## UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

14	
(	SECRETARIA
	DE
P	OS-GRADUAÇÃO
1	LB.
1	

### CAROLINE CARAMANO DE LOURENÇO

# **"BIOPROSPECÇÃO DE FOTOSSENSIBILIZADORES**

## NATURAIS E SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS EM Eugenia

### chlorophylla E DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS

## ANALÍTICOS"

Este exem	plar corresponde	e à redsção fin	ai	
da tese d	lefendida pelo(a	a), candidato (	a)	
Cardine	anameno a	be dowingo		
			-	
e aprovada	a pela Comissão	Julgadora.	-	
		0 0	- AV	
(	m	There	MM	
0.	And Contraction	KK	ALL.	2
Orie	entador: Prot.	Ur. Marco	s lose paivad	lor.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Vegetal.

Campinas, 2012

### FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR

### ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430

### BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA -

### UNICAMP

L934b	Lourenço, Caroline Caramano de, 1988- Bioprospecção de fotossensibilizadores naturais e substâncias bioativas em <i>Eugenia chlorophylla</i> e desenvolvimentos de procedimentos analíticos / Caroline Caramano Lourenço. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.	
	Orientador: Marcos José Salvador. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.	
	<ol> <li>Eugenia chlorophylla. 2. Agentes fotossensibilizantes. 3. Fotoquimioterapia. 4. Cromatografia de gases e espectrometria de massas. I. Salvador, Marcos José, 1971 II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</li> </ol>	

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Bioprospecting of photosensitizers and natural bioactive substances in Eugenia chlorophylla and development of analytical procedures Palavras-chave em Inglês: Eugenia chlorophylla Photosensitizing agents Photochemotherapy Gas chromatography-mass spectrometry Área de concentração: Biologia Vegetal Titulação: Mestre em Biologia Vegetal Banca examinadora: Marcos José Salvador [Orientador] Cristiane Yumi Koga-Ito Claudia Regina Baptista Haddad Data da defesa: 24-02-2012 Programa de Pós Graduação: Biologia Vegetal Campinas, 24 de fevereiro de 2012

### BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos José Salvador (Orientador)

Profa. Dra. Cristiane Yumi Koga Ito

total Assinatura

Assinatura

Profa. Dra. Claudia Regina Baptista Haddad

Dra. Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya

Dr. Emmanoel Vilaça Costa

Assinatura

Assinatura

### Agradecimentos

À Deus, pela vida, saúde, força e oportunidades maravilhosas colocadas em meu caminho.

Aos meus pais Lucia e Adilson por todo amor, carinho, incentivo e exemplo de vida.

Aos meus familiares, Edith, Regina e Giovanni que tornaram possível a elaboração desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcos José Salvador, pela orientação, paciência e confiança depositada em mim.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da UNICAMP, pelo suporte concedido ao longo do mestrado.

À FAPESP, FAEPEX-UNICAMP, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

Aos técnicos, pela paciência e dedicação.

À professora Dra. Maria Elida Alves Stefanello (DQ/UFPR), pela coleta do material vegetal.

Ao professor Dr. Armando Carlos Cervi (IB/UFPR), pela identificação Botânica.

Aos colegas de laboratório, Aislan; Natalia; Larissa; Gislaine e Carlos por toda ajuda durante a elaboração desse trabalho.

Às alunas de iniciação científica que estiveram presentes durante todo desenvolvimento do projeto.

Aos componentes das bancas de qualificação e defesa pelas valiosas dicas e por aceitarem fazer parte dessas etapas da minha formação.

Aos amigos que em todos os momentos estiveram ao meu lado incentivando e apoiando.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada a todos!

# Lista de Figuras

Figura 1. Esquema de preparação do extrato bruto de Eugenia chlorophylla extraído em
solventes orgânicos19
Figura 2. Fluxograma do fracionamento do extrato etanólico bioativo de Eugenia
chlorophylla21
Figura 3. Etapas do isolamento dos constituintes químicos da fração diclorometânica (ECD) de
Eugenia chlorophylla24
Figura 4. 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 fildmaster27
Figura 5. Equipamento laser Photon Lase®
Figura 6. Espectro de absorção no visível (A) do Azul de metileno e do diluente
(Água/Propilenoglicol 95:5), (B) extrato bruto (ECB) e fração diclorometânica (ECD) de E.
chlorophylla com o diluente água/propilenoglicol (95:5) e (C) ECB e ECD com o diluente
água/DMSO (95:5). As amostras foram avaliadas na concentração de 1,25mg/mL40
Figura 7. Espectro de absorção na região do UV-visível do (A), extrato bruto (ECB) e (B)
fração diclorometânica (ECD) de Eugenia chlorophylla e (C) ácido quínico (concentração de
0,1mg/mL, diluído em DMSO)42
Figura 8. Espectros de emissão de fluorescência do extrato bruto (ECB) da fração
diclorometânica (ECD), de Eugenia chlorophylla diluído em propilenoglicol na concentração
de 0,1mg/mL43

Figura 9. Espectros de excitação do ECB diluído em DMSO na concentração de 0,1mg/mL,
$\lambda_{emi} = 630 \text{nm} (A), \lambda_{emi} = 725 \text{nm} (B).$
Figura 10. Espectros de excitação do ECD diluído em DMSO na concentração de 0,1mg/mL,
$\lambda_{emi} = 630 nm (A), \lambda_{emi} = 725 nm (B).$
Figura 11. Espectros de fluorescência modo de emissão do ECD (A) e do ácido quínico (B)
em propilenoglicol na concetração de 0,1mg/mL46
Figura 12. Produção de oxigênio singlete do ECB de Eugenia chlorophylla (A), ECD (B) e
ácido quínico (C), concentração final de 1,25mg/mL, na presença de DPBF, irradiado e não
irradiado47
Figura 13. Número de unidades formadoras de colônia por mililitros(UFC/mL) da cepa de
Staphylococcus epidermidis 6epi-cepa de campo (A), Staphylococcus epidermidis ATCC 1228
(B), Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 (C) e Staphylococcus aureus ATCC 14458 (D),
tratadas com ECB de Eugenia chlorophylla e sua fase ECD na ausência e na presença de

irradiação com laser diodo InGaAIP (**λ**=660nm) por 5min. Extratos avaliados na concentração sub-inibitória mínima (CIM/2). Símbolos diferentes indicam diferença estatística entre sem luz X com luz, P<0,05 (ANOVA seguido do Teste de Tukey)......52

 

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Rendimento dos extratos orgânicos e códigos das folhas de Eugenia chlorophylla. 19
Tabela 2. Rendimentos obtidos a partir do fracionamento do extrato bruto etanólico (ECB) de
Eugenia chlorophylla21
Tabela 3. Resultado da atividade antibacteriana das amostras e controles em placas não-
irradiadas, expresso como média do número de UFC/mL50
Tabela 4. Resultado da atividade antibacteriana das amostras controles, placa irradiada,
expresso como média do número de UFC/mL
Tabela 5. Resultado da atividade antifúngica das amostras ECB, ECD e controles, placa não
irradiada, expresso como média do número de UFC/mL53
Tabela 6. Resultado da atividade antifúngica das amostras ECB, ECD e controles, placa
irradiada, expresso como média do número de UFC/mL54
Talela 7. Substâncias encontradas em óleos essenciais de Eugenia chlorophylla obtidos em
diferentes períodos
Talela 8. Atividade antimicrobiana (CIM em mg/mL) dos óleos essenciais de Eugenia
<i>chlorophylla</i> obtidos em diferentes períodos frente a micro-organismos

### Lista de anexos

Anexo1. Perfil cromatográfico em CLAE-UV/DAD do extrato bruto etanólico das folhas
(ECB) de Eugenia chlorophylla, analisado em dois comprimentos de onda 254nm (A) e
660nm (B)
Anexo 2. Perfil cromatográfico em CLAE-UV/DAD da fração diclorometânica (ECD) de
<i>Eugenia chlorophylla</i> , analisado em dois comprimentos de onda 254nm (A) e 660nm (B)90
Anexo 3. Fingerprint ESI-MS em modo negativo doextrato bruto etanólico (ECB) de Eugenia
chlorophylla91
Anexo 4. Fingerprint ESI-MS em modo negativo da fração diclorometânica (ECD) de Eugenia
chlorophylla92
Anexo 5. Espectro de MS-MS, energia de colisão 25 V, da amostra padrão de ácido quínico
(Sigma-Aldrich)
Anexo 6. Espectro de MS-MS, energia de colisão 25 V, do pico 191 m/z do extrato bruto
etanólico (ECB) de <i>Eugenia chlorophylla</i> 94
Anexo 7. Espectro de ESI-MS/MS, energia de colisão 25 V, do pico 293 m/z do extrato bruto
etanólico (ECB) de Eugenia chlorophylla95
Anexo 8. Espectro de ESI-MS/MS, energia de colisão 25 V, do pico 587 m/z do extrato bruto
etanólico (ECB) de Eugenia chlorophylla96
Anexo 9. Cromatograma CLAE-UV/DAD da subfração ECD 25A do fracionamento da fração
diclorometânica analisado em dois comprimentos de onda 254nm (A) e 660nm (B)97

Anexo 10. Cromatograma CLAE-UV/DAD da subfração ECD 25B do fracionamento da fração diclorometânica analisado em dois comprimentos de onda 254nm (A) e 660nm (B)....98

Anexo 16. Cromatogramas CG/EM obtidos em 2011 das amostras dos óleos do caule (ENC),

folhas (ENF) e flores (MYRT) coletadas em 2005. .....103

Anexo 17. Expansão entre 20 e 30 minutos......103

Anexo 18. Expansão entre 30 e 35 minutos ......104

Anexo 19. Cromatograma CG-EM do óleo essencial das folhas obtido em 2005, mostrando os picos de compostos mais voláteis (entre 20 e 23 minutos) que não foram detectados em 2011.

Anexo 20. Cromatograma CG-EM dos óleos essenciais obtidos em 2011: caule (ECC) e folhas
(ECF)105
Anexo 21. Comparação entre os óleos com intensificação dos sinais do óleo do caule (ECC).
Anexo 22. Ampliação da região de 2 a 20 minutos106
Anexo 23. Ampliação da região de 20 a 30 minutos106
Anexo 24. Ampliação da região entre 30 e 40 minutos107
Anexo 25. Ampliação da região entre 40 e 50 minutos

### Abreviaturas

ASD	Ágar Saboraud dextrose		
AM	Azul de metileno		
AA	Ácido ascórbico		
AS	Azida sódica		
aPDT	(do inglês Antimicrobial Photodynamic therapy-Terapia fotodinâmica antimicrobiana		
CIM	Concentração inibitória mínima		
CCD	Cromatografia em camada delgada		
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência		
CLAE-UV/DAD	Cromatografia de alta eficiência acoplada com detector ultravioleta e conjunto de fotodiodos		
cm <sup>2</sup>	Centímetro quadrado		
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa		
C.V.	Coeficiente de variação		
°C	Graus Celsius		
DMSO	Dimetilsulfóxido		
DPPH	Radical 2,2- difenil-1- picril-hidrazil		
DPBF	1,3- diphenylisobenzofuran		
ECB	Extrato de Eugenia chlorophylla bruto		
ECBT	Extrato de Eugenia chlorophylla fração butanólica		
ECC	Óleo essencial de Eugenia chlorophylla obtido. a partir do caule em 2011		
ECD	Extrato de Eugenia chlorophylla partição diclorometânica		
ECF	Óleo essencial de Eugenia chlorophylla obtidos a partir da folha em 2011		
ECH	Extrato de Eugenia chlorophylla hexânico		
ECHX	Extrato de Eugenia chlorophylla fração hexânica		
ECR	Extrato de Eugenia chlorophylla fração remanescente		
ENC	Óleo essencial de Eugenia chlorophylla obtido a partir do caule em 2005		

ENF	Óleo essencial de Eugenia chlorophylla obtido a partir da folha em 2005		
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 seqüencial com ionização por eletrospray)		
θΤ	Campo quântico do estado triplete		
g	Gramas		
h	Horas		
HIS	Histidina		
InGaAlP	Fosfeto de Indio-Gálio-Alumínio		
J	Joules		
J/cm <sup>2</sup>	Joules por centímetro quadrado		
L-	Não irradiado		
L+	Irradiado		
$\lambda_{abs}$	Comprimento de onda de Absorção		
$\lambda_{emi}$	Comprimento de onda de Emissão		
λ <sub>exi</sub> MANI	Comprimento de onda de Excitação Manitol		
mg	Miligramas		
mg/mL	Miligramas por mililitros		
MHb	Muller Hilton Broth		
min	Minutos		
μg	Microgramas		
<b>μ</b> g/mL	Microgramas por mililitros		
μL	Microlitros		
mL	Mililitros		
mm	Milímetros		

m/v	Massa/Volume
mW	Miliwatts
mW/cm <sup>2</sup>	Miliwatts por centímetro quadrado
nm	Nanômetros
Myrt	Óleo essencial de Eugenia chlorophylla obtido a partir das flores em 2005
$O_2^-$	Ânion radical superóxido
PDT	(do inglês Photodinamic therapy-Terapia fotodinâmica)
pH	Potencial hidrogeniônico
RB	Rosa de bengala
ROS	(do inglês Reactive oxygen species- Espécies reativas de oxigênio
RMN 1D	Ressonância magnética nuclear em uma dimensão
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN 2D	Ressonância magnética nuclear em duas dimensões
S	Segundos
Si	Estado singlete
S <sub>n</sub>	Estado excitado singlete superior
$S_0$	Estado fundamental
TSA	(do inglês Tryptone Soy Agar- ágar de triptona de soja)
TSB	(do inglês Tryptone Soy Broth- caldo de triptona de soja)
ТВО	Azul de toluidina
TRIP	Triptofano
UFC	Unidades formadoras de colônias
UFC/mL	Unidades formadoras de colônias por mililitros
UI/mL	Unidades por mililitros
UV	Ultravioleta
v/v	Volume em volume
W/cm <sup>2</sup>	Watts por centímetro quadrado

,			
T	nd	i	Ce
-	пu		u

Ficha Catalográfica	ii
Composição da banca Erro! Indicador não	definido.
Agradecimentos	iv
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	viii
Lista de Anexos	ix
Abreviaturas	xii
Índice	xv
Resumo	1
Summary	4
1.Introdução	7
1.1.Considerações quanto à família Myrtaceae e espécie em estudo	10
1.2.Considerações gerais quanto a Laser, Terapia Fotodinâmica ( Fotossensibilizadores aplicados em PDT	PDT) e
2.Objetivos	17
3. Material e métodos	
3.1.Coleta, classificação e obtenção do Material Vegetal	18
3.2.Preparo dos extratos brutos	
3.3. Fracionamento dos extratos brutos	
3.4.Identificação dos constituintes químicos	
3.5.Espectroscopia de absorção na região do visível	
3.6. Espectroscopia de fluorescência de emissão e excitação em estado estacionário	25
<ul><li>3.7. Avaliação da eficiência fotoquímica dos extratos</li><li>3.7.1. Verificação do comprimento de onda e potência do LASER</li></ul>	
3.7.2. Avaliação da formação de Oxigênio Singlete (Ensaio DPBF)	
3.7.3.Determinação da atividade fotodinâmica pelos mecanismos fotoquímicos	do tipo I
ou tipo II em modelo biológico in vitro	
3.8.Efeito do oxigênio no processo de fotoinativação	
3.9.Ensaios Biológicos in vitro	

3.9.1 Determinação da atividade antimicrobiana e da concentração inibitória mínima
(CIM)
3.9.2. Avaliação do efeito de produtos naturais como fotossensibilizadores em PDT33
3.10.Obtenção e análise dos óleos essenciais
3.11.Estatística
4.Resultados
4.1.Preparação dos extratos brutos e fracionamento biomonitorado
4.2. Varredura na região do visível
4.3. Espectroscopia de fluorescência de emissão e excitação em estado estacionário40
4.4.Efeito do oxigênio no processo de fotoinativação45
4.5. Avaliação da eficiência fotoquímica dos extratos - Avaliação da formação de Oxigênio Singlete (Ensaio DPBF)
4.6. Ensaios Biológicos in vitro
4.6.2. Avaliação do potencial do extrato etanólico bruto das folhas de Eugenia
chlotophylla e de suas frações como fotossensibilizadores em PDT antimibrobiana48
4.6.3. Determinação da atividade fotodinâmica pelos mecanismos fotoquímicos do tipo I
ou tipo II em modelo biológico in vitro55
4.7. Obtenção, caracterização química por CG-EM e avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de <i>Eugenia chlorophylla</i>
5. Discussão
6.Conclusões
7. Referências bibliográficas75
8. Anexos
8.1.Cromatogramas obtidos por CLAE-UV/DAD do extrato bruto das folhas de E. chlorophylla e de suas fases da partição
8.2.Cromatogramas obtidos por CLAE-UV/DAD das subfrações da fração diclorometânicado extrato bruto etanólico das folhas de <i>E. chlorophylla</i>

### Resumo

Este estudo teve por objetivo a prospecção químico-farmacológica de fotossensibilizadores naturais para aplicação em terapia fotodinâmica (PDT) antimicrobiana e de substâncias bioativas acumuladas no extrato etanólico das folhas de Eugenia chlorophylla (Myrtaceae), bem como a caracterização química e da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das folhas, caule e flores desta espécie vegetal. Para tanto, procedeu-se o preparo do extrato vegetal bruto (hexânico e etanólico) a partir das folhas de E. chlorophylla e a avaliação da absorção de luz na região espectral do visível de interesse e útil para aplicação em PDT. O extrato bruto etanólico foi submetido a uma extração líquido-líquido com hexano, diclorometano e butanol. Os melhores resultados na avaliação da absorção de luz na região espectral do visível de interesse e útil para aplicação em PDT foram obtidos com o extrato bruto e com a fração diclorometânica da partição, para os quais foram avaliadas suas características fluorescentes em estado estacionário no modo de emissão e excitação (caracterização preliminar de suas propriedades fotoquímicas e fotofísicas). Desenvolveuse a adequação de metodologia para uma avaliação inicial da eficiência fotoquímica dos (produção de oxigênio singlete, extratos e fracões obtidos ensaio, 1.3 – diphenylisobenzofuran (DPBF), bem como adequou-se os procedimentos para a realização dos bioensaios na presença e ausência de luz. Procedeu-se a avaliação da atividade antimicrobiana in vitro com o extrato bruto etanólico e suas frações da partição líquidolíquido, na ausência de irradiação laser, determinando-se os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) para as amostras bioativas e estimando-se os valores de concentração subinibitória que seriam usados na PDT atimicrobiana. Ainda, foram estabelecidos os procedimentos para a padronização do protocolo experimental de PDT antimicrobiana frente a bactérias (Gram positivas e Gram negativas) e leveduras in vitro e avaliou-se o efeito do extrato bruto etanólico e da fração diclorometânica como fotossensibilizadores naturais em PDT antimicrobiana, utilizando-se 11 cepas indicadoras. De acordo com os resultados obtidos o extrato bruto etanólico (ECB) e sua fração diclorometânica (ECD) apresentaram absorção de luz na região de 600 a 800 nm, demonstrou a capacidade de formar oxigênio singlete no ensaio com DPBF quando irradiados pelo laser e apresentou resultado efetivo na inativação de algumas das cepas indicadoras (bactérias e leveduras) em PDT antimicrobiana quando irradiados em sessão única por 5 min com laser diodo InGaAlP,  $\lambda$ =660nm. A partir dos resultados dos ensaios com DPBF e com a utilização de inibidores específicos do mecanismo fotoquímico em modelo biológico sugeriu-se que o mecanismo fotoquímico predominante para ECD é o do tipo II (mediado pela formação de oxigênio singlete). Deu-se inicio ao estudo fitoquímico monitorado pela absorção de luz na região do visível (400 a 830 nm), pela avaliação da eficiência fotoquímica e pelas atividades biológicas. Pelo resultado do estudo de desreplicação por ESI-MS/MS do extrato etanólico bruto e da fração ECD sugeriu-se a presença do ácido quínico nestas amostras. Como as folhas frescas de E. chlorophylla apresentavam odor intenso e neste projeto foi proposto também estudo para a prospecção de substâncias bioativas, realizou-se um estudo para a caracterização química e avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das folhas, caule e flores desta espécie vegetal. A caracterização química dos constituintes majoritários do óleo essencial foi realizada por cromatografia gasosa (CG-EM). Os óleos essenciais das folhas, caule e flores de *E. chlorophylla* foram obtidos por hidrodestilação e apresentaram rendimento de 0,01 a 0,1%. Setenta e cinco componentes foram identificados, representando mais de 85% do total do óleo. Os principais componentes detectados nos óleos essenciais foram *E*-cariofileno (flores), óxido de cariofileno (caule, flores e folhas), globulol (caules e folhas) e *T*-muurolol, 1-epi-cubenol e  $\alpha$ -cadinol (caule, flores e folhas). Todos os óleos mostraram leve a moderada atividade antimicrobiana (na ausência de radiação laser), sobre principalmente as bactérias Gram positivas e *Candida albicans*, sendo estes resultados similares ao observado na literatura para esta espécie vegetal, com exceção do óleo do caule, coletado em 2011, que não se mostrou ativo nas condições experimentais utilizadas e é composto, predominantemente (85,4%) por um constituinte alifático para o qual não foi possível identificar a estrutura química por CG-EM. Ainda, observou-se variação nos valores de concentração inibitória mínima frente às cepas bioativas dependendo do ano de coleta e armazenagem dos óleos essenciais obtidos.

