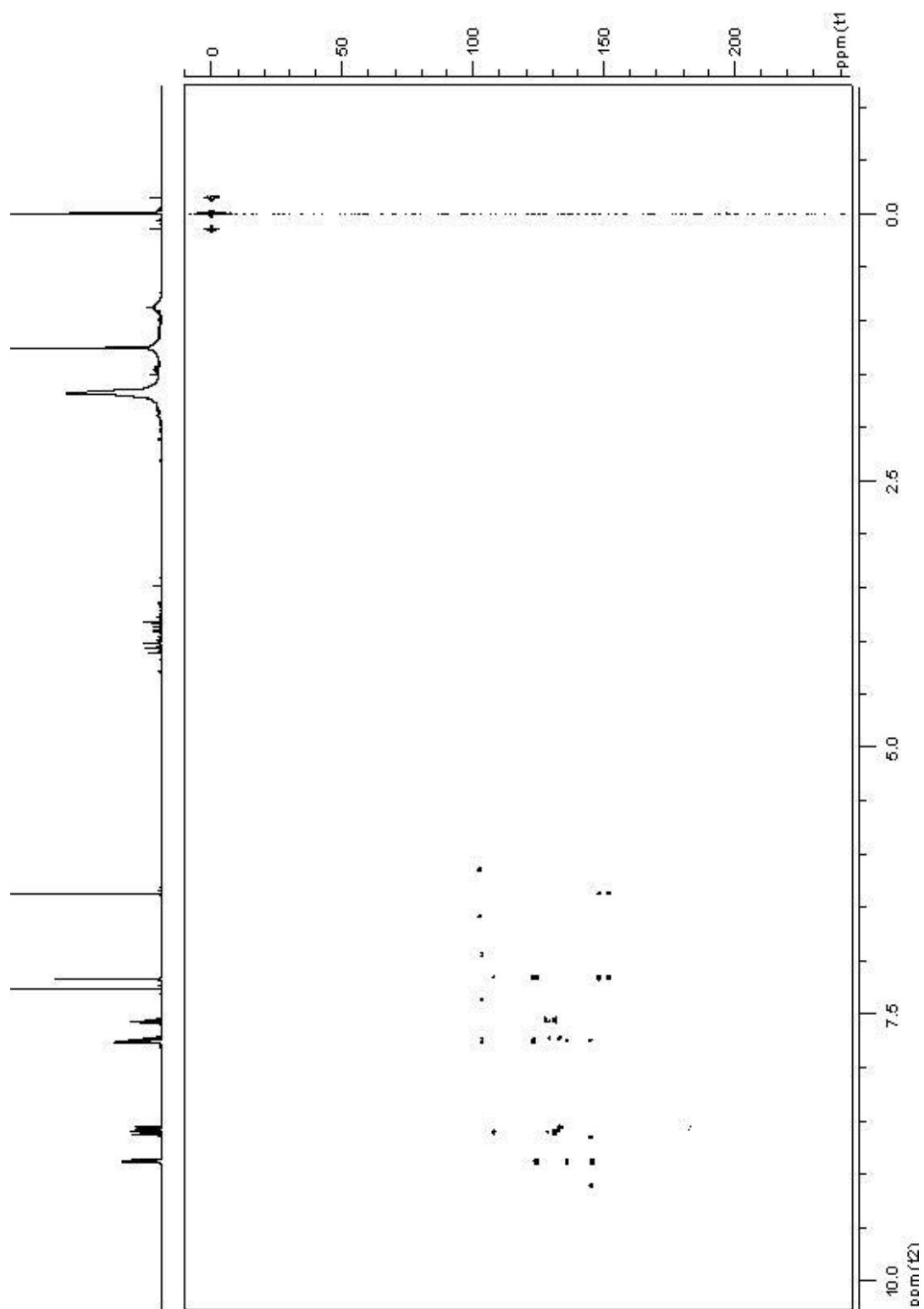
Anexo 54. Espectro HSQC (^1H - ^{13}C , H 400; C 100 MHz, CDCl_3) da amostra GB3– ampliação.



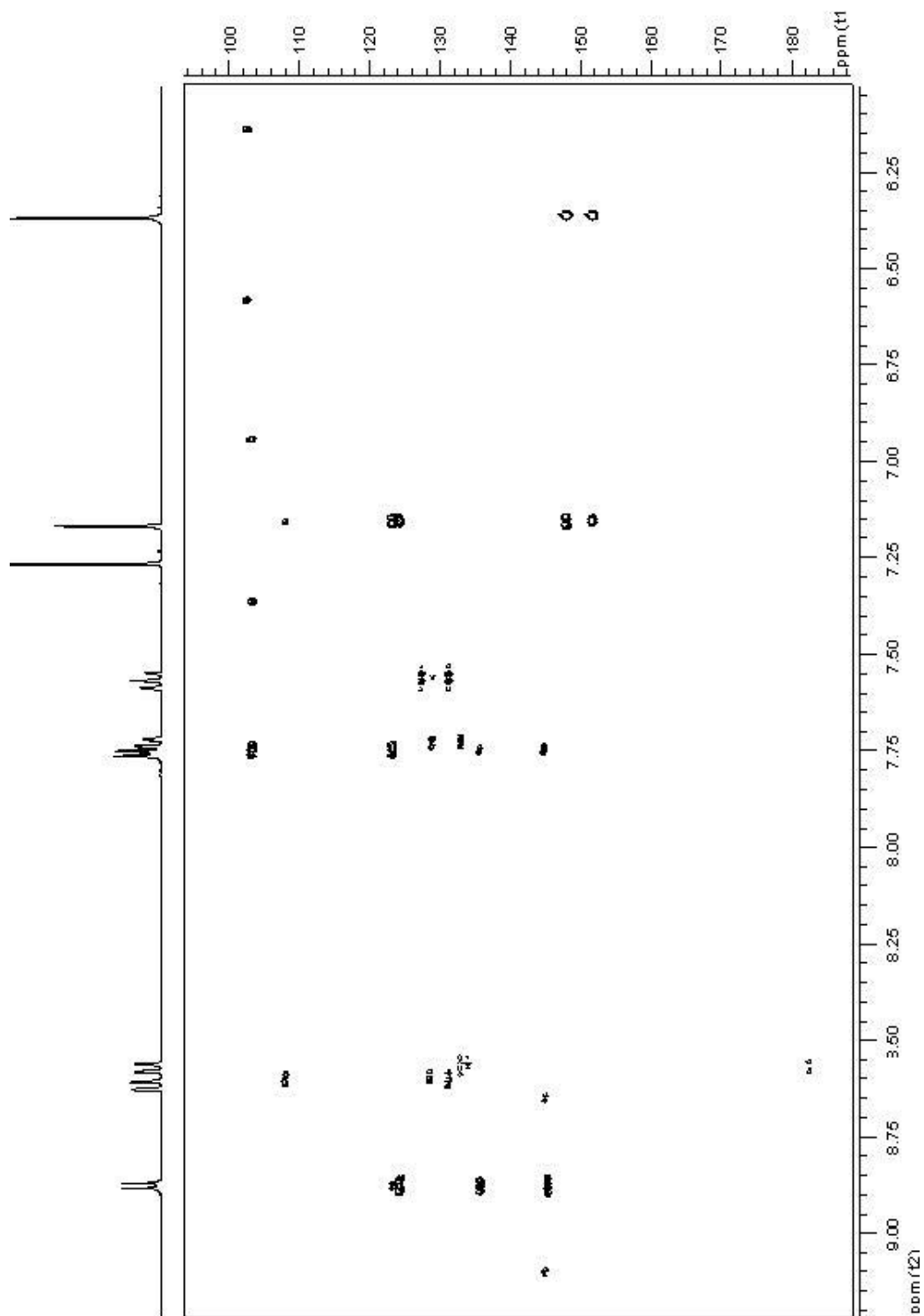
Anexo 55. Espectro HSQC (^1H - ^{13}C , H 400; C 100 MHz, CDCl_3) da amostra GB3– ampliação.



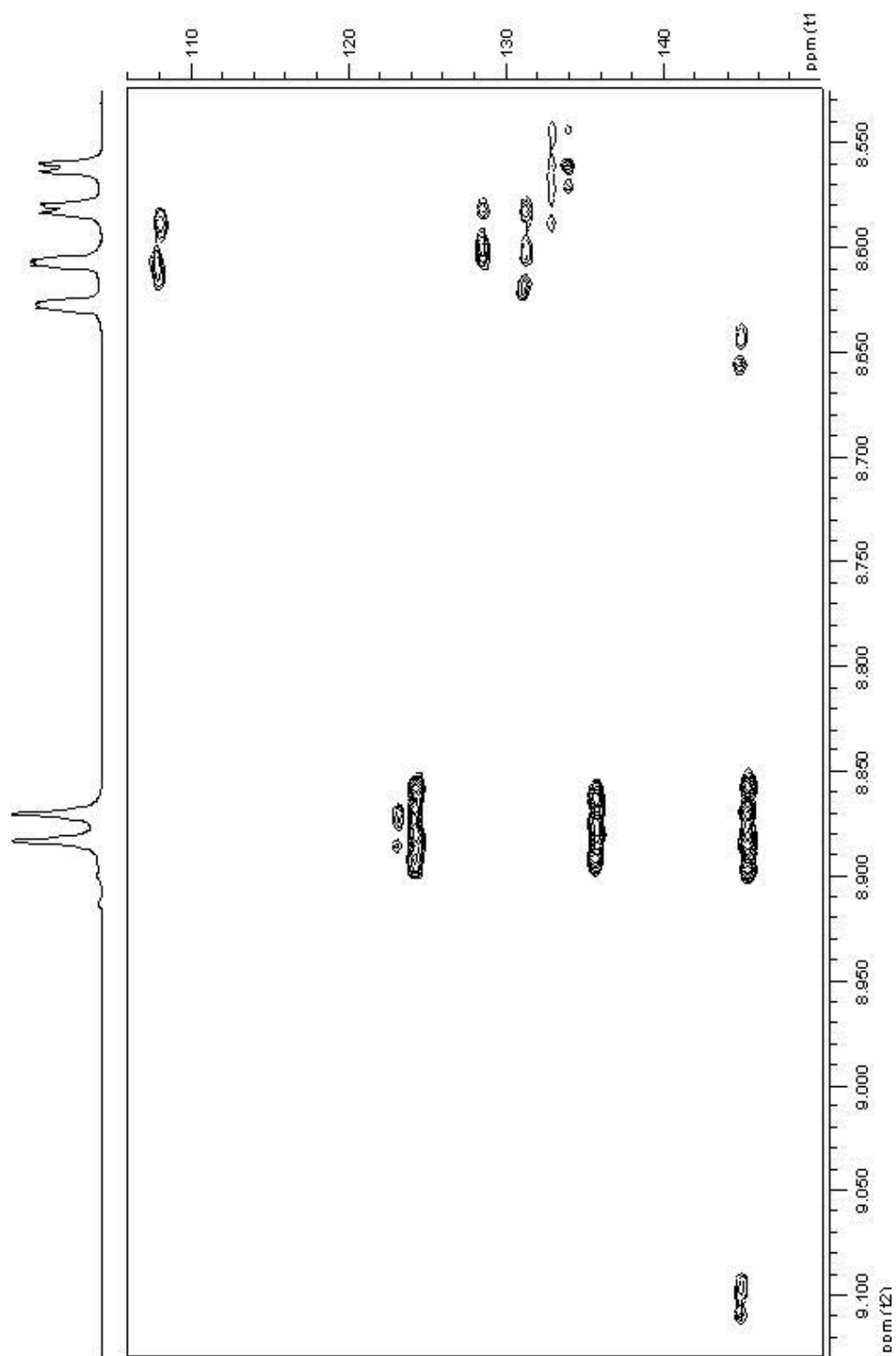
Anexo 56. Espectro HSQC (^1H - ^{13}C , H 400; C 100 MHz, CDCl_3) da amostra GB3–ampliação.



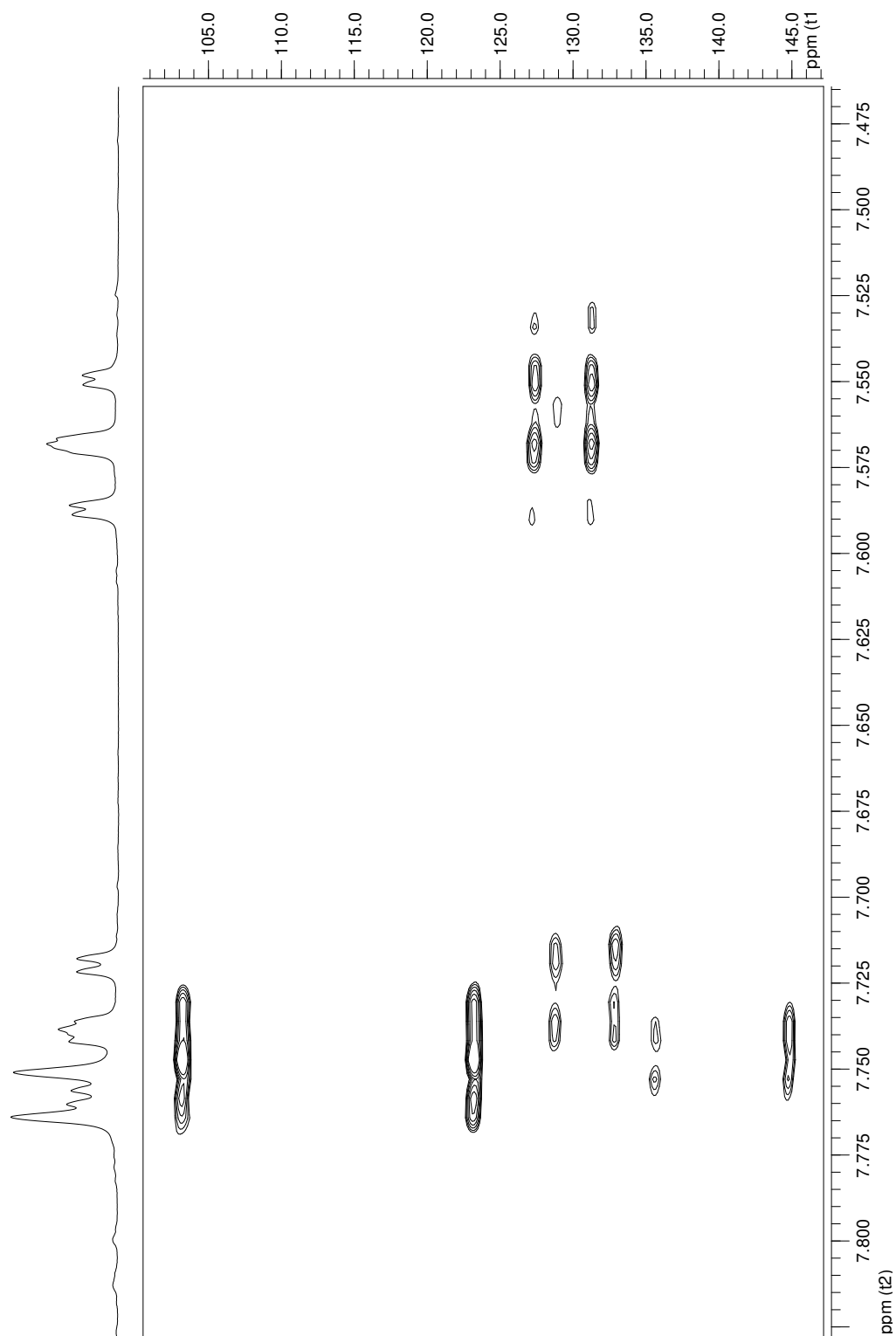
Anexo 57. Espectro HMBC (^1H - ^{13}C , H 400 e C 100 MHz, CDCl_3) da amostra GB3.



