



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

CIDA DARA AMORIM CANHOTO

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA, AÇÃO BIOLÓGICA E
POTENCIAL NA TERAPIA FOTODINÂMICA (PDT) DE
PLANTAS PRODUTORAS DE PIGMENTOS**

Recife
2024

CIDA DARA AMORIM CANHOTO

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA, AÇÃO BIOLÓGICA E
POTENCIAL NA TERAPIA FOTODINÂMICA (PDT) DE
PLANTAS PRODUTORAS DE PIGMENTOS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Yara

Coorientador: Bel. Paulo Henrique da
Silva

Recife
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Canhoto, Cida Dara Amorim .

Prospecção fitoquímica, ação biológica e potencial na Terapia Fotodinâmica (PDT) de plantas produtoras de pigmentos. / Cida Dara Amorim Canhoto. - Recife, 2024.

43 p. : il., tab.

Orientador(a): Ricardo Yara

Coorientador(a): Paulo Henrique da Silva

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2024.

Inclui referências.

1. Inovação tecnológica. 2. Resistência microbiana. 3. Bioativos. 4. Fotossensibilizador. 5. Antimicrobiano. I. Yara, Ricardo. (Orientação). II. Silva, Paulo Henrique da. (Coorientação). IV. Título.

600 CDD (22.ed.)

CIDA DARA AMORIM CANHOTO

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA, AÇÃO BIOLÓGICA E POTENCIAL NA
TERAPIA FOTODINÂMICA (PDT) DE PLANTAS PRODUTORAS DE
PIGMENTOS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Biomedicina da Universidade
Federal de Pernambuco, como pré-
requisito à obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr Ricardo Yara
UFPE/ Departamento de Engenharia Biomédica

MSC. Carolina Karen Alves Silva
UFPE/ Departamento de Tecnologias Energéticas e Nucleares

MSC. Abraão Ítalo dos Santos
UPE

Dedico este trabalho a mainha e ao meu
irmão João Antonio Amorim Canhoto
que sempre foram o meu alicerce.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pelo seu zelo, proteção e força. Por me permitir vivenciar cada fase da minha vida da maneira mais bela possível, assim como em Josué 1:9.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Yara, por todo direcionamento e suporte prestado durante a elaboração do trabalho e ao meu coorientador Bel. Paulo Henrique da Silva, por ter sido um anjo enviado por Deus em meu auxílio. Sempre solícito, prestativo, atencioso e disponível para sanar todas minhas dúvidas durante o projeto.

A Universidade Federal de Pernambuco - UFPE por ter sido meu lar durante esses anos de graduação, me fornecendo um ensino de qualidade e as ferramentas necessárias para tal.

Aos professores do CCS/CB - UFPE, que contribuíram para a minha formação acadêmica e profissional. Especialmente à professora Dra. Claudia Sampaio, por ter acreditado no meu potencial e me dado a oportunidade de iniciar na pesquisa científica.

A todos os membros do departamento de Biofísica/CCS-UFPE, do Laboratório de Biofísica Química (LBQ), em especial a Carolina Karen, por todas as trocas de conhecimento, conversas confortantes e por ter sido meu suporte durante toda essa jornada. Aos órgãos de fomento Propesqi e ITCBio, por todo apoio financeiro e científico.

Jamais poderia deixar de agradecer à minha mãe Maria Aparecida Amorim, por todo cuidado e dedicação, por ser minha motivação e apoio diário em meio a tantas dificuldades, e ao meu pai João Antonio Pegacha Canhoto, por todo suporte financeiro e conselhos ao longo da vida. Ao meu irmão João Antonio Amorim Canhoto por sempre estar comigo, nas alegrias e tristezas, por todo cuidado e atenção, por toda escuta, por suportar todo meu estresse e por nunca me abandonar. Aos meus irmãos paternos e a minha sobrinha Sophia, por todos os momentos de alegria compartilhados. Aos meus padrinhos Silvana e Charles, e aos meus afilhados por todo suporte emocional.

Agradeço ao meu namorado Gabriel Filinkoski, por dividir a vida comigo, por me apoiar e me auxiliar em todos os meus sonhos, por todo carinho e amor compartilhado. Aos meus sogros Elena e Roberto por todo suporte prestado e

ao meu amado cunhado Nicholas, por todo carinho e momentos felizes.

Aos meus amigos de graduação Ana Vitoria, Giovanna e Janael, por todo companheirismo, trocas de conhecimentos e por compartilharmos todos os surtos. A minha amiga Lorennny por toda partilha, apoio emocional e espiritual.

Aos preceptores e amigos de estágio no laboratório Zeferino Veloso, Kayssa, Karina, Júlia e José neto por contribuírem para a minha formação profissional e por serem suporte em meio ao caos.

Por fim e não menos importante, agradeço aos meus filhinhos de 4 patas Belinha, Joca, Mel, Mew e Meg (in memoriam) por todo amor puro, todo suporte emocional e por serem minha válvula de escape, sempre vou amar vocês.

“A ciência é uma perpétua busca pela verdade, mas que nunca pode ser encontrada na sua totalidade.” – Karl Popper

CANHOTO, Cida Dara Amorim. **PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA, AÇÃO BIOLÓGICA E POTENCIAL NA TERAPIA FOTODINÂMICA (PDT) DE PLANTAS PRODUTORAS DE PIGMENTOS**. 2024. 43. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

RESUMO

A crescente resistência microbiana aos antibióticos representa um grande desafio à saúde pública, impulsionando a busca por terapias alternativas. Nesse cenário, o uso de plantas medicinais, amplamente empregadas na medicina popular, surge como uma oportunidade de inovação terapêutica. A Terapia fotodinâmica (ou em inglês Photodynamic Therapy - PDT) é uma técnica que promove a apoptose ou necrose de diferentes estruturas, pela combinação ao mesmo tempo de oxigênio molecular, luz e um agente fotossensibilizador (FTS). Por ser inespecífica, pode ser aplicada na inativação de diversos tipos de células ou microrganismos, como células tumorais, vírus e bactérias, além de ser uma alternativa à resistência antimicrobiana. Atualmente, os FTS utilizados na clínica médica ainda apresentam algumas desvantagens como: efeitos colaterais, alto custo, lenta eliminação pelo organismo e baixa seletividade. Como alternativa, o presente trabalho propõe o uso de plantas produtoras de pigmentos, para serem aplicados na Terapia Fotodinâmica. O uso de princípios bioativos vegetais na PDT ainda é pouco explorado quando comparado a diversidade de compostos foto-bioativos existentes na natureza, sendo uma alternativa promissora e acessível. Neste sentido, foi realizada a coleta das partes pigmentadas das espécies de *Macroptilium sp.*, *Thunbergia sp.*, *Ipomea batatas* e *Vaccinium myrtillus*, sendo feitos seus extratos etanólicos em evaporador rotativo com vácuo. Procedeu-se com a prospecção fitoquímica para a identificação de compostos fenólicos, flavonóides, saponinas e taninos, análise dos perfis espectrofotométricos buscando-se a presença do comprimento de onda (λ) de 660 nm. análise cromatográfica por CCD (Cromatografia em Camada Delgada) para avaliar qualitativamente e quantitativamente os compostos de cada extrato. E poder de fotoinativação através da irradiação em ambiente isolado da luz em placas de Elisa com LED de 600, com posterior incubação e semeio, para ser observado o potencial antimicrobiano das amostras. Todas as amostras apresentaram compostos fenólicos, conferindo às espécies um poder antioxidante. Quando comparados os potenciais antimicrobianos das amostras irradiadas, com as não irradiadas, notou-se uma maior inibição do crescimento bacteriano naquelas que ficaram expostas à luz, indicando assim o poder fotoinativador dos extratos.

Palavras-chave: Resistência microbiana. Fotossensibilizador. Bioativos. Antimicrobiano.

CANHOTO, Cida Dara Amorim. **PHYTOCHEMICAL PROSPECTING, BIOLOGICAL ACTION AND POTENTIAL IN PHOTODYNAMIC THERAPY (PDT) OF PIGMENT-PRODUCING PLANTS**. 2024. 43. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

ABSTRACT

The growing microbial resistance to antibiotics represents a major challenge to public health, driving the search for alternative therapies. In this scenario, the use of medicinal plants, widely used in folk medicine, emerges as an opportunity for therapeutic innovation. Photodynamic Therapy (PDT) is a technique that promotes apoptosis or necrosis of different structures, by combining molecular oxygen, light and a photosensitizing agent (STA). Because it is nonspecific, it can be applied to inactivate various types of cells or microorganisms, such as tumor cells, viruses and bacteria, in addition to being an alternative to antimicrobial resistance. Currently, STAs used in clinical medicine still have some disadvantages such as: side effects, high cost, slow elimination by the body and low selectivity. As an alternative, this study proposed the use of pigment-producing plants to be applied in Photodynamic Therapy. The use of plant bioactive principles in PDT is still little explored when compared to the diversity of photo-bioactive compounds existing in nature, being a promising and accessible alternative. In this sense, the collection of pigmented parts of the species of *Macroptilium* sp., *Thunbergia* sp., *Ipomea batata* and *Vaccinium myrtillus* was carried out, and their ethanolic extracts were made in a rotary evaporator with vacuum. Phytochemical prospecting was carried out to identify phenolic compounds, flavonoids, saponins and tannins, analysis of spectrophotometric profiles searching for the presence of the wavelength (λ) of 660 nm. chromatographic analysis by CCD (Thin Layer Chromatography) to qualitatively and quantitatively evaluate the compounds of each extract. And photoinactivation power through irradiation in an environment isolated from light in ELISA plates with LED of 600, with subsequent incubation and seeding, to observe the antimicrobial potential of the samples. All samples presented phenolic compounds, giving the species antioxidant power. When comparing the antimicrobial potential of the irradiated samples with the non-irradiated ones, a greater inhibition of bacterial growth was observed in those that were exposed to light, thus indicating the photoinactivating power of the extracts.