### Summary

This study aimed at making a chemical-pharmacological search for prospection of natural photosensitizers in photodynamic therapy (PDT) and of bioactive compounds accumulated in the ethanolic extract of leaves from Eugenia chlorophylla (Myrtaceae) and to study the chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils from leaves, stems and flowers of this plant species. For this purpose, we carried out the preparation of the crude plant extract (hexane and ethanol) from the leaves of E.chlorophylla followed by the assessment of light absorption in the visible spectral region of interest could be useful for application in PDT. The crude ethanol extract was subjected to a liquid-liquid extraction with hexane, dichloromethane and butanol. The best results for the absorption of light in the visible spectral region of interest to gets with usefulness for application in PDT were obtained for the crude extract and dichloromethane fraction, which were evaluated for their characteristics in steady-state fluorescent emission mode and excitement (preliminary characterization of photochemical properties). Still, it has adequate methodology was developed for an initial assessment of the photochemical efficiency of extracts (production of singlet oxygen, DPBF test 1.3-diphenylisobenzofuran) as well as the adequate conformed for the achievement of bioassays in the presence and absence of light. Evaluation of antimicrobial activity was carried out in vitro with a crude ethanol extract and their fractions from liquid-liquid partition, in the absence of laser irradiation, determining the values of minimum inhibitory concentration (MIC) in antimicrobial testes for bioactive samples and estimating the sub-inhibitory concentration values which would be used in antimicrobial PDT. Standardization of the experimental protocol of *in vitro* antimicrobial PDT was carried out against Gram positive and Gram-negative bacteria and yeast the effect of the crude ethanol extract and the dichloromethane fraction evaluated as natural photosensitizes in antimicrobial PDT using 11indicator strains. According to results obtained from the crude ethanol extract (ECB) and its dichloromethane fraction (ECD) showed light absorption in the region from 600 to 800 nm, it was demonstrated that singlet oxygen was formed in the assay with DPBF when irradiated by laser ( $\lambda$ =660nm) showed effective results in the inactivation of antimicrobial PDT in some of the indicator strains (bacteria and yeasts) when irradiated in a single session for 5 min with InGaA1P laser diode. Along with the test result with DPBF, research using specific inhibitors of the photochemical mechanism in a biological model suggests that the dominant photochemical mechanism for ECD is the type II (mediated by the formation of singlet oxygen). We carried out the phytochemical study monitored by light absorption in the visible region (400 to 830nm), in which the evaluation of photochemical efficiency and biological activities and the results of the study of dereplication of the crude ethanolic extract and the ECD fraction by ESI-MS/MS suggest the presence of quinic acid in these samples. Since the fresh leaves of E. chlorophylla have an intense smell and this project also contemplated a search for bioactive substances a study was carried out for the chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils from leaves, stems and flowers of the plant species. The chemical characterization of the major constituents of the essential oil was performed by gas chromatography (GC-MS). Essential oils from leaves, stems and flowers of *E. chlorophylla* were obtained by hydrodistillation and presented a yield of 0.01 to 0.1%. Seventy-five compounds were identified, representing over 85% of the total oil. The main components were *E*-caryophyllene (flowers), caryophyllene oxide (stem, leaves and flowers), globulol (stems and laves) and *T*-muurolol, 1-epi- $\alpha$  cubenol, and  $\alpha$ -cadinol (stem, leaves and flowers). All essential oils studied showed mild to moderate antimicrobial activity mainly associated with Gram positive bacteria and *Candida albicans* with results similar to those observed in the literature for this plant species. An exception was the stem oil collected in 2011 that was not active in the experimental conditions used and is constituted predominantly (85.4%) for an aliphatic constituent not identified by GC-MS. Was verified variation in the minimum inhibitory concentration values of essential oils of *E. chlorophylla* with the year of collect and with storage time.

### 1.Introdução

O uso de produtos naturais, principalmente os de origem vegetal, no tratamento e na cura de enfermidades advém dos primórdios da humanidade e vem contribuindo para a obtenção e planejamento de novos fármacos e o desenvolvimento de tecnologias e medicamentos, além de possibilitar sua aplicação como cosméticos e alimentos nutracêuticos (AKERELE, 1988; 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;).

A terapia laser de baixa potência é amplamente empregada na medicina com várias finalidades: na bioestimulação tecidual, promovendo a hemostasia e estimulação da cicatrização (PINHEIRO & FRAME, 1992); no alívio da dor; no controle do processo inflamatório com reabsorção do edema e inativação de catabólitos intermediários (GENOVESE, 2000); em patologias cutâneas estimulando a proliferação de fibroblastos, diminuindo o edema local e favorecendo a neovascularização (BELKIN & SCHWARTZ, 1989); na regeneração óssea; na eliminação de células neoplásicas e na inativação de microrganismos patogênicos (KESSEL & LUO, 2004; SAITO & SHIMIZU, 1997). A terapia fotodinâmica – PDT (do inglês *Photodynamic Therapy*) representa um sistema terapêutico que envolve a administração de um agente fotossensibilizador, seguida pela ativação do mesmo pela luz, resultando em uma seqüência de processos fotoquímicos e fotobiológicos que geram produtos fototóxicos danosos à célula-alvo (BLISS *et al.*, 2006; DOUGHERTY *et al.*, 1998). Sendo assim, a PDT baseia-se na administração tópica ou

sistêmica de uma substância não tóxica sensível à luz, seguida de irradiação em baixas doses com luz visível de comprimento de onda adequado (PERUSSI, 2007; FUCHS & THIELE, 1998). Trata-se de uma nova alternativa no tratamento anti-câncer e também de outras condições não cancerosas, geralmente caracterizadas por um super crescimento de células anormais ou indesejáveis (SOLBAN *et al.*, 2006; DOUGHERTY *et al.*, 2002; DOUGHERTY *et al.*, 1998; FUCHS & THIELE, 1998). Esta terapêutica requer a presença de três fatores: um fotossensibilizador, uma fonte de luz e oxigênio (HUANG, 2005; KENDALL & MORTON, 2003; FUCHS & THIELE, 1998). A PDT já foi aprovada como esquema terapêutico para o tratamento de vários tipos de câncer como de bexiga, pulmão, esôfago, gástrico e cervical, além do tratamento de degeneração macular relacionada à idade. Outras aplicações não oncológicas de PDT incluem tratamento de lesões prémalignas, psoríase, artrite e aterosclerose (HAMBLIN & HASAN, 2004).

Fotossensibilizadores são agentes, geralmente exógenos, que, sob iluminação em determinado comprimento de onda e na presença de oxigênio encontrado nas células, produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) como peróxidos, radicais hidroxilas, íons superóxidos e oxigênio singlete, que interagem com os sistemas biológicos e são citotóxicas para as células alvo contendo o agente fotoativo (ORTH *et al.*, 2000; ACKROYD *et al.*, 2001; CASTANHO *et al.*, 2004; NYMAN & HYNNINEN, 2004; RIBEIRO & GROTH, 2005; PERUSSI, 2007). A absorção de luz não habilita um componente a se comportar como um fotossensibilizador alguns requisitos são necessários para que isso ocorra como: não ser tóxico com as células do hospedeiro; permanecer em estado excitado para interagir com as moléculas vizinhas e assim produzir espécies

citotóxicas capazes de causar a morte da célula indesejável (MACROBERT *et al.*, 1989; ACKROYD *et al.*, 2001; GARCEZ *et al.*, 2003).

Os fotossensibilizadores utilizados ou estudados para o tratamento do câncer e outras doenças apresentam núcleos tetrapirrólicos incluindo porfirinas, clorinas, bacterioclorinas e ftalocianinas, devido às suas baixas toxicidades na ausência de luz em células de mamíferos e por suas propriedades de afinidade (DETTY *et al.*, 2004; PERUSSI, 2007). A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) em sua maioria, emprega fotossensibilizadores derivados de corantes vitais, tais como os xantenos halogenados, fenotiazídicos, acridinas e conjugados de clorina, que se caracterizam por não serem tóxicos às células humanas em concentrações superiores às requeridas para a inativação microbiana efetiva (WAINWRIGHT, 1998; PERUSSI, 2007).

Por fim, pode-se dizer que a busca de fotossensibilizadores em produtos naturais é promissora em vista da inegável biodiversidade brasileira que apresenta grande importância no cenário mundial, dado o valor intrínseco de seus recursos naturais. Assim, a necessidade de preservação e uso sustentável desta diversidade biológica é indispensável dado o acelerado processo de devastação que acomete muitos biomas brasileiros.

Desse modo, neste estudo procedeu-se à prospecção químico-farmacológica de fotossensibilizadores naturais para aplicação em PDT antimicrobiana e de substâncias bioativas em *Eugenia chlorophylla*, que pertence à família Myrtaceae, a qual apresenta espécies com considerável diversidade química e com potencial para atividades biológicas.

#### 1.1.Considerações quanto à família Myrtaceae e espécie em estudo

A família Myrtaceae compreende 130 gêneros e cerca de 3.000 espécies, das quais aproximadamente um terço pertence ao gênero *Eugenia*, ocorrendo principalmente nas regiões tropicais e subtropicais das Américas, desde o México até a Argentina (MCVAUGH, 1968; JOHNSON & BRIGGS, 1984; JUDD *et al.*, 1999; PEIXOTO *et al.*, 2002). O perfil químico da família caracteriza-se, principalmente, pela presença de taninos, flavonóides e terpenóides (CRUZ & KAPLAN, 2004).

Em estudos com *Eugenia brasiliensis* foi verificado seu potencial farmacológico, tendo sido encontrados relatos de atividade anti-reumática e diurética (PIO CORRÊA, 1984), antiinflamatória (MENEZES-DE-LIMA JR. *et al.*, 1997) e anti-*Tripanosoma cruzi* (FERNANDEZ *et al.*, 1997). Estudos com *Eugenia dysenterica* mostraram atividade antioxidante de seus frutos pelo método baseado na captura do radical 2,2-difenil-1- picrilhidrazil (DPPH) (ROESLER *et al.*, 2007). Além disso, os óleos essenciais de suas folhas apresentaram considerável atividade antifúngica, principalmente frente à *Cryptococcus neoformans* e algumas espécies de *Candida* (COSTA *et al.*, 2000). Os extratos aquosos e hidroalcoólicos de suas folhas foram ativos contra *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus faecalis* e em menor intensidade frente à *Escherichia coli*. (JUNQUEIRA *et al.*, 2007).

A espécie *E. chlorophylla* apresenta somente um estudo documentando a extração e caracterização de óleos essenciais de planta coletada no Paraná no ano de 2005 que apresentou moderada atividade antimicrobiana (STEFANELLO *et al.*, 2008).

## **1.2.**Considerações gerais quanto a Laser, Terapia Fotodinâmica (PDT) e Fotossensibilizadores aplicados em PDT

Laser, abreviatura de "Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation" (Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação), é um aparelho que gera ou amplifica radiação óptica coerente na região do infravermelho, visível ou ultravioleta do espectro eletromagnético (BRUGNERA JUNIOR & PINHEIRO, 1998). O primeiro aparelho de laser foi desenvolvido na década de 60 pelo cientista Theodore Mainan que utilizou uma barra de rubi sintético como emissor. Em 1965, Sinclair e Knoll criaram o primeiro laser terapêutico, sem efeito de corte, mas com ação biomodulatória. Em 1968, Mester foi o primeiro a empregá-lo na química médica e defendia a teoria de que lasers de rubi e argônio, em baixa intensidade, aceleravam a cura de úlceras crônicas (REDDY, 2004). Desta forma o laser começou a ser utilizado na área da saúde como coadjuvante no tratamento de doenças de pele e pequenos tumores.

Atualmente o uso de radiação laser pode ser observado em quase todas as áreas de tratamento de saúde com elevado índice de sucesso (MIDDA & RENTON-HARPER, 1991). O laser é aplicado na medicina com finalidades diversas como: bioestimulação tecidual; estimulação da cicatrização (PINHEIRO & FRAME, 1992); ação analgésica; controle do processo inflamatório; inativação de catabólitos intermediários (GENOVESE, 2000); proliferação de fibroblastos (BELKIN & SCHWARTZ, 1989); favorecimento da regeneração óssea (SAITO & SHIMIZO, 1997). Pela ação de mediadores químicos, o efeito do laser terapêutico pode alcançar sítios anatômicos distantes. Desta forma seus efeitos podem não se limitar ao local de aplicação.

A PDT ou, Terapia de Fotoradiação, envolve a administração de uma substância fotoativa (fotossensibilizador) que é ativada na presença de luz em um determinado comprimento de onda, por um determinado período de tempo e na presença de oxigênio. A transferência de energia do fotossensibilizador ativado ao oxigênio disponível, resulta na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), tal 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 nucléicos e outros componentes celulares, sendo assim citotóxicas e vasculotóxicas, causando, portanto, dano tecidual (DOUGHERTY *et al.*, 1998; ACKROYD *et al.*, 2001; BLISS *et al.*, 2006).

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), lesões e biofilmes orais (fibrose cística e periodontitis) (BHATTI *et al.*, 1998; WOOD *et al.*, 1999; SHARWANI *et al.*, 2006); dermatoses (MAISH *et al.*, 2004; SZEIMES *et al.*, 1996). A aPDT, quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (do inglês PACT, *photodynamic antimicrobial chemoterapy*) 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; DONELLY *et al.*, 2007).

12

Descrevem-se como vantagens da aPDT: o baixo custo do agente fotossensibilizador já que sua aplicação constante, em altas concentrações, na área infectada por tempo prolongado não se faz necessária; a morte microbiana mais rápida; a capacidade de inativar cepas resistentes a antibióticos; a prevenção ao aparecimento de novas formas resistentes a antifúngicos e antimicrobianos (devido à multiplicidade de moléculas alvos), a possibilidade de desenvolver formulações farmacológicas com ação especifica na área infectada e a inexistência de interações medicamentosas indesejáveis. (ZANIN *et al.*, 2006; JORI *et al.*, 2006).

Como antitumoral, a PDT é uma terapia não invasiva. Pode atingir com precisão e alta seletividade tumores diagnosticados precocemente, melhorar a qualidade e a longevidade de pacientes em estado avançado da doença, permitir a administração de doses repetidas sem que haja uma dose total limitada e, apresentar efeitos colaterais moderados (HOOPER, 1996, 2000; DOUGHERTY *et al.*, 1998; BROWN *et al.*, 2004; ALLISON *et al.*, 2006; NYST *et al.*, 2009)

Dois tipos iniciais de processos podem ocorrer com os fotossensibilizadores (MAISH *et al.*, 2004; PERRUSI, 2007). A reação tipo I é iniciada pela interação do fotossensibilizador com biomoléculas e resulta na formação de radicais livres (radicais peróxido e várias outras espécies reativas de oxigênio) provenientes da transferência de íons hidrogênio ou de elétrons que podem degradar as células (LIM *et al.*, 2002).

A reação tipo II ocorre quando o fotossensibilizador, em seu estado triplete, interage com oxigênio molecular e ar forma oxigênio singlete, que constitui o principal agente tóxico da PDT (FERGUSON, 2002; KONAN; *et al* 2002; ALLÉMANN & SCHNEIDER, 2002). Estas reações podem ocorrer simultaneamente e a proporção entre estes processos depende do fotossensibilizador usado, da sua concentração e da quantidade de oxigênio presente no meio reacional (CASTANHO *et al.*, 2004).

Em resumo, a atividade fotodinâmica para indução de dano e morte celular é determinada por basicamente cinco propriedades fotofísicas e fotoquímicas: (1) a completa ionização dos fotossensibilizadores; (2) o coeficiente de extinção molecular  $\varepsilon$ ; (3) a formação de campo quântico do estado triplete  $\phi$ T; (4) o potencial redox dos estados excitados do fotossensibilizador, se a reação seguir o processo tipo I ou, (5) a formação de campo quântico do oxigênio singlete, se a reação seguir o processo tipo II (AVELINE, 2001).

Entretanto, a habilidade de um componente em absorver uma luz incidente não significa necessariamente que ele possa atuar como um fotossensibilizador. Outros requisitos importantes são: não ser tóxico para as células sadias do hospedeiro, deve permanecer em estado excitado por tempo suficiente para permitir a interação do fotossensibilizador com o oxigênio presente nas células produzindo espécies tóxicas capazes de causar a morte da célula indesejável (MACROBERT *et al.*, 1989; ACKROYD *et al.*, 2001).

Os fotossensibilizadores podem ser hidrofílicos, lipofílicos ou anfifílicos. Essa característica afeta os parâmetros fotofísicos e a eficácia do fotossensibilizador, assim como determina a via de administração *in vivo*: oral; endovenosa, intraperitoneal ou tópica.

Fotossensibilizadores hidrofóbicos têm alta tendência a agregar-se em meio aquoso e necessitam de outras moléculas, como por exemplo, lipossomos para manter-se dispersos (NYMAN & HYNNINEN, 2004). Já os hidrofílicos podem acumular-se rapidamente na lesão e ser excretados. Essa propriedade pode ser vantajosa para prevenir fotossensibilidade cutânea ao corante (SEGUCHI *et al.*, 2002).

Grande parte das moléculas que podem atuar biologicamente como fotossensibilizadores tem em sua estrutura um anel heterocíclico similar ao presente na clorofila e hemoglobina (ACKROYD *et al.*, 2001). A maioria dos fotossensibilizadores que estão sendo empregados ou investigados para o tratamento de câncer e outras doenças é baseada em núcleos tetrapirólicos incluindo porfirinas, clorinas, bacterioclorinas e ftalocianinas, devido a sua baixa toxicidade na ausência de luz em células de mamíferos e por suas propriedades de acumulo por mais tempo nas células alvo (DETTY *et al*, 2004; PERUSSI, 2007).