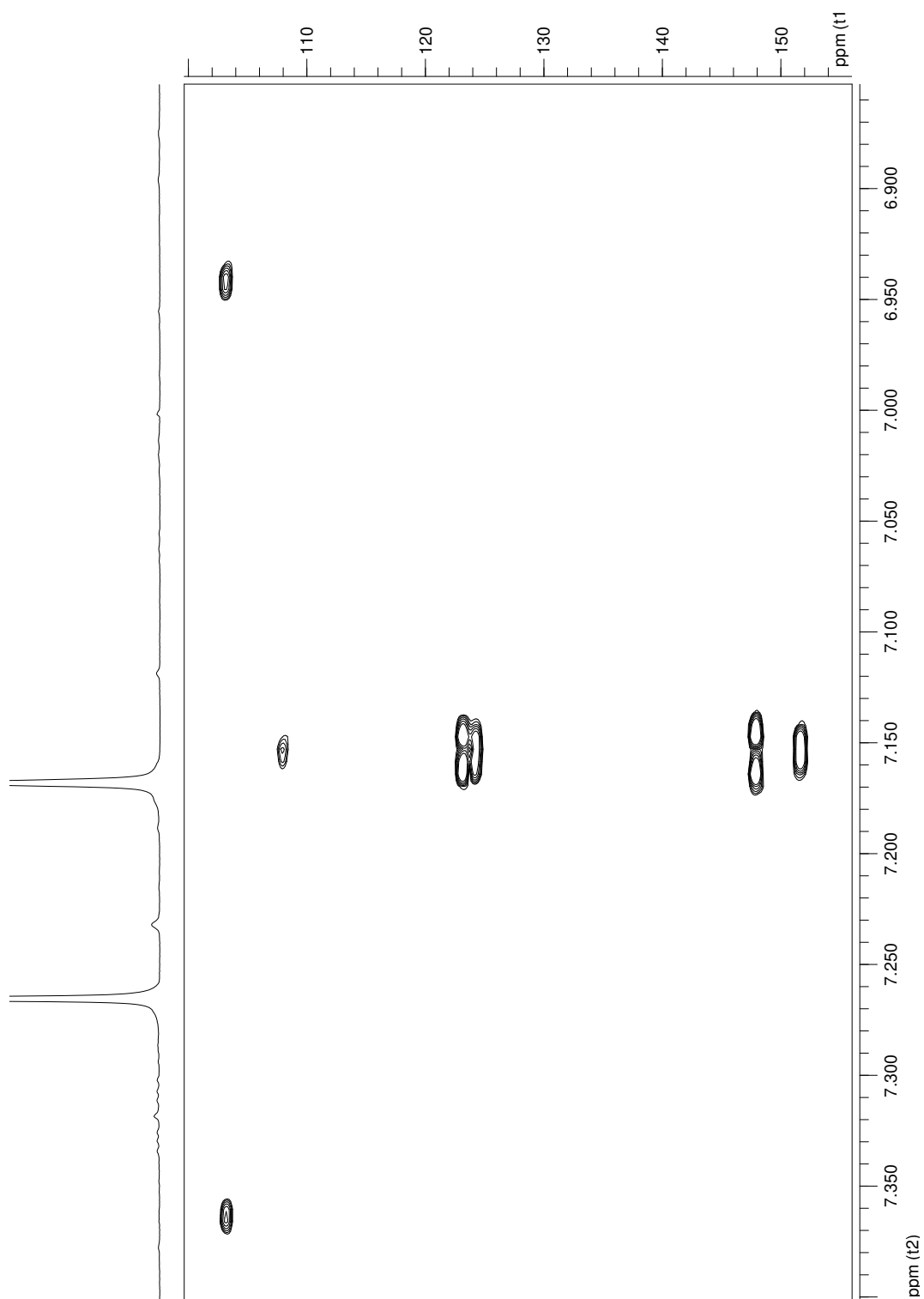
Anexo 58. Espectro HMBC (^1H - ^{13}C , H 400 e C 100 MHz, CDCl_3) da amostra GB3 – ampliação.



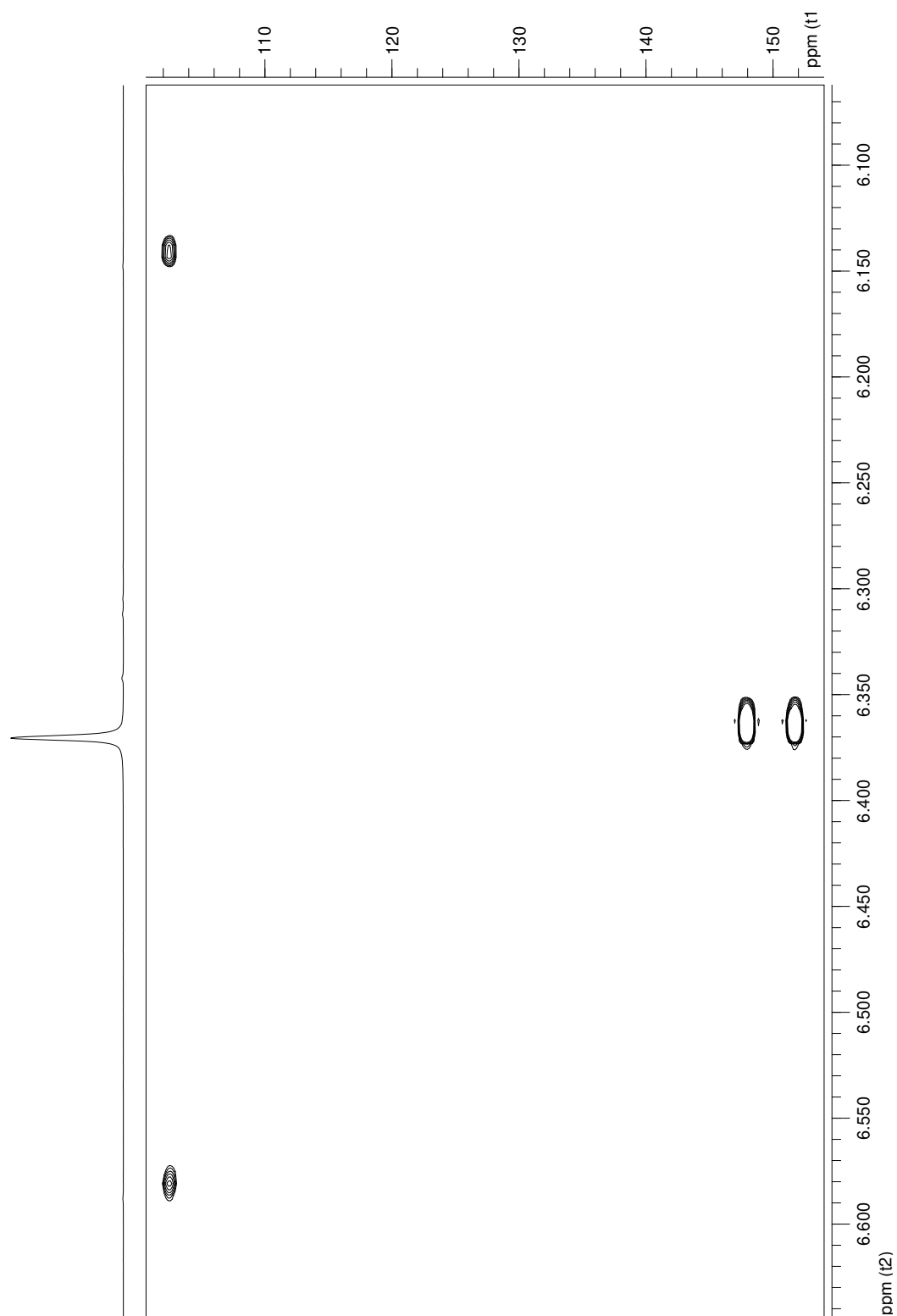
Anexo 59. Espectro HMBC (^1H - ^{13}C , H 400 e C 100 MHz, CDCl_3) da amostra GB3 – ampliação.



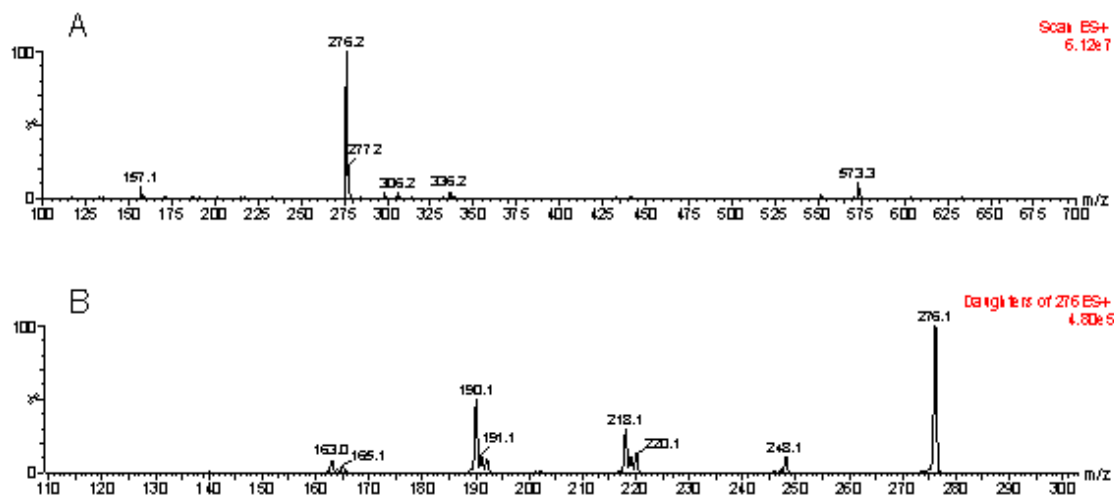
Anexo 60. Espectro HMBC (^1H - ^{13}C , H 400 e C 100 MHz, CDCl_3) da amostra GB3 – ampliação.



Anexo 61. Espectro HMBC (^1H - ^{13}C , H 400 e C 100 MHz, CDCl_3) da amostra GB3 – ampliação.

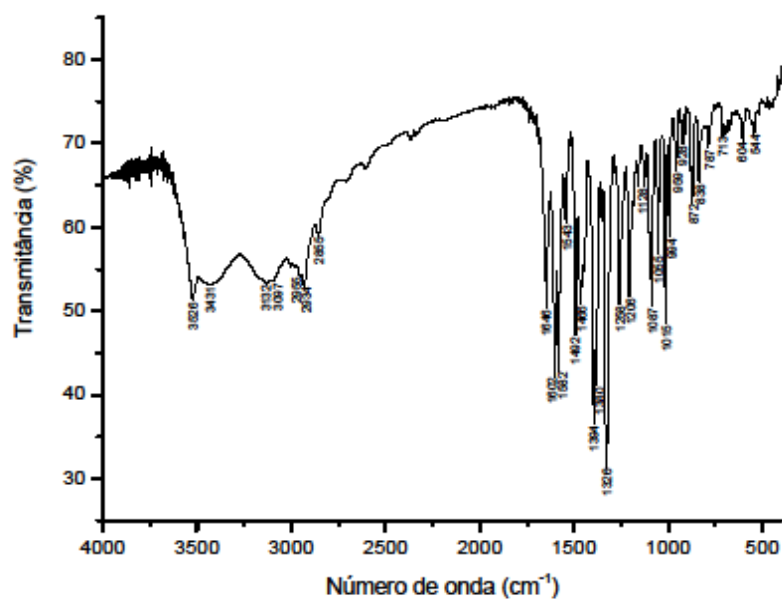


Anexo 62. Espectro HMBC (^1H - ^{13}C , H 400 e C 100 MHz, CDCl_3) da amostra GB3 – ampliação.

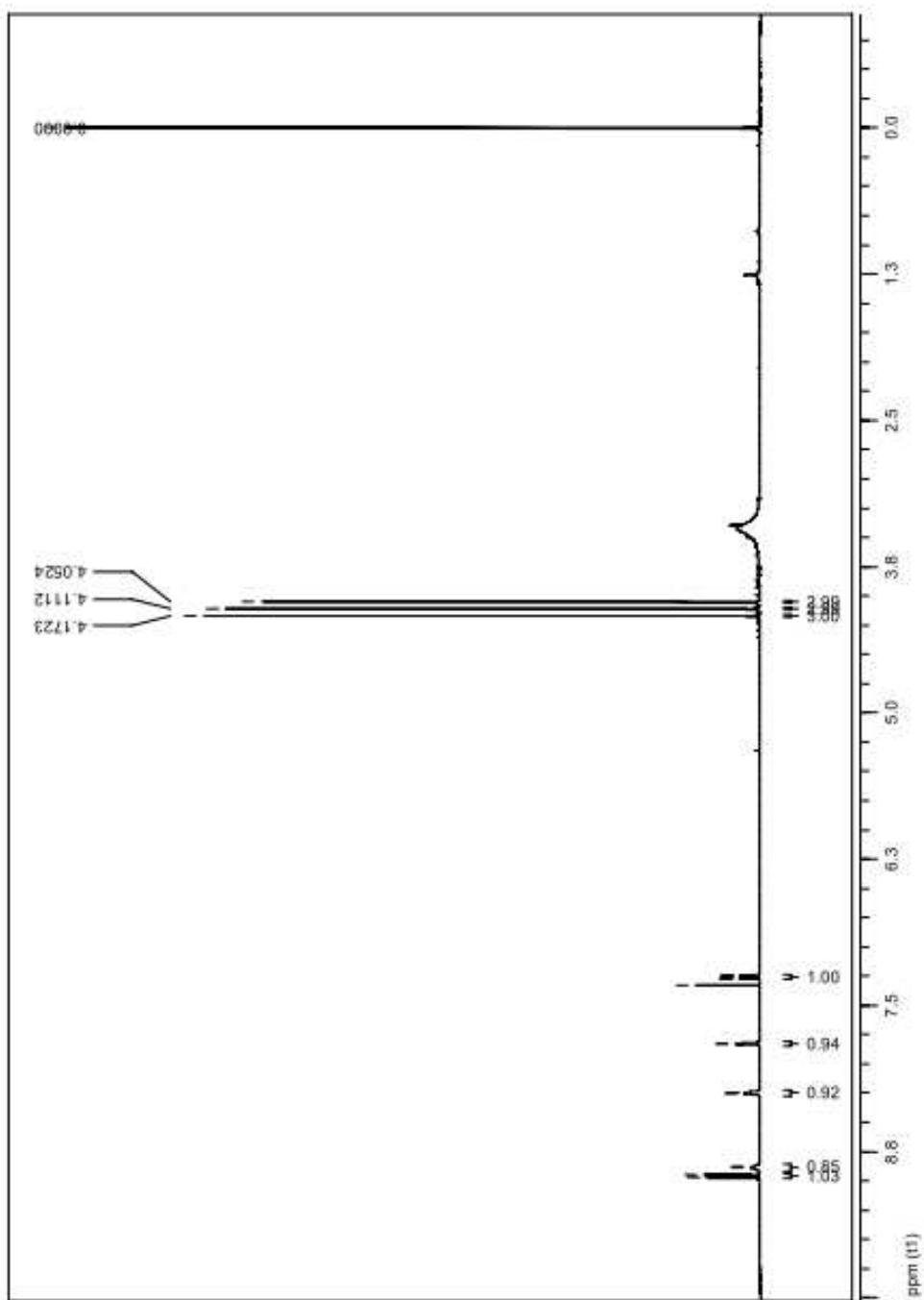


Anexo 63. Espectro de massa ESI-MS, modo positivo, 15eV da amostra GB3 em metanol (A) e espectro do MS/MS do m/z 276,1, modo positivo, 15eV, em metanol.