Key words: Microbial resistance. Photosensitizer. Bioactives. Antimicrobial.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Extratos de *Macroptilium sp.*, *Thunbergia sp.*, *Ipomea-batatas* e *Vaccinium sp.* em frascos de penicilina. 29
- Figura 2** – Da esquerda para a direita: corridas cromatográficas reveladas em luz branca (1), em luz UV no comprimento de onda de 365 nm (2) e em luz UV no comprimento de onda de 254 nm (3). Sendo o extrato de *Macroptilium sp.* representado por (A), o de *Thunbergia sp.* representado por (B), o de *Ipomea batatas* representado por (C) e o de *Vaccinium sp.* representado por (D). 32
- Figura 3** – Perfis cromatográficos de *Macroptilium sp.* 33
- Figura 4** – Perfis cromatográficos de *Ipomea batatas*. 33
- Figura 5** – Perfis cromatográficos de *Thunbergia sp.* 34
- Figura 6** – Perfis cromatográficos de *V. myrtillus*. 34
- Figura 7** – Placas de 96 poços (sem irradiar e irradiada) cultivadas, antes da confirmação de crescimento com solução aquosa a 3% de sal 2,3,5 trifenil tetrazólio. 36
- Figura 8** – Placas de 96 poços (sem irradiar e irradiada) incubadas com solução aquosa a 3% de sal 2,3,5 trifenil tetrazólio. 37
- Figura 9** – Bioautografias das placas sem irradiação e irradiada, respectivamente. 39

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação taxonômica do gênero <i>Macroptilium</i> .	19
Quadro 2 – Classificação taxonômica do gênero <i>Thunbergia</i>	19
Quadro 3 – Classificação taxonômica do gênero <i>Ipomea</i>	20
Quadro 4 – Classificação taxonômica do gênero <i>Vaccinium myrtillus</i>	21
Quadro 5 – Interpretação dos resultados da prospecção fitoquímica.	30
Quadro 6 – Relação entre concentração de extrato e crescimento bacteriano.	38

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Concentração eficiente das amostras analisadas.

31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
AlCl ₃	Cloreto de Alumínio
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina Trifosfato
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCDAE	Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência
CH ₃ OH	Metanol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
FTS	Fotossensibilizador
H	Hora
HCl	Ácido Clorhídrico
J	Joule
LBQ	Laboratório de Biofísica Química
LED	Diodo Emissor de Luz
Min	Minutos
mW	Microwatts
NaCl	Cloreto de Sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONG	Organização Não Governamental
PDT	Terapia Fotodinâmica
pH	Potencial Hidrogeniônico
TLC	Thin-Layer Chromatography
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV	Ultravioleta
Vis	Visível
°C	Graus Celsius

1 Introdução	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Resistência Microbiana	15
2.2 Terapia Fotodinâmica (PDT)	15
2.2.1 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana	16
2.3 Fotossensibilizadores	16
2.3.1 Pigmentos Fotoativos Vegetais	17
2.4 Planta Produtoras de Pigmentos	17
2.4.1 <i>Macropitilium</i> sp.	18
2.4.2 <i>Thunbergia</i> sp.	19
2.4.3 <i>Ipomea batatas</i>	20
2.4.4 <i>Vaccinium myrtillus</i>	20
3 OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo Geral	22
3.2 Objetivos Específicos	22
4 METODOLOGIA	23
4.1 Obtenção dos Extratos	23
4.2 Prospeção Fitoquímica	23
4.2.1 Identificação de Saponinas	23
4.2.2 Identificação de Taninos e Fenóis	24
4.2.3 Identificação de Flavonóides (antocianinas, antocianidinas, xantonas, chalconas, auronas, flavonas e flavonóis)	24
4.3 Potencial Antioxidante	24
4.4 Análise dos Perfis Espectrofotométricos	25
4.5 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	25
4.6 Detecção da Atividade Antimicrobiana	26
4.7 Teste de Fotoativação	27
4.8 Bioautografia Aplicada a PDT	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1 Prospeção Fitoquímica	28
5.2 Potencial Antioxidante	30
5.3 Cromatografia em Camada Delgada	31
5.4 Análise do Perfil Espectrofotométrico	31
5.5 Atividade Antimicrobiana	33
5.6 Bioautografia Aplicada a PDT	38
6 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	39

1 Introdução

Embora as bactérias possuam mecanismos naturais de defesa, a exposição constante a antibióticos leva ao desenvolvimento de resistência, muitas vezes por recombinação genética (ANVISA, 2020). Fatores como prescrições inadequadas e automedicação contribuem para este fato (Lima *et al.*, 2017). Com isso, se faz necessário o desenvolvimento de terapias alternativas à resistência microbiana.

O potencial farmacológico de espécies de plantas de uso popular como medicamentos, impulsiona o surgimento de novas aplicações dessas espécies, além da produção de produtos e patentes (Ministério da Saúde, 2012). Técnicas analíticas práticas, rápidas, eficientes e de alta reprodutibilidade como a Terapia Fotodinâmica, permitem esse aprofundamento. O conjunto de metodologias aplicadas à verificação dos metabólitos e de atividades biológicas presentes nas espécies analisadas juntamente com a PDT, contribuem para nortear a utilização da alternativa com maior confiabilidade, interferindo de maneira positiva na proliferação de tratamentos médicos e inovações terapêuticas.

A Terapia Fotodinâmica é uma modalidade terapêutica baseada na fotooxidação de materiais biológicos induzida por um fotossensibilizante (Gilabert *et al.*, 2006). Atualmente a terapia fotodinâmica vem sendo amplamente utilizada na dermatologia para o tratamento de câncer e queratose actínica (Gilabert *et al.*, 2006; Torezan, Niwa, Festa Neto, 2009).

Os fotossensibilizadores são substâncias que, ao serem ativadas pela luz, geram espécies reativas de oxigênio para destruir células-alvo. Eles devem ter características específicas, como seletividade para o tecido alvo e baixa toxicidade na ausência de luz. Pigmentos vegetais têm se mostrado alternativas promissoras para a PDT. Alguns são capazes de gerar oxigênio reativo e podem ser aplicados na terapia antimicrobiana e oncológica. Pigmentos como cumarinas, alcalóides e antocianinas possuem propriedades que os tornam adequados à técnica.

Assim, este trabalho utilizou os extratos de *Macroptilium sp.*, *Thunbergia sp.*, *Ipomea batatas* e *Vaccinium myrtillus*, como agentes fotossensibilizantes para a inativação bacteriana através da Terapia Fotodinâmica. O uso dos ativos vegetais ainda é pouco explorado quando comparado a diversidade de compostos fotobioativos existente na natureza, sendo uma alternativa promissora e acessível (Wainwright *et al.*, 2016).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 RESISTÊNCIA MICROBIANA

As bactérias possuem defesas naturais em sua parede celular, como esporinas e bombas de efluxo. Contudo, com o passar do tempo e devido à exposição constante aos antibióticos, elas desenvolveram resistência a esses medicamentos, principalmente por meio de recombinação genética, que pode ocorrer por transdução, transformação, conjugação ou transposição. A resistência microbiana é a capacidade do microrganismo de resistir ao antimicrobiano utilizado para combatê-lo (ANVISA, 2020).

Fatores como prescrições médicas inadequadas, automedicação pela população e fiscalização ineficiente na venda de antimicrobianos em farmácias e drogarias contribuem para a resistência bacteriana múltipla. Além disso, novos antibióticos são lançados no mercado lentamente, uma vez que as empresas farmacêuticas enfrentam baixo retorno financeiro em relação aos altos custos de pesquisa, extração e comercialização desses medicamentos (Lima *et al.*, 2017). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) o número de bactérias resistentes a múltiplas drogas é crescente, gerando uma necessidade de terapias alternativas para o combate desses mutantes resistentes (OMS, 2022) .

2.2 TERAPIA FOTODINÂMICA (PDT)

A Terapia Fotodinâmica utiliza a combinação de luz, um agente fotossensibilizador e oxigênio para promover a morte celular e é uma técnica que promove a apoptose ou necrose de diferentes estruturas (Rodrigues, 2014). Um composto fotossensível é aplicado ou injetado no paciente e se acumula preferencialmente nas células doentes (por exemplo, em células tumorais ou em áreas infeccionadas). Em seguida, uma fonte de luz (laser ou LED) emite luz de um comprimento de onda específico que corresponde ao pico de absorção do fotossensibilizador. A luz é direcionada para a área afetada, onde o fotossensibilizador foi concentrado.

A ativação do fotossensibilizador leva à formação de oxigênio singleto e outras espécies reativas de oxigênio, que causam dano oxidativo às células doentes, resultando na destruição celular seletiva sem afetar significativamente o tecido saudável. Sua inespecificidade faz com que seja uma técnica aplicável a fotoinativação de diferentes células, já que independente da molécula-alvo intracelular, a técnica será bem-sucedida. Para cada tecido-alvo, serão escolhidos fármacos tópicos ou sistêmicos para que se tenham bons resultados (Ribeiro *et al.*, 2005a; Alfenas *et al.*, 2011). No geral, a PDT tem se evidenciado por apresentar efeitos colaterais mais leves que as terapias tradicionais, como à cirurgia, na área da oncologia, à quimioterapia e à radioterapia (Longo, Lozzi & Azevedo, 2011).

2.2.1 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

A terapia fotodinâmica antimicrobiana é uma aplicação da PDT voltada para o combate de infecções causadas por bactérias, fungos e vírus. Essa técnica é promissora, especialmente no cenário atual de aumento da resistência aos antibióticos e ausência de resistência à PDT. Já se tem registros positivos do uso da técnica como agente antimicrobiano (Rocha *et al.*, 2020b). As áreas de maior aplicabilidade, são as de aplicações tópicas, como a odontologia e a dermatologia (Zanin *et al.*, 2003; Torezan *et al.*, 2009).