Visando o desenvolvimento de novos fotossensibilizadores, muitas substâncias estão em fase de teste (TARDIVO *et al.*, 2005), a fim de reduzir os efeitos colaterais dos tratamentos e aumentar sua eficiência, como na cura do paciente com aplicações menores de droga. Dentre os fotossensibilizadores que podem ser úteis à PDT, há relatos de estudos com os corantes fenotiazínicos, que se caracterizam por não serem tóxicos às células humanas em concentrações superiores às requeridas para a inativação microbiana efetiva (WAINWRIGHT, 1998).

Na PDT antimicrobiana emprega-se fotossensibilizadores derivados de corantes, tais como os xantenos halogenados (Rosa de Bengala–RB), fenotiazidicos (Azul de Toluidina–TBO, Azul de Metileno–AM), acrinas, tionina e conjugados de clorina (e<sub>6</sub>) (PERRUSSI, 2007; TADA, 2007). Essas substâncias possuem baixo custo, forte absorção de luz na região acima de 660nm (onde a luz apresenta maior penetração no tecido) alto rendimento quântico de estado triplete e de geração de oxigênio singlete (TADA, 2007).

Quanto a substâncias fotoativas naturais, derivadas de espécies vegetais, descreve-se a classe das antocianinas (WONGCHAREE *et al.*, 2007), betalaínas, como a gomphrenina, isolada de espécies de Amaranthaceae (QIN & CLARK, 2007; ZHANG *et al.*, 2008), antraderivados, como as antraquinonas (NUNEZ MONTOYA *et al.*, 2003, 2005; WANG *et al.*, 2006; COMINI *et al.*, 2007), curcumina, isolada da planta *Curcuma longa* (LEUNG & KETE, 2009; PARK *et al.*, 2007; KOON *et al.*, 2006) e perilenequinona, como a hipericina, um pigmento fotoativo natural produzido por plantas do gênero *Hypericum* da família Guttiferaceae (STUPAKOVA *et al.*, 2009). Fotossensibilizadores naturais isolados de microrganismos também foram descritos, como por exemplo, as perilenequinonas Hipocrellina A e B isolada do fungo *Hypocrella bambusae* (LIU *et al.*, 2009).

Recentemente foi desenvolvido um trabalho com o extrato alcoólico de *Hyptis martiusii* (Lamiaceae) e *Eugenia jambolana* (Myrtaceae) em que foram analisados quanto à atividade fotossensibilizadora frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, obtendose resultados promissores em relação à inativação de bactérias (COUTINHO *et al.*, 2009). GASPARETTO *et al.* (2010) demonstraram que os extratos de *Alternanthera marítima*  (Amaranthaceae) apresentavam potencial efeito como fotossensibilizadores naturais em PDT antimicrobiana.

### 2.Objetivos

Este trabalho teve como objetivo geral a bioprospecção de fotossensibilizadores naturais e de outras substâncias bioativas em *E. chlorophylla*.

Objetivos específicos:

- Avaliar o comportamento do extrato etanólico das folhas de *E. chlorophylla* na absorção de luz na região espectral do visível de interesse útil para aplicação em aPDT (600 a 800nm) e avaliar a sua eficiência fotoquímica;
- Adequar metodologia e avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* (frente a bactérias e leveduras) do extrato etanólico, de suas frações, dos óleos essenciais e das substâncias isoladas de *E. chlorophylla* e determinar sua concentração inibitória mínima (CIM);
- Padronizar protocolo experimental *in vitro* de PDT antimicrobiana e avaliar o efeito do extrato, frações e substância isolada como fotossensibilizadores naturais em PDT;
- Realizar estudo fitoquímico de *E. chlorophylla* monitorado pela análise de absorção de luz na região do visível de interesse em PDT, pela avaliação da eficiência fotoquímica e/ pelos bioensaios.

#### 3. Material e métodos

### 3.1. Coleta, classificação e obtenção do Material Vegetal

O material vegetal, folhas *in natura*, de *Eugenia chlorophylla* foi coletado em seu hábitat natural na cidade de Curitiba (PR) pela Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Elida Alves Stefanello do departamento de química da Universidade Federal do Paraná (DQ/UFPR), sendo a identificação botânica efetuada pelo Prof. Dr. Armando Carlos Servi do departamento de biologia da Universidade Federal do Paraná (DB-UFPR). Amostras foram depositadas no herbário do DB-UFPR (número de registro UPCB 53304). Visando a correta identificação da espécie. Neste estudo, somente os indivíduos que apresentaram flores e/ou frutos foram coletados para a preparação dos extratos.

#### **3.2.Preparo dos extratos brutos**

As folhas coletadas foram secas em estufa de ar circulante à temperatura de 40 °C (até textura friável) e em seguida pulverizadas em moinho de faca. O pó obtido foi submetido ao processo de maceração, primeiro com hexano (para baixa polaridade) e depois com etanol (solvente mais polar), na proporção massa de pó/solvente de 1:20 (massa/volume) (Figura 1.). Foram utilizados 240 g de pó das folhas de *E. chlorophylla*. Das soluções obtidas foram removidos os solventes em rota evaporador sob pressão reduzida, obtendo-se assim diferentes extratos brutos. Após completa secagem foram calculados os rendimentos (Tabela 1).



Figura 1. Esquema de preparação do extrato bruto de Eugenia chlorophylla extraído em solventes orgânicos.

Extratos	Código	Rendimento (g)
Hexânico	ECH	3,67
Etanólico	ECB	18,43

Tabela 1. Rendimento dos extratos orgânicos e códigos das folhas de Eugenia chlorophylla.

#### 3.3. Fracionamento dos extratos brutos

Buscando-se o isolamento dos constituintes ativos presentes na espécie em estudo, o extrato etanólico foi submetido ao processo de fracionamento biomonitorado. O ECB foi submetido a um processo de extração líquido-líquido, visando à eliminação de pigmentos tais como clorofila e constituintes apolares de menor interesse. Esse extrato foi solubilizado em 20 mL de uma solução de metanol com 10% de água e submetido a três extrações consecutivas com hexano, na proporção de três partes de hexano para uma parte de solução metanol/água.

Separou-se a solução hexânica da solução metanol/água em funil de separação. A solução metanol/água foi submetida a três novas extrações consecutivas com diclorometano, utilizando a proporção de três partes de diclorometano para uma parte de solução metanol/água, sob agitação manual em cada uma delas. Para que as fases fossem visíveis acrescentou-se água até 40% do volume. A solução diclorometânica e a solução metanol/água foram separadas em funil de separação. A solução metanol/água foi submetida a três extrações com n-butanol, utilizando a proporção de 3 partes de n-butanol para uma de solução metanol/água, sob agitação manual em cada extração. A solução n-butanol para uma de solução metanol/água, sob agitação manual em cada extração. A solução n-butanol para uma de solução metanol/água, sob agitação manual em cada extração. A solução n-butanólica foi separada da solução remanescente (metanol/água). Todos os solventes foram removidos em rota evaporador sob pressão reduzida, obtendo-se assim diferentes frações (Figura 2 e Tabela 2).


Figura 2. Fluxograma do fracionamento do extrato etanólico bioativo de Eugenia chlorophylla.

Tabela 2. Rendimentos obtidos a partir do fracionamento do extrato bruto etanólico (ECB) de *Eugenia* chlorophylla.

Frações	Códigos	Rendimentos (g)
Hexânica	ECHX	0,65
Diclorometânica	ECD	8,06
Butanólica	ECBT	2,14
Remanescente	ECR	4,16

# a) Purificação da fração diclorometânica (ECD).

Em função dos resultados positivos obtidos (Itens 4.6 e 4.7) nos ensaios microbiológicos antibacterianos e antifúngicos com aplicação do laser, assim como da confirmação de produção de oxigênio singlete pelo método DPBF (Item 3.7.2) de ECD, continuou-se o processo de fracionamento para prosseguir na busca de fossensibilizadores e substâncias bioativas.

Assim, uma parte da fração diclorometânica (1,39 g), foi submetida ao fracionamento através de cromatografia em coluna (altura x  $\varphi$  = 42,0 x 2,2 cm) contendo sephadex LH-20 como fase estacionária e eluída com metanol, obtendo-se 63 frações de 15 mL cada. As frações obtidas foram analisadas em cromatografia de camada delgada analítica (CCD) e reunidas de acordo com as semelhanças entre os cromatogramas.

Também se empregou a técnica de cromatografia de camada delgada preparativa (CCD) em que as placas cromatograficas foram preparadas pela aplicação de suspensão do adsorvente (sílica gel  $PF_{254+366}$  - Merk) em água destilada sobre placas de vidro com espalhador de tipo Desaga, tendo a camada adsorvente a espessura de 1 mm.

Após a preparação, as placas foram deixadas em repouso (6 horas) à temperatura ambiente e posteriormente ativadas a 150 °C. Posteriormente as amostras foram aplicadas em linha, respeitando as margens correspondentes à altura do solvente na cuba. A mistura de solventes utilizada na eluição foi acetato de etila/hexano (80:20) em cuba saturada. Como reveladores para a CCD empregou-se a irradiação com UV em 254 e 366 nm. As bandas foram raspadas, eluidas no mesmo solvente utilizado para o desenvolvimento da cromatografia e filtradas. Em seguida, procedeu-se à análise em CLAE-UV-DAD, com a finalidade de verificar a pureza das amostras. Para as amostras ECD-26 e ECD 26b preparou-se ainda duas colunas de Sílicagel 60:PVPP a qual foi eluída com metanol e as frações resultantes foram monitoradas por CCD para verificação de sua pureza e reunião das amostras com perfis cromatográficos semelhantes.

# b) Isolamento dos constituintes químicos.

Observou-se a formação de precipitado nas frações ECD-25 (5mg) e ECD-26 (10mg), que foram lavadas com acetona. Obteve-se dessa forma a fração ECD-26b que juntamente com a ECD-25 foram analisadas por cromatografia líquida (CLAE) com detectores ultra-violeta (UV) e arranjo diodo (DAD) nos comprimentos de onda de  $\lambda$ -254 nm e  $\lambda$ -660 nm. Utilizou-se uma coluna supelco RP-5 µL 18 com injeção de 20 µL de amostra em fase móvel correspondendo a seis partes de metanol para quatro partes de água (6:4, v/v), com 0,1% de ácido acético e vazão de 1mL/min em modo de eluição isocrático.

A fração ECD-26 foi recristalizada obtendo-se as frações ECD-26b(5mg) (remanescente da lavagem) e ECD-26c (3mg) (contendo cristais) solubilizadas em metanol deuterado para as quais foi obtido o espectro de RMN<sup>1</sup>H junto à central analítica do instituto de química (IQ) da UNICAMP (Figura 3.)

Para a fração ECD-26c, observou-se o predomínio de uma substância fenólica heterosídica para a qual tentou-se obter os demais dados espectrais (RMN 2D (HMBC e HMQC) e ESI-MS), visando a identificação do constituinte majoritário.



Figura 3. Etapas do isolamento dos constituintes químicos da fração diclorometânica (ECD) de Eugenia chlorophylla.

# 3.4. Identificação dos constituintes químicos

A identificação dos constituintes químicos foi realizada utilizando-se métodos espectroscópicos (UV, RMN (1D e 2D), espectrometria de massas) e através da comparação com dados da literatura. A identificação utilizando-se métodos cromatográficos e espectrometria de massas, com comparação com amostras-padrão autênticas também foi realizada.

# 3.5. Espectroscopia de absorção na região do visível

O extrato bruto etanólico e suas frações foram analisados quanto a sua capacidade de absorção de luz. Para isso foi feito uma análise preliminar entre os comprimentos de onda de 400 a 830nm (varredura na região do visível) para determinar a região de maior absorção de luz de cada amostra em estudo, utilizando-se um leitor de microplaca (Biotek, Sinergy 2).

O volume final de cada amostra no poço foi de 100  $\mu$ L e as concentrações finais das amostras no poço foram de 1,25 mg/mL em água: propilenoglicol (95:5), para os extratos brutos e frações.

Como branco (controle negativo), utilizou-se o diluente água: propilenoglicol (95:5) e como controle positivo, o azul de metileno (0,1 mg/mL). As leituras foram realizadas em triplicata.

# 3.6. Espectroscopia de fluorescência de emissão e excitação em estado estacionário

O ECB e ECD foram avaliados quanto a suas características fluorescentes em estado estacionário no modo de emissão e excitação na concentração de 0,1mg/mL. Estes ensaios foram realizados junto ao Laboratório de Fotoquímica e Fotofísica Clássica e com Laser do IQ-UNICAMP em colaboração com a professora Dra. Teresa Dib Zambon Atvars. Portanto, para estas amostras, obtiveram-se novos espectros de absorção UV-visível, utilizando-se um espectrofotômetro Hewlett Packard 8452 A. A partir dos picos obtidos no espectro de absorção escolheu-se os comprimentos de onda adequados para excitação e leitura de emissão de fluorescência das amostras. Por fim, para definir o comprimento de onda fixou-se os comprimentos de onda de emissão segundo os resultados obtidos nos ensaios de excitação. O equipamento utilizado para estas medições foi um espectrofluorímetro ISS-PC1, operando com uma lâmpada de xenônio. As soluções de cada amostra, a 0,1 mg/mL diluídas em 3,5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram colocadas

em uma cubeta de quartzo 1 cm de caminho óptico e com as quatro faces transparentes. Dessa forma, a emissão de fluorescência foi captada a 90° em relação à fonte de excitação. As fendas de saída do laser utilizadas foram de 2,0 mm.

# 3.7. Avaliação da eficiência fotoquímica dos extratos

# 3.7.1. Verificação do comprimento de onda e potência do LASER

Para ativação do fotossensibilizador utilizou-se um equipamento laser de baixa potência do tipo InGaAIP (Fosfeto de Indio-Gálio-Alumínio) modelo PHOTON LASE nod. III, DMN Equipamentos Ltda, com potência de 35mW e comprimento de onda de 660nm (laser vermelho).

A fonte de laser iluminou uma área de 0,38 cm<sup>2</sup> com tempo de irradiação de 5 min, resultando em uma densidade de energia de 560 J/cm<sup>2</sup> para cada amostra. Para verificação do comprimento de onda e potência do aparelho, o feixe de luz emitido pelo laser foi submetido à avaliação em espectrômetro/monocromador modelo Princeton instruments acton SP2300 e medidor de potência modelo fildmaster. Os dados obtidos a partir dessas análises foram processados no programa Win Spec/32 e o resultado expresso em forma de gráfico (Figura 4.).



Figura 4. 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.

# 3.7.2. Avaliação da formação de Oxigênio Singlete (Ensaio DPBF)

Na avaliação da eficiência fotoquímica das amostras utilizou-se ensaio que monitora a fotodecomposição do *1,3-diphenylisobenzofuran* (DPBF) como descrito por ALVES *et al.* (2009) e ROBERTSON *et al.* (2009), com modificações, medindo a absorbância ( $\lambda$ =415 nm) com intervalo de irradiação de 1 min, sendo o decaimento da cinética de decomposição proporcional à produção de oxigênio singlete da amostra.

Este ensaio indica indiretamente a ocorrência de reação do tipo II, uma vez que o DPBF é um conhecido "seqüestrador" de oxigênio singlete e através da sua queda de fluorescência (avaliada espectroscopicamente), pode-se avaliar a eficiência da amostra para gerar oxigênio singlete (ROBERTSON *et al.* 2009).

Soluções estoque do extrato bruto etanólico, frações a 25 mg/mL em DMSO:H<sub>2</sub>O (9:1) e uma solução estoque de DPBF a 100  $\mu$ M em DMSO foram preparadas no mesmo dia de realização do ensaio. Para análise, a mistura de reação constituía de 50  $\mu$ L do

estoque de DPBF (concentração final no poço de 50  $\mu$ M) e 50  $\mu$ L do estoque da amostra analisada foram colocados no poço 1A de placas de 96 poços. 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/cm<sup>2</sup> e área irradiada de 0,38 cm<sup>2</sup>) por 1 min, após o qual mediu-se a queda da absorbância do DPBF a 410 nm. A não irradiada, foi submetida à mesma leitura em intervalos de 1 min. Os experimentos foram realizados em triplicata e como controle negativo utilizou-se a amostra não submetida à irradiação laser mantendo as demais condições experimentais.

# 3.7.3.Determinação da atividade fotodinâmica pelos mecanismos fotoquímicos do tipo I ou tipo II em modelo biológico *in vitro*

Procedeu-se à análise para determinação da atividade fotodinâmica, pelos mecanismos fotoquímicos do tipo I ou tipo II, em modelo biológico *in vitro* seguindo procedimento experimental descrito por SU *et al.* (2011), com modificações. Para tanto, utilizou-se os seguintes inibidores com suas respectivas concentrações: mecanismo do tipo I- manitol (10 mM) e ácido ascórbico (30 mM); mecanismo do tipo II- azida sódica (1 mM) e histidina (10 mM); mecanismo do tipo I e II: triptofano (10 mM). O micro-organismo utilizado nesse ensaio foi selecionado de acordo com os resultados obtidos no ensaio biológico (Item 4.7). Utilizou-se o *Staphylococcus epidermidis* – ATCC 12228 como indicadora deste bioensaio, micro-oganismo este que se apresentou mais susceptível à fotoinativação pelas amostras-teste nos ensaios de PDT-antimicrobiana. As porcentagens de

sobreviventes foram calculadas de acordo com a equação [(N1/N0)x100], em que N0 representa o número de UFC/mL de cada amostras antes da irradiação e N1 representa o número de UFC/mL após a exposição à luz. Este experimento foi realizado em duplicata para cada inibidor (dois ensaios com irradiação ou não e plaqueamento, n=4), sendo os resultados expressos como as médias ± desvio padrão das quatro repetições.

# 3.8. Efeito do oxigênio no processo de fotoinativação

Para investigar a importância do oxigênio no processo de inativação, os ensaios foram desenvolvidos variando a presença de oxigênio na solução da amostra com posterior substituição por nitrogênio. Através deste teste foi possível verificar se havia interação do fotossensibilizador presente na amostra, com o oxigênio e nitrogênio presente na solução.

# 3.9. Ensaios Biológicos in vitro

Os ensaios biológicos *in vitro* frente a bactérias e leveduras foram realizados no Departamento de Biologia Vegetal, Laboratório de Farmacognosia, Tecnologia Fitofarmacêutica e de Bioensaios, UNICAMP.

# 3.9.1 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 (GROVE & RANDALL, 1955; NCCLS, 1993 e 1998; ESPINHEL-INGROFF *et al.*, 1995; OKEKE *et al.*, 2001) seguido de adequação de metodologia como descrito por SALVADOR *et al.*, (2003 e 2004).

Para realização dos ensaios utilizaram se 15 cepas de bactérias cepas padrão e cepas

de campo: Gram-negativas e Gram-positivas:

Escherichia coli - ATCC 10538;

Escherichia coli – ATCC 10799;

Proteus vulgaris – cepa de campo;

Salmonella typhimurium – cepa de campo;

Enterobacter aerogenes – cepa de campo;

Pseudomonas aeruginosa - ATCC 27853;

Kocuria rhizophila - ATCC 9341;

Staphylococcus aureus - ATCC 6538;

Staphylococcus aureus - ATCC 14458;

*Staphylococcus aureus* cepa de campo 8<sup>-</sup> penicilinase negativo;

*Staphylococcus aureus* cepa de campo 7<sup>+</sup> penicilinase positivo;

Staphylococcus epidermidis – ATCC 12228;

Staphylococcus epidermidis – cepa de campo 6epi;

Bacillus subtilis – cepa de campo;

Enterococcus faecalis – ATCC 10100;

Cultivadas por 24h a 37 °C em Müller Hinton (Difco)- MH (protocolo padrão para

bactérias) e oito leveduras:

Candida albicans – ATCC 1023;

Candida albicans - ATCC 10231;

Candida tropicalis – cepa de campo;

Candida tropicalis – ATCC 157;

Candida glabrata - ATCC 30070;

Candida dubliniensis - ATCC 778157;

Candida dubliniensis - ATCC 777;

Candida parapsilosis - ATCC 22019;

Cultivadas por 48h a 30 °C em ágar Sabouraud dextrose (ASD) (protocolo padrão para leveduras). As cepas foram mantidas como culturas puras no Laboratório de Produtos Naturais e de Bioensaios do IB/DBV/Área de Ciências Farmacêuticas/UNICAMP.