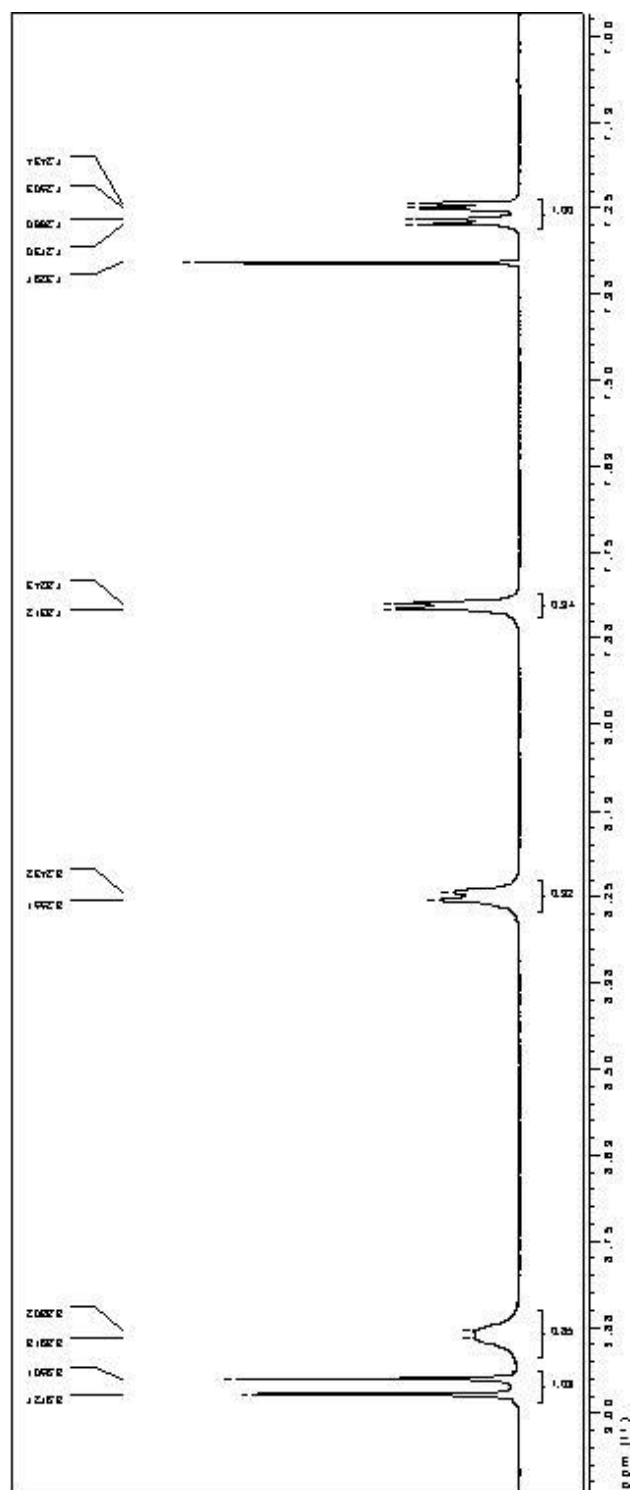
6. Substância GB4- Subsessilina



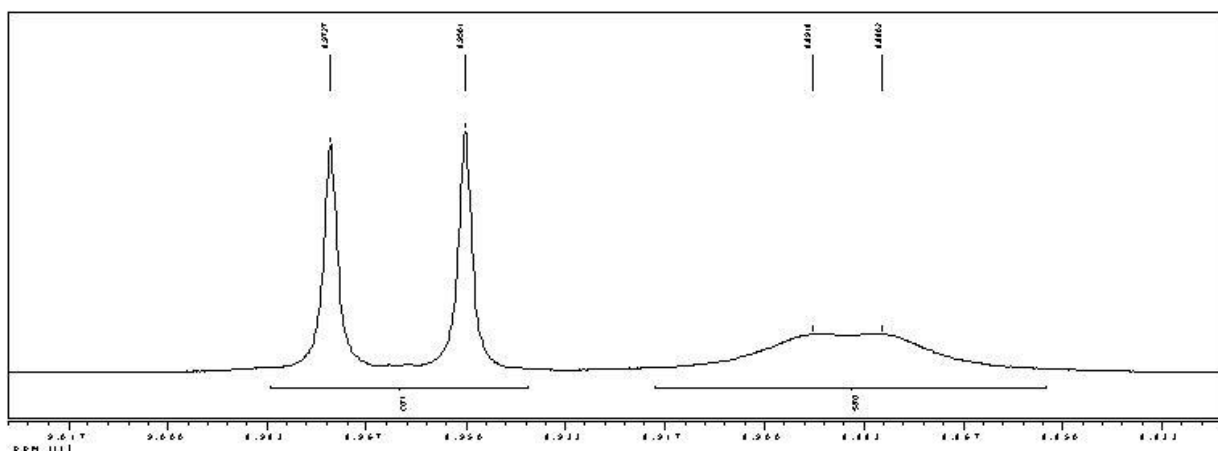
Anexo 64. Espectro de absorção na região do IV (KBr) da amostra GB4.



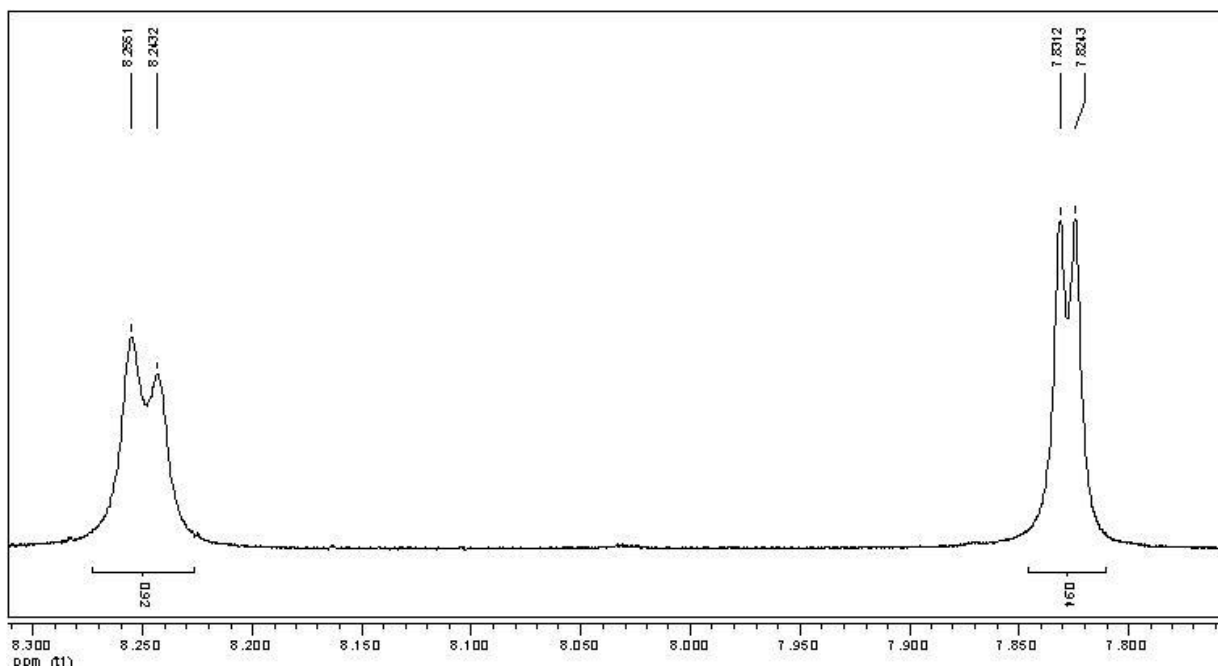
Anexo 65. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da amostra GB4.



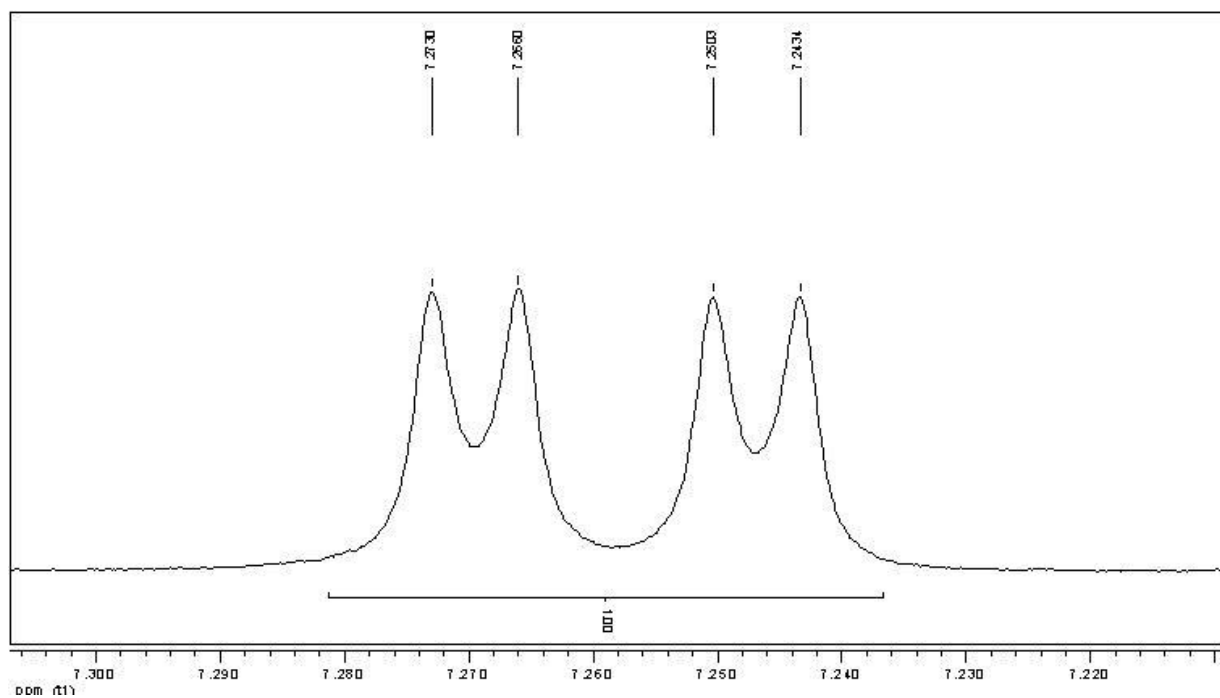
Anexo 66. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da amostra GB4— ampliação.



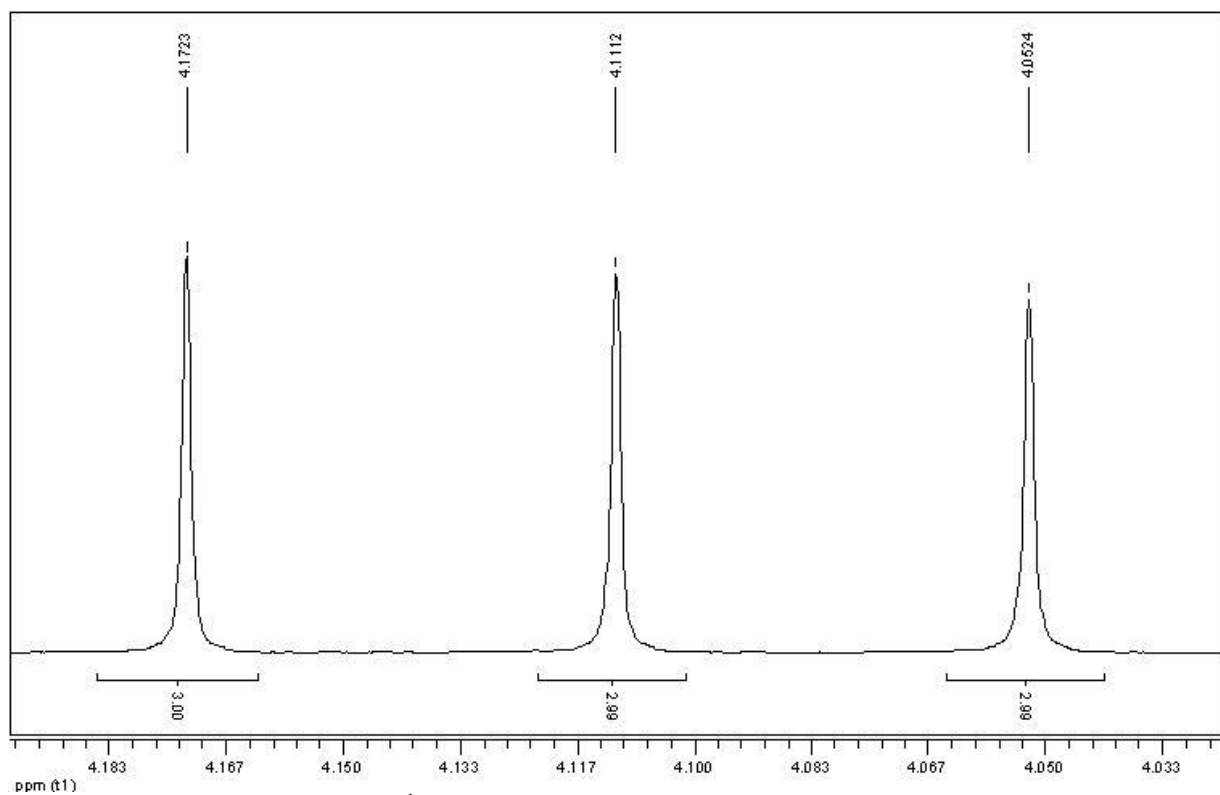
Anexo 67. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl₃) da amostra GB4 – ampliação.



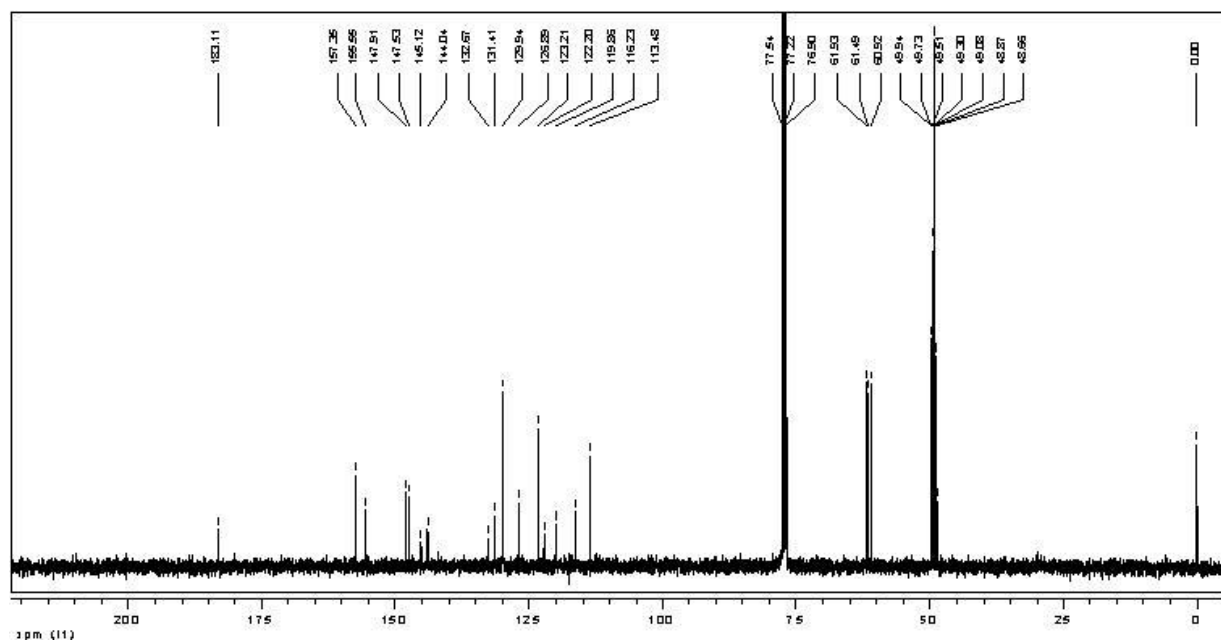
Anexo 68. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl₃) da amostra GB4– ampliação.