Recentemente se têm explorado o uso de nanopartículas e novas combinações de fotossensibilizadores para aumentar a eficiência da PDT antimicrobiana. Há também estudos sobre o uso de luz infravermelha para penetrar mais profundamente nos tecidos, aumentando a aplicabilidade em infecções internas (Wang *et al.*, 2023). A PDT antimicrobiana ainda não é utilizada como terapia alternativa à resistência microbiana, mas sim como uma terapia complementar, auxiliando no tratamento de lesões superficiais e na disponibilidade dos fármacos (Carlos *et al.*, 2015; Teodoro *et al.*, 2020).

2.3 FOTOSSENSIBILIZADORES

Os fotossensibilizadores atuais são classificados em diferentes grupos concordando com a sua estrutura química, os principais grupos são derivados porfirínicos; da clorofila; de fenotiazínio; de xanteno; de fenalenona; de riboflavina e

de curcumina (Cieplik *et al.*, 2018; Alves, 2014). Para que haja eficácia, eles devem ser ativados por luz em um comprimento de onda adequado, geralmente na faixa do visível ou infravermelho entre 600 nm e 700 nm, havendo assim uma maior penetração no tecido.

Para que uma substância possa ser utilizada como FTS na PDT, sem que haja efeitos prejudiciais à saúde do paciente, é necessário que apresente algumas propriedades físico-químicas, fotofísicas, farmacológicas e fisioterapêuticas específicas. Em relação às características farmacológicas, é necessário que haja um direcionamento seletivo e eficiente para o tecido alvo, além de baixo tempo de depuração. O FTS precisa ter toxicidade mínima na ausência de luz, além de ausência de potencial mutagênico/carcinogênico (Simplicio, Maionchi & Hioka, 2002).

Essas características tornam os fotossensibilizadores ferramentas versáteis, podendo ser adaptados para diferentes tipos de PDT, desde tratamentos oncológicos até aplicações antimicrobianas. A pesquisa contínua busca desenvolver novos fotossensibilizadores com maior seletividade e eficácia (Wang *et al.*, 2023; The University of Hong Kong, 2023).

2.3.1 Pigmentos Fotoativos Vegetais

Os pigmentos são metabólitos secundários, que representam uma alternativa inovadora e ecológica para a PDT. Alguns pigmentos vegetais são capazes de produzir oxigênio reativo, podendo assim ser úteis na PDT, especialmente em terapia antimicrobiana e na oncologia. Os principais metabólitos são: derivados cumarínicos, alcalóides, poliacetilenos, xantonas, porfirinas, antraquinonas e outros (Muniyandi *et al.*, 2020; Siewert & Stuppner, 2019; Oliveira, 2019). As espécies vegetais foram selecionadas por produzirem pigmentos com absorção na região do vermelho, pois têm uma maior chance de terem picos na janela terapêutica da PDT, entre 600 nm e 700 nm (De Oliveira *et al.*, 2015).

2.4 PLANTA PRODUTORAS DE PIGMENTOS

As plantas têm grande importância industrial devido à produção de pigmentos com variadas aplicações. Esses pigmentos podem ser utilizados na indústria como aditivos alimentares, atuando com funções bactericidas, corantes e conservantes

(Martins *et al.*, 2022). Embora os pigmentos naturais sejam menos estáveis em comparação com os sintéticos, eles ganham espaço no mercado a cada ano. Fatores como temperatura, oxigênio e luz prejudicam a qualidade e a aparência dos produtos. Porém, agentes oxidantes e quelantes podem ser usados como estabilizadores para esses compostos naturais (Schiozer *et al.*, 2013).

Dentre os principais corantes utilizados no Brasil, estão as antocianinas, que são corantes polifenólicos, solúveis em água e pertencentes ao grupo dos flavonóides. Esse metabólito secundário tem uma variação de coloração que vai do vermelho ao púrpura e além da cor, traz propriedades antioxidantes (Martins *et al.*, 2022).

2.4.1 *Macroptilium sp.*

Macroptilium sp. pertence à família Fabaceae, que compreende cerca de dezessete espécies, e é exclusivo do continente americano (Silva, *et al.*, 2018). Concentrando-se na região tropical, é comumente encontrada na caatinga, muito utilizada na alimentação de bois e cabras, pois tem um bom desenvolvimento mesmo em épocas de seca (Araujo *et al.*, 2014). Suas sementes ficam dormentes, o que favorece a dispersão e reprodução (Vasconcelos *et al.*, 2011). Ela melhora a qualidade do solo, contribui para a produção animal por meio de pastagens e é útil em práticas de conservação ambiental.

Quadro 1: Classificação taxonômica do gênero *Macroptilium*.

Classificação	Identificação
Reino	Plantae
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Fabales
Família	Fabaceae
Gênero	<i>Macroptilium</i>
Principais Espécies	<i>M. atropurpureum</i> , <i>M. lathyroides</i> , <i>M. gibbosifolium</i> , <i>M. longepedunculatum</i> , <i>M. fraternum</i> , <i>M. gracile</i> , <i>M. martii</i> .

Fonte: Autora (2024)

2.4.2 *Thunbergia* sp.

O gênero *Thunbergia* sp. pertence à família Acanthaceae e é composto por diversas espécies de plantas trepadeiras, herbáceas ou arbustivas. São conhecidas por suas flores ornamentais e seu crescimento rápido, sendo cultivadas em jardins e paisagismo de regiões tropicais e subtropicais. São plantas que preferem sol intenso e solo drenado, podendo crescer em ambientes parcialmente sombreados. Elas também possuem atividade antibacteriana, antiinflamatória, antifúngica, antioxidante, entre outras (Sultana *et al.*, 2015).

Quadro 2: Classificação taxonômica do gênero *Thunbergia*.

Classificação	Identificação
Reino	Plantae
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Lamiales
Família	Acanthaceae
Gênero	<i>Thunbergia</i>
Principais Espécies	<i>T. alata</i> , <i>T. grandiflora</i> , <i>T. fragrans</i> , <i>T. mysorensis</i> , <i>T. battiscombei</i> , <i>T. coccinea</i> , <i>T. erecta</i> , <i>T. laurifolia</i>

Fonte: Autora (2024)

2.4.3 *Ipomea batatas*

A batata-doce (*Ipomea batatas*) é uma raiz tuberosa adaptada ao clima temperado, amplamente cultivada no Brasil. Caracteriza-se por ser uma planta rústica, com grande capacidade de adaptação a diferentes tipos de solo, alta resistência à seca e cultivo fácil. Além disso, apresenta alta produtividade, exigindo baixo investimento para seu cultivo (Oliveira *et al.*, 2002).

A batata doce de polpa roxa é caracterizada pela coloração púrpura intensa tanto na casca quanto na polpa. Ela pertence à família Convolvulaceae, e é cultivada por seu valor nutricional, suas propriedades antioxidantes e seu uso culinário diversificado. Seus tubérculos são ricos em fibras, melhorando o trânsito intestinal e tem baixo índice glicêmico, mantendo os níveis de liberação de insulina mais estáveis (Soares Vital *et al.*, 2023). Suas folhas apresentam grandes quantidades de substâncias antioxidantes, antocianinas e polifenóis (Cesare *et al.*, 2012).

Quadro 3: Classificação taxonômica do gênero *Ipomea*.

Classificação	Identificação
Reino	Plantae
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Solanales
Família	Convolvulaceae
Gênero	<i>Ipomea</i>
Espécie	<i>Ipomea-batatas</i>
Principais Variedades	Batata-doce de polpa roxa, Batata-doce de polpa branca, Batata-doce de polpa amarela, Batata-doce de casca vermelha e polpa branca.

Fonte: Autora (2024)

2.4.4 *Vaccinium myrtillus*

Vaccinium myrtillus, é uma planta da família Ericaceae, rica em antocianinas, o que confere a ela a cor azul e um alto poder antioxidante. Acredita-se que esse metabólito secundário é o principal componente da espécie responsável por promover

tantos benefícios à saúde. Já existem comprovações de que o mirtilo tem propriedades que reduzem o colesterol, ação antiinflamatória, diminui o estresse oxidativo, entre outras doenças relacionadas à idade. (Chu *et al.*, 2011). Quando utilizado na indústria alimentícia, o extrato de *Vaccinium myrtillus* tem um poder de coloração mais baixo que o de corantes artificiais, porém suas propriedades bioativas promovem uma maior longevidade e conservação dos alimentos (Pires *et al.*, 2020).

Quadro 4: Classificação taxonômica do *Vaccinium myrtillus*.

Classificação	Identificação
Reino	Plantae
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Ericales
Família	Ericaceae
Gênero	<i>Vaccinium</i>
Espécie	<i>Vaccinium myrtillus</i>
Principais Variedades	Bluecrop, Patriot, Legacy.

Fonte: Autora (2024)

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a prospecção e o doseamento de bioativos de *Macroptilium sp.*, *Thunbergia sp.*, *Ipomea batatas* e *Vaccinium myrtillus*, utilizando métodos analíticos cromatográficos e espectroscópicos para avaliar o seu efeito sobre o *Bacillus cereus*, através da Terapia Fotodinâmica (PDT).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a prospecção fitoquímica das espécies selecionadas;
- Avaliar os perfis espectrofotométricos de cada extrato;
- Verificar a presença de metabólitos secundários a partir de CCD (Cromatografia em Camada Delgada);
- Avaliar a atividade antimicrobiana;
- Verificar a atividade fotodinâmica através de Teste de Fotoativação.

