

14º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP - 2023

EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE HIPERICINA COM POTENCIAL PARA A OBTENÇÃO DE NOVAS NANOPARTÍCULAS FOTOSENSIBILIZADORAS COM AÇÃO ANTIMICROBIANA

MARCELO S. PECORARO¹, GIOVANNA FUENTES², CAROLINA R. HURTADO³

¹Graduando em Bacharelado em Engenharia Mecânica, Bolsista PIBIFSP, IFSP, Câmpus São José dos Campos, pecoraro.marcelo@aluno.ifsp.edu.br

²Graduanda em Licenciatura em Química, IFSP, Câmpus São José dos Campos

³Docente do Curso de Licenciatura em Química, IFSP, Câmpus São José dos Campos

Área de conhecimento (Tabela CNPq): 3.13.02.01-7 Biomateriais e Materiais Biocompatíveis

RESUMO: Cada vez mais vem sendo procuradas terapias rápidas e eficazes para o tratamento de infecções bacterianas. A Terapia Fotodinâmica (TFD) ganhou destaque, por não ser antibiótica e proporcionar a morte celular na presença de fotossensibilizadores (FS), ativados por luz, gerando espécies reativas, causando danos às células alvo. Os FS apresentam atividade antimicrobiana *in vitro*, mas sua desativação em meio biológico pode comprometer a fotoatividade *in vivo*. Para superar esse impasse, moléculas do FS podem ser conjugadas a nanopartículas. Os nanodiamantes (NDs), são materiais promissores para aplicação biomédica devido à biocompatibilidade. Um FS natural de destaque é a hipericina, produzido pela planta *Hypericum Perforatum*. Assim o presente trabalho teve como objetivo a extração e purificação de hipericina de folhas e flores da planta, com potencial para a obtenção de novas nanopartículas fotossensibilizadoras aplicadas em TFD. A extração metanólica foi realizada sob refluxo a 60°C. O isolamento da hipericina foi realizado por cromatografia em camada delgada e a comprovação da eficácia dos processos foi acompanhada por espectroscopia UV-vis e de fluorescência. Foi possível evidenciar intensa emissão de fluorescência após excitação em $\lambda=598\text{nm}$, adequado para aplicação em TFDa, demonstrando potencial para que seja posteriormente conjugada à nanopartículas, seguida de avaliação da ação antimicrobiana.

PALAVRAS-CHAVE: hipericina; nanodiamante; fototerapia; *hypericum perforatum*.

EXTRACTION AND PURIFICATION OF HYPERICIN WITH POTENTIAL FOR OBTAINING NEW PHOTOSENSITIZING NANOPARTICLES WITH ANTIMICROBIAL ACTION

ABSTRACT: Faster and more effective therapies are being sought for the treatment of bacterial. Photodynamic Therapy (PDT) gained prominence because it is not an antibiotic and provides cell death in the presence of photosensitizers (PS), activated by light, generating reactive species, causing damage to target cells. The PS present antimicrobial activity *in vitro*, but its deactivation in biological environment can compromise the photoactivity *in vivo*. To overcome this impasse, FS molecules can be conjugated to nanoparticles. Nanodiamonds (NDs) are promising materials for biomedical application due to their biocompatibility. A prominent natural PS is hypericin, produced by the *Hypericum Perforatum* plant. Thus, the present work aimed to extract and purify hypericin from leaves and flowers of the plant, with the potential to obtain new photosensitizing nanoparticles applied in PDT. Methanolic extraction was performed under reflux at 60°C. The isolation of hypericin was performed by thin layer chromatography and the proof of the effectiveness of the processes was accompanied by UV-vis and fluorescence spectroscopy. It was possible to show intense fluorescence emission after excitation at

$\lambda=598\text{nm}$, suitable for application in PDT, demonstrating potential for its subsequent conjugation to nanoparticles, followed by evaluation of antimicrobial action.

KEYWORDS: hypericin; nanodiamonds; phototherapy; *hypericum perforatum*.

INTRODUÇÃO

A Terapia Fotodinâmica (TFD) tem sido utilizada com eficácia como tratamento alternativo de diversas doenças, com destaque na área dermatológica, como psoríase, verrugas, tumores não melanomas, micoses fúngicas, queratoses e dermatites. O funcionamento da TFD se dá por meio da aplicação de um fotossensibilizador (FS) que, ao receber irradiação luminosa na presença de oxigênio, cria espécies reativas (ROS), que por sua vez são responsáveis por levar microrganismos e células tumorais à morte, causando a eles danos oxidativos.

É visto que as FS são muito eficazes na TFD, porém, apesar de mostrarem alta atividade antimicrobiana e antitumoral in vitro, devido a sua desativação em meio biológico e sua agregação, sua fotoatividade in vivo é comprometida. Com o objetivo de superar esses impasses enfrentados pelo uso do FS livre, muitos estudos têm sido focados no desenvolvimento de nanopartículas (NPs) fotossensibilizadoras formadas pela conjugação de moléculas de FS à sua superfície (Yang et al., 2021). Dentre as inúmeras NPs com potencial antimicrobiano e/ou antitumoral, os nanodiamantes (NDs) estão entre os novos materiais promissores para aplicação biomédica devido à sua propriedade de estabilidade química e coloidal em meios aquosos, o que permite que sejam utilizados como transportadores de medicamentos.

Como possível candidato de FS a ser conjugado à superfície dos NDs, está a Hipericina, que apesar dos seus importantes efeitos biológicos, não há estudos de conjugação com NDs.

A extração desse FS e conjugação à superfície dos NDs poderá contribuir para a obtenção de um nanossistema inédito e útil para aplicação na terapia fotodinâmica em células tumorais e/ou microbianas.

MATERIAIS E MÉTODOS

A fim de facilitar a compreensão, separou-se os métodos com base nos principais procedimentos seguidos.

Extração da Hipericina do *Hypericum Perforatum*

Uma massa de 1,0612g de hipérico em pó foi colocada em um balão de fundo redondo com 21,2ml de metanol e o sistema foi colocado sob refluxo por 20 minutos a 60°C. Ao final do processo, a solução resultante foi centrifugada e filtrada. Através de uma micropipeta, a fase líquida contendo o extrato de Hipericina metanólica foi extraída e submetida a evaporação do solvente em um rotaevaporador. Posteriormente, o extrato recolhido foi solubilizado em 20mL de metanol e armazenado a 4°C para caracterizações físico-químicas e purificação.

Caracterização físico-química: obtenção dos espectros UV-VIS

Os espectros de absorção das suspensões metanólicas dos extratos, foram coletados por meio de um espectrofotômetro, utilizando um volume de 100 μL de cada suspensão. A faixa de varredura foi de 300 a 800nm. Todos os gráficos a serem comentados foram plotados por meio do software *OriginPro 2023b* (Learning Edition).

Purificação

A purificação do extrato foi realizada por cromatografia em camada delgada (CCD) (Figura 1), utilizando placa cromatográfica de sílica. Como fase móvel, foi-se utilizada uma mistura de acetato de etila e ácido acético seguindo, respectivamente, a proporção 50:6.

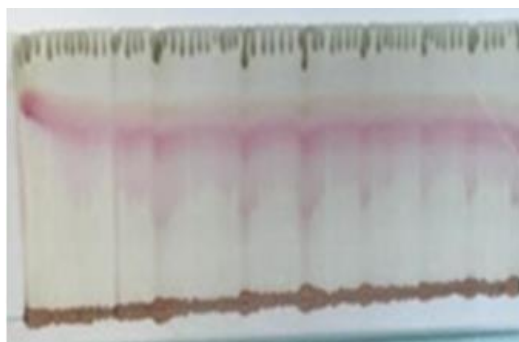


FIGURA 1. CCD do extrato de Hipericina dissolvido em metanol.

Após a eluição, cortou-se a fase de coloração rosada e em seguida raspou-a para solubiliza-la em metanol. O novo extrato, agora purificado, foi armazenado a 4°C para novas caracterizações físico-químicas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração descrita resultou em soluções metanólicas de colorações escuras, com um tom que segue um meio termo entre o marrom e o roxo.

Na Figura 1, é possível observar o espectro de absorção do extrato em solução metanólica. Foi possível observar bandas na região de 540 a 600nm, sendo que a banda de máxima absorção é em 591nm. Já na figura 2, tem-se o espectro de absorção da Hipericina (Gusmão, 2019) para fins de comparação.