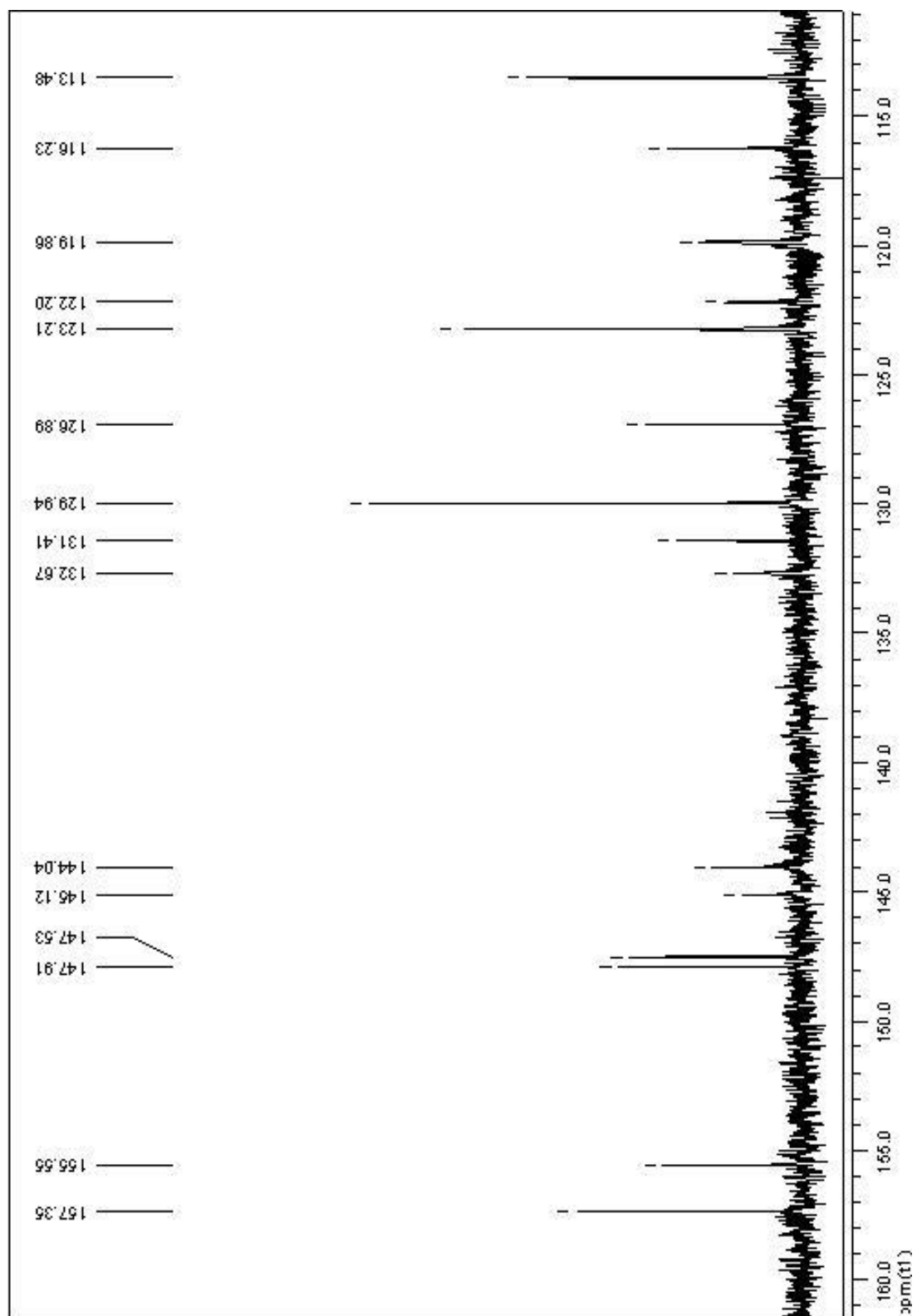
Anexo 69. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da amostra GB4- ampliação.



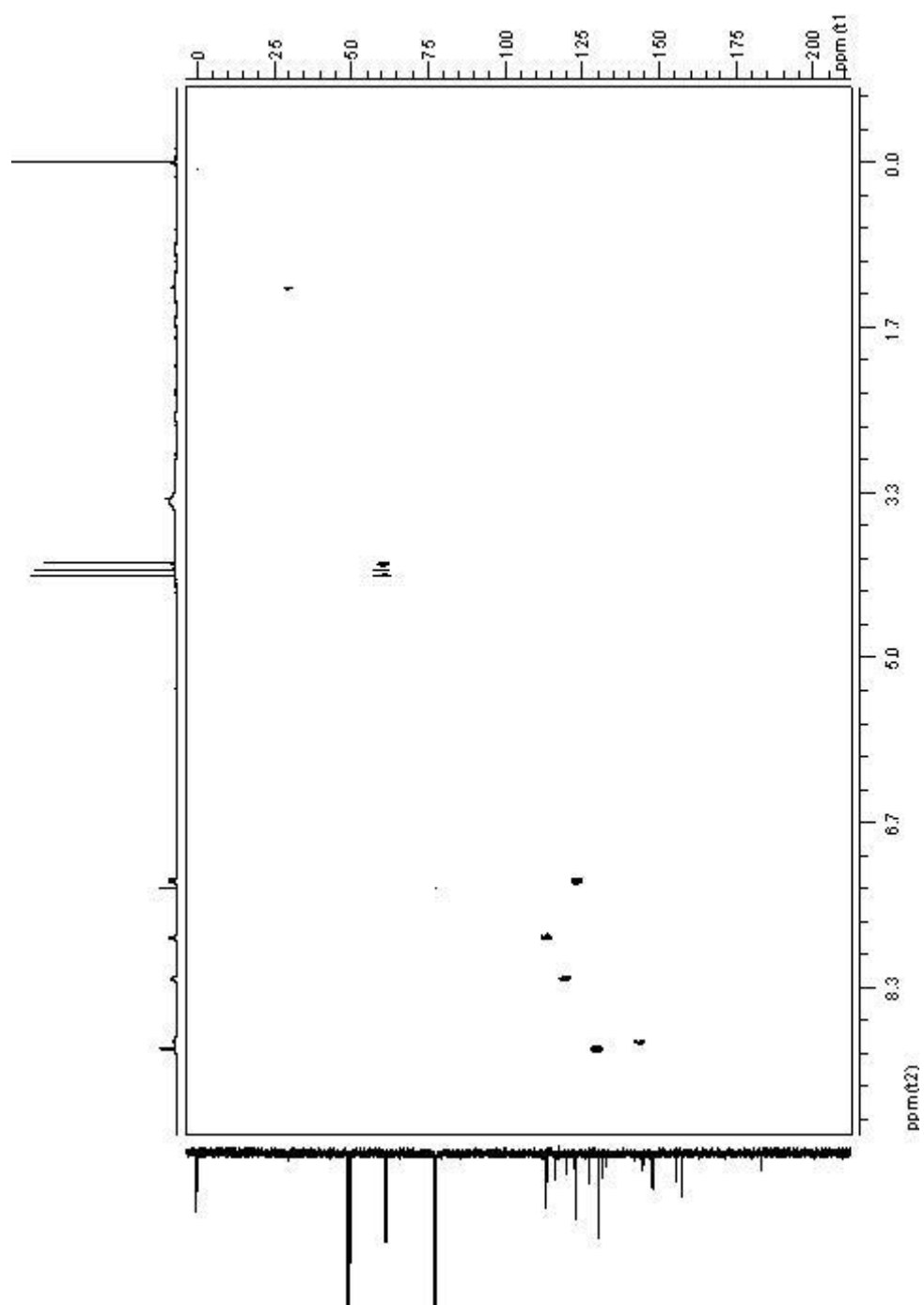
Anexo 70. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da amostra GB4- ampliação.



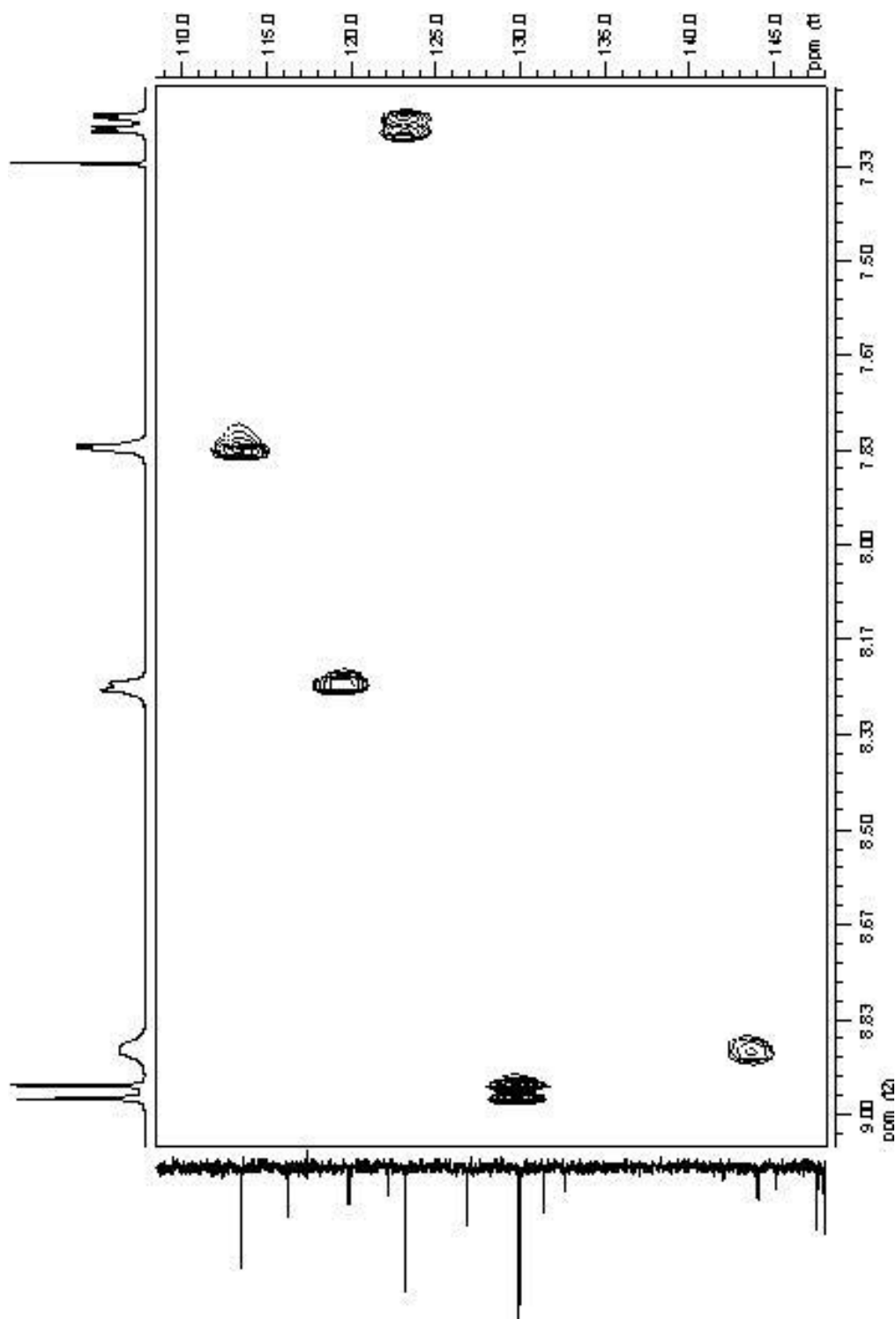
Anexo 71. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da amostra GB4.



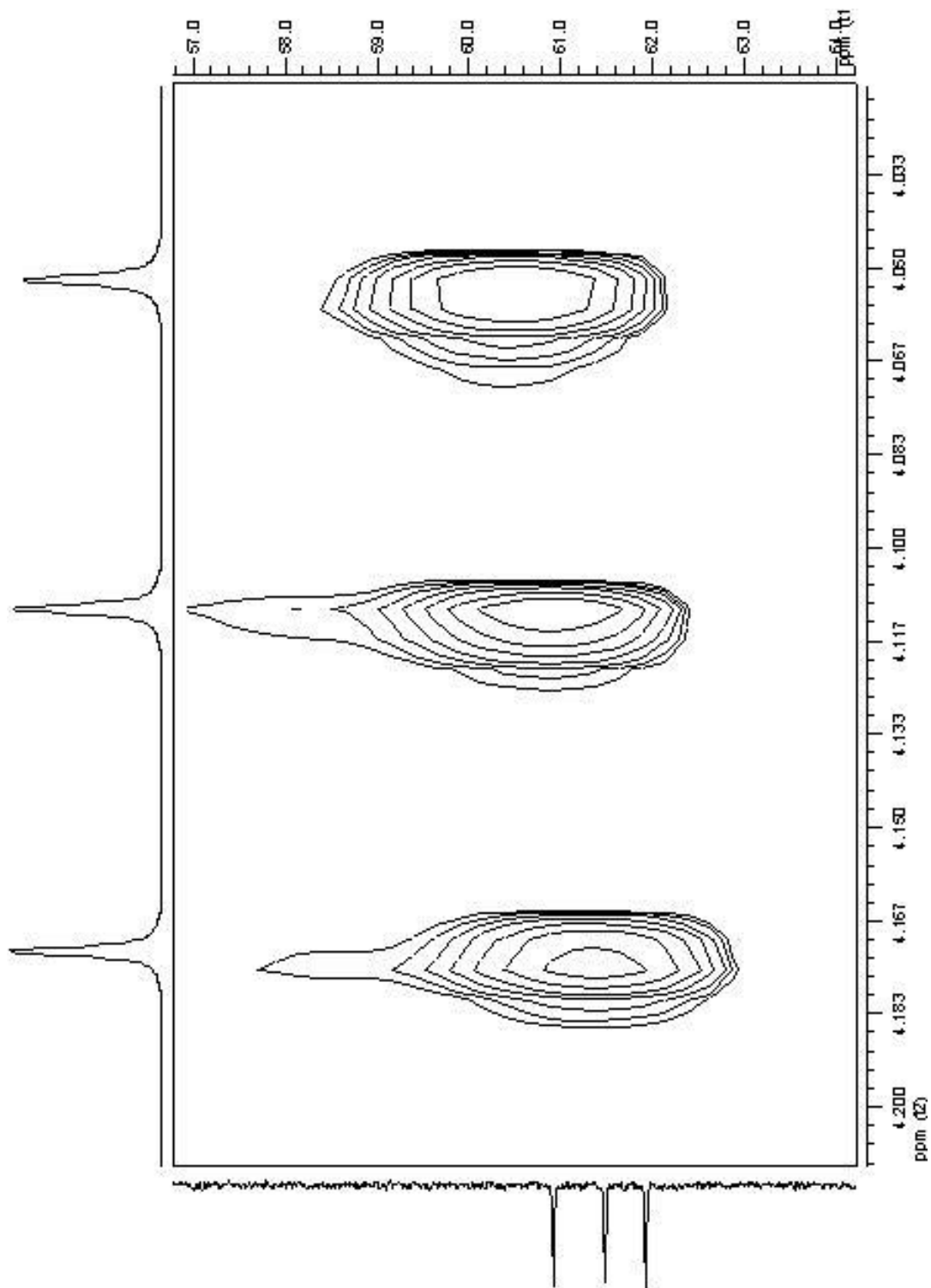
Anexo 72. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da amostra GB4– ampliação.