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção dos Extratos

Para a obtenção dos extratos as partes das plantas selecionadas e limpas foram testadas para averiguação de qual solvente iria extrair com maior eficiência os corantes presentes nas espécies. Foi testada a extração com água destilada, etanol e acetona. Para as folhas de *Ipomea batatas* e frutos de *Vaccinium myrtillus* o solvente que melhor extraiu os pigmentos foi a acetona, já para as flores de *Macroptilium sp.* e flores de *Thunbergia sp.*, o melhor solvente foi o etanol. As partes vegetais foram maceradas com o auxílio de almofariz com pistilo e embebidas em seus respectivos solventes seguindo a proporção de 50g de material vegetal para 100ml de solvente. Para as folhas de *Ipomea batatas* e frutos de *Vaccinium myrtillus* foram feitas extrações de 48h até esgotamento, após, as amostras foram filtradas em papel filtro (Adaptado de Rodriguez-Saona *et al.*, 2001). Já para as flores de *Macroptilium sp.* e flores de *Thunbergia sp.*, foram feitas extrações de 24h até esgotamento, após, as amostras foram filtradas em papel filtro (Adaptado de Nunes *et al.*, 2021). Todas as amostras filtradas foram submetidas à destilação em evaporador rotativo a 45°C e posteriormente acomodadas em dessecador de vidro até alcançar peso constante.

4.2 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

A prospecção fitoquímica é um procedimento importante para identificação de metabólitos secundários em amostras de espécies vegetais de interesse farmacológico. A aplicação de métodos qualitativos é pertinente para possibilitar um rastreio rápido e de baixo custo, principalmente quando não se tem conhecimento do perfil fitoquímico da espécie vegetal estudada (Matos, 1997).

4.2.1 Identificação de Saponinas

Para a identificação de saponinas, dilui-se 10 mg do extrato em 10 ml de água destilada e agitou-se vigorosamente por 5 minutos. A presença de espuma persistente na solução, indica a presença da substância no extrato.

4.2.2 Identificação de Taninos e Fenóis

A identificação da presença de taninos e fenóis é qualitativa por meio de variações de cores no extrato. Foi utilizada uma solução etanólica do extrato com concentração de 2 mg/ml, adicionando-se 3 gotas de cloreto férrico (FeCl_3) a 3% (m/v), agitando-se por 10 segundos. Coloração de tonalidade azul a vermelho indica a presença de fenóis, precipitado com coloração azul indica a presença de taninos hidrolisáveis e precipitado de coloração verde indica a presença de taninos condensados (Kodangala *et al.*, 2010).

4.2.3 Identificação de Flavonóides (antocianinas, antocianidinas, xantonas, chalconas, auronas, flavonas e flavonóis)

Para a identificação de flavonóides (antocianinas, antocianidinas, xantonas, chalconas, auronas, flavonas e flavonóis) também verifica-se variações de cores na amostra, esse fenômeno ocorre por meio da mudança de pH da amostra.

Foi utilizada uma solução etanólica do extrato com concentração de 2 mg/ml em dois tubos de ensaio, o primeiro foi submetido a acidificação com ácido clorídrico (HCl) a 10% e o segundo a alcalinização com por hidróxido de sódio (NaOH) a 20% (m/v). A presença de antocianinas e antocianidinas é indicada pela coloração vermelha em meio ácido e pela variação de lilás a azul-púrpura em meio alcalino. A presença de flavonas, flavonóis e xantonas se dá pela mudança de cor apenas em meio alcalino, resultando numa coloração amarela. Chalconas e auronas são identificadas pela coloração vermelha em meio ácido e pela coloração vermelho púrpura em meio alcalino. A presença de flavonóides é indicada pela coloração vermelho-laranja em meio alcalino.

4.3 POTENCIAL ANTIOXIDANTE

Para medir o potencial antioxidante das amostras, foi utilizado o teste de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil). Por ação antioxidante, o DPPH (cor púrpura) é reduzido a forma de difenil-picril-hidrazina (coloração amarela). Tal mudança é observada pela diminuição da absorbância das amostras.

Foram preparadas soluções etanólicas contendo 200, 100, 50, 25, 10 e 5 µg/ml

dos extratos, além de um controle positivo de álcool e DPPH na proporção 1:1. Em cada amostra de solução etanólica do extrato foi adicionada igual proporção em volume de uma solução de DPPH 300 µM, com exceção do branco, em que foi adicionado etanol. Após adicionar o DPPH, as amostras ficaram em repouso por 40 minutos e em seguida foram feitas as leituras da absorbância no espectrofotômetro com o comprimento de onda de 515nm.

A capacidade de eliminação do DPPH (% de antioxidante) foi calculada pela equação: $eliminação [DPPH] (\%) = \frac{(Abs\ do\ controle\ positivo - Abs\ da\ amostra)}{Abs\ controle\ positivo} \times 100$. A curva de calibração foi obtida a partir de uma solução de DPPH 300 µM em uma concentração de 120 µg/ml. Assim como as soluções dos extratos, também foram feitas diluições nas mesmas concentrações. A leitura da absorbância foi realizada e utilizou-se etanol como branco. A curva padrão de DPPH foi construída utilizando o valor médio das absorbâncias encontradas, multiplicado pela concentração da solução (Nascimento *et al.*, 2011).

4.4 ANÁLISE DOS PERFIS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

As amostras de extrato diluídas em seus respectivos solventes utilizados na extração foram dispostas em cubetas de quartzo, os perfis espectrofotométricos foram obtidos a partir do UV-Vis espectrofotômetro Shimadzu UV-Vis 1800, no intervalo do comprimento de onda (λ) de 200 nm a 800 nm, no intuito de observar a presença de picos na região da chamada janela de irradiação da terapia fotodinâmica. Foram considerados os picos de absorção com valores inferiores a 1 de absorbância, respeitando a lei de Lambert-Beer.

4.5 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

A cromatografia em camada delgada (CCD) é um método baseado na afinidade que permite a separação de compostos em uma mistura. Este método é bastante versátil e é amplamente utilizado tanto para análise qualitativa quanto quantitativa de amostras. A TLC é aplicável para a análise de praticamente qualquer classe de substância. A fase estacionária utilizada foi uma placa 60F254 (15cm × 10cm) Merck (Darmstadt, Alemanha) composta por sílica gel pré-ativada com suporte de alumínio.

As amostras foram aplicadas na placa em bandas, eluídas com tolueno:acetato de etila (7:3) de acordo com suas características polares e reveladas de acordo com a classe de metabólitos secundários a serem pesquisados.

4.6 DETECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O teste de atividade antimicrobiana foi realizado segundo a metodologia de (Santos Filho, 2019).

- a) Renovação da cultura bacteriana do *Bacillus cereus*, previamente isolada, purificada e suscetível à amoxicilina. Realizando um semeio no meio ágar Mueller Hinton em Placa de Petri na forma de zig-zag horizontalmente e verticalmente e incubada por 24h, com o intuito de obter colônias com o microrganismo ativo.
- b) A partir de uma solução de 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) em água destilada, foram diluídos os extratos etanólicos com uma concentração de 100 mg/ml, filtrando-se em filtro de nylon com porosidade de 0,22 µm em microtubos estéreis.
- c) Em solução salina de 0,85% de NaCl, foram diluídas colônias isoladas do *Bacillus cereus* até atingir o padrão de turvação 0,5 na escala de McFarland, tendo sua consequente constatação no espectrofotômetro no comprimento de onda de 660 nm, resultando em uma absorbância entre 0,08 e 0,13.
- d) Foi preparado um caldo Mueller Hinton estéril e nele diluída a solução salina com bactérias na seguinte proporção: 10,96 µl de caldo e 36,67 µl de solução salina, resultando em um meio com concentração final de 5×10^5 UFC/ml.

Para a realização do experimento, foi utilizada placa de ELISA fundo chato com 96 poços. Procedeu-se da seguinte maneira: foram pipetados 180 µl do caldo com bactérias em todos os poços da linha A e no poço H9, nos poços da linha B à linha G e nos poços H10, H11 e H12 foram pipetados 100 µl do mesmo caldo. Nos poços da linha A foram pipetados 20 µl das soluções com os extratos, sendo A1, A2 e A3 extrato de *Macroptilium sp.*, A4, A5 e A6 extrato de *Thunbergia sp.*, A7, A8 e A9 extrato de *Ipomea batatas* e A10, A11 e A12 extrato de *Vaccinium myrtillus*, e no poço H9 foi pipetada apenas a solução diluente, para ser realizado o controle de toxicidade do diluente.

A partir daí, foram feitas as diluições seriadas dos poços da linha A até a linha

G, sendo desse, descartados 100 µl e dos poços H9 ao H12, sendo desse, descartados 100 µl para que a cada diluição a concentração do extrato/diluyente caísse pela metade. Do poço H1 ao H4 foram pipetados 100 µl de caldo estéril sem bactérias, para o controle de esterilidade e do poço H5 ao H8 foram pipetados 100 µl do caldo com bactérias para o controle de crescimento. A placa foi fechada e incubada em estufa biológica (Bacteriolog - Q316M) por 24 horas a 37°C.

Para constatar a integridade do experimento, a princípio foram observados os controles de esterilidade, crescimento e toxicidade, em seguida foram observados os poços onde foram testados os extratos para identificação da concentração inibitória mínima. Para confirmação do crescimento bacteriano foram utilizados 20 µl de solução aquosa a 3% de sal 2,3,5-trifenil-tetrazólio em cada um dos 96 poços, a placa foi novamente incubada por 1h, os poços com turvação vermelha indicaram onde houve crescimento bacteriano. Para a confirmação da inibição ou ação bactericida dos extratos, foi realizada um cultivo em meio Agar Mueller Hinton em Placa de Petri, com incubação a 37°C por 24 h, de uma alíquota de 10 µl de cada concentração em que não houve crescimento bacteriano na placa de ELISA.