No plaqueamento, para as bactérias, a camada base foi obtida pela adição de 20 mL de MH em placas de 20 x 150 mm. Após a solidificação foram adicionados 20 mL de MH, a cerca de 45 °C, inoculados com as cepas bacterianas ( $6.10^6$  UFC/mL), obtendo-se, assim, a camada *seed*. Após solidificação confeccionou-se poços com 5 mm de diâmetro. No caso das leveduras, a camada base foi obtida pela adição de 20 mL de ASD e posterior à solidificação foram adicionados 20 mL de ASD, a cerca de 45 °C, inoculados com cepas padrão ( $6.10^6$  UFC/mL) para obter-se a camada *seed* e em seguida foram confeccionados poços com 5 mm de diâmetro.

Em cada poço foram aplicados 20  $\mu$ L das soluções controle (positivo e negativo) e drogas-teste. Os extratos foram preparados em propilenoglicol:água (5:95) e aplicados nas concentrações de 25, 5 e 1 mg/mL. Como controle positivo foram utilizados bacitracina (200 UI/mL), para o ensaio com bactérias e cetoconazol (100  $\mu$ g/mL) para o ensaio com leveduras e como controles negativos propilenoglicol:água (5:95) e propilenoglicol esterilizado. As placas-testes foram mantidas à temperatura ambiente por cerca de 2h e

depois incubadas a 37 °C por cerca de 24h para as bactérias e por 30 °C por cerca de 48h para as leveduras.

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

Para as amostras-teste que se mostraram ativas na concentração usada procedeu-se à determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), pelo método de microdiluição em placa com 96 poços, de acordo com metodologia preconizada pela ANVISA (2008). Foi considerada como CIM a menor concentração onde se observou a inibição de 100% do desenvolvimento microbiano (OKEKE *et al.*, 2001; SALVADOR *el al.*, 2002).

Em uma placa de microdiluição estéril com 96 poços, em poços individuais foram aliquotados 50  $\mu$ L dos caldos *Trypticase Soy broth* (TSB), para bactérias e ASD, para leveduras, 50  $\mu$ L das drogas teste em diferentes concentrações e 5  $\mu$ L da suspensão de micro-organismos com turvação equivalente a 6.10<sup>6</sup> UFC/mL da escala de Mac Farland.

Como controles positivos foram utilizados a bacitracina (200 UI/mL) para o ensaio com bactérias e o cetoconazol (100  $\mu$ g/mL) para o ensaio com leveduras e como controles negativos propilenoglicol:água (5:95, v/v) e propilenoglicol esterilizado em autoclave, além do controle do inóculo e controle do meio de cultura.

Decorrido o período de incubação, procedeu-se à leitura visual da turvação nos poços e quando em dúvida quanto à inibição total, o material do poço foi inoculado (estrias) em placas contendo meio *Trypticase Soy agar* (TSA), para bactérias e meio ASD, para

leveduras e ambas foram incubadas para verificar se o efeito era biocida ou não. Ou seja, verificou-se se houve ou não crescimento dos micro-organismos nas placas. Os experimentos foram realizados pelo menos em duplicata para cada cepa indicadora utilizada.

## 3.9.2. Avaliação do efeito de produtos naturais como fotossensibilizadores em PDT

Os ensaios foram realizados no laboratório de Produtos Naturais e Bioensaios do IB-UNICAMP. Quanto ao laser, foram estudadas as condições de operação (tipo de laser, comprimentos de onda, dentre outros parâmetros) e avaliou-se o efeito antimicrobiano da associação laser/extrato e laser/fração.

# **Equipamento Laser**

Foi utilizado o equipamento laser diodo InGaAlP (meio ativo fosfeto de índio-gálioalumínio) modelo Photon Lase III (DMC equipamentos), que opera com comprimento de onda de emissão de 660 nm, localizado na faixa de luz visível, região do vermelho do espectro eletromagnético.



Figura 5. Equipamento laser Photon Lase®.

# a)Avaliação do efeito como fotossensibilizador em PDT antimicrobiana

Para este ensaio foram escolhidas as cepas de bactéria e leveduras que apresentaram menor CIM na avaliação preliminar.

# Cepas bacterianas:

Foram utilizadas bactérias Gram positivas e Gram negativas, cepas padrão, cultivadas por 24h a 37 °C em Muller Hilton (Difco)- MHb.

Staphylococcus aureus – ATCC 14458 Staphylococcus aureus – ATCC 6538 Staphylococcus epidermidis – ATCC 12228 Staphylococcus epidermidis – cepa de campo 6epi Escherichia coli – ATCC 10799 Proteus vulgaris – cepa de campo Pseudomonas aeruginosa - ATCC 27853

# Cepas de leveduras:

Foram empregadas leveduras, cepas padrão, cultivadas por 48h a 30 °C em ágar Sabouraud Dextrose- ASD.

Candida albicans – ATCC 1023 Candida albicans – ATCC 10231 Candida dubliniensis – ATCC 778157 Candida parapsilosis - ATCC 22019 Candida tropicalis – ATCC 157

Procedeu-se à análise seguindo procedimento experimental de GASPARETO *et al.* (2010), GASPARETTO (2008), LAPINSKI (2008), 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 ASD broth para as leveduras), 50  $\mu$ L das drogastestes (a concentração foi padronizada em metade da CIM) e 5  $\mu$ L da suspensão de microrganismos (6.10<sup>6</sup> UFC/mL, segundo a escala de Mac Farland, sendo que foi realizada a contagem do inóculo para cada cepa estudada). Como controle positivo foi utilizado o fotossensibilizador azul de metileno (0,1 mg/mL), diluído em solução salina estéril e como controle negativo foi usado o diluente (propilenoglicol/água) 5:95, além do controle do inóculo e do controle do meio de cultura.

Este experimento foi realizado em duplicata para cada droga teste (irradiação e plaqueamento resultando em um n=4). Foram realizados dois experimentos em dois dias diferentes (n<sub>total por amostra</sub>=8) para confirmar a reprodutibilidade do ensaio. Em cada ensaio uma das placas foi submetida à radiação e outra não (placa controle a qual não ficou exposta sequer à luz ambiente). O período de interação do fotossensibilizador em contato com os micro-organismos, antes da aplicação do laser foi de 5 minutos com base em procedimento experimental de GASPARETTO (2008) e GASPARETO *et al.* (2010).

As placas foram irradiadas com laser operando em densidade de energia de 28J/cm<sup>2</sup> por 5 minutos e área irradiada de 0,38cm<sup>2</sup> por amostra. Depois da irradiação as placas foram incubadas como descrito anteriormente.

Ao término do período de incubação, procedeu-se à diluição seriada  $(10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3})$ em tubos de ensaio com 0,9 mL de solução de NaCl a 0,9%, e, para cada uma das amostras, alíquotas da diluição a  $10^{-3}$  contendo 10 µL de bactérias e 50 µL de leveduras foram plaqueadas em duplicatas no meio TSA para bactérias e ADS para leveduras. Decorrido o período de incubação padrão para cada micro-organismo, determinou-se o número de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) através de contagem, estimando-se a porcentagem de redução de UFC/mL para cada micro-organismo.

# 3.10.Obtenção e análise dos óleos essenciais 3.10.1.Isolamento do óleo essencial

O material vegetal (folhas, caule e flores) de *E. chlorophylla* foi coletado de um mesmo indivíduo em seu hábitat natural, cujas amostras foram depositadas no herbário da UFPR (número de registro UPCB 53304) na cidade de Curitiba (PR) em 09/2005. Material vegetal este que já foi objeto de estudo anterior (STEFANELLO *et al.*, 2008) e em 01/2011 foi novamente coletado para nova análise. O material vegetal fresco foi submetido, individualmente, ao processo de hidrodestilação em aparelho de Clevenger por duas horas, seguindo metodologia descrita por STEFANELLO *et al.* (2008). No final de cada destilação, os óleos obtidos foram recolhidos e secos com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, sua quantidade foi determinada e as amostras foram transferidas para frascos de vidro âmbar e mantidos à temperatura de -18 °C.

Os óleos essenciais (caule, folhas e flores) obtidos em 2005 foram submetidos à análise de seus constituintes químicos em dezembro de 2005 (STEFANELLO *et al.*, 2008). Desde então, foram mantidos em congelador (-4  $^{\circ}$ C) e em maio de 2011 foram reanalisados por CG/EM juntamente com os óleos obtidos a partir da coleta realizada em 01/2011.

# b)Análise de voláteis e perfil químico por CG/EM

As análises por CG/EM (70 eV) foram realizadas em equipamento Shimadzu CG/EM equipado com uma coluna capilar Durabond-DB5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm) e operado de acordo com metodologia descrita por STEFANELLO *et al.* (2008): 60 °C por 3 min e, em seguida, foi programada uma rampa de 60-220 °C com aumento de 5 °C/min e depois mantido em isoterma a 220 °C por 5 min. O gás de arraste foi o hélio (1 mL/min) e a temperatura do injetor e do detector de 250 °C. As análises foram realizadas no modo de injeção split 1:20. Os componentes dos óleos essenciais foram identificados com base em dois parâmetros: por comparação de seus índices de retenção, sendo calculado o Índice de Kovats pela corrida nas mesmas condições de padrão de n-alcanos (Sigma-Adrich) e pela análise dos espectros de massas por comparação com aqueles encontrados na literatura e em banco de dados (NYST, 1998).

# c)Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais

A atividade antimicrobiana dos óleos foi avaliada de acordo com STEFANELLO *et al.* (2008). A atividade antioxidante destes óleos essencias também foi avaliada pelo método de cromatografia em camada delgada (CCD) com DPPH como revelador. A amostra foi aplicada pulverizada sobre placa de CCD com uma solução a 500  $\mu$ g/mL de DPPH em etanol. Após a evaporação do solvente (cerca de 5 minutos), a atividade anti-radical livre potencial foi verificada pelo aparecimento de manchas amarelas sobre fundo violeta de acordo com o descrito por TAKAMATSU *et al.* (2003).

# 3.11.Estatística

Para cada um dos experimentos foi utilizado o teste estatístico mais adequado (ANOVA, Wilcoxon, teste de Tukey, teste t de Student, dentre outros) com nível de

significância de 0,05. Os resultados foram apresentados como médias e coeficiente de variação (C.V).

# 4.Resultados

# 4.1. Preparação dos extratos brutos e fracionamento biomonitorado

Inicialmente o pó das folhas de *E. chlorophylla*, foi extraído com hexano para que as substâncias mais apolares tais como pigmentos, clorofila, carotenóides e substâncias de natureza graxa fossem extraídas e em seguida o material remanescente foi extraído com etanol, originando, após a eliminação do solvente, o extrato etanólico bruto (ECB). Assim, o extrato hexânico bruto (ECH) e a fração hexânica da partição do extrato etanólico (ECHX) não foram avaliadas quanto a sua bioatividade por conterem substâncias de pouco interesse quanto aos objetivos deste trabalho.

O extrato etanólico (ECB) teve rendimento em massa de 18,43g a partir de 240 g do pó da planta. O estudo fitoquímico biomonitorado seguiu com o fracionamento do ECB, o qual foi submetido a um processo de extração líquido-líquido (partição) com hexano, diclorometano e n-butanol, dando origem a fração ECHX (0,649g), ECD (8,057g), ECBT (2,14g) e fração ECR (4,162g).

O ECB e suas frações ECD (Anexo 1-2), ECBT e ECR foram submetidos a estudos de desreplicação por CLAE-UV-DAD. As frações ECBT e ECR não se mostraram promissoras na etapa de triagem e para tanto o estudo se concentrou no extrato ECB e ECD, os quais foram submetidos à análise por ESI-MS (Anexo 3-4).

As análises por ESI-MS e estudo de fragmentação por MS-MS (Anexo 5-8) sugerem a presença do ácido quínico ( $[M-H]^{-} = 191 \text{ m/z}$ ) e MS/MS ions m/z, 25 eV:  $191 \rightarrow 173$ , 127, 111, 93, 85 no ECB e ECD, por comparação com amostra padrão autêntica (Anexo 7) e com dados da literatura (SALVADOR *et al.*, 2011). De maneira geral, verificou-se que o perfil químico por CLAE-DAD e ESI-MS (Anexo 1 ao 8) do ECB e ECD são bastante similares.

A fração ECD foi submetida a fracionamento sendo obtidas as subfrações ECD-25, ECD-26b e ECD-26c. Pelas análises iniciais dos cromatogramas (Anexo 10-12), e do espectro de RMN<sup>1</sup>H (Anexo 13-14) e espectro de HMBC (Anexo 15) destas subfrações verifica-se que em ECD26c há o predomínio de um constituinte fenólico heterosídeo, que não pôde ser identificado devido à pequena quantidade em massa.

### 4.2. Varredura na região do visível

A espectroscopia óptica revelou o perfil absortivo das amostras analisadas. Na Figura 6A, podem-se observar os espectros do fotossensibilizador azul de metileno (controle positivo), com pico de máxima absorção em 670nm, e do controle negativo, o diluente propilenoglicol:água, (5:95). Os espectros de varredura na região do visível do extrato ECB e a fração ECD, diluídos em DMSO/água (5:95) estão apresentados na Figura 6B e 6C. Estas duas frações apresentaram absorção entre os comprimentos de onda de 600 a 700nm, enquanto as outras frações não apresentaram absorção na região de interesse para PDT. Buscou-se obter os espectros em várias concentrações, de maneira a minimizar a saturação do detector ( $\lambda$ =200 a 300nm).



Figura 6. Espectro de absorção no visível (A) do Azul de metileno e do diluente (Água/Propilenoglicol 95:5), (B), extrato bruto (ECB) e fração diclorometânica (ECD) de *E. chlorophylla* com o diluente água/propilenoglicol (95:5) e (C) ECB e ECD com o diluente água/DMSO (95:5). As amostras foram avaliadas na concentração de 1,25mg/mL.

# 4.3. Espectroscopia de fluorescência de emissão e excitação em estado estacionário

As análises de fluorescência foram realizadas com o extrato bruto etanólico de *E*. *chlorophylla* (ECB) e com a fração ECD da partição de ECB, pois essas amostras demonstraram perfis de absorção, dentro da janela terapêutica, promissores para a busca de fotossensibilizadores. Os espectros de absorção no UV-visível de ECB e ECD apresentaram picos de absorção máxima próximos a  $\lambda_{abs}$ =270nm, e outros picos de menor intensidade nos comprimentos de onda  $\lambda_{abs}$ =300nm,  $\lambda_{abs}$ =415nm e  $\lambda_{abs}$ =670nm (Figuras 7A e B). O ácido quínico identificado em ECB e ECD apresenta pico de absorção máxima próximo a  $\lambda_{abs}$ =350nm (Figura 7C).

Este resultado está coerente com o obtido em microplaca e no Leitor Sinergy-2, Biotek. No entanto, foi possível obter sinal sem que houvesse saturação do detector devido ao pico de absorção na faixa de 200-350nm. A partir deste resultado efetuou-se uma varredura com excitação em  $\lambda_{exi}$ =350nm até 800nm, em que se obtiveram os espectros de emissão de fluorescência (Figura 8). A análise dos resultados permitiu observar que a máxima emissão de fluorescência para ECB e ECD ocorre em  $\lambda_{emi}$ =670nm. Para ECD houve maior intensidade de emissão de fluorescência, sendo que as emissões para os demais comprimentos de onda de excitação tiveram intensidade reduzida.



Figura 7. Espectro de absorção na região do UV-visível do (A), extrato bruto (ECB) e (B) fração diclorometânica (ECD) de *Eugenia chlorophylla* e (C) ácido quínico (concentração de 0,1mg/mL, diluído em DMSO).



Figura 8. Espectros de emissão de fluorescência do extrato bruto (ECB) da fração diclorometânica (ECD), de *Eugenia chlorophylla* diluído em propilenoglicol na concentração de 0,1mg/mL.

A partir dos resultados dos espectros de emissão de fluorescência, fixou-se o comprimento de onda de emissão em dois comprimentos de onda,  $\lambda_{emi}$ =630 nm e em  $\lambda_{emi}$ =725 nm, para obtenção dos espectros de fluorescência no modo de excitação (Figuras 9 e 10). No  $\lambda_{emi}$ =430 nm observou-se uma banda bem definida em  $\lambda_{exi}$ =415 nm. Em  $\lambda_{emi}$ =725 nm observou-se, também, uma banda em  $\lambda_{exi}$ =660 nm. As bandas obtidas são coincidentes com as bandas do espectro de absorção. A fração diclorometânica, reproduziu as mesmas bandas observadas para o extrato bruto, apresentando uma maior intensidade no sinal.



Figura 9. Espectros de excitação do ECB diluído em DMSO na concentração de 0,1mg/mL,  $\lambda_{emi}$ =630nm (A),  $\lambda_{emi}$ =725nm (B).



Figura 10. Espectros de excitação do ECD diluído em DMSO na concentração de 0,1mg/mL,  $\lambda_{emi}$ =630nm (A),  $\lambda_{emi}$ =725nm (B).

As amostras analisadas apresentaram emissão de fluorescência, portanto há coerência entre os resultados encontrados nos experimentos fotoquímicos e fotofísicos realizados e os resultados biológicos de PDT. Logo tanto o extrato bruto etanólico das folhas de *E. chlorophylla*, quanto a sua fração diclorometânica da partição atuam como fotossensibilizadores quando expostos à excitação a 660 nm.

Assim, estes experimentos fotoquímicos e fotofísicos são importantes e podem ser úteis no processo de busca de substâncias fotoativas. No entanto, em estudos de bioprospecção, como extratos brutos e frações tratam-se de misturas complexas, as suas propriedades fotofísicas podem se mostrar distintas às das substâncias deles isoladas.

## 4.4. Efeito do oxigênio no processo de fotoinativação

A fim de investigar a importância no oxigênio no processo de inativação, estudos foram desenvolvidos para substituir o oxigênio presente nos tubos por nitrogênio por 20 minutos antes da obtenção do espectro de fluorescência no modo de emissão em  $\lambda_{exi}$ = 420nm até 800nm. Observaram-se picos de emissão máxima de fluorescência em  $\lambda_{emi}$ =680 nm em que ECD diluída em DMSO apresentou maior intensidade, seguida de ECD e DMSO oxigenado por 20 min, e com uma intensidade bem menor ECD e DMSO nitrogenado (Figura 11A). Para o ácido quínico identificado nas amostras *de E. clhorophylla* nenhum pico máximo de fluorescência foi observado (Figura 11B).