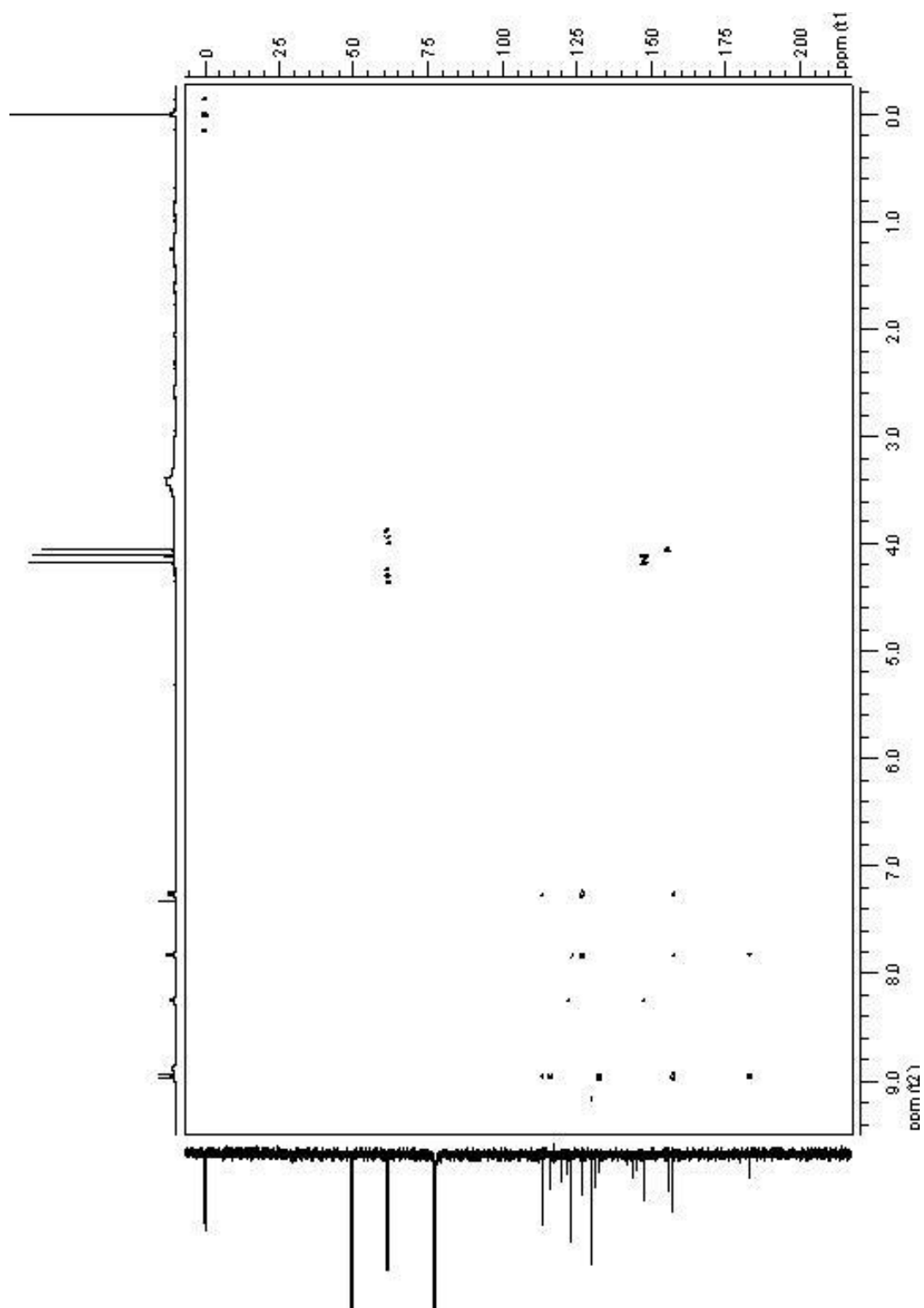
Anexo 73. Espectro HSQC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CDCl_3) da amostra GB4.



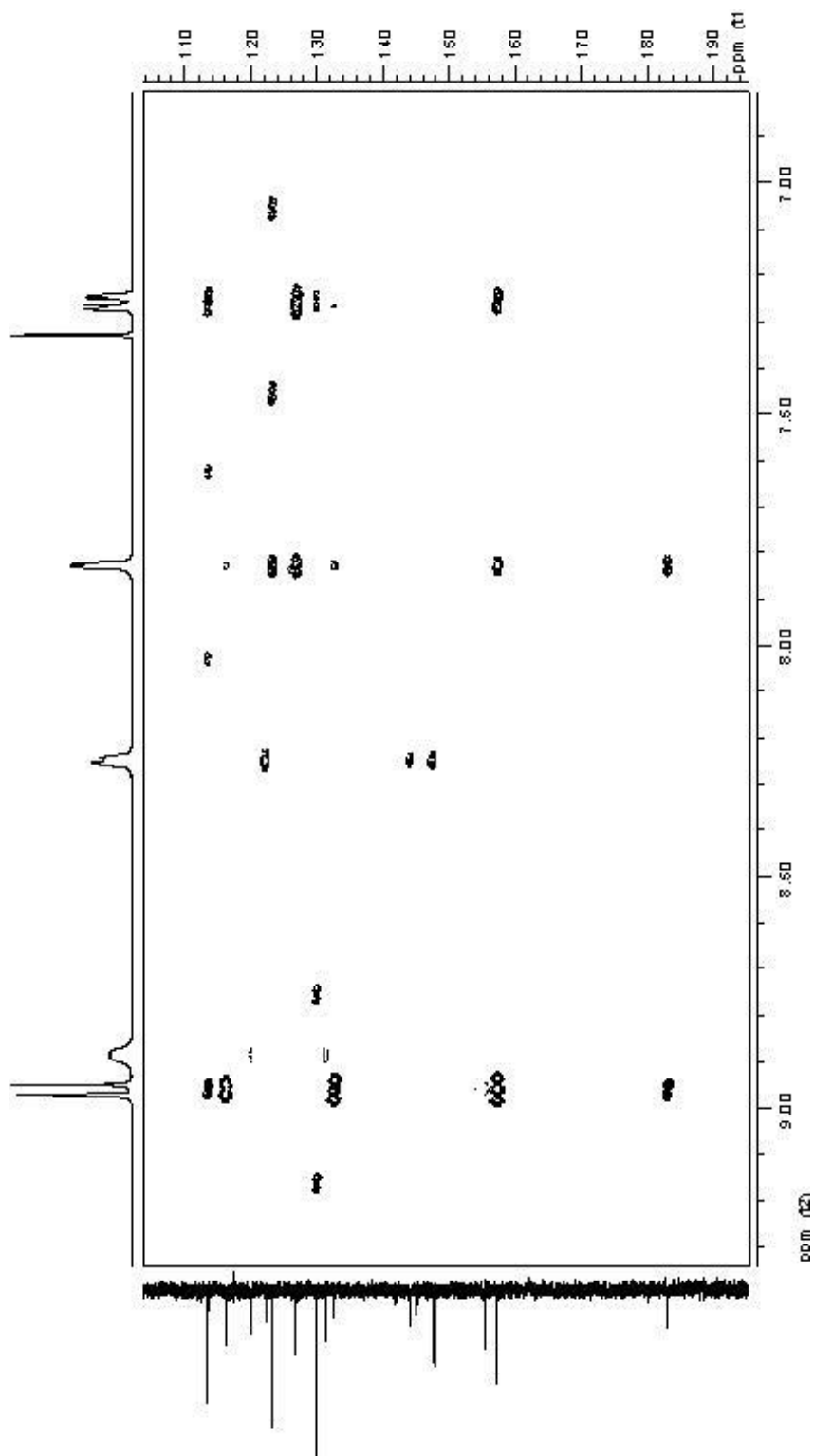
Anexo 74. Espectro HSQC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CDCl_3) da amostra GB4.



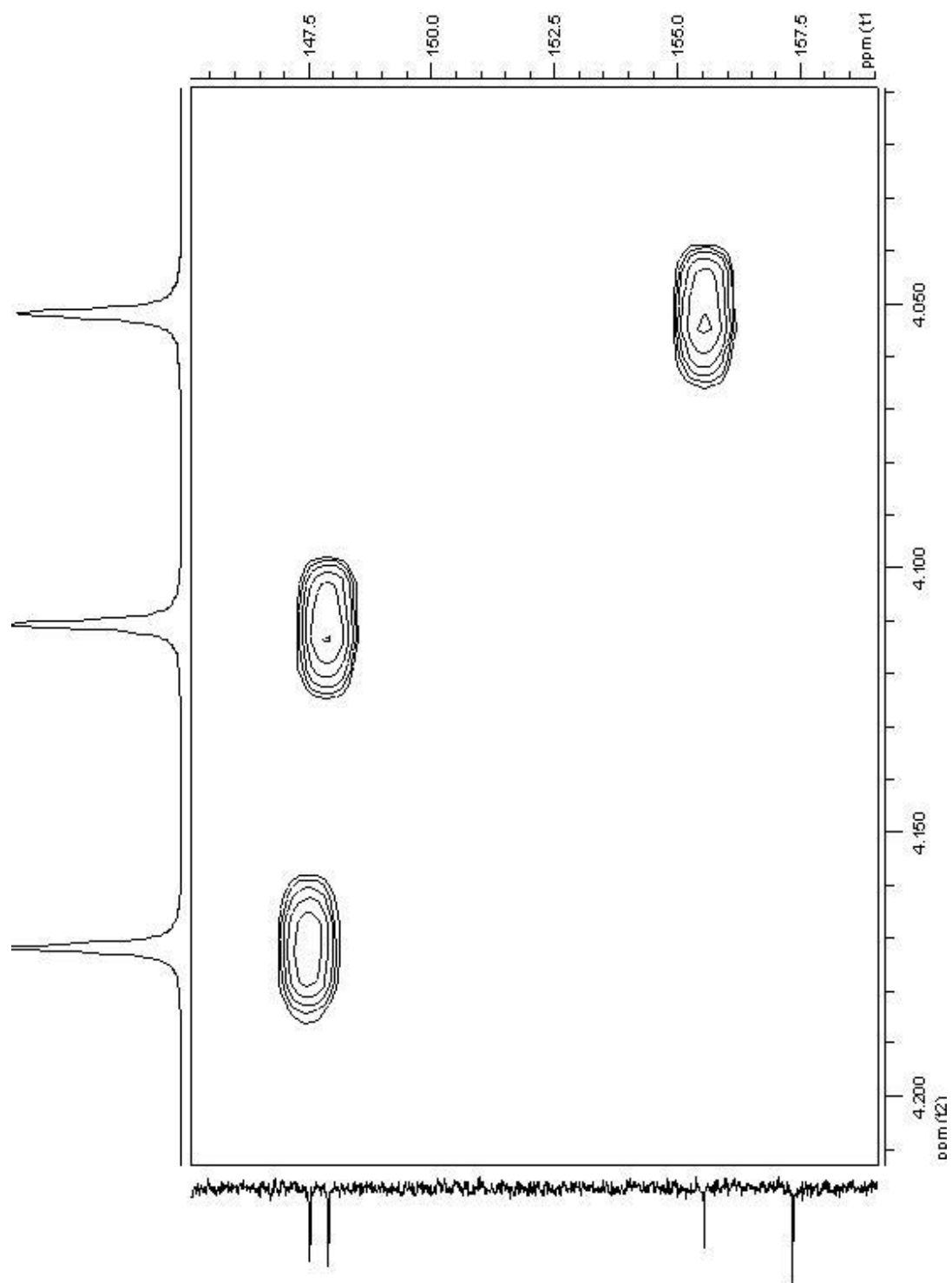
Anexo 75. Espectro HSQC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CDCl_3) da amostra GB4 – ampliação.



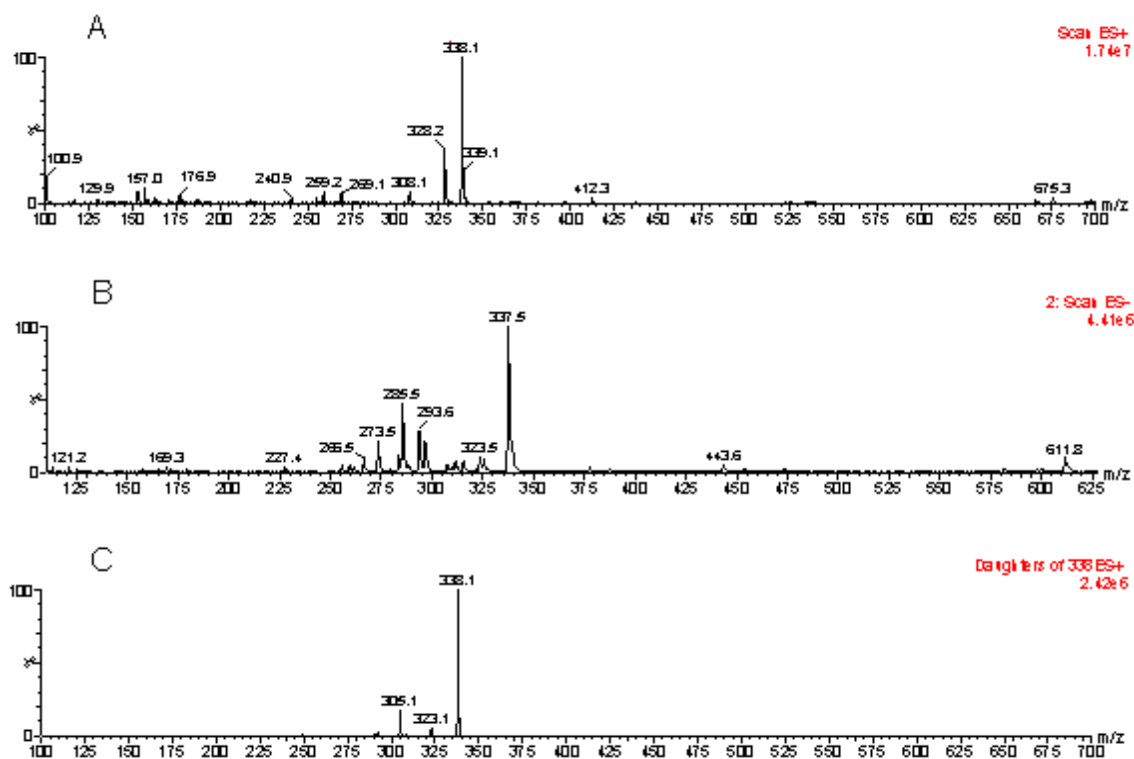
Anexo 76. Espectro HMBC (400 MHz para ¹H e 100 MHz para ¹³C, CDCl₃) da amostra GB4.



Anexo 77. Espectro HMBC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CDCl_3) da amostra GB4 – ampliação.

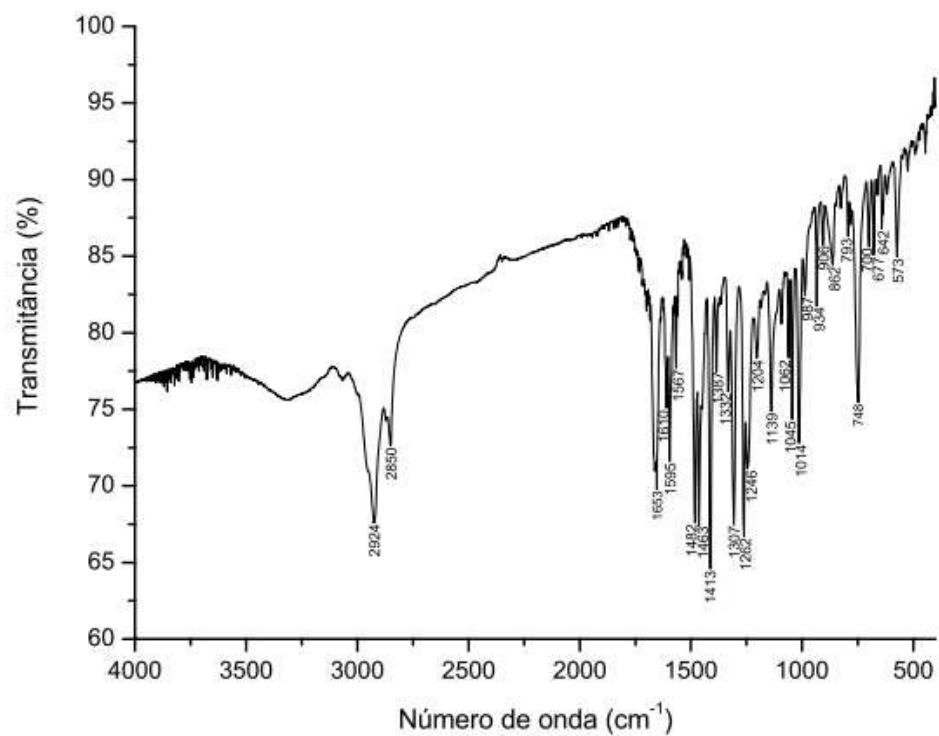


Anexo 78. Espectro HMBC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CDCl_3) da amostra GB4 – ampliação.