4.7 TESTE DE FOTOINATIVAÇÃO

O teste para a fotoinativação foi realizado a partir da duplicata do teste antimicrobiano, sendo que para a fotoinativação, antes da primeira incubação a placa de Elisa foi irradiada por 20 minutos com fonte de luz LED 660nm (LEDbox, BioLambda), numa irradiância fixa de 25,07 mW/cm² e exposição radiante de 30,08J/cm². Após incubação de 24 horas a 37°C, as amostras passaram pelos testes seguintes de atividade antimicrobiana.

4.8 BIOAUTOGRAFIA APLICADA A PDT

A bioautografia é uma técnica que utiliza a cromatografia de placa para separar as substâncias e, sucessivamente, avaliar seu potencial biológico (Wang, 2021). Aqui ela foi adaptada para avaliar a capacidade de inativação fotodinâmica de cada substância presente nos extratos. Foram feitas duas corridas idênticas em camada delgada, com as amostras a serem analisadas. As amostras foram diluídas e aplicadas na placa, com o auxílio de tubo capilar, em bandas. A fase móvel utilizada

foi tolueno:acetato de etila (7:3) de acordo com suas características polares. Após a confecção, as placas ficaram em dessecador de vidro por 24h, para que houvesse evaporação total do diluente. Uma Cepa de *Bacillus cereus* foi incubada em meio caldo Mueller Hinton em estufa a 37 °C por 24h para obter uma cultura microbiana na fase de crescimento estacionária. Após esse cultivo, foi preparado meio ágar Mueller Hinton e misturado ao caldo com bacilos até obter a padronização de acordo com a absorbância de 0,08-0,13 a 600 nm, o que corresponde a 5×10^5 UFC/ml (0,5 na escala de McFarland).

As placas foram colocadas nas tampas de microplaca de microtitulação de 96 poços estéreis, com o verso metálico voltado para a placa e, em seguida, o meio foi vertido sobre as cromatoplas. Após o endurecimento do meio uma das placas foi incubada em estufa isolada da luz por 24h e a outra antes de ser incubada, foi irradiada por 20 minutos com fonte de luz LED 660nm (LEDbox, BioLambda), numa irradiância fixa de 25,07 mW/cm² e exposição radiante de 30,08 J/cm². É observada a formação de halo de inibição nas bandas em que houver a fotoinativação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

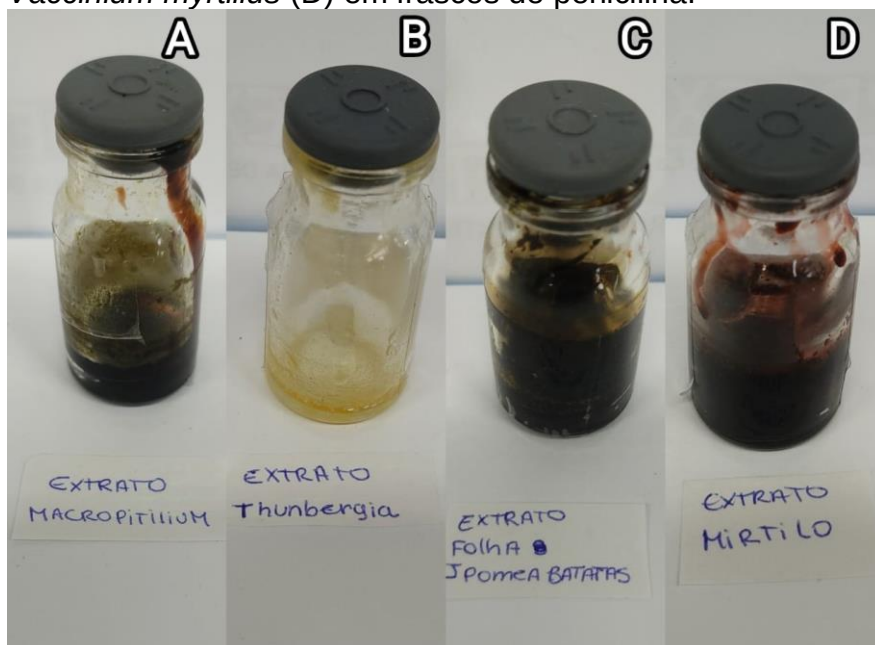
5.1 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

Foram escolhidas 4 (quatro) espécies vegetais com características botânicas distintas, onde foram extraídos os pigmentos das folhas, flores e frutos, resultando em 4 (quatro) amostras (Figura 1). As espécies estudadas levaram em consideração critérios como disponibilidade e acessibilidade. Ao longo de todo o desenvolvimento do estudo, houve o cuidado com a integridade do material, dessa forma, a extração foi melhor sucedida com as partes das plantas frescas. Além disso, os extratos foram sempre armazenados em um dessecador de vidro e isolados da luz.

Os extratos apresentaram um pH levemente ácido, em torno de 5. O que pode ser benéfico para uma possível aplicação fotodinâmica, uma vez que, estudos já observaram que o baixo pH do ambiente aumenta a protonação dos fotossensibilizadores, diminuindo a hidrofiliabilidade, facilitando a passagem através da membrana celular, potencializando o efeito terapêutico (Silva, 2007). Após a obtenção dos extratos, foi realizada a prospecção fitoquímica para a identificação dos metabólitos secundários (Quadro 2). É sabido que as espécies de plantas escolhidas

possuem antocianinas, porém os testes não evidenciaram a presença da substância. Isso pode ter ocorrido devido à sua sensibilidade ao calor, que influencia as concentrações de antocianinas nos extratos. O aumento da temperatura pode favorecer a concentração simultânea de ácidos fenólicos e taninos, além de promover a formação de complexos entre os pigmentos e proteínas, o que compromete a estabilidade dos extratos.

Figura 1: Extratos de *Macroptilium* sp. (A), *Thunbergia* sp. (B), *Ipomea batatas* (C) e *Vaccinium myrtillus* (D) em frascos de penicilina.



Fonte: Autora (2024)

Quadro 5: Interpretação dos resultados da prospecção fitoquímica.

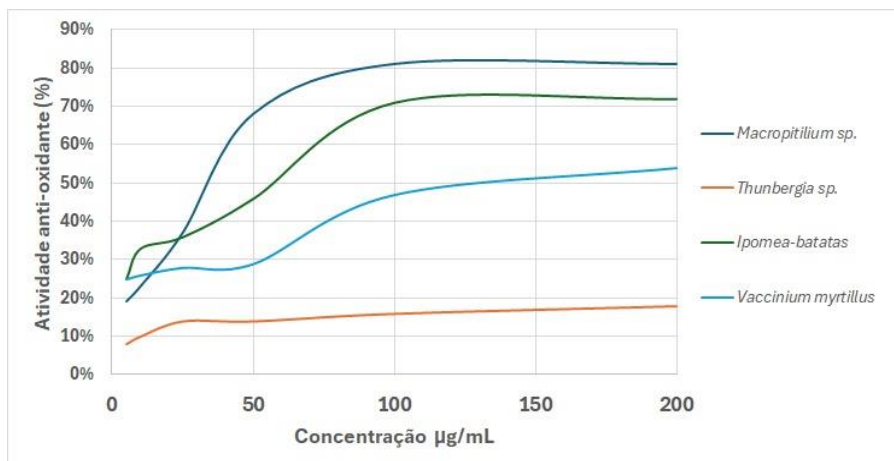
Prospecção Fitoquímica							
Espécie	Teste para identificação de Saponinas	Teste para identificação de Taninos	Teste para identificação de Fenóis	Teste para Flavonóides			
				Antocianinas e Antocianidinas	Flavonas e Xantonas	Chalconas e Auronas	Flavonóis
<i>Macroptilium sp.</i>	+	-	-	-	+	-	-
<i>Thunbergia sp.</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>Ipomea batatas</i>	-	+	+	-	+	-	+
<i>Vaccinium sp.</i>	+	-	+	-	-	-	+

Fonte: Autora (2024)

5.2 POTENCIAL ANTIOXIDANTE

O potencial antioxidante dos extratos fica ainda mais evidente quando vemos os resultados do Teste de DPPH no gráfico 1, onde está evidenciado a concentração eficiente (CE50), que representa a concentração da amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais de DPPH. O extrato de *Macroptilium sp.* é o que tem um maior poder antioxidante, seguido do extrato de *Ipomea batatas*, extrato de *Vaccinium myrtillus* e extrato de *Thunbergia sp.*, respectivamente.

Gráfico 1: Concentração eficiente das amostras analisadas.