# 4.5. Avaliação da eficiência fotoquímica dos extratos - Avaliação da formação de Oxigênio Singlete (Ensaio DPBF)

A capacidade do extrato bruto e frações em gerar oxigênio singlete (fotossensibilizadores com reação tipo II) foi avaliada através do acompanhamento da fotodecomposição de DBPF, na concentração de 1,25 mg/mL para o extrato ECB e para a fração ECD e de 5 mg/mL para as frações ECBT, ECHX e ECR da partição, todos solubilizados em DMSO/H<sub>2</sub>O (9:1). As frações ECBT, ECHX e ECR não apresentaram decaimento. As Figuras 12 A, B e C mostram o decaimento da absorção de DPBF sob condições de escuro e de irradiação com laser a 660 nm, na presença das amostras. Houve

diminuição na absorção de DPBF após 30 segundos de irradiação para o ECB (56,74 % de redução da absorção), para ECD (64,39% de redução da absorção) e para o ácido quínico. Nas amostras não irradiadas não foi observada nenhuma variação na absorção do 1,3-DPBF.



Figura 11. Espectros de fluorescência modo de emissão do ECD (A) e do ácido quínico (B) em propilenoglicol na concetração de 0,1mg/mL.



Figura 12. Produção de oxigênio singlete do ECB de *Eugenia chlorophylla* (A), ECD (B) e ácido quínico (C), concentração final de 1,25 mg/mL, na presença de DPBF, irradiado e não irradiado.

# 4.6. Ensaios Biológicos in vitro

# 4.6.1. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do extrato ECB e de suas frações foi determinada inicialmente pelo método de difusão em ágar, pela técnica de poço em camada dupla utilizando 15 cepas de bactérias e oito de leveduras, como indicadoras de atividade. Para as amostras bioativas, determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição em placa de 96 poços. Para *Proteus vulgaris*- campo e *Escherichia coli* ATCC 10538 a CIM foi maior que 0,25 mg/mL, enquanto que para *Salmonela Typhimurium* campo, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2553 e *Enterobacter aerogenes*-campo a CIM foi de 0,5 mg/mL. Para todas as bactérias Gram positivas estudadas a CIM foi maior que 0,5 mg/mL. Resultados similares foram obtidos para as fases butanólica e hidroalcoólica. A CIM para as leveduras estudadas foi maior ou igual a 1 mg/mL. A partir da CIM estabeleceu-se um protocolo de estudos utilizando concentrações iguais a CIM ou inferiores (sub-inibitória) para avaliação do efeito das amostras como fotossensibilizadores em PDT.

# 4.6.2. Avaliação do potencial do extrato etanólico bruto das folhas *de Eugenia chlorophylla* e de suas frações como fotossensibilizadores em PDT antimibrobiana.

Após a adequação da metodologia, os ensaios de PDT antimicrobiana foram realizados frente a bactérias (Gram positivas e Gram negativas) e leveduras, os resultados estão apresentados nas Tabelas 3-6 e Figuras 13-14. Somente a exposição ao laser não foi capaz de interferir com o desenvolvimento microbiano de nenhuma das cepas estudadas (controle do inóculo). O solvente e diluente (propilenoglicol:água, 5:95 v/v), empregado

como controle negativo, não interferiu com o desenvolvimento dos micro-organismos quando irradiados e não iluminados com o laser, enquanto que os antimicrobianos padrão utilizados como controles positivos (cetoconazol e bacitracina) foram ativos, tanto nas condições de irradiação, como na ausência de exposição à luz. O controle positivo da PDT, azul de metileno (0,1 mg/mL), mostrou-se efetivo com irradiação a laser inativando as cepas estudadas. Os resultados dos ensaios de PDT mostraram que para determinadas cepas, os extratos e a fração diclorometânica apresentaram percentagem de redução das UFC/mL de 100%, após a irradiação com laser. De modo geral na PDT antimicrobiana frente a bactérias (Tabelas 3 e 4, Figura 13) é possível observar que no grupo irradiado (L+), o ECB e ECD, na concentração 0,5 mg/mL, mostraram-se ativos principalmente para as *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e 6epi-cepa de campo. Na ausência de irradiação laser o extrato ECB e fração ECD na mesma concentração (0,5 mg/mL) não interferiram com o desenvolvimento microbiano (Tabelas 3 e 4, Figura 13 grupo não irradiação).

	Grupo não irradiado (L-)									
Micro-	Média do número de UFC/mL* (%CV)									
organismos	ECB 0,5mg/mL	ECB 0,05mg/mL	ECD 0,5mg/mL	ECD Controle Controle Controle Controle mL 0,05mg/mL inóculo negativo- PDT positivo	Tamanho inóculo inicial					
Staphylococcus aureus ATCC 14458	0	$2,0.10^{6}$ (7,0)	2,22.10 <sup>6</sup> (3,57)	$2,36.10^{6}$ (9,65)	> 10 <sup>8</sup>	> 10 <sup>8</sup>	2,61.10 <sup>5</sup> (11,44)	0	5,54.10 <sup>8</sup> (6,73)	
Staphylococcus aureus ATCC 6538	$1,40.10^{6}$ (2,05)	$1,96.10^{6}$ (6,22)	$   \begin{array}{r}     1,80.10^6 \\     (3,45)   \end{array} $	2,12.10 <sup>6</sup> (5,79)	3,7.10 <sup>6</sup> (2,91)	> 10 <sup>7</sup>	1,18.10 <sup>5</sup> (4,93)	0	$2,7.10^7$ (3,70)	
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	> 10 <sup>7</sup>	> 10 <sup>7</sup>	> 10 <sup>7</sup>	> 10 <sup>7</sup>	> 10 <sup>7</sup>	> 10 <sup>7</sup>	$6,53.10^4$ (2,33)	0	$2,7.10^7$ (13,35)	
Staphylococcus epidermidis 6epi cepa de campo	0	6,8.10 <sup>5</sup> (8,82)	> 10 <sup>8</sup>	4,9. 10 <sup>5</sup> (31,08)	> 10 <sup>8</sup>	> 10 <sup>8</sup>	> 10 <sup>8</sup>	0	> 10 <sup>8</sup>	
Escherichia coli ATCC 10799	1,42.10 <sup>6</sup> (16,84)	1,14.10 <sup>6</sup> (19,75)	2,6.10 <sup>5</sup> (9,21)	$2,4.10^{5}$ (4,95)	> 10 <sup>7</sup>	> 10 <sup>7</sup>	3,5.10 <sup>4</sup> (8,50)	0	8,2.10 <sup>6</sup> (7,87)	
<i>Proteus</i> vulgaris Cepa de campo	$2,41.10^{6}$ (2,64)	>10 <sup>7</sup>	1,85.10 <sup>6</sup> (10,73)	6,6.10 <sup>5</sup> (24,24)	> 10 <sup>7</sup>	> 10 <sup>7</sup>	1,5.10 <sup>5</sup> (2,17)	0	2,24.10 <sup>7</sup> (13,39)	
Pseudomonas aeroginosa ATCC 27853	> 10 <sup>8</sup>	> 10 <sup>8</sup>	> 10 <sup>8</sup>	> 10 <sup>8</sup>	> 10 <sup>8</sup>	> 10 <sup>8</sup>	> 10 <sup>8</sup>	0	> 10 <sup>8</sup>	

Tabela 3. Resultado da atividade antibacteriana das amostras e controles em placas não-irradiadas, expresso como média do número de UFC/mL.

\*: dados expressos como média das UFC/mL, n=6 (Coeficiente de variação CV (%) = (desvio padrão/média) x 100); Controle positivo: Bacitracina (200 UI/mL); Controle positivo PDT: Azul de Metileno (0,1mg/mL); Controle negativo: diluente- propilenoglicol/água (5:95); Inóculo inicial= número de UFC/mL do inóculo. ECB-Extrato etanólico bruto das folhas de *E. chlorophylla*; ECD-fração diclorometânica da partição do extrato etanólico bruto de *E. chlorophylla*.

Micro-	Grupo irradiado (L+)									
organismos	Média do número de UFC/mL* (%CV)									
	ECE 0,5mg/mL	ECE 0,05mg/mL	ECD 0,5mg/mL	ECD 0,05mg/mL	Controle Inóculo	Controle Negativo	Controle Positivo PDT	Controle Positivo	Tamanho inóculo inicial	
Staphylococcus aureus	0	$1,76.10^{6}$	$1,8.10^{6}$	$2,49.10^{6}$	$3,7.10^{7}$	>10 <sup>8</sup>	0	0	$5,54.10^{8}$	
ATCC 14458		(0,09)	(0,23)	(0,50)	(2,7)				(0,75)	
Staphylococcus aureus	1 60 10 <sup>6</sup>	$2.27 \ 10^{6}$	1 04 10 <sup>6</sup>	1 76 10 <sup>6</sup>	0.58.106				$2.7  10^7$	
ATCC 6538	(16,90)	(2,97)	(12,91)	(13,58)	9,38.10 (2,79)	>10 <sup>8</sup>	0	0	(3,70)	
Staphylococcus epidermidis	1 55 10 <sup>6</sup>	0	1 97 10 <sup>6</sup>	1 78 10 <sup>6</sup>	0	0			$2.7  10^7$	
ATCC 12228	(22,94)	>10 <sup>8</sup>	(12,76)	(4,02)	>10 <sup>8</sup>	>10 <sup>8</sup>	0	0	(13,35)	
Staphylococcus epidermidis 6epi cepa de campo	0	5,1.10 <sup>5</sup> (8,45)	0	$1,32.10^{6}$ (3,78)	> 10 <sup>8</sup>	> 10 <sup>8</sup>	0	0	>10 <sup>8</sup>	
Escherichia coli ATCC 10799	>10 <sup>7</sup>	$2,4.10^{5}$ (4,95)	3,2. 10 <sup>5</sup> (12,94)	>10 <sup>8</sup>	$6,04.10^{6}$ (0,92)	> 10 <sup>7</sup>	0	0	8,2.10 <sup>6</sup> (7,87)	
Proteus vulgaris cepa de campo	$1,9.10^{6}$ (3,15)	>10 <sup>8</sup>	$9,3.10^5$ (5,83)	7,2.10 <sup>5</sup> (34,03)	>10 <sup>8</sup>	> 10 <sup>8</sup>	0	0	$2,24.10^7$ (13,39)	
Pseudomonas aeroginosa	$9,0.10^{5}$	>10 <sup>8</sup>	$1,78.10^{6}$	>10 <sup>8</sup>	> 10 <sup>8</sup>	> 10 <sup>8</sup>	0	0	>10 <sup>8</sup>	
1100 27055	(20,50)		(1,11)							

Tabela 4. Resultado da atividade antibacteriana das amostras controles, placa irradiada, expresso como média do número de UFC/mL.

\*: dados expressos como média das UFC/mL, n=6 (Coeficiente de variação, CV (%) = (desvio padrão/média) x 100); Controle positivo: Bacitracina (200 UI/mL); Controle positivo PDT: Azul de Metileno (0,1mg/mL); Controle negativo: diluente- propilenoglicol/água (5:95); Inóculo inicial= número de UFC/mL do inóculo. ECB-Extrato etanólico bruto das folhas de *E. chlorophylla*; ECD-fração diclorometânica da partição do extrato etanólico bruto de *E. chlorophylla*.



Figura 13. Número de unidades formadoras de colônia por mililitros (UFC/mL) da cepa de *Staphylococcus epidermidis* 6epi-cepa de campo (A), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 1228 (B), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (C) e *Staphylococcus aureus* ATCC 14458 (D), tratadas com ECB de *Eugenia chlorophylla* e sua fase ECD na ausência e na presença de irradiação com laser diodo InGaAIP ( $\lambda$ =660nm) por 5min. Extratos avaliados na concentração sub-inibitória mínima (CIM/2). Símbolos diferentes indicam diferença estatístic a entre sem luz X com luz, P<0,05 (ANOVA seguido do Teste de Tukey).

Na PDT frente às leveduras, o extrato ECB e a fração ECD nas concentrações de 1,0mg/mL e 0,5mg/mL, apresentaram resultados efetivos quando irradiados com laser, interferindo com o crescimento de *Candida albicans* ATCC 10231 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (Tabelas 5 e 6, Figura 14). Na ausência de luz, estas mesmas amostras e na mesma concentração foram inativas (Tabelas 5 e 6, Figura 14).

Micro-	Grupo não irradiado (L-)									
organismos	Média do número de UFC/mL* (%CV)									
	ECB 1,0mg/mL	ECB 0,5mg/mL	ECD 1,0mg/mL	ECD 0,5mg/mL	Controle Inóculo	Controle Negativo	Controle Positivo PDT	Controle Positivo	Tamanho Inóculo inicial	
Candida albicans ATCC 1023	9,4. 10 <sup>5</sup> (18,58)	5,7. 10 <sup>5</sup> (1,87)	5,2.10 <sup>5</sup> (5,70)	3,7.10 <sup>5</sup> (5,77)	5,7.10 <sup>5</sup> (4,28)	> 10 <sup>6</sup>	> 10 <sup>6</sup>	5,0.10 <sup>4</sup> (3,84)	5,7.10 <sup>5</sup> (29,38)	
Candida albicans ATCC10231	$0,3.10^{6}$ (19,74)	> 10 <sup>6</sup>	$0,23.10^{6}$ (4,60)	$0,25.10^{6}$ (10,82)	> 10 <sup>6</sup>	> 10 <sup>6</sup>	> 10 <sup>6</sup>	0	8,2.10 <sup>6</sup> (7,87)	
Candida tropicalis ATCC 157	0,07.10 <sup>6</sup> (23,54)	0,05.10 <sup>6</sup> (12,46)	0,06.10 <sup>6</sup> (12,02)	0,04.10 <sup>6</sup> (1,41)	0,04.10 <sup>6</sup> (1,62)	> 10 <sup>8</sup>	> 10 <sup>8</sup>	0	2,7.10 <sup>7</sup> (3,70)	
<i>Candida dubliniensis</i> ATCC 778157	0,005.10 <sup>6</sup> (28,02)	0,02.10 <sup>6</sup> (14,4)	0,02.10 <sup>6</sup> (11,3)	0,02. 10 <sup>6</sup> (5,05)	> 10 <sup>8</sup>	> 10 <sup>8</sup>	> 10 <sup>8</sup>	0	>10 <sup>8</sup>	
Candida parapsilosis ATCC 22019	0,001.10 <sup>6</sup> (0)	0,012.10 <sup>6</sup> (23,57)	0	0,008.10 <sup>6</sup> (0)	0,07.10 <sup>6</sup> (4,78)	> 10 <sup>8</sup>	> 10 <sup>8</sup>	0	>10 <sup>8</sup>	

Tabela 5. Resultado da atividade antifúngica das amostras ECB, ECD e controles, placa não irradiada, expresso como média do número de UFC/mL

\*: dados expressos como média das UFC/mL, n=3 (Coeficiente de variação CV (%) = (desvio padrão/média) x 100); Controle positivo: Cetoconazol (100  $\mu$ g/mL); Controle positivo PDT: Azul de Metileno (0,1mg/mL); Controle negativo: diluente- propilenoglicol/água (5:95); Inóculo inicial= número de UFC/mL do inóculo. ECB-Extrato etanólico bruto das folhas de *E. chlorophylla*; ECD-fração diclorometânica da partição do extrato etanólico bruto de *E. chlorophylla*.

	Grupo irradiado (L+)										
Micro- organismos	Média do número de UFC/mL* (%CV)										
	ECB 1,0mg/mL	ECB 0,5mg/mL	ECD 1,0mg/mL	ECD 0,5mg/mL	Controle inóculo	Controle Negativo	Controle Positivo PDT	Controle positivo	Tamanho inóculo inicial		
Candida albicans ATCC 1023	5,5. 10 <sup>5</sup> (4,09)	4,4. 10 <sup>5</sup> (14,58)	6,3.10 <sup>5</sup> (10,26)	3,8.10 <sup>5</sup> (2,91)	6,0.10 <sup>5</sup> (0,79)	> 10 <sup>6</sup>	2,61.10 <sup>5</sup> (11,44)	0	5,7.10 <sup>5</sup> (29,38)		
Candida albicans ATCC10231	2,0.10 <sup>5</sup> (6,48)	3,0.10 <sup>5</sup> (0,81)	$5,0.10^4$ (0)	1,8.10 <sup>5</sup> (0,38)	8,0.10 <sup>4</sup> (17,86)	> 10 <sup>7</sup>	3,5.10 <sup>4</sup> (8,50)	0	8,2.10 <sup>6</sup> (7,87)		
<i>Candida</i> tropicalis ATCC 157	6,0.10 <sup>4</sup> (1,14)	5,0.10 <sup>4</sup> (2,61)	6,0.10 <sup>4</sup> (11,04)	2,0.10 <sup>4</sup> (10,87)	5,0.10 <sup>4</sup> (17,09)	> 10 <sup>8</sup>	1,18.10 <sup>5</sup> (4,93)	0	2,7.10 <sup>7</sup> (3,70)		
Candida dubliniensis ATCC 778157	$5,0.10^{3}$ (0)	1,0.10 <sup>4</sup> (4,04)	2,0.10 <sup>4</sup> (10,87)	2,0. 10 <sup>4</sup> (6,42)	5,0.10 <sup>3</sup> (0)	> 10 <sup>8</sup>	> 10 <sup>8</sup>	0	>10 <sup>8</sup>		
Candida parapsilosis ATCC 22019	0	0	0	0	7,0.10 <sup>4</sup> (4,78)	> 10 <sup>8</sup>	> 10 <sup>8</sup>	0	>10 <sup>8</sup>		

Tabela 6. Resultado da atividade antifúngica das amostras ECB, ECD e controles, placa irradiada, expresso como média do número de UFC/mL

\*: dados expressos como média das UFC/mL, n=3 (Coeficiente de variação, CV (%) = (desvio padrão/média) x 100); Controle positivo: Cetoconazol (100  $\mu$ g/mL); Controle positivo PDT: Azul de Metileno (0,1mg/mL); Controle negativo: diluente- propilenoglicol/água (5:95); Inóculo inicial= número de UFC/mL do inóculo. ECB-Extrato etanólico bruto das folhas de *E. chlorophylla*; ECD-fração diclorometânica da partição do extrato etanólico bruto de *E. chlorophylla*.



Figura 14. Número de unidades formadoras de colônia por mililitros (UFC/mL) da cepa de *Candida* parapsilosis ATCC 22019 de *Candida albicans* ATCC 10231, tratadas com ECB de *Eugenia chlorophylla* e sua fase ECD na ausência e na presença de irradiação com laser diodo InGaAIP ( $\lambda$ =660nm) por 5min. Extratos avaliados na concentração sub-inibitória mínima (CIM/2). Símbolos diferentes indicam diferença estatística entre sem luz X com luz, P<0,05 (ANOVA seguido do Teste de Tukey).

# 4.6.3. Determinação da atividade fotodinâmica pelos mecanismos fotoquímicos do tipo

# I ou tipo II em modelo biológico in vitro

Estudos de fotoinativação microbiológica foram desenvolvidos nas condições de depleção de oxigênio e em presença de sequestradores de EROs, a fim de determinar o mecanismo envolvido na fototoxicidade do extrato ECB e fração ECD de *E. chlorophylla*. Na Figura 15A, podemos observar que o ácido ascórbico não impediu a ação do fotossensibilizador. Esse fato indica que possivelmente o mecanismo fotoquímico predominante é o do tipo II para ECD. O ácido quínico, substância que foi identificada no extrato ECB e na fração ECD, não se mostrou ativo como fotossensibilizador em PDT antimicrobiana (Figura 15B). A cepa indicadora utilizada neste bioensaio foi a *S. epidermidis* – ATCC 12228.