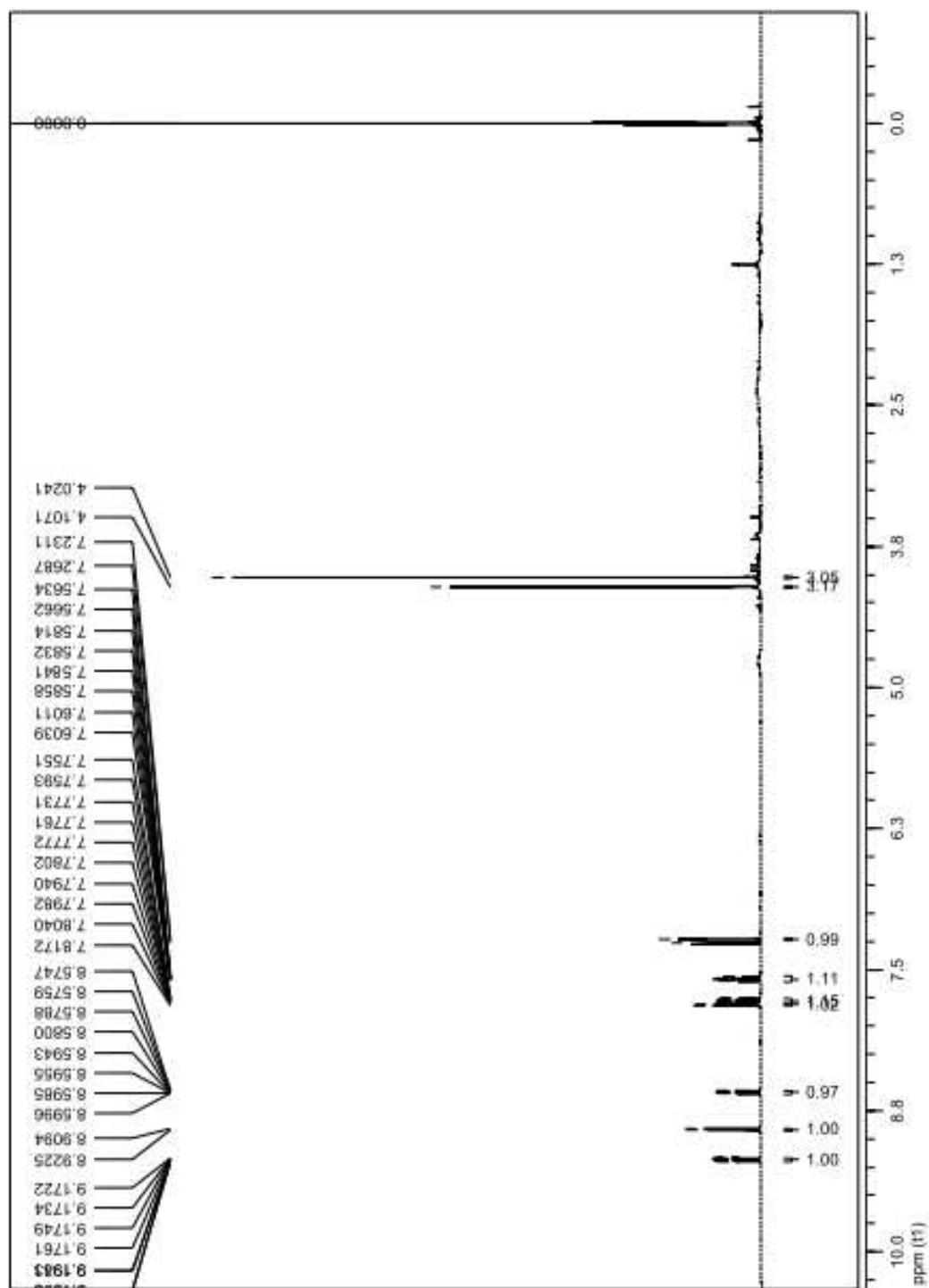


Anexo 79. Espectro de massa ESI-MS, modo positivo (A) e negativo (B), 15 eV da amostra GB4 em metanol e espectro do MS/MS do m/z 338,1, modo positivo, 15 eV, em metanol (C).

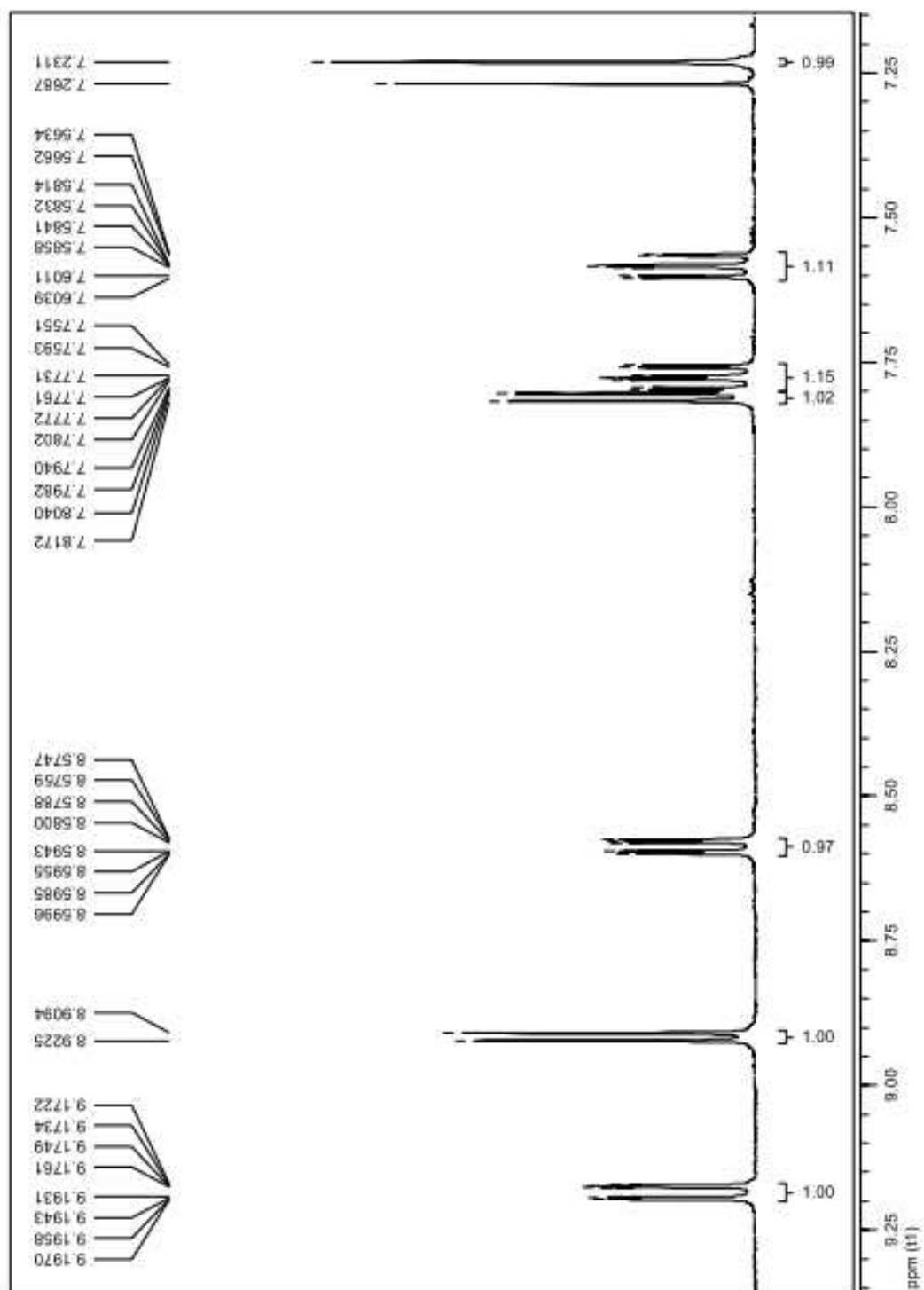
7. Substância GB5- Lysicamina



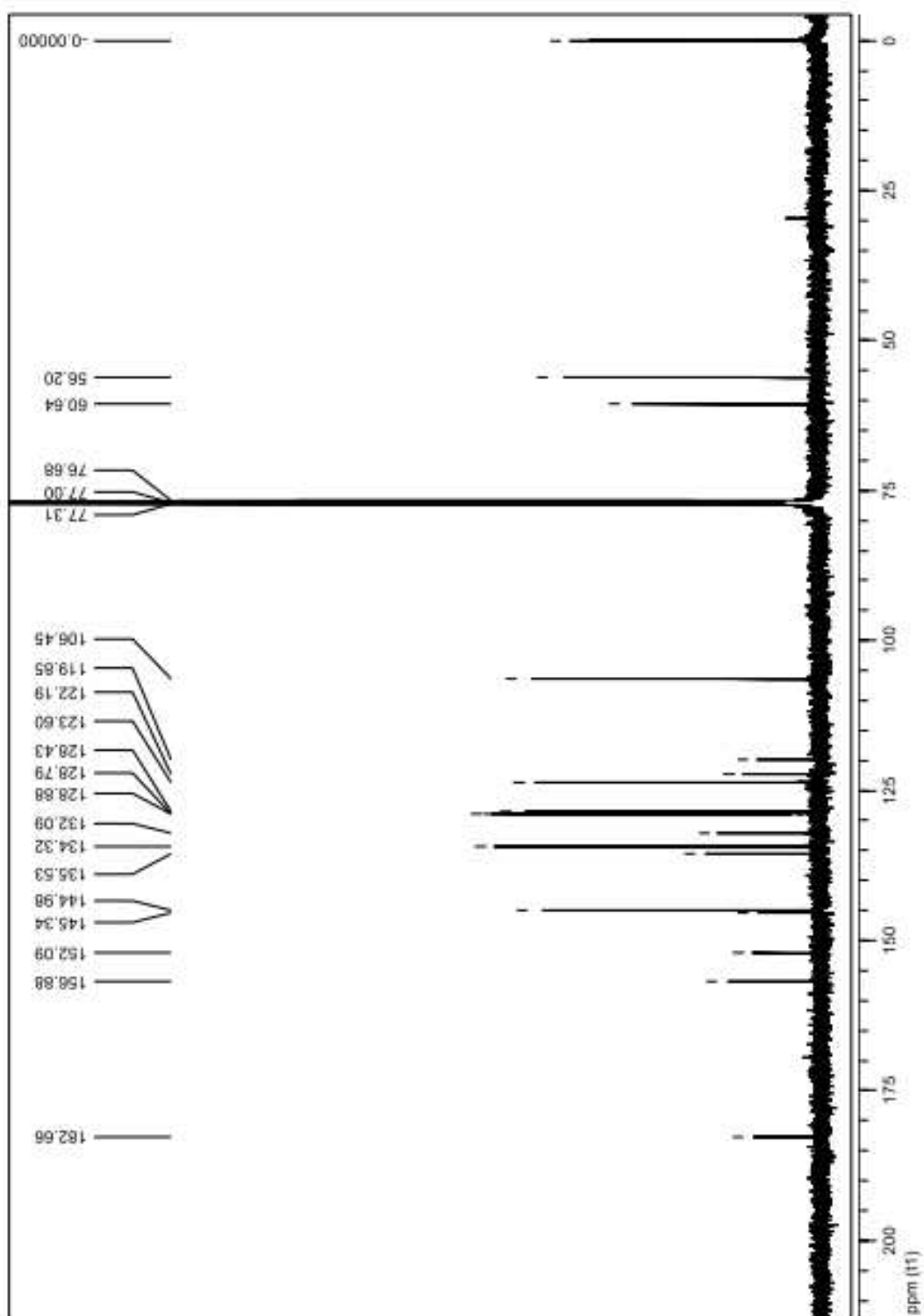
Anexo 80. Espectro de absorção na região do IV (KBr) da amostra GB4.



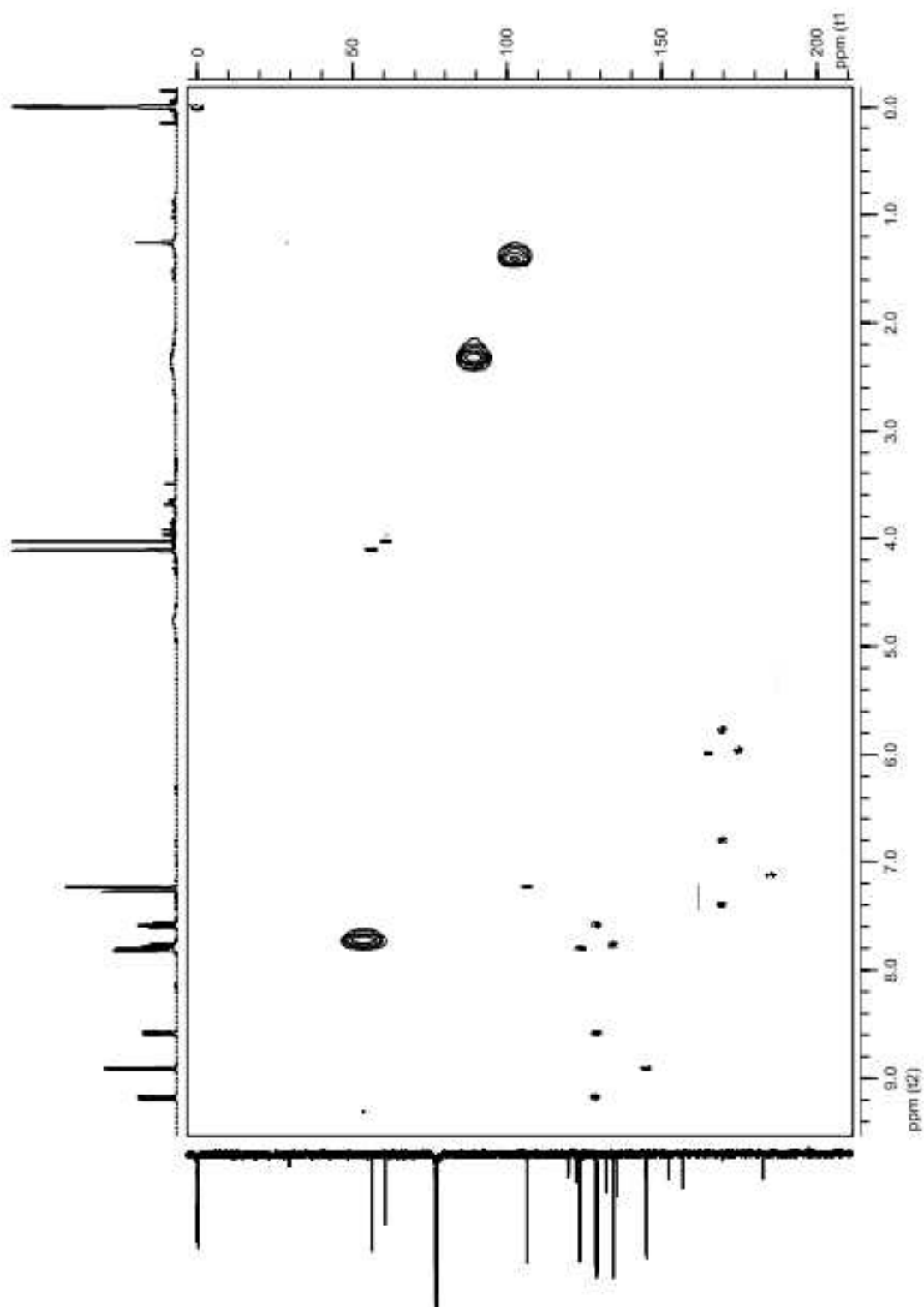
Anexo 81. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) de GB5.