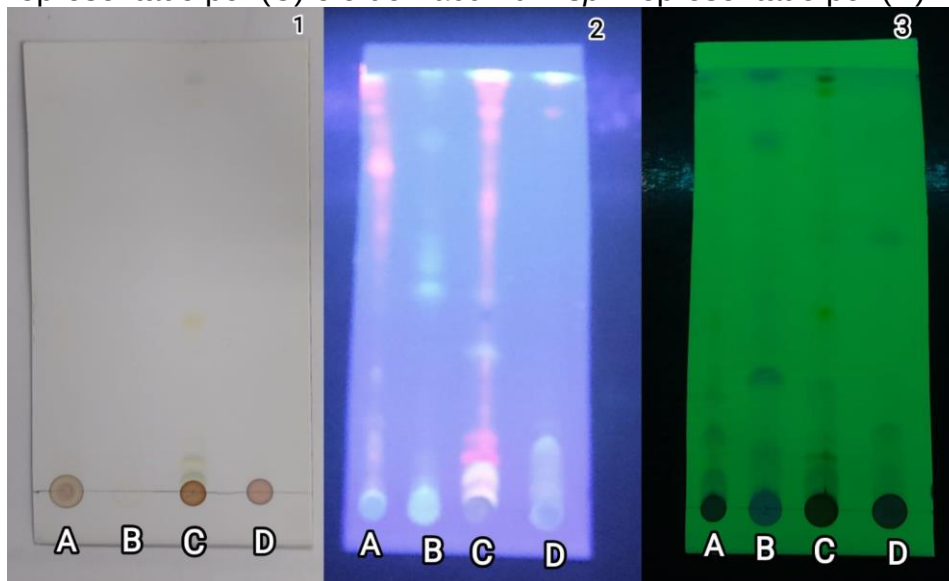


Fonte: Autora (2024)

5.3 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

A cromatografia em camada delgada também mostrou a presença de metabólitos secundários das amostras (Figura 2). Apesar das amostras terem corrido com a mesma fase móvel, o que não é o ideal, já que cada extrato possui polaridade diferente e seus compostos não ficaram totalmente separados, ainda assim foi possível notar que em luz visível, as amostras apresentam vermelho, azul-violeta e amarelo, cores que sugerem a presença de antocianinas. As bandas que apresentam fluorescência vermelha quando expostas a radiação ultravioleta sugerem a presença de clorofilas. Enquanto que fluorescência amarela, laranja e azul sugerem a presença de cumarinas e fenilpropanóides (Matos,1997).

Figura 2: Da esquerda para a direita: corridas cromatográficas reveladas em luz branca (1), em luz UV no comprimento de onda de 365 nm (2) e em luz UV no comprimento de onda de 254 nm (3). Sendo o extrato de *Macroptilium sp.* representado por (A), o de *Thunbergia sp.* representado por (B), o de *Ipomea batatas* representado por (C) e o de *Vaccinium sp.* representado por (D).

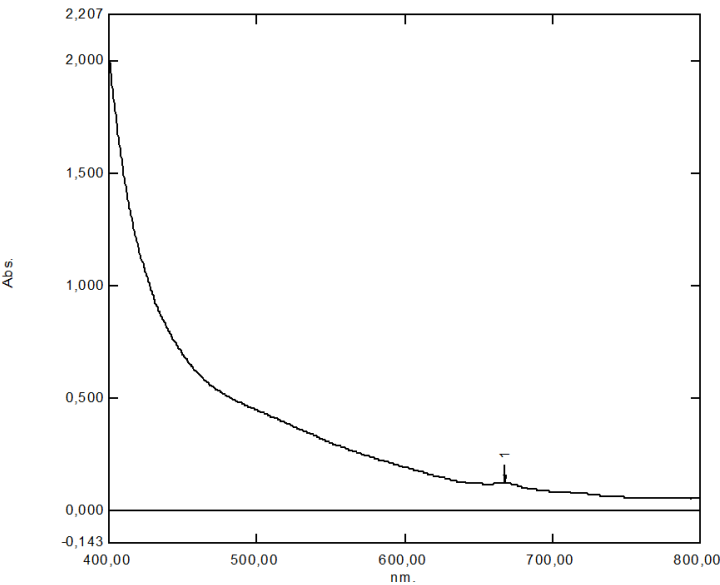


Fonte: Autora (2024)

5.4 ANÁLISE DO PERFIL ESPECTROFOTOMÉTRICO

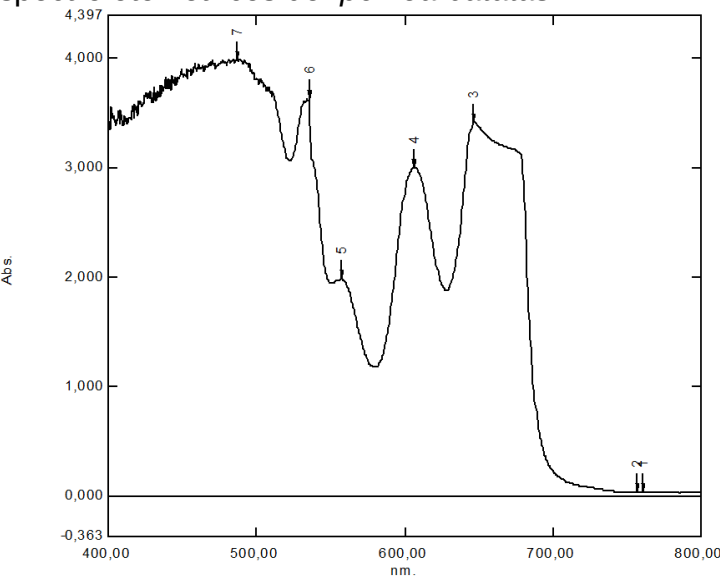
A análise dos perfis espectrofotométricos mostrou que as amostras de *Macroptilium sp.* e de *Ipomea batatas* apresentaram picos na janela terapêutica da Terapia Fotodinâmica entre 600 nm e 700 nm (Figuras 3 e 4), essa região tem uma maior penetração nos tecidos, o que permite uma maior permeabilidade dos agentes fotossensibilizantes, aumento na síntese de ATP, alterações nos ácidos nucleicos e a possibilidade de tratamento de lesões mais profundas (Paolillo *et al.*, 2014; De Oliveira *et al.*, 2015). O perfil espectrofotométrico da *Thunbergia sp.* e *V. myrtillus* não mostraram picos significativos na janela terapêutica (Figuras 5 e 6).

Figura 3: Perfis espectrofotométricos de *Macroptilium sp.*



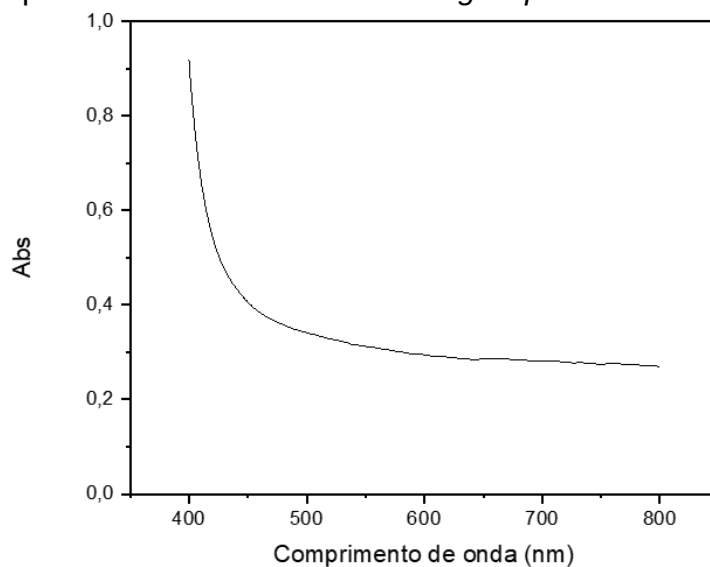
Fonte: Autora (2024)

Figura 4: Perfis espectrofotométricos de *Ipomea batatas*



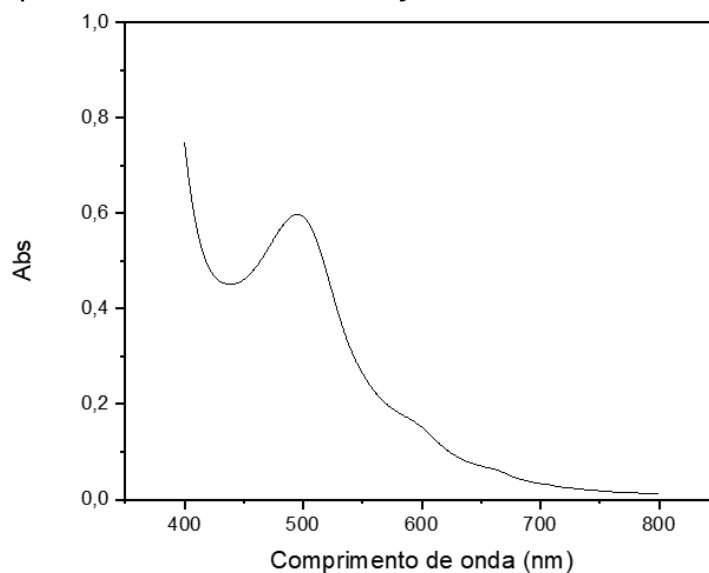
Fonte: Autora (2024)

Figura 5: Perfis espectrofotométricos de *Thunbergia sp.*



Fonte: Autora (2024)

Figura 6: Perfis espectrofotométricos de *V. myrtillus*



Fonte: Autora (2024)