Figura 15. Porcentagem de sobrevivência da cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 tratada com a fase em diclorometano (ECD) de *Eugenia chlorophylla* (A) e com ácido quínico (AQ) (B) na concentração de 0,5 mg/mL, na ausência de inibidor: amostra e micro-organismo (ECD ou AQ + MIC) e na presença dos inibidores: dos mecanismos de PDT tipo I (manitol- MANI e ácido ascórbico-AA) e dos mecanismos de PDT tipo II (Azida sódica – AS e histidina – HIST) e tipo I e II (Triptofano – TRIP), na ausência e na presença de irradiação com laser diodo InGaAIP ( $\lambda$  = 660nm) por 5 min. Símbolos diferentes indicam diferença estatística entre pares, P<0,05 (ANOVA seguido do Teste de Tukey).
# 4.7. Obtenção, caracterização química por CG-EM e avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de *Eugenia chlorophylla*

#### a) Caracterização química dos óleos essenciais por CG-EM

A composição química foi determinada por CG-EM (Anexo 16-25). Os componentes majoritários detectados nos óleos essenciais analisados estão apresentados na Tabela 7. Os óleos essenciais de *E. clhorophylla*, obtidos das folhas, caule e flores de *E. chlorophylla* apresentaram rendimento de 0,01 a 0,1%. Setenta e cinco componentes foram identificados, representando mais de 85% do total do óleo. Os principais componentes foram E-cariofileno (flores), óxido de cariofileno (caule, flores e folhas), globulol (caules e folhas) e T-muurolol, 1-epi-cubenol e  $\alpha$ -cadinol (caule, flores e folhas), verificando-se que constituintes mais voláteis e susceptíveis de oxidação, como os sesquiterpenos não oxigenados, praticamente desapareceram com o armazenamento dos óleos de 2005. O pico em 20.350 corresponde ao *E*-cariofileno e o pico mais intenso em 24.461 ao globulol (Anexo 19). O pico em 14,8 min no óleo das flores (Anexo 16) corresponde ao salicilato de metila (IR calc. 1195, lit. 1191). Nos óleos da coleta de 2011 foram detectados monoterpenos oxigenados e grande quantidade de componentes alifáticos que não apareciam nos óleos de 2005.

Pico	Componente	IR	IR	%										
		lit.	calc.											
				El	ENC 2005		ENF 2005		ECF	Myrt 2005				
				Análise	Análise 2011	2011	Análise	Análise 2011	2011	Análise Análise 2011				
				2005	(armazenado)		2005	(armazenado)		2005	(armazenado)			
1	Hexenal	801	800	-	-	$0,8 \pm 0,0$	-	-	-	-	-			
2	NI (alifático)*		804	Nq	q -		Nq	-	26,4 ± 0,7	-	-			
3	3-Z-hexanol	850	848	-	-	0,4	-	-	1,0	-	-			
4	n-hexanol	870	861	-			-	-	Т	-	-			
5	Benzaldeido	952	963	-	-	-	-	-	Т					
6	acetato de 3-Z- hexenil	1004	1010	-	-	-	-	_	Т	-	-			
7	alcool benzilico	1032	1037	-	-	-	-	-	-	6,6	$3,1 \pm 0,1$			
8	benzenoacetaldeido	1042	1044	-	-	$1,3 \pm 0,0$	-	-	Т	-	-			
9	oxido de cis-linalool (furanoide)	1074	1066	-	-	0,4	-	-	0,1	-	-			
10	o-guaiacol	1086	1087	-	-	-	-	-	-	3,1	1,4 ± 0,0			
11	Oxido de trans- linalool (furanoide)	1088	1086	-	-	0,4	-	-	0,1	-	-			
12	Linalool	1095	1106	-	-	-	-	-	0,5	-	-			
13	Fenil etil álcool	1110	1113	-	-	-	-	-	-	1,5	0,5			

Talela 7: Substâncias encontradas em óleos essenciais de Eugenia chlorophylla obtidos em diferentes períodos

14	Veratrole	1147	1147	-	-	-	-	-	-	-	0,3
15	Benzylacetato	1157	1163	-	-	-	-	-	-	-	0,4
16	Oxidon de trans-	1173	1174	-	-	t	-	-	0,3	-	-
	linalool (piranoide)										
17	Butaoato de 3Z-	1184	1187	-	-	-	-	-	0,5	-	-
	hexenil										
18	2-allilfenol	1189	1191	-	-	t	-	-	-	-	-
19	Salicilato de metila	1191	1195	-	-	-	-	-	0,3	Nq	$19,3 \pm 0,3$
20	γ-terpineol	1199	1199	-	-	-	-	-	Т	-	-
21	Trans-carveol	1215	1223	-	-	t	-	-	-	-	-
22	3-metilbutanoato de	1232	1233	-	_	t	-	-	0,1	-	-
	3Z-hexenila										
23	Butirofenona	1251	1255	-	-	-	-	-	-	-	0,3
24	Salicilato de etila	1267	1267	-	-	-	-	-	-	-	t
25	δ-elemeno	1338	1331	-	-	-	-	-	Т	-	-
26	4'-metoxiacetofenona	1348	1337	-	-	-	-	-	-	0,4	0,3
27	Eugenol	1356	1353	-	-	-	-	-	-	5,2	$2,7 \pm 0,2$
28	Ciclosativeno	1368	1364	-	_	-	-	-	Т	-	t
29	Isoledeno	1373	1373	-	-	-	-	-	-	-	$1,2 \pm 0,0$
30	β-bourboneno	1384	1377	-	_	-	-	-	-	-	t
31	α-copaeno	1376	1384	-	$0,8 \pm 0,0$	-	-	-	0,6	1,8	-
32	Salicilato de p-		1395	_	-		_	-	_	1,7	-
	hidroxi metila										
33	Metil eugenol	1403	1403	-	-	-	-	-	-	-	0,5
34	1,3,5-		1410	-	_	-	-	-	-	0,7	_
	trimetoxibenzeno										
35	E-cariofilleno	1418	1413	0,1	-	-	5,3	-	Т	12,8	$9,1\pm 0,1$

36	β-copaeno	1430	1423	_	-	-	-	-	0,1	_	-
37	Aromadendreno	1439	1430	-	-	-	-	-	Т	-	$1,0 \pm 0,0$
38	α-guaieno	1439	1435	0,1	-	-	1,1	-	1,9±	1,2	0,2
									0,0		
39	E-β-farneseno	1458	1448	0,1	-	-	1,0	-	-	-	-
40	Cis-muurola-4(14)-5-	1460	1450	-	$0,8\pm0,0$	-	-	-	-	0,7	-
	dieno										
41	Alloaromadendreno	1461	1454	-	-	-	-	-	0,2	1,7	0,4
42	γ-muuroleno	1477	1470	0,2	-	-	1,7	-	1,6 ±	3,2	$2,4 \pm 0,2$
									0,0		
43	α-amorfeno	1483	1476	-	-	-	-	-	0,2	-	$1,0 \pm 0,1$
44	Cis-β-guaieno	1490	1483	-	-	-	-	-	0,2	-	$1,5 \pm 0,0$
45	Viridifloreno	1493	1488	0,1	-	-	0,1	-	-	1,4	t
46	Epi-cubebol	1493	1491	-	-	-	-	-	-	-	t
47	α-muuroleno	1499	1496	-	-	-	-	-	0,4	0,7	0,6
48	Trans-β-guaieno	1500	1497	-	-	-	-	-	-	-	0,3
49	γ-cadineno	1513	1507	0,2	_	t	1,7	-	1,1 ±	2,5	$1,5 \pm 0,0$
									0,1		
50	Cubebol	1513	1513	-	$0,8\pm0,0$	-	-	0,6	-	-	$4,7 \pm 0,0$
51	Trans-calameneno	1521	1516	-	_	-	-	-	0,3	-	-
52	δ-cadineno	1524	1526	0,4	Т	-	1,4	-	-	2,0	0,3
53	Cis-calameneno	1528	1518	-	_	-	-	-	0,3	-	-
54	α-cadineno	1538	1532	-	-	-	-	-	-	-	$5,2 \pm 0,0$
55	α-calacoreno	1545	1538	-	-	-	-	-	0,1	-	-
56	Elimicina	1554	1550	-	0,4	-	-	0,5	-	0,6	0,5
57	Ledol	1565	1555	1,0	$1,1 \pm 0,0$	0,1	1,8	$2,0 \pm 0,0$	1,3 ±	1,5	0,6
									0,0		
58	1α-10α-epoxi-	1570	1567	-	-	-	-	-	Т	-	-

	amorfo-4-eno										
59	Alcool de Cariofilleno	1568	1563	-	t	-	-	1,1 ± 0,1	$1,2 \pm 0,0$	-	0,1
60	Germacreno-D-4-ol	1574	1579	0,8	-	-	0,9	-	-	-	-
61	Spathulenol	1576	1569	5,1	4,4±0,1	-	6,3	$7,0 \pm 0,0$	$5,9 \pm 0,1$	-	0,6
62	Oxido de cariofilleno	1581	1573	17,2	4,1±0,2	0,3	6,4	3,1 ± 0,0	11,6 ± 0,1	8,9	0,2
63	Globulol	1583	1577	16,5	14,1 ± 0,3	0,8	22,5	23,9 ± 0,5	$11,2 \pm 1,0$	2,9	6,6 ± 0,1
64	Guaiol	1595	1586	3,8	4,0 ± 0,1	0,1	4,7	5,3 ± 0,0	1,6± 0,1	1,2	1,2 ± 0,0
65	trans-β-elemenono	1602	1588	-	2,0 ± 0,1	t	-	2,6 ± 0,0	1,6± 0,1	-	1,2 ± 0,0
66	Humuleno epoxido II	1606	1600	-	2,0±0,1	-	-	$1,2 \pm 0,0$	$1,4 \pm 0,1$	-	1,0 ± 0,0
67	1,10-di-epi-cubenol	1614	1609	1,6	0,3	-	9,8	0,6	0,4	-	0,4
68	1-epi-cubenol	1627	1622	10,9	12,8 ± 0,2	-	4,5	10,7 ± 0,6	$3,9 \pm 0,2$	6,1	8,1 ± 0,1
69	epi-α-cadinol (T- cadinol)	1640	1636	1,0	3,7 ± 0,2	-	1,0	3,3 ± 0,1	$1,9 \pm 0,0$	-	3,3 ± 0,1
70	Epi-α-muurolol (T- muurolol)	1641	1638	16,8	$7,4 \pm 0,3$	t	8,1	6,6 ± 0,1	$2,2 \pm 0,0$	8,5	3,3 ± 0,1
71	Cubenol	1642		0,2	t	-	1,1	-	-	2,9	-
72	α-muurolol	1645	1642	1,0	5,3 ± 0,1	t	1,0	$3,3 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,2$	1,2	1,6 ± 0,0
73	α-cadinol	1653	1650	12,1	$11,9 \pm 0,2$	t	5,7	$8,6 \pm 0,0$	$4,5 \pm 0,1$	10,1	8,3 ± 0,2

74	Khusinol			1,2	-	-	1,0	-	0,1	-	-
75	Acido hexadecanoico	1960	1964	nq	$10,4 \pm 0,5$	$2,3 \pm$	Nq	$6,5 \pm 0,5$	0,3	-	-
_						0,1					
_	Total identificado			85,4	85,2	92,6	87,1	86,8	86,8	96,3	90,2
	Monoterpenos			-	-	0,8	-	-	1,0	-	-
	oxigenados										
	Sesquiterpenos CH			1,2	1,6	-	12,3	-	7,0	33,2	19,4
	Sesquiterpenos			84,2	72,5	1,4	74,8	79,8	50,2	43,3	41,3
	oxigenados										
	Compostos			-	0,4	1,3	-	0,5	0,3	19,8	29,3
	aromáticos										
	Compostos alifáticos			_	10,4	89,1	_	6,5	28,3	-	0,2

- não detectado.

Nq – não quantificado.

t- detectado a nível de traço

% - média de duas determinações.

NI: constituinte não identificado

 $ENC - \delta leo do caule obtido em set/2005 - analisado em 2005 e 2011 (armazenado em congelador (-4<sup>o</sup>) e reanalisados em maio/2011); ECC - <math>\delta leo do caule coletado em jan/2011$  no mesmo exemplar da planta e habitat natural.

 $ENF - \delta leo das folhas obtido em set/2005 - analisado em 2005 e 2011(armazenado em congelador (-4<sup>o</sup>) e reanalisados em maio/2011);$ 

ECF - óleo das folhas coletadas em jan/2011 no mesmo exemplar da planta e habitat natural.

Myrt – óleo das flores coletadas em dez/2004 – analisadas em 2005 e 2011.

#### b) Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais

Para as bactérias *E. faecalis, K. rhizophila* e *S. epidermidis*-campo a CIM, com ação bactericida de 100%, dos óleos provenientes das flores e folhas foi de 1,0 mg/mL. A maioria das amostras de óleos essenciais mostraram leve a moderada atividade antimicrobiana (Tabela 8) associada principalmente com bactérias Gram positivas e à *C. albicans* com resultados similares ao observado na literatura para esta espécie vegetal (STEFANELLO *et al.*, 2008). O óleo do caule coletado em 2011 não se mostrou ativo nas condições experimentais utilizadas e é composto, predominantemente (85,4%), por um constituinte alifático não identificado por CG-EM. Ainda, observou-se variação nos valores de concentração inibitória mínima frente às cepas bioativas demonstrando diferenças entre os resultados obtidos por STEFANELLO *et al.*, (2008).

		ENC			ENF		
		2005			2005		
Micro-organismos	ENC 2005	armazenado e analisado em 2011	ECC 2011	ENF 2005	armazenado e analisado em 2011	ECF 2011	MYRT 2005
Kocuria rhizophila ATCC 9341	0.5	-	-	0.5	1.0	1.0	1.0
Staphylococcus aureus ATCC 6538	0.5	-	-	0.5	-	-	0.5
Staphylococcus epidermides (6ep)	-	-	-	-	1.0	1.0	-
Enterococcus faecalis	-	-	-	-	1.0	1.0	1.0
Escherichia coli ATCC 10538	-	-	-	-	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	-	-	-	-	-	-	-
Candida albicans ATCC 1023	-	1.0	-	0.5	1.0	1.0	0.5
Candida albicans ATCC 10231	N.F	1.0	-	N.F	-	-	N.F
Candida tropicalis (campo)	0.5	-	-	0.5	-	-	-

Tabela 8: Atividade antimicrobiana (CIM em mg/mL) dos óleos essenciais de *Eugenia chlorophylla* obtidos em diferentes períodos

- não apresentou inibição no desenvolvimento microbiano . NF - não avaliado.

 $ENC - \delta leo do caule obtido em set/2005 - analisado em 2005 e 2011 (armazenado em congelador (-4 °) e reanalisados em maio/2011);$ 

ECC – óleo do caule coletado em jan/2011 na mesma planta em habitat natural.

 $ENF - \delta leo das folhas obtido em set/2005 - analisado em 2005 e 2011(armazenado em congelador (-4 °) e reanalisados em maio/2011);$ 

ECF - óleo das folhas coletadas em jan/2011 na mesma planta em habitat natural.

Myrt - óleo das flores coletadas em dez/2005 - analisadas em 2005 e 2011

### c) Avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram submetidos à avaliação da atividade antioxidante pelo método de DPPH em CCD, como descrito na literatura (TAKAMATSU, *et al*, 2003). Os resultados mostraram que as amostras de todos os óleos essenciais (folhas, caule e flores) de *E. clhorophylla* (coletas de 2005 e 2011) apresentaram manchas amarelas, demonstrando efeito positivo quanto à atividade antioxidante quando reveladas com solução do reagente DPPH.

#### 5. Discussão

A PDT é uma opção terapêutica em pleno desenvolvimento, e tem se mostrado efetiva, *in vitro*, contra bactérias, fungos, vírus e parasitas (WAINWRIGHT, 1998). Na PDT, há uma zona do espectro eletromagnético que é conhecida como janela terapêutica que compreende os comprimentos de onda entre 600 e 800nm. Devido às absorções endógenas e dispersão da luz, faz-se necessário a administração de comprimentos de onda longos para que haja penetração no tecido. Iluminação superficial com vermelho e infravermelho-próximo pode atingir a profundidade de 5 a 10mm dependendo do tipo de tecido e aplicação da luz que estão envolvidos (WAINWRIGHT, 2009).

Todas as substâncias que absorvem nesta faixa configuram-se como potenciais agentes fotossensibilizadores. Um exemplo disto é o azul de metileno, que apresenta pico de absorção em 760nm (USACHEVA, 2006). Ainda, as substâncias que absorvem luz nesta faixa espectral precisam, por exemplo, quando excitadas com laser a 660nm, saírem do estado fundamental (singlete) e irem para um estado singlete energicamente excitado ( $^{1}F^{*}$ ) e assim serem capazes de atuarem como fotossensibilizados para possível aplicação em PDT. Este estado singlete energicamente excitado ( $^{1}F^{*}$ ) pode ser desativado pela emissão de fluorescência ou através do cruzamento entre sistemas levando a um estado triplete ( $^{3}FS^{*}$ ). O estado singlete excitado e o triplete podem reagir diretamente com moléculas do substrato biológico, transferindo hidrogênio e elétrons, formando radicais livres, os quais poderão interagir com o oxigênio para gerar espécies reativas de oxigênio, principalmente superóxido e seus derivados, mecanismo este conhecido reação fotoquímica do tipo I. O estado triplete pode transferir energia diretamente para o oxigênio singlete ( $^{1}O_{2}$ ) e assim

serem capazes de atuar como fotossensibilizados para possível aplicação em PDT, processo chamado de mecanismo do tipo II. Para se entender como age determinada amostra como fotossensibilizador em PDT, são necessários experimentos para a caracterização fotoquímica e fotofísica desta amostra como, por exemplo: obtenção dos espectros de fluorescência em estado estacionário, espectro de emissão da fluorescência resolvido no tempo, de maneira que os parâmetros espectrais possam permitir o estabelecimento de conclusões acerca dos mecanismos de luminescência presentes nas amostras.

Verificou-se pelos resultados obtidos com o extrato etanólico e fração diclorometânica de *E. chlorophylla* que, apesar da excitação utilizada nos ensaios de PDT com laser em  $\lambda$ =660 nm não apresentar rendimento quântico máximo de emissão de fluorescência, ainda assim as amostras analisadas apresentaram emissão de fluorescência. Portanto, há coerência entre os resultados encontrados nos experimentos fotoquímicos e fotofísicos realizados e os resultados biológicos de PDT. Logo, tanto o extrato bruto etanólico das folhas de *E. chlorophylla*, quanto a sua fração diclorometânica da partição atuam como fotossensibilizadores, quando expostos à excitação a 660 nm com resultados efetivos na PDT antimicrobiana.

Os extratos vegetais e frações foram analisados quanto à sua eficiência fotoquímica avaliando-se a formação de oxigênio singlete (reação tipo II) na PDT. Assim, os resultados do ensaio DPBF ajudaram a triar as amostras quanto ao seu potencial pró-oxidativo através da avaliação de sua capacidade em gerar oxigênio singlete quando submetidas à luz laser. Através deste monitoramento fotoquímico das amostras em estudo, determinaram-se aquelas com maior potencial para presença de fotossensibilizadores. Os resultados obtidos são sugestivos de que os extratos ECB e ECD produzem oxigênio singlete quando irradiados nas condições de PDT. Também foram utilizados seqüestradores de espécies reativas de oxigênio visando-se avaliar por qual mecanismo (tipo I ou II) as amostras estudadas estavam agindo na PDT antimicrobiana. De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que o mecanismo II era o que predominava. Entretanto, em menor intensidade o mecanismo tipo I também pode estar ocorrendo.

Neste estudo, o extrato bruto e a sua fração diclorometânica demonstraram promissora atividade em PDT antimicrobiana frente a algumas cepas de bactérias como S. epidermidis ATCC 12228 e 6epi-cepa de campo e frente às leveduras C. albicans ATCC 10231 e C. parapsilosis ATCC 22019. Esse fato é provavelmente decorrente da presença de substâncias bioativas presentes nestas matrizes. Durante o fracionamento com o objetivo de concentrar e/ou isolar os constituintes bioativos, buscou-se minimizar a presença de pigmentos como clorofila e carotenóides nas frações. No entanto, é importante se considerar que esta atividade pode não ser atributo de uma única substância, e sim de um conjunto de substâncias com efeito sinérgico. Além disso, muitas vezes as substâncias ativas podem ser minoritárias e/ou quimicamente instáveis quando isoladas, dificultando sua caracterização química (YUNES, 2001). Por outro lado, um extrato ou fração que possui efeito biocida satisfatório, poderia ser utilizado como um fitocomplexo ou um fitoterápico, desde que garantidas a segurança, eficácia e a qualidade do produto. Entretanto estes estudos são preliminares, necessitando de um maior aprofundamento tanto na avaliação da atividade como fotossensibilizadores para aplicação em PDT, quanto na caracterização fitoquímica e de fotoquímica, fotofísica e fotobiologia das amostras mais promissoras.

As bactérias do gênero *Staphylococcus* pertencem à família *Micrococcaceae*, possuem células esféricas  $(0,5 - 1,5 \mu m)$ , são anaeróbias facultativas, quimiorganotróficas com metabolismo fermentativo e respiratório. Estão associadas à pele e membranas mucosas de animais vertebrados de sangue quente, podendo ser eventualmente isolados de produtos alimentares, poeira e água. Muitas espécies são patogênicas para o homem e animais (HOLT et al., 1994).

*Staphylococcus aureus* é a espécie de maior importância, denominado como coagulase positiva e o segundo em importância é *Staphylococcus epidermidis* reconhecidamente como coagulase negativa (SCN) mais isolado em amostras clínicas (BANNERMAN, 2003). As infecções causadas por este microrganismo são bastante variadas e incluem bacteremias, infecção de válvulas cardíacas, infecção de próteses de válvulas cardíacas, osteomielites, pioartrites, peritonites durante processos de hemodiálises ambulatoriais, mediastinites, prostatites, infecção de marcapassos permanentes, cateteres intravasculares, líquido cefalorraquidiano, uma grande variedade de aparelhos ortopédicos e infecções do trato urinário entre outras (KLOOS e BANNERMAN, 1994; KONEMAN et al., 1997, BANNERMAN, 2003).

O gênero Candida está presente na microbiota humana. *C. albicans*, podem ser isoladas das superfícies mucosas sadias da cavidade bucal, vagina, trato gastrintestinal e região retal, cerca de 80% dos indivíduos podem exibir colonização desses locais na

ausência de doença. Quando se tornam patogênicos são usualmente denominados fungos oportunistas (BASSETTI *et al.*, 2006; CAPOOR *et al*, 2005; LAUPLAND *et al.*, 2005). C. albicans é considerada a espécie do gênero Candida mais freqüentemente isolada e que apresenta mais fatores de virulência (GRIMOUD *et al.*, 2003; FIGUEIREDO *et al.*, 2001; JORGE *et al.*, 1997; ZÖLLNER *et al.*, 2003). Diante dos fatos apresentados, ressalta-se a importância do controle desses micro-organismos para manutenção do bem estar e saúde da população e reforça a necessidade da busca por substâncias antimicrobianas capazes de vencer a resistência desses patógenos.

A adequação dos procedimentos analíticos dos bioensaios de PDT foi promissora. Como alguns estudos sugerem que certos micro-organimos podem apresentar cromóforos, intrínsecos, e desta forma, poderiam absorver a luz da radiação laser na PDT e a atividade observada ser devida a este fato (WILSON, *et al.*, 1994, ALMEIDA *et al.* 2006), os inóculos de todas as bactérias e leveduras estudados foram analisados na presença e ausência de radiação sem adicionar nenhuma substância além do caldo nutritivo (grupo controle do inóculo). O grupo controle do inóculo apresentou-se inalterado quando irradiado, o que sugere que as cepas analisadas não foram sensibilizadas por substâncias cromóforas intrínsecas, visto que não houve redução do número de micro-organismos frente à irradiação laser. Como controle positivo empregou-se fármacos antimicrobianos convencionalmente utilizados na terapêutica como a bacitracina para bactérias e cetoconazol para os fungos (RANG *et al.*, 2003, LEVISNON *et al.*, 2005). Como controle positivo da aPDT, utilizou-se o azul de metileno, um composto fenotiazínico cujo tamanho e forma permitem que ele se intercale no ácido nucléico. Quando ativado pela luz, ele age seletivamente sobre os resíduos de guanosina conduzindo à formação de 8hidroxiguanosina (SCHNEIDER *et al.*, 1990) que levam à desestabilização da molécula de DNA, comprometendo a suas funções e conseqüentemente a viabilidade celular (ZEINA, 2001; USACHEVA, 2006; MUNIN, 2007; GIROLDO, 2009).

Quanto à análise dos óleos essenciais bioativos de E. clhorophylla, setenta e cinco componentes foram identificados, verificando-se que constituintes mais voláteis e susceptíveis de oxidação, como os sesquiterpenos não oxigenados, praticamente desapareceram com o armazenamento dos óleos de 2005. Nos óleos da coleta de 2011 foram detectados monoterpenos oxigenados e grande quantidade de componentes alifáticos que não apareciam nos óleos de 2005. Todos os óleos mostraram leve a moderada atividade antimicrobiana associada principalmente às bactérias Gram positivas e à C. albicans com resultados similares aos observados na literatura (STEFANELLO et al., 2008) para esta espécie vegetal. O óleo do caule coletado em 2011, não se mostrou ativo nas condições experimentais utilizadas e é composto, predominantemente (85,4%), por constituinte alifático não identificado por CG-MS. O pico intenso em 2,8 minutos (Anexo 20) foi observado na primeira análise (2005), representando 0,7% do óleo das folhas e 5% do óleo do caule. Em nova análise em 2011, esse componente é quase o único presente no óleo do caule e o principal no das folhas. A atividade antimicrobiana dos óleos parece estar relacionada à presença de sesquiterpenos oxigenados nos óleos bioativos. Ainda, observouse variação nos valores de concentração inibitória mínima frente as cepas bioativas com o ano de coleta e armazenagem dos óleos coletados em 2005. Todos os óleos estudados apresentam atividade antioxidante no ensaio com DPPH em CCD em análise no ano de 2011.

Portanto, considerando-se os resultados obtidos neste estudo, sugere-se que o extrato bruto e a fração diclorometânica de *E. chlorophylla* possuem potencial para aplicação como agentes fotossensibilizadores em PDT antimicrobiana. Além disso, esta espécie vegetal acumula também outras substâncias com atividades biológicas como óleos essenciais e que apresentam atividade antimicrobiana e antioxidante. O estudo fitoquímico monitorado pela atividade biológica e PDT antimicrobiana desta espécie vegetal deverá ser aprofundado, visando identificar outros constituintes acumulados nos extratos bioativos desta matriz vegetal.

Assim, a partir dos resultados obtidos nesse trabalho propõem-se algumas perspectivas para trabalhos futuros:

- A obtenção de maior quantidade de massa das frações mais promissoras para que seja possível realizar mais estudos fitoquimicos, visando identificar quais constituintes presentes nos extratos bioativos estariam atuando como fotossensibilizadores;
- Avaliação dos efeitos de sazonalidade e de influencia de fatores edáficos como temperatura, luminosidade, umidade, pH do solo que podem alterar a reprodutibilidade da atividade biológica do extrato.
- Detalhamento e pormenorização dos mecanismos de ação envolvidos na atividade biológica das amostras bioativas e sua toxicidade;

- Avaliação das atividades destes fotossensibilizadores em PDT antimicrobiana in vivo;
- Avaliações mais aprofundadas dos fenômenos fotoquímicos, fotofísicos e fotobiológicos destes fotossensibilizadores naturais, determinando uma curva dose resposta dos extratos bioativos frente ao laser, variando os tipos de laser, o tempo de irradiação e o comprimento de onda, bem como estudos com outros micro-organismos.

### 6.Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo permitiram concluir que:

• O extrato etanólico bruto e a sua fração da partição em diclorometano apresentaram banda de absorção entre 600 e 700 nm e mostraram capacidade de formar oxigênio singlete no ensaio DPBF quando submetidos a irradiação laser diodo InGaAlP, a  $\lambda$ =660 nm;

• Os valores de CIM para os extratos observados foram maiores ou iguais a 0,5 mg/mL para as bactérias e maior ou igual a 1 mg/mL para os fungos estudados;

• Óleos essenciais de *E. chlorophylla* apresentaram atividade antioxidante e antimicrobiana *in vitro* na ausência de irradiação laser, e setenta e cinco componentes voláteis (mais de 85% do total de constituintes do óleo) foram identificados por CG/EM, verificando-se a presença de sesquiterpenos oxigenados como constituintes majoritários dos óleos bioativos;

• Os resultados permitiram selecionar as amostras mais promissoras no processo de fracionamento e análises por ESI-MS/MS possibilitando identificar a presença do ácido quínico no ECB e ECD.

• Os experimentos fotoquímicos e fotofísicos mostraram que, apesar da excitação utilizada nos ensaios de PDT com laser em  $\lambda$ =660 nm não apresentar rendimento quântico máximo de emissão de fluorescência, ainda assim as amostras analisadas (extrato etanólico bruto das folhas de *E. chlorophylla* e sua fração de partição em diclorometano) apresentaram emissão de fluorescência e demonstram coerência entre os resultados encontrados nos experimentos fotoquímicos e fotofísicos realizados e os dados dos ensaios biológicos de PDT. Logo, no conjunto, os resultados sugerem que tanto o ECB como a fração da partição ECD atuam como fotossensibilizadores com resultados efetivos na inativação em irradiados quando irradiados em sessão única por 5 min com laser diodo InGaAIP,  $\lambda$ =660nm. Os diferentes procedimentos analíticos utilizados neste estudo multidisciplinar sejam eles químicos, biológicos, fotoquímicos ou fotofísicos mostraram-se importantes no processo de procura de fitoderivados bioativos na presença ou ausência de irradiação laser.

#### 7. Referências bibliográficas

ACKROYD, R.; KELTY, C.; BROWN, N.; REED, M. 2001. The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, 74: 656-669.

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.

AKERELE, O. 1988. Medicinal plants and primary health care: an agend for action. **Fitoterapia**, 59:533-563.

ALLEMANN, N.; SCHNEIDER, A. 2002. Mitochondrial substrate level phosphorylation is essential for growth of procyclic Trypanosoma brucei. **The Journal of Biological Chemistry**, 277: 32849–32854.

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.; CUENCA, R. E.; DOWNIE, G. H.; CAMNITZ, P.; BRODISH, B.; SIBATA, C. H. 2005. Clinical Photodinamic 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.

ALMEIDA, J. M.; GARCIA, V. G.; THEODORO, L. H.; BOSCO, A. F.; NAGATA, M. J. H.; MACARINI, V. C. 2006. Terapia fotodinâmica: uma opção na terapia periodontal. **Arquivos em odontologia**, 42: 161-256.

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.

AVELINE, B. 2001. Primary processes in photosensitization mechanisms. **Comprehensive** Series in Photosciences, 2:17-34.

BALANDRIN, M. F.; KLOCKE, J. A.; WURTELE, E. S.; BOLLINGER, W. H. 1985. Natural plant chemicals sources of industrial and medicinal materials. **Science**, 228:1154.

BANNERMAN, T. L. 2003. *Staphylococcus, Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.;

FALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. **Manual of clinical microbiology.** 8a ed. Washington, DC: ASM Press, 384-404.

BASSETTI, M.; RIGHI, E.; COSTA, A.; FASCE, R.; MOLINARI, M. P.; ROSSO, R.; PALLAVICINI, F. B.; VISCOLI, C. 2006. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. **BMC Infectious Diseases**, 10: 6-21.

BELKIN, M.; SCHWARTZ, M. 1989. New biological phenomena associated with laser radiation. **Health Physics**, 56:687-690.

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.

BLISS, J. M., BIGELOW, C. E., FOSTER, T. H., HAIDARIS, C. G. 2006. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of Photofrin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48:2000-2006.

BROWN, S. B.; BROWN, E. A.; WALKER, I. 2004. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. **The Lancet Oncology**, 5:497-508.

BRUGNERA JUNIOR, A.; PINHEIRO, A. L. B. 1998. Lasers na odontologia moderna, São Paulo: Pancast, 355p.

CAPOOR, M. R.; NAIR, D.; DEB, M.; VERMA, P. K.; SRIVASTAVA, L.; AGGARWAL, P. V. 2005. Emergence of nonalbicans Candida species and antifungal resistance in tertiary care hospital. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, 58: 8-344.

CARVALHO, A. A. T.; SAMPAIO, M. C. C.; SAMPAIO, F. C.; MELO, A. F. M.; SENA, K. X. F. R.; CHIAPPETA, A. A.; HIGINO, J. S. 2002. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos hidroalcoolicos de Psidium guajava L. sobre bactérias Gram-negativas. Acta Farmacêutica Bonaerense, 21:255-258.

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: 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

CECHINEL, V. F., YUNES, R. A. 1998. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, 21:99-105.

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 Phtobiology B: Biology, 188:185-191.

COSTA ,T. R.; FERNANDES, O. F. L.; SANTOS, S. C.; OLIVEIRA, C. M. A.; LIÃO, L. M.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R.; FERREIRA, H. D.; SALES, B. H. N.; SILVA, M. R. R. 2000. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. Journal of Ethnopharmacology, 72: 111-117.

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 Phtobiology B: Biology, 96: 63-65.

CRUZ, A. V. D M.; KAPLAN, M. A. C. 2004. Estudo comparativo do perfil químico e o uso popular de espécies das famílias myrtaceae e melastomataceae. Rio de Janeiro: UFRJ/Universidade Federal do Rio de Janeiro.

DETTY, M. R.; GIBSON, S. L.; WAGNER, S. J. 2004. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamictherapy. **Journal of Medicinal** Chemistry, 47:3897-3915.

DONELLY, R. F.; MCCARRON, P. A.; TUNNEY, M. M.; WOOLFSON, A. 2007. Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of mouth. Journal of **Photochemistry and Phtobiology B: Biology**, 86:59-69.

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.; GOMER, C. J.; HENDERSEN, B. W.; JORI, G.; KESSEL, D.; KORBELICK, M. 2002. An update on photodynamic therapy applications. Journal of Clinical Medicine and Surgery, 20:3-7.

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.

FARNSWORTH, N. R.; GRAHAM, J. G.; QUINN, M. L.; FRABRICANT, D. S. 2000. Plants used against cancer – and extension of the work of Jonathan Hartwell. **Journal of Ethnopharmacology**,73: 347-377.

FERGUSON, J. 2002. Photosensitivity due to drugs.photodermatology, **Photoimmunology** and **Photomedicine**,18:262-269.

FERNANDES, F.; SANTOS, R.; SOARES, R.; BRANQUINHO, L. F.; RAMOS, M. F. S.; HENRIQUES, M. G. M. O.; SIANI, A. C.; GUIMARÃES, A. C. 1997. Avaliação da atividade de óleos essenciais de espécies de Myrtaceae e Burseraceae como agentes tripanossomicidas. **III Jornada Paulista de Plantas Medicinais**, CPQBA. UNICAMP.

FIGUEIREDO, R. L. Q.; BATISTA, O. M.; RAMALHO, R. M.; LIMA, E. O. 2001. Estudo microbiológico da prevalência de enterobactérias na cavidade bucal de pacientes HIV positivos e sua relação com o gênero Candida. Jornal Brasileiro de Clinica e Estética Odontológica, 5:111-115.

FUCHS, J.; THIELE, J. 1998. The role of oxygen in cutaneous photodynamic therapy. **Free Radical Biology and Medicine**, 24:835-847.

GAD, F.; ZAHRA, T.; FRANCIS, K. P.; HASAN, T.; HAMBLIN, M. R. 2004. Targeted photodynamic therapy of established softtissue interactions in mice. **Photochemical and Photobiological Sciences**, 3:451-458.

GARCEZ, A. A.; RIBEIRO, M. S.; NUNEZ, S. C.; SOUZA, F. R. 2003. Terapia fotodinâmica em odontologia laser de baixa potência para redução microbiana. **Revista da** Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas, 57: 223-226.

GARCEZ, A. S.; RIBEIRO, M. S.; TEGOS, G. P.; NUNEZ, S. C.; JORGE, A. O.; HAMBLIN, M. R. 2007. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional treatment to eliminate root canal biofilm infections. Lasers in Surgery and Medicine. 39:59-66.

GASPARETTO, A. 2008. *Alternanthera maritima:* preparo de extratos e formulações tópicas e avaliação do seu efeito como fotossensibilizador em terapia fotodinâmica antimicrobiana. 122p. Mestrado (Mestrado em Engenharia Biomédica), **Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba**, São José dos Campos (SP).

GASPARETO, A .; LAPINSKI, T. F.; ZAMUNER, S. R.; KHOURI, S.; ALVES, L. P.; MUNIN, E.; 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. São Paulo: Lovise. 175p.

GIROLDO, L. M. 2009. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with methylene blue increases membrane permeability in *Candida albicans*. Lasers in Medical Science, 24:109-112.

GOTLLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C.; BORIN, M. R. M. B. 1996. Biodiversidade: um enfoque químico-biológico. Rio de Janeiro: Ed. UFRJ, 267p.

GRIMOUD, A. M.; MARTY, M.; BOCQUET, H.; ANDRIEU, S.; LODTER, J. P.; CHABANON, G. Colonization of the oral cavity by Candida species: risk factors in long-term geriatric care. **Journal of Oral Science**, 45: 51-55.

GROVE, D. C.; RANDALL, W. A. 1955. Assay methods of antibiotics: a laboratory manual (Antibiotics monographs, 2). New York: Medical Encyclopedia Inc.

HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. 2004. Photodinamic therapy: A new antimicrobial approach to infections disease? **Photochemical and Photobiological Sciences**, 3:436-450. HARVEY, A. 2000. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today** 5: 294-300.

HAVSTEEN, B. H., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, 96: 67-202.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. 1994. **Bergey's manual of determinative bacteriology.** 9a ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 787p.

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. Photodinamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer. **The Lancet Oncology**, 1:212-219.

HUANG, Z. 2005. A review of progress in clinical photodynamic therapy. **Technology in Cancer Research and Treatment**, 4: 283-293.

JOHNSON, L. A. S.; BRIGGS, B. G. 1984. Myrtales and Myrtaceae phylogenetic analysis. Annals of the Missouri Botanical Garden, 71: 700-756.

JOLY, C. A. 1998. Biodiversidade do estado de São Paulo, Brasil. Volume 2: fungos macroscópicos e plantas. São Paulo: FAPESP, 79p.

JORGE, A. O. C.; KOGA-ITO, C. Y.; GONÇALVES, C. R.; FANTINATO, V.; UNTERKIRCHER, C.S. 1997. Presença de leveduras do gênero Candida na saliva de pacientes com diferentes fatores predisponentes e de indivíduos controle. **Revista Odontológica da Universidade de São Paulo**, 11:85-279.

JORI, G.; FABRIS, C.; SONCIN, M.; FERRO, S.; COPPELLOTTI, O.; DEI, D.; FANTETTI, L.; CHITI, G.; RONCUCCI, G. 2006. Photodinamic therapy in the treatment of Microbial infections Basic principles and Perspective Applications. Laser in Surgery and Medicine, 38:468-481.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. 1999. Plant systematics: a phylogenetic approach. Sunderland, **Sinauer Associates**, Inc. 464 p.