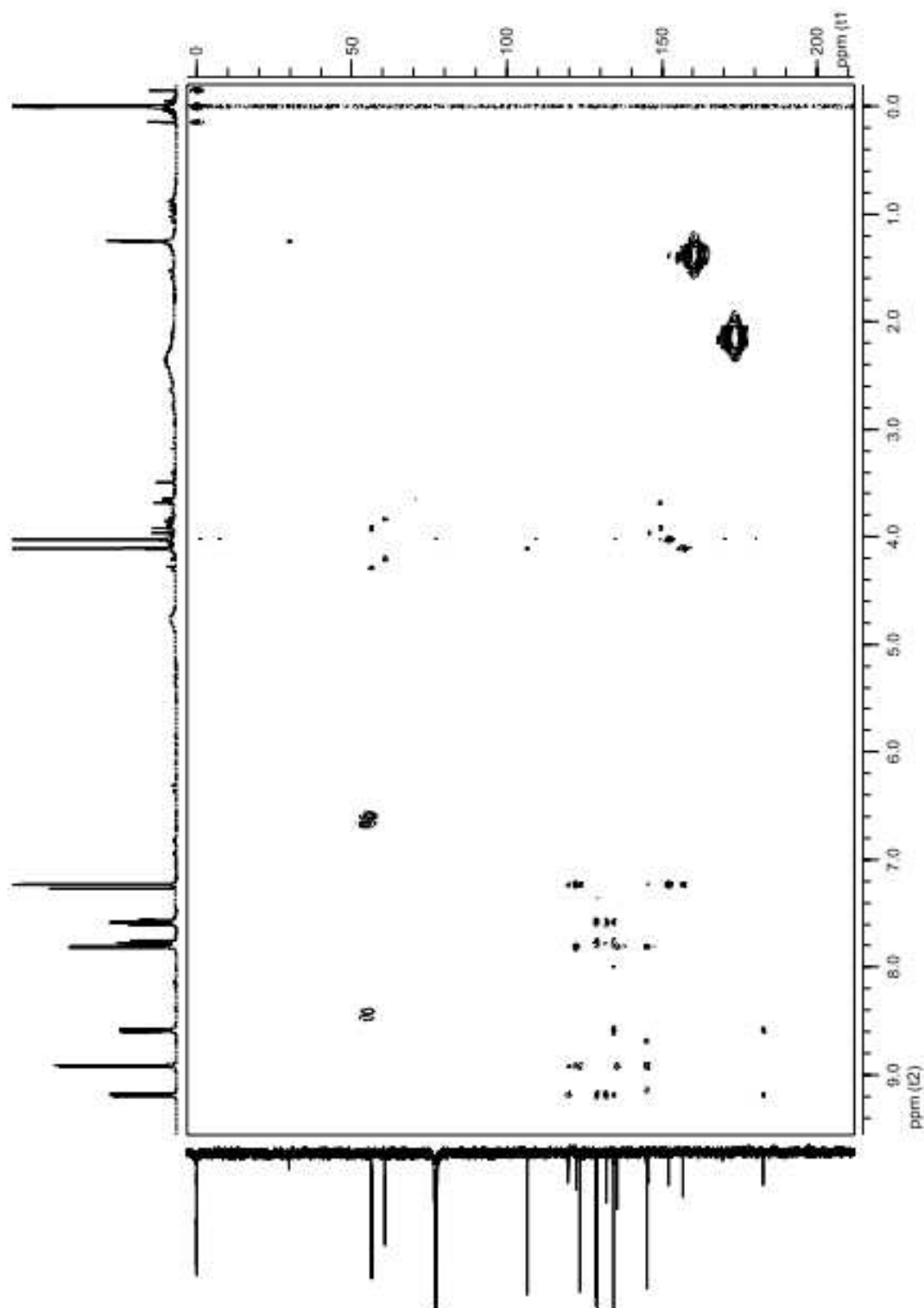
Anexo 82. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de GB5- ampliação



Anexo 83.Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de GB5.

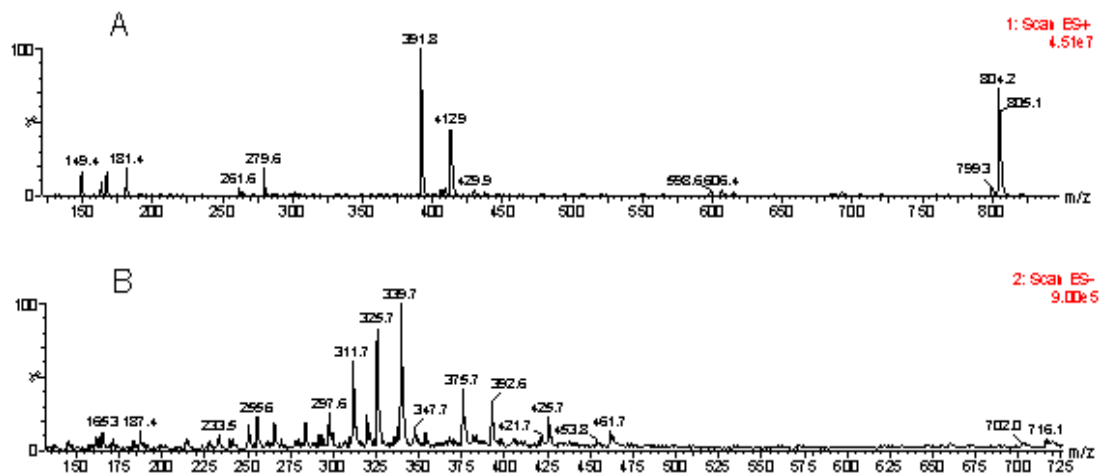


Anexo 84. Mapa de contorno gHSQC (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl₃) de GB5.

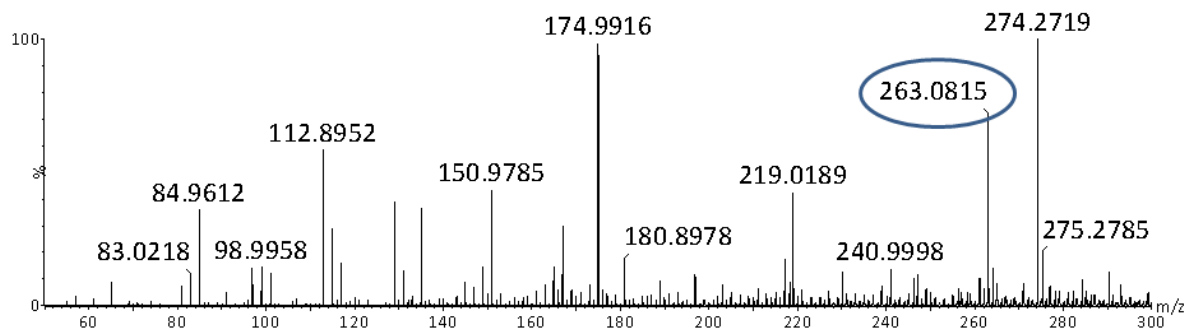


Anexo 85. Mapa de contorno gHMBC (H 400 MHz, C 100 MHz, CDCl₃) de GB5.

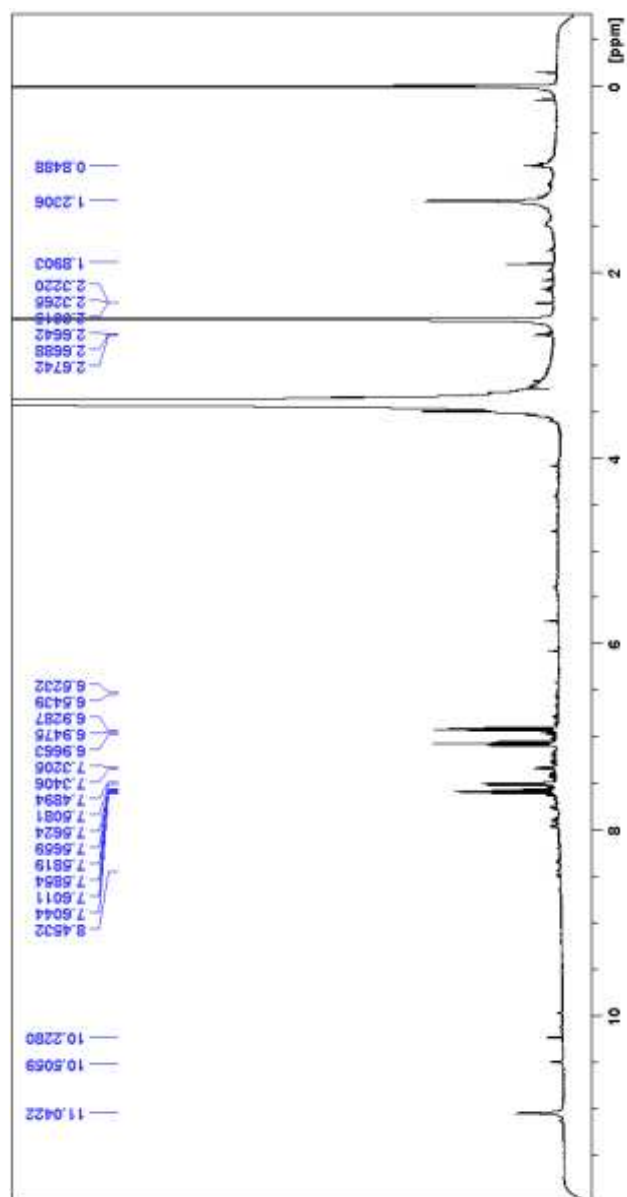
8. Substância IT1- Índigo



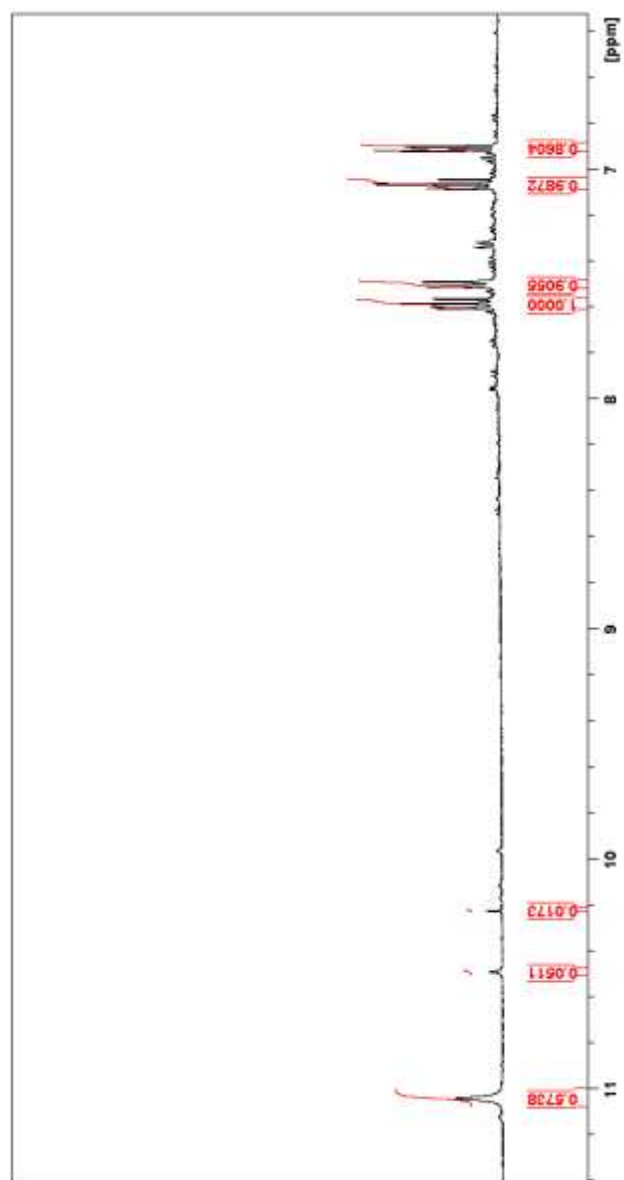
Anexo 86. Espectro de massa ESI-MS, modo positivo (A) e modo negativo (B), 25 eV da amostra IT1 em metanol.



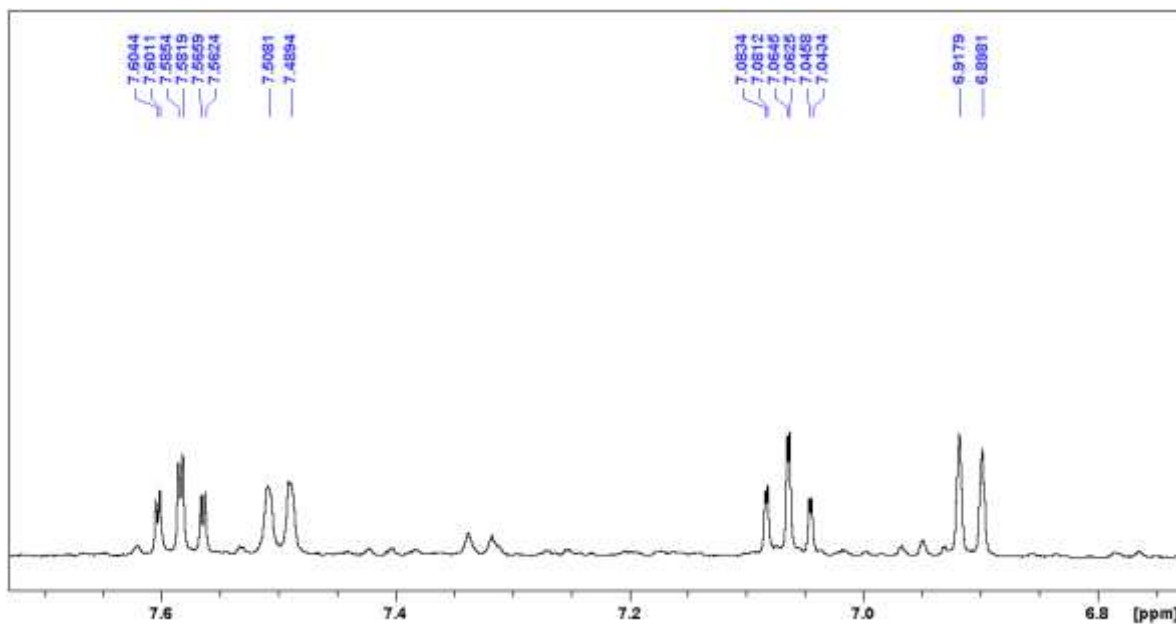
Anexo 87. Espectro de massa ESI-MS, modo positivo, 25 eV (A) de alta resolução da amostra IT1 em metanol.