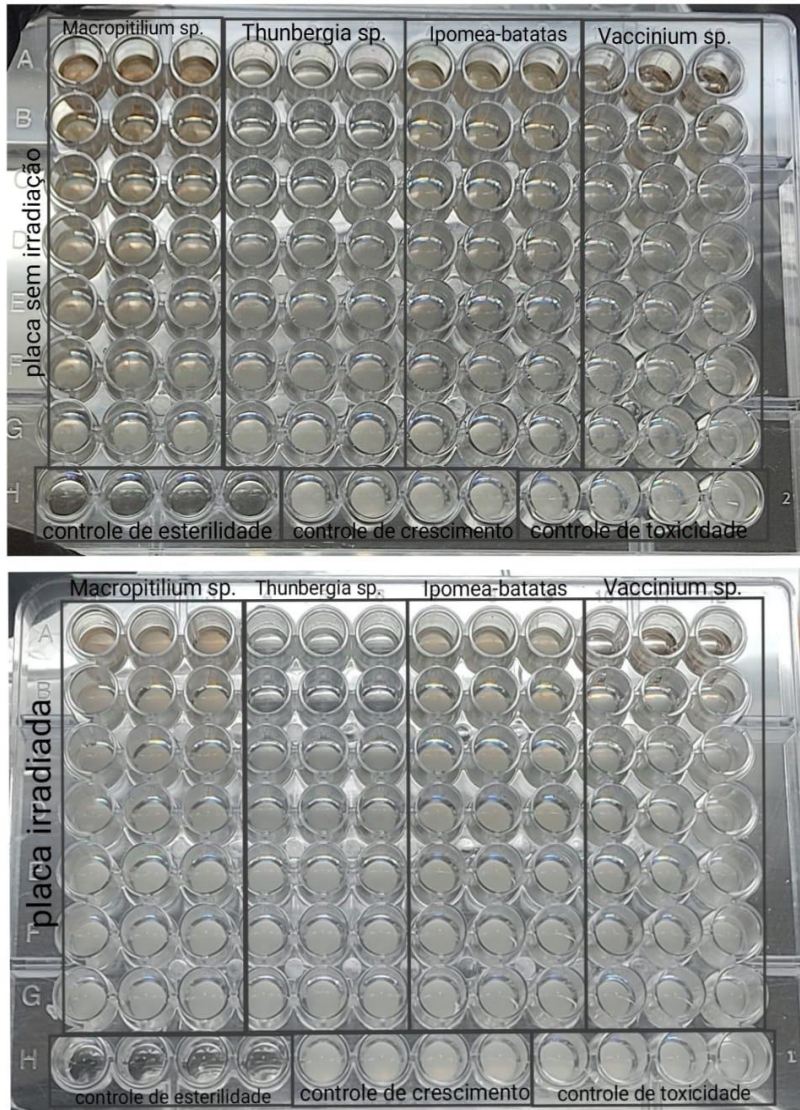
5.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Na detecção da atividade antimicrobiana em placa de 96 poços sem irradiação foram identificados que, nas concentrações utilizadas no teste, o extrato de *Macroptilium sp.* possui poder antimicrobiano já que houve inibição do crescimento do *Bacillus cereus* na concentração de 10 mg/ml e 5 mg/ml da solução do extrato, o de

Thunbergia sp. também possui poder antimicrobiano, pois inibiu o crescimento bacteriano na concentração de 10 mg/ml e 5 mg/ml da solução do extrato, o de *Ipomea-batatas* é o que possui um menor poder antimicrobiano dentre as espécies testadas, pois inibiu o crescimento bacteriano na concentração de 10mg/ml, e o de *V. myrtillus* é o que tem o maior poder antimicrobiano de todos os extratos analisados, já que teve uma inibição nas concentrações de 10 mg/ml, 5 mg/ml e 2,5 mg/ml.

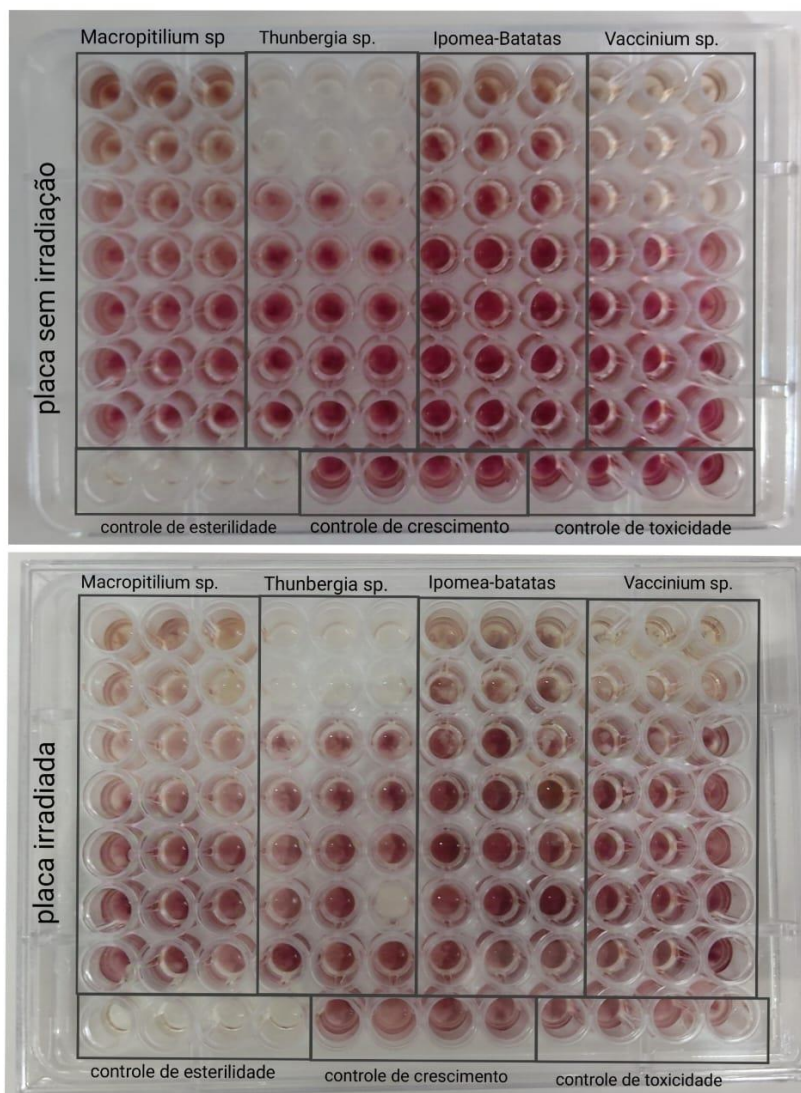
Nota-se que onde houve inibição do crescimento do *Bacillus cereus*, não há turvação do meio (Figura 7) e os poços com coloração rosa após a adição do sal 2,3,5 trifenil tetrazólio, indicam o crescimento bacteriano (Figura 8). O teste de fotoinativação foi realizado com a duplicata do teste de inativação microbiana, onde antes de ser incubada a placa fechada com tampa foi irradiada com a luz de LED por 20 minutos. Foi observado o aumento do poder de inibição do crescimento bacteriano através dos extratos de *Macroptilium sp.* e de *Ipomea batatas* irradiados. Já os extratos de *Thunbergia sp.* e de *V. myrtillus*, mantiveram os mesmos níveis de inibição do *Bacillus cereus* (Figuras 7 e 8).

Figura 7: Placas de 96 poços (sem irradiar e irradiada) cultivadas, antes da confirmação de crescimento com solução aquosa a 3% de sal 2,3,5 trifenil tetrazólio.



Fonte: Autora (2024)

Figura 8: Placas de 96 poços (sem irradiar e irradiada) incubadas com solução aquosa a 3% de sal 2,3,5 trifenil tetrazólio.



Fonte: Autora (2024)

Para ambos os testes foi realizado o cultivo em Placa de Petri com meio ágar Mueller Hinton, para identificar se os extratos inibiram o crescimento bacteriano ou foram bactericidas. Os cultivos da placa não irradiada mostraram os seguintes resultados: Para o extrato de *Macropitilium sp.* não houve crescimento bacteriano na concentração de 10 mg/ml, mostrando que ele tem poder bactericida, mesmo não ficando tão evidente no teste antimicrobiano da placa de 96 poços. No cultivo com *Thunbergia sp.* não houve crescimento nas concentrações de 10 mg/ml e 5 mg/ml, confirmando seu alto poder bactericida dentre as amostras testadas. No cultivo com *Ipomea-batatas* houve crescimentos em todas as concentrações cultivadas, confirmando que o extrato da planta não possui poder bactericida, apenas de inibição.

No cultivo com *V. myrtillus*, assim como no cultivo com *Thunbergia sp.*, não houve crescimento nas concentrações de 10 mg/ml e 5 mg/ml, conferindo ao extrato um alto poder bactericida. Já para a placa irradiada, foi possível identificar se apenas o poder de inibição do crescimento bacteriano aumentou ou se o poder bactericida dos extratos também aumentou. Com o extrato de *Macroptilium sp.* foi possível observar que não houve crescimento nas concentrações de 10 mg/ml e 5 mg/ml, evidenciando que o extrato teve seu poder bactericida aumentado após a irradiação.

Com relação ao extrato de *Thunbergia sp.*, seu poder bactericida se manteve, assim como previsto na placa de 96 poços. O extrato de *Ipomea-batatas* também teve o seu poder de inibição e bactericida aumentado, não havendo crescimento bacteriano na concentração de 10 mg/ml. O extrato de *V. myrtillus*, assim como o extrato de *Thunbergia sp.*, manteve seu poder bactericida. Os dados supracitados podem ser melhor observados no quadro 3, que relaciona de forma binária a concentração de cada extrato à presença ou ausência de crescimento bacteriano, sendo a presença representada por + e a ausência por -, e a não irradiação ou irradiação da amostra, sendo representadas por I ou N.I respectivamente.

Quadro 6: Relação entre concentração de extrato e crescimento bacteriano.

Extrato Concentração	Macroptilium sp.		Thunbergia sp.		Ipomea batatas		Vaccinium myrtillus	
	N. I.	I	N. I.	I	N. I.	I	N. I.	I
10 mg/ml	-	-	-	-	+	-	-	-
5 mg/ml	+	-	-	-	+	+	-	-
2,5 mg/ml	+	+	+	+	+	+	+	+
1,25 mg/ml	+	+	+	+	+	+	+	+
0,625 mg/ml	+	+	+	+	+	+	+	+
0,313 mg/ml	+	+	+	+	+	+	+	+
0,156 mg/ml	+	+	+	+	+	+	+	+

Fonte: Autora (2024)

5.6 BIOAUTOGRAFIA APLICADA A PDT

Na bioautografia aplicada a PDT foi possível observar a formação do halo de inibição apenas na corrida do extrato de *Thunbergia* sp. sem irradiação (Figura 9) e o aumento desse halo na placa irradiada (Figura 9). Não foi possível identificar a substância fotoativadora, pois a fase móvel utilizada não foi adequada, o que não separou bem os componentes dos extratos. Embora o teste não tenha sido realizado da maneira mais eficiente, ainda foi possível observar um resultado promissor.