JUNQUEIRA, V. M. S.; SILVA, M. A.; CANABRAVA, L. C. M. N., ROSSI, D. A.; BELETTI, M. E.; CANABRAVA, H. A. N. 2007. Avaliação antimicrobiana e antiulcerogência de *Eugenia dysenterica*. Disponível em: http://www.seer.ufu.br/index.php/horizontecientifico/article/viewFile/3800/2805. Acesso em: 12/06/07.

KENDALL, C. A.; MORTON, C. A. 2003. Phtodynamic therapy for the treatment of skin disease. **Technology in Cancer Research & Treatment**, 2: 283-288.

KESSEL, D.; LUO, Y. 2004. Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 42: 89-95.

KLOOS, W. E.; BANNERMAN, T. L. 1994. Update on clinical significance of coagulasenegative staphylococci. Clinical Microbiology Reviews, 7: 117-140.

KONAN, Y. N.; GURNY, R.; ALLÉMAN, E. 2002. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, 66:89-106.

KONAPKA, K.; GOSLINSKI, T. 2007. Photodinamic therapy in dentistry. **Journal of Dental Research**, 86:694-707.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN Jr., W. C. 1997. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 5<sub>4</sub> ed. Philadelphia: Lippincott, 1395p.

KÖMERIK, N.; MACROBERT, A. J. 2006. Photodynamic therapy as an alternative antimicrobial modality for oral infections. **The 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. **The Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, 25:205-215.

KÜBLER, A. C. 2005. Photodynamic therapy. Medical Laser Application, 20:37-45.

LAPINSKI, T. F. 2008. Fotossensibilizadores naturais em terapia fotodinâmica antimicrobiana: desenvolvimento de creme e gel creme contendo extratos de *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae). 112p. Mestrado (Mestrado em Engenharia Biomédica), **Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba**, São José dos Campos (SP).

LAUPLAND, K. B.; GREGSON, D. B.; CHURCH, D. L.; ROSS, T.; ELSAYED, S. 2005. Invasive Candida species infections: a 5 year population based assessment. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 56:1-6.

LEUNG, M. H.; KEE, T. W. 2009. Effective stabilization of Curcumin by association to plasma proteins: human serum albumin and fibrinogen. Langmuir, 25: 5773-5777.

LIM, D. S.; KO, S. H.; KIM, S. J.; PARK, Y. J.; PARK, J. H.; LEE, W. Y. 2002. Photoinactivation of vesicular stomatitis virus by a photodynamic agent, chlorophyll derivates from silkworm excreta. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 67:149-153.

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. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, 94: 171-178.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. 2005. Microbiologia medica e Imunologia, 7 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 101-104.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F.; GRYNDERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. 2002. Medicinal plants: the need for multidisciplinary scientific studies. **Química Nova**, 25:429-438.

MACROBERT, A. J.; BOWN, S. G.; PHILLIPS, D. 1989. What are the idea properties of a photosensitizer? In: Photosensitizing compounds: their chemistry, biology and clinical use. Chinchester: Wiley, 4-16.

MAISH, T.; SZEIMIES, R. M.; JORI, G.; ABELS, C. 2004. Antibacterial photodinamic therapy in dermatology. **Photochemical & Photobiological Sciences**, 3:907-917.

MARES, M. A. 1992. Neotropical mammals and the myths of Amazonian biodiversity. Science, 255: 976.

MCVAUGH, R. 1968. The genera of American Myrtaceae, an interim report. Taxon, 17:354-418.

MEISEL, P.; KOCHER, T. 2005. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 79:159-170

MENEZES-DE-LIMA JR, O.; ROSAS, E. C; HENRIQUES, M. G. M. O; BRANQUINHO, L. F.; RAMOS, M. F. S.; SIANI, A. C. 1997. Avaliação da atividade antiinflamatória de óleos essenciais de espécies de Myrtaceae e Compositae. **III Jornada Paulista de Plantas Medicinais**, CPQBAUNICAMP. Campinas, Brasil.

MIDDA. M.; RENTON-HARPER, P. 1991. Lasers in dentistry. The British Dental Journal, 170:343-346.

MONTANARI, C. A., VANDERLAN, S. B., 2001. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química nova**, 24: 105-111.

MUNIN, E. 2007. Study of germ tube formation by Candida albicansafter photodynamic antimicrobial chemoteraphy (PACT). Journal of Photochemistry and Photobiology B:Biology, 88:16-20.

NCCLS-NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. 1993. Methods for dilution in antimicrobial susceptibility tests. Approved standard M2-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standard, Villanova, PA,

NCCLS-NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. 1998. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Proposed standard M38-P. National Committee for Clinical Laboratory Standard, Wayne, p.28.

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.

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.; ALBESA, I.; ARGUELLO, G. A.; CABRERA, J. L. 2005. Natural anthraquinones probed as type I and type II photosensitzers 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**, 73:1-28.

NYST, H. J.; TAN, I. B.; STEWART, F. A.; ALFONS, J. M.; BALM, M. D. 2009. Is photodynamic therapy a good alternative to surgery and radiotherapy in the treatment of head and neck cancer. **Photodiagnosis and Photodynamic**, 6:3-11.

OJIMA I., 2007. Miniperpectives: natural products in drug discovery. Journal of Medicinal Chemistry, 51:2587-2588.

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 Ehtnopharmacology**, 78: 119-127.

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

ORTH, K.; BECK, G.; GENZE, F.; RÜCK, A. 2000. Methylene blue mediated photodynamic therapy in experimental colorectal tumors in mice. Journal of Photochemistry and Photobiology B – Biology, 57: 186-192.

ORTIZ, M. C. S.; CARRINHO, P. M.; SANTOS, A. A. S.; GONÇALVES, R. C.; PARIZOTTO, N. A. 2001. Laser de baixa intensidades: princípios e generalidades- Parte 1. **Fisioterapia Brasil**, 2: 221-240.

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.

PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; GUIMARÃES, E. F.; BARROSO, G. M. 2002. Sistemática de Angiospermas do Brasil, Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 309p.

PEREIRA, D. F.; DOS SANTOS; M., POZZATI, P.; ALVES, S. H.; DE CAMPOS, M. M. A.; ATHAYDE, M. L. 2007. Antimicrobial ctivity of crude extracts and fractions from *Althernathera brasiliana* (L.) O. Kuntze leaves. **Latin American Journal of Pharmacy**, 26:893-896.

PERUSSI, J. R. 2007. Inativação fotodinâmica de microorganismos. **Química Nova**, 30: 1-7.

PINHEIRO, A. L. B.; FRAME, J. W. 1992. Laser em Odontologia. Seu uso atual e perspectivas futuras. **Revista Gaúcha de Odontologia**, 40:327-332.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. 2002. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Quimica Nova**, 25: 45-61.

PIO CORRÊA, M. 1984. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 4330p.

QIN, C.; CLARK, A. E. 2007. Dft characterization of the optical and redox properties of natural pigments relevant to dyesensitized solar cells. **Chemical Physics Latters**, 438: 26-30.

RANG, H. P. 2003. Framacologia, Traduçao da 5<sup>a</sup> Edicao American. Rio de janeiro: Elsevier, p. 704-742.

REDDY, G. K. 2004. Photobiological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine. Journal of Clinical Lasers Medicine and Surgery, 22:141-150.

RIBEIRO, M. S.; GROTH, E. B. 2005. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana. In: Livro virtual, 23° CIOSP, São Paulo, 26p. Disponível em: http://www.netodonto.com.br/ciosp/index.php. Acesso em: 10 nov.

ROBBERS, J. E.; SEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. 1997. Farmacognosia e farmacobiotecnologia. São Paulo: Editorial Premier, 372p.

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.

ROESLER, R.; LUCIANA, G. M.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE G. M. 2007. Atividade antioxidante de frutas do cerrado, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 27: 53-60.

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, 111:525-532.

SALVADOR, M. J.; FERREIRA, E. O.; PRAL, E. M. F., ALFIERI, S. C.; KOGA-ITO, I. Y.; DIAS, D. A. 2002. Bioactivity of crude extracts and some constituents of *Blutaparon portulacoides* (Amaranthaceae). **Phytomedicine**, 9: 566-571.

SALVADOR, M. J. 2002. Estudo fitoquímico, caracterização dos elementos inorgânicos por espectrometria de raios X e atividades biológicas de *Alternanthera marítima* (Mart.) St. Hil. 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.

SALVADOR, M. J.; ZUCCHI, O. L. A. D.; CANDIDO, R. C.; ITO, I. Y.; DIAS, D. A. 2004. *In vitro* antimicrobial activity of crude extracts and isolated constituents of *Alternanthera maritima* (Amaranthaceae). **Pharmaceutical Biology**, 42: 138-148.

SALVADOR, M. J. 2005. Estudo químico, biológico e biotecnológico de alternanthera marítima e *Alternanthera tenella* (Gomphreneae, Amaranthaceae). 410p. Doutorado (Doutorado em Ciências – Área Química), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

SALVADOR, M. J.; ANDREAZZA, N. L.; LOURENÇO, C. C.; PASCOAL, A. C. R. F.; STEFANELLO, M. E. A. 2011. Antioxidant capacity and phenolic content of four Myrtaceae plants of the south of Brazil. **Natural Product Communications**, 6: 977-982.

SCHENEIDER, N. F. Z.; MOURA, N. F.; COLPO, T.; MARINS, K.; MARANGONI, C.; FLACH, A. 2008. Estudo dos compostos voláteis e atividade antimicrobiana da *Myrciaria tenella* (cambuí), **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 89: 131-133.

SEGUCHI, K.; KAWAUCHI, S.; MORIMOTO, Y.; ARAI, T.; ASANUMA, H.; HAYAKAWA, M.; KIKUSHI, M. 2002. Critical parameters in the cytotoxity of photodynamic therapy using a pulsed laser. **Lasers in Medical Science**, 17:265-271.

SHARWANI, A.; JERJES, W.; SALIH, V.; MACROBERTS, A. J.; EL-MAAYTAH, M.; KHALIL, H. S. M. 2006. Fluorescence spectroscopy combined with 5-aminolevulinic acidinduced protoporfhyrin IX fluorescence in detecting oral premalignancy. **Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 83:27-33. SIMÕES, M. J. S; FALVO, I. F. 2000. Estudo da prescrição de medicamentos para idosos atendidos em serviço público de saúde, em município da região sudeste. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 21:217-227.

SIMÕES, C. M. O; GUERRA, M. P. 2004. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5<sup>a</sup> ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 1102p.

SMITH, A. W. 2005. Biolfims and antibiotic therapy: is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? Advanced Drug Delivery, 57:1539-1550.

SOARES, M. M. S. R.; CURY, A. E. 2001. *In vitro* activity of antifungal and antiseptic agents against dermatophyte isolates from patients with tinea pedis. **Brazilian Journal of Microbiology**, 32:130-134.

SOLBAN, N.; RIZVI, I.; HASAN, T. 2006. Targeted photodynamic therapy. Laser in Surgery and Medicine, 38:522-531.

STEFANELLO, M. E. A.; CERVI, A. C.; ITO, I. Y.; SALVADOR, M.J.; SIMONATTO, E. L.; WISNIEWSKI, A. 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Eugenia chlorophylla* (Myrtaceae). Jorurnal of Essential Oil Research, 20:75-78.

STUPAKOVA, V.; VARINSKA, L.; MIROSSAY, A. 2009. Photodynamic effect of Hypericin in primary cultures of human umbilical endothelial cells and glioma cell lines. **Phytotheraphy Research**, 23: 827-832.

SU, Y.; SUN, J.; RAO, S.; CAI, Y.; YANG, Y. 2011. Photodynamic antimicrobial activity of hypocrellin A, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 103: 29–34.

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.

TADA, D. B. 2007. Desenvolvimento de nanopartículas fotossensibilizadoras. Universidade de São Paulo- Dissertação doutorado em bioquímica.

TAKAMATSU, H., 2003. Vapor absorption by LiBr aqueous solution in vertical smooth tubes. International Journal of Refrigeration, 26:659–666.

TARDIVO, J. P.; GIGLIO, A. D.; OLIVEIRA,C. S. 2005. "New Photodynamic Therapy Protocol to Treat AIDS-Related Kaposi's Sarcoma," Jorurnal Photodiagnosis Photodyamic Therapy, 2:175.

USACHEVA, M. N. 2006. Effect of Ca2+ on the photobacterial efficacy od methylene blue and toluidine blue against gram-negative bacteria and the dye affinity for lipopolysaccharides. Lasers in Surgery and Medicine, 29:165-173.

WAINWRIGHT, M. 1998. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 42:13-28.

WAINWRIGHT, M.; CROSSLEY, K.M. 2004. Photosensitizing agents- circumventing resistance and breaking down biofilms: a review. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 53:119-126.

WAINWRIGHT, M. 2009. **Photosensitisers in biomedicine**, School of pharmacy and chemistry Liverpool John Moos University, UK. Wiley-Blackwell.281p.

WANG, H.; LU, L.; ZHU, S.; LI Y.; CAI, W. 2006. The photoxicity of xanthenederivatires against *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* and *Saccharomyces cerevisiae*. Current Microbiology, 52:1-5.

WILSON, M.; PRATTEN, J. 1994. Lethal photosensitizaztion of *Staphylococcus aureus*. **Microbios**, 78: 163-168.

WONGCHAREE, K.; MEEYOO V.; CHAVADEJ, S. 2007. Dye-sensitized solar cell using natural dyes extracted from rosella and blue pea flowers, **Solar Energy Materials and Solar Cells**, 91: 566–571.

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. Jorurnal Photochemistry and Photobiology B: Biology, 50:1-7.

WOOD, S.; METCALF, D.; DEVINE, D.; ROBINSON C. 2006. Erythrosine is a potencial photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biolfilms. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 57:680-684.

VEIGAS JR., C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E. J. 2006. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química nova**, 29: 326-337.

VILLAS BOAS, G. K.; GADELHA, C. A. G. 2007. Oportunidades na indústria de medicamentos e lógica do desenvolvimento local baseado nos biomas brasileiros: bases para a discussão de uma política nacional. **Caderno de Saúde Pública**. 23:1463-1471.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C. 2001, Fármacos e fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fármacos no Brasil. **Química nova,** 24: 147-152.

ZANIN, I. C. J.; BRUGNERA, J. R.; ZANIN, F.; GONÇALVES, R. B., 2003. Terapia fotodinamica na odontologia (T.F.D.). **Revista gaucha de odontologia**, 51:179:182.

ZANIN, I. C.; GONÇALVES, R. B.; JUNIOR, A. B.; HOPE, C. K.; PRATTEN, J. 2005. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 56:324-330.

ZANIN, I. C.; LOBO, M. M.; RODRIGUES, L. K.; PIMENTA, L. A.; HOFLING, J. F.; GONÇALVES, R. B. 2006. Photosensitization of in vitro biofilms by toluidine blue O combined with a light- emitting diode. **European Journal of Oral Sciences**, 114:64-69.

ZEINA, B. 2001. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. **British** Journal of Dermatology, 44:274-278.

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. **The Journal of Biological Chemistry**, 195: 72-80.

ZÖLLNER, M. S. C, JORGE, A. O. C. 2003. Candida spp. occurrence in oral cavities of breastfeeding infants and their mother's mouths and breasts. **Brazilian Oral Research**, 17:151-155.

## 8. Anexos

# 8.1.Cromatogramas obtidos por CLAE-UV/DAD do extrato bruto das folhas de E. chlorophylla e de suas fases da partição

Condições de análise para as cromatografias líquidas de alta eficiência no estudo quanto ao perfil químico dos extratos vegetais: coluna supelco RP-18, 5 $\mu$ m. detector UV/DAD,  $\lambda$ - 254 nm e 660nm. fase móvel MeOH:água com 0,1% de ácido acético-eluição isocrática (6:4, v/v), com vazão de 1 ml/min.. 20,0  $\mu$ l injetado.



Anexo 1. Perfil cromatográfico em CLAE-UV/DAD do extrato bruto etanólico das folhas (ECB) de *Eugenia chlorophylla*, analisado em dois comprimentos de onda 254nm (A) e 660nm (B)



Anexo2. Perfil cromatográfico em CLAE-UV/DAD da fração diclorometânica (ECD) de *Eugenia chlorophylla*, analisado em dois comprimentos de onda 254nm (A) e 660nm (B)



Anexo3. Fingerprint ESI-MS em modo negativo do extrato bruto etanólico (ECB) de *Eugenia* chlorophylla



Anexo4. Fingerprint ESI-MS em modo negativo da fração diclorometânica (ECD) de *Eugenia* chlorophylla



Anexo5. Espectro de MS-MS, energia de colisão 25 V, da amostra padrão de ácido quínico (Sigma-Aldrich).


Anexo 6. Espectro de MS-MS, energia de colisão 25 V, do pico 191 m/z do extrato bruto etanólico (ECB) de *Eugenia chlorophylla* 



Anexo 7. Espectro de ESI-MS/MS, energia de colisão 25 V, do pico 293 m/z do extrato bruto etanólico (ECB) de *Eugenia chlorophylla* 



Anexo 8. Espectro de ESI-MS/MS, energia de colisão 25 V, do pico 587 m/z do extrato bruto etanólico (ECB) de *Eugenia chlorophylla* 

## **8.2.**Cromatogramas obtidos por CLAE-UV/DAD das subfrações da fração diclorometânicado extrato bruto etanólico das folhas de *E. chlorophylla*

Condições de análise para as cromatografias líquidas de alta eficiência no estudo quanto ao perfil químico dos extratos vegetais: coluna supelco RP-18, 5 $\mu$ m. detector UV/DAD,  $\lambda$ - 254 nm e 660nm. fase móvel MeOH:água com 0,1% de ácido acético-eluição isocrática (6:4, v/v), com vazão de 1 ml/min. 20,0  $\mu$ l injetado.



Anexo 9. Cromatograma CLAE-UV/DAD da subfração ECD 25A do fracionamento da fração diclorometânica analisado em dois comprimentos de onda 254nm (A) e 660nm (B)



Anexo 10. Cromatograma CLAE-UV/DAD da subfração ECD 25B do fracionamento da fração diclorometânica analisado em dois comprimentos de onda 254nm (A) e 660nm (B)



Anexo 11. Cromatograma CLAE-UV/DAD da sub-fração ECD 26c do fracionamento da fração diclorometânica analisado em dois comprimentos de onda 254nm (A) e 660nm (B)



Anexo 12. Cromatograma CLAE-UV/DAD da subfração ECD 26b do fracionamento da fração diclorometânica em dois comprimentos de onda 254nm (A) e 660nm (B)



Anexo 13. Espectro de RMN 1H da Subfração ECD 26b do fracionamento da fração diclorometânica, MeOD, 500 MHz



Anexo 14. Espectro de RMN 1H da Subfração ECD 26c do fracionamento da fração diclorometânica, MeOD, 500 MHz



Anexo 15. Espectro do experimento HMBC da Subfração ECD 26c do fracionamento da fração diclorometânica, MeOD, 500 MHz



Anexo 16. Cromatogramas CG/EM obtidos em 2011 das amostras dos óleos do caule (ENC), folhas (ENF) e flores (MYRT) coletadas em 2005.





Anexo 18. Expansão entre 30 e 35 minutos



Anexo 19. Cromatograma CG-EM do óleo essencial das folhas obtido em 2005, mostrando os picos de compostos mais voláteis (entre 20 e 23 minutos) que não foram detectados em 2011.



Anexo 20. Cromatograma CG-EM dos óleos essenciais obtidos em 2011: caule (ECC) e folhas (ECF)













Anexo 25. Ampliação da região entre 40 e 50 minutos.