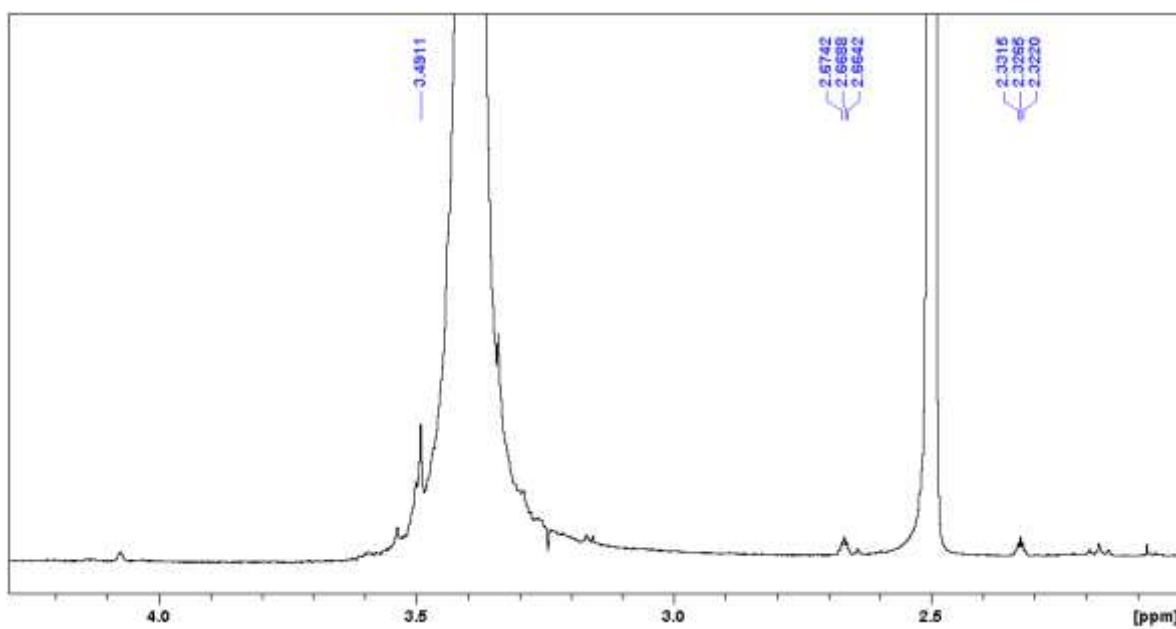
Anexo 88. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, *DMSO-d6*) de IT1.



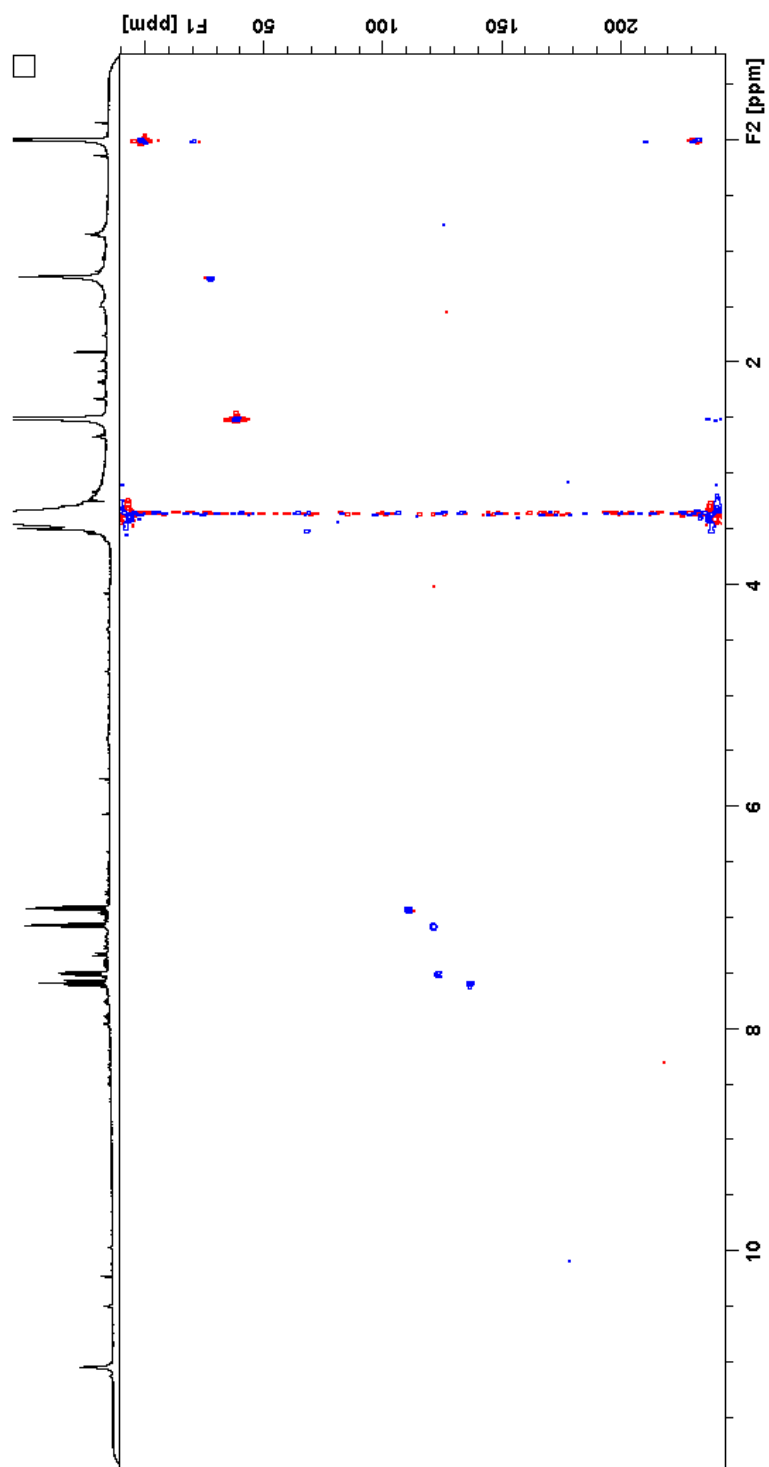
Anexo 89. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de IT1- ampliação



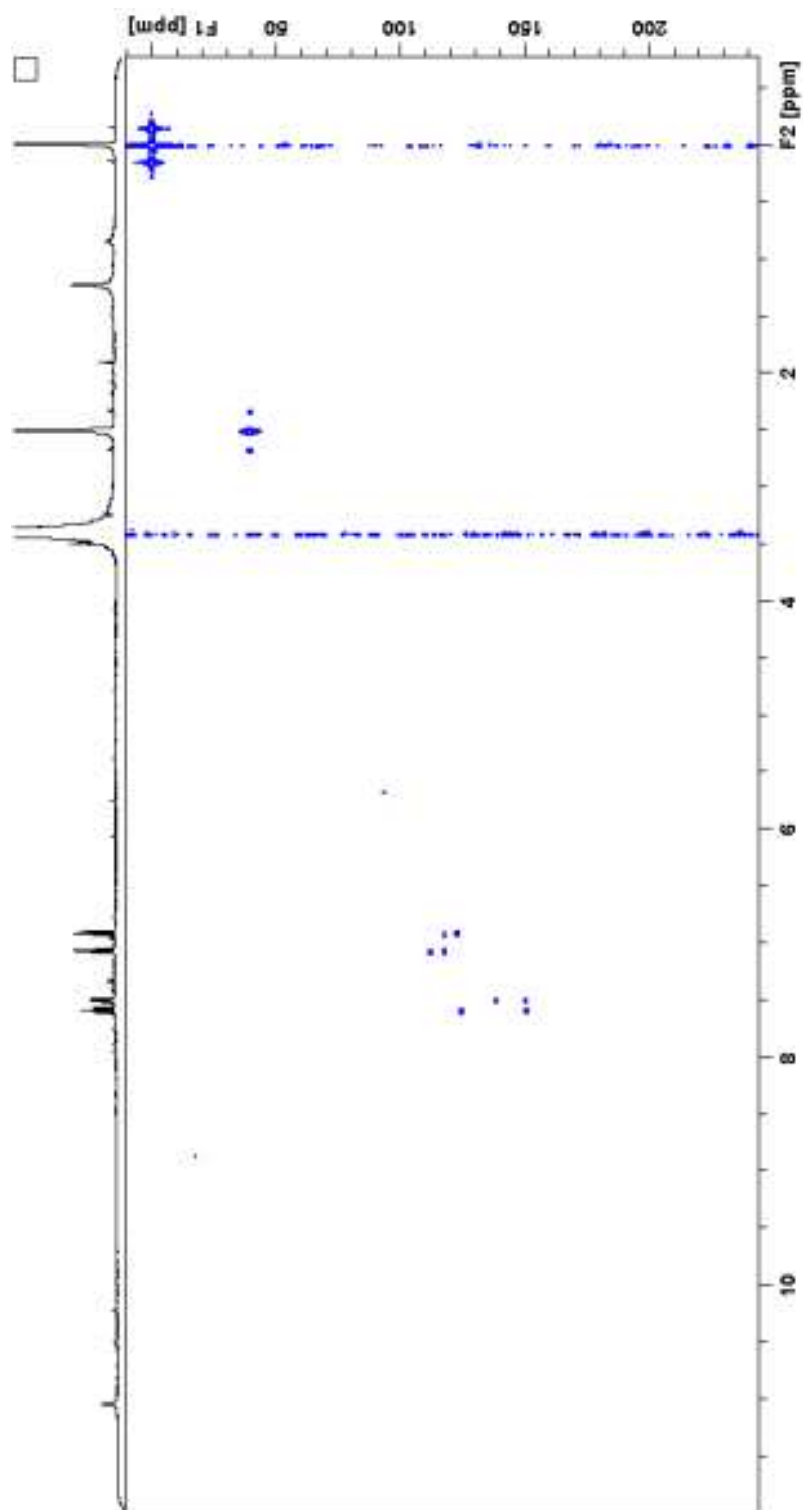
Anexo 90. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, *DMSO-d6*) de IT1- ampliação região aromática



Anexo 91. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, *DMSO-d6*) de IT1- ampliação região alifática



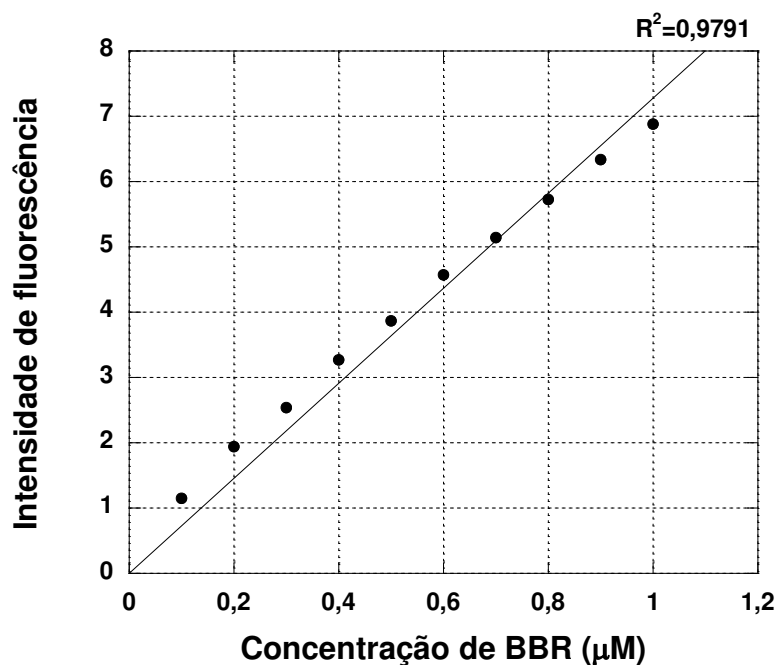
Anexo 92. Espectro de HSQC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , *DMSO-d6*) de IT1.



Anexo 93. Espectro de HMBC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , $\text{DMSO-}d_6$) de IT1.

9. Curva padrão da fluorescência de berberina em Triton 0,3%.

Para determinar a quantidade de berberina nos extratos celulares (Triton X-100 0,3%) fez-se uma curva padrão utilizando-se soluções com diferentes concentrações de berberina em Triton X-100 0,3%. Os parâmetros de medida de fluorescência foram os mesmos utilizados para medir a fluorescência dos extratos celulares (excitação a 350nm, detecção a 540nm e voltagem do detector de 950V). A figura 1a mostra a intensidade de fluorescência a 540nm em função da concentração de berberina.



Anexo 94. Curva padrão para quantificação da BBR: Intensidade de fluorescência da berberina em função da sua concentração em Triton X-100 0,3%.

10. Curva padrão de Albumina Humana em Triton 0,3%

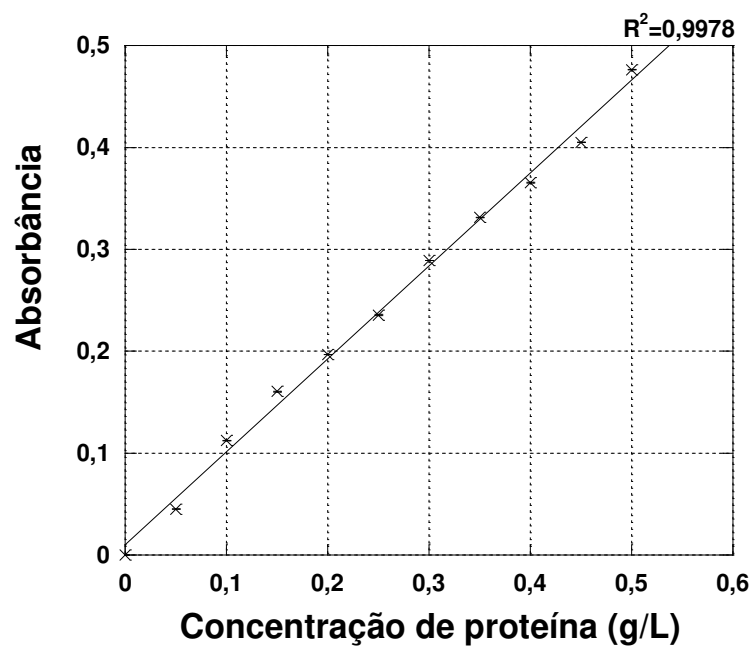
A dosagem de proteínas pelo método de Lowry (Lowry, 1951) é um ensaio bioquímico para determinar a quantidade total de proteínas em uma solução. O método baseia-se na formação de complexos entre íons bivalentes de cobre e ligações peptídicas de proteínas em condições alcalinas que induz a oxidação em íons monovalentes de cobre. Estes íons monovalentes e os grupamentos dos radicais tirosina, triptofanos e cisteína reagem com o reagente do Folin para formar um produto molibdênio/tungstênio azul. A concentração total de proteínas é expressa pela mudança de cor do reativo de Folin que pode ser medido por absorbância a 750nm. O método é sensível dentro do intervalo de concentração entre 0,01-1g/L.

Assim, para dosagem de proteínas das amostras realizou-se as seguintes etapas:

- preparo da solução A: 5mg/ml de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) em tartarato duplo de sódio e potássio tetra hidratado ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a 10 mg/ml.
- preparo da solução B: 50 ml de carbonato de sódio (NaCO_3) em hidróxido de sódio (NaOH) 0,1N à 20mg/ml.
- preparo do reativo C: 1 ml da solução A + 50 ml da solução B

Em seguida preparou-se a mistura de reação: 100 µl do extrato celular de cada amostra com 100µl de NaOH 0,1 N e por fim acrescentou-se 2ml de reativo C. Após 15 minutos de espera acrescentou-se 100 µl de reativo de Folin. As amostras foram então armazenadas no escuro, temperatura ambiente (25°C) e após 90 minutos mediu-se sua absorbância à 750nm.

A curva padrão foi feita utilizando-se soluções de albumina em NaOH 0,1N em diferentes concentrações. Para cada concentração em albumina a mistura de reação consistia de 100 µl de Triton X-100 0,3%, 100µl de solução de albumina em NaOH 0,1N e 2ml de reativo C. As outras etapas foram iguais às realizadas para as amostras.



Anexo 95. Curva padrão para dosagem de proteínas: absorbância da mistura de reação à 750nm em função da concentração da albumina em NaOH 0,1 N.