Figura 9: Bioautografias das placas sem irradiação e irradiada, respectivamente.



Fonte: Autora (2024)

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados foi possível perceber que as espécies estudadas possuem um grande potencial como fotossensibilizadores aplicados à PDT. Mais especificamente, pôde-se concluir que:

- Na prospecção fitoquímica verificou-se a presença de saponinas, flavonas e xantonas no extrato de *Macroptilium sp.*, a presença de flavonas e xantonas no extrato de *Thunbergia sp.*, a presença de taninos, fenóis, flavonas, xantonas e flavonóis no extrato de *Ipomea-batatas* e saponinas, fenóis e flavonóis no extrato de *Vaccinium myrtillus*.
- No teste de potencial antioxidante foi possível verificar que as espécies estudadas têm altos teores antioxidantes, sendo o *Macroptilium sp.* o extrato com maior teor.
- A partir da CCD identifica-se a presença de antocianinas, cumarinas , fenilpropanóides e clorofilas nas amostras.
- Os perfis espectrofotométricos evidenciaram a presença de picos na janela terapêutica da PDT.
- Verificou-se que a atividade antimicrobiana dos extratos foi intensificada após a aplicação da PDT, promovendo uma maior eficácia quando destinados a tal objetivo.

Esse trabalho introdutório, permite a construção de conhecimento e elucidação a respeito das técnicas e das espécies utilizadas. Espera-se que a partir dele, seja possível o desenvolvimento de terapias alternativas à resistência microbiana, trazendo benefícios à saúde dos indivíduos. Estudos futuros podem explorar a aplicação dos extratos como fotossensibilizadores para a PDT em microrganismos patogênicos, propiciando assim a possibilidade da aplicação clínica. Assim como também é possível fazer um estudo mais detalhado da Bioautografia aplicada a PDT, para a identificação das substâncias específicas bactericidas.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Resistência microbiana: saiba o que é e como evitar**. 2020. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2020/resistencia-microbiana-saiba-o-que-e-e-como-evitar>> Acesso em 30 set. 2024.
- ALFENAS, C. et al. **Terapia fotodinâmica na redução de microrganismos no sistema de canais radiculares**. Rev. Bras. Odontol., Rio de Janeiro, v. 68, n. 1, p. 68-71, 2011.
- ALVES, J. **Porfirinas e Terapia Fotodinâmica em Neoplasias**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.
- ARAÚJO, A. et al; **Caracterização morfométrica e germinação de sementes de *Macroptilium martii* benth.** (FABACEAE). Revista Caatinga. v. 27, n. 3, jul. - set., 2014.
- ARAÚJO, M. S. O. et al. **Uso de Fitocosméticos no Tratamento da Acne**. Revista Brasileira Interdisciplinar de Saúde - ReBIS. V. 2 n. 3 (2020): v. 2, n. 3, 2020, 2024.
- ATTIMARAD, M. et al. **High-performance thin layer chromatography: A powerful analytical technique in pharmaceutical drug discovery**. Pharmaceutical Methods. 2011 Apr;2(2):71-5, 2011.
- CESARE et al., **Potencial dos extratos liofilizados de folhas de batata doce de polpa roxa (*Ipomea batatas*) no tratamento metabólico da obesidade**. XXI FEIRA DE INICIAÇÃO À INOVAÇÃO E AO DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO – FINOVA/2012. Porto Alegre, 2012.
- CHU, Wing-Kwan et al., Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). **Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects**. Edition 2, cap.4, 55-69, 2011.
- CIELPIK, F. et al. **Antimicrobial photodynamic therapy – what we know and what we don't**. Critical Reviews in Microbiology. Volume 44, Issue 5, 2018.
- DE OLIVEIRA, K. et al. **Conceitos Fundamentais e Aplicações de Fotossensibilizadores do Tipo Porfirinas, Clorinas e Ftalocianinas em Terapias Fotônicas**. Rev. Virtual Quím., 310-335, 2015.
- KODANGALA et al. **Phytochemical studies of aerial parts of the plant *Leucas lavandulaefolia***. Der Pharma Chemica, 2010, 2(5):434-437, 2010.
- LIMA, CAMILA CORREA et al. **Mecanismo de resistência bacteriana frente aos fármacos: uma revisão**. CuidArte, Enferm ; 11(1): 105-113, 2017.
- LONGO, J.; LOZZI, S.; AZEVEDO, R. **Oral cancer and photodynamic therapy as a treatment**. RGO, Rev. gaúch. odontol. (Online) vol.59 supl. Porto Alegre Jan./Jun, 2011.

MARTINS, P. H. P. et al. **Pigmentos naturais como alternativa a corantes e conservantes sintéticos para a indústria alimentícia animal: uma revisão.** The Journal of Engineering and Exact Sciences – jCEC, Vol. 08 N. 10, 2022.

MATOS, F. **Introdução à Fitoquímica Experimental.** ed.2. Fortaleza: Edições UFC, 1997.

Ministério da Saúde. **Plantas Medicinais e Fitoterapia na Atenção Básica.** Série A. Normas e Manuais Técnicos Cadernos de Atenção Básica, n. 31. Brasília 2012.

NADINIC, JELENA et al., **Fitocosmética: Fitoingredientes y otros productos naturales.** 1ª ed. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Eudeba, 2015.

NUNES, D. et al; **Indicador ácido-base: extrato hidroalcoólico da flor da espécie *Macroptilium lathyroides* (L.) Urb.** Scientia Naturalis, v. 3, n 1. 288-299, 2021.

OLIVEIRA, A.C.B. et. al. **Variabilidade genética em batata-doce com base em marcadores isoenzimáticos.** Horticultura Brasileira, Brasília, v.20, p.576-582, 2002. Organização Mundial da Saúde (OMS). **Relatório do sistema global de vigilância de resistência e uso de antimicrobianos (GLASS): 2022.** Disponível em: <<https://who.int/publications/i/item/9789240062702>> Acesso em 08 out. 2024

Paolillo, F. et al. **FOTOTERAPIA NA FUNÇÃO MUSCULAR, PERFIL METABÓLICO E QUALIDADE DE VIDA DE MULHERES NA PÓS-MENOPAUSA.** XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, 2014.

PIRES, Tânia C. S. P. et al. **Extracts from *Vaccinium myrtillus* L. fruits as a source of natural colorants: chemical characterization and incorporation in yogurts.** *Food Funct.*, 11, 3227-3234, 2020.

RIBEIRO, J.; FLORES, A.; MESQUITA, R.; NICOLA, J.; NICOLA, E. **Terapia Fotodinâmica: uma luz na luta contra o câncer.** *Physicae.* v.5, n.2, p.5, 2005a.

ROCHA, B.; LIMA, C.; YARA, R. **PRODUTOS NATURAIS APLICADOS COMO FOTOSSENSIBILIZADORES NA TERAPIA FOTODINÂMICA: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.** Ciências Biológicas: Campo promissor em pesquisa 3. Ed Atena, 2020b.

RODRIGUES, M. C. **Terapia fotodinâmica mediada por extrato de caju e cloreto de alumínio-ftalocianina em nanoemulsões no tratamento de câncer de mama in vitro.** 2014. xxi, 118 f., il. Dissertação (Mestrado em Nanociências e Nanobiotecnologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

RODRIGUEZ-SANOJA, L. E.; Wrolstad, R. E. **Extraction, isolation and purification of anthocyanins.** Current Protocols, 01 de agosto de 2001.

SANTOS FILHO. L. G. A. **Deteção da atividade antimicrobiana in vitro de compostos naturais à base de plantas: metodologia científica.** Teresina: EMBRAPA-UEPAE Teresina, 2019. (EMBRAPA-UEPAE Teresina. Comunicado

Técnico, 254).

SANTOS, L. B. M. **Aplicação de zinco-porfirina e azul de metileno em gel e avaliação para uso em terapia fotodinâmica.** 2016. Disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/24538>> Acesso em: 07 de setembro de 2024.

SCHIOZER, A. L.; BARATA, L. E. S.. **Estabilidade de Corantes e Pigmentos de Origem Vegetal.** Revista Fitos, [S.l.], v. 3, n. 02, p. 6-24, 2013.

SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. **Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos.** Quim. Nova, Vol. 25, No. 5, 801-807, 2002.

SILVA, M. S. A. et al. **Cytotoxic and genotoxic effects of Macroptilium lathyroides.** Planta Daninha, v. 36, p. e018166574, 2018.
SILVA, Renato. **Avaliação da eficiência fotodinâmica de fotossensibilizadores com aplicação em Terapia Fotodinâmica.** Programa de Pós-graduação em Ciências (Dissertação) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

SOARES VITAL, A. N., & Bazílio de Omena Messias, C. M. **Composição e aspectos nutricionais da batata-doce (Ipomoea batatas (L.) Lam): revisão de literatura.** Revista Brasileira Multidisciplinar, 26(3), 155-163, 2023.

SULTANA et al. **An Overview on Ethnopharmacological and Phytochemical properties of Thunbergia sp.** Med Aromat Plants, 2015. 4: 217.

The University of Hong Kong. **Breakthrough in photoactivatable nanomedicine for the treatment of age-related macular degeneration.** 2023. ScienceDaily. Disponível em: <www.sciencedaily.com/releases/2023/12/231205114811.htm> Acesso em 30 set. 2024.

WAINWRIGHT, M.; MAISCH, T.; NONELL, S.; PLAETZER, K., ALMEIDA, A.; TEGOS, G.; RAMBLIN, M. **Photoantimicrobials—are we afraid of the light?.** Lancet Infect Dis, 2016.

WANG, Xia et al. **Recent advances for enhanced photodynamic therapy: from new mechanisms to innovative strategies.** Chemical Science, 15, p. 12234-12257. Dezembro 2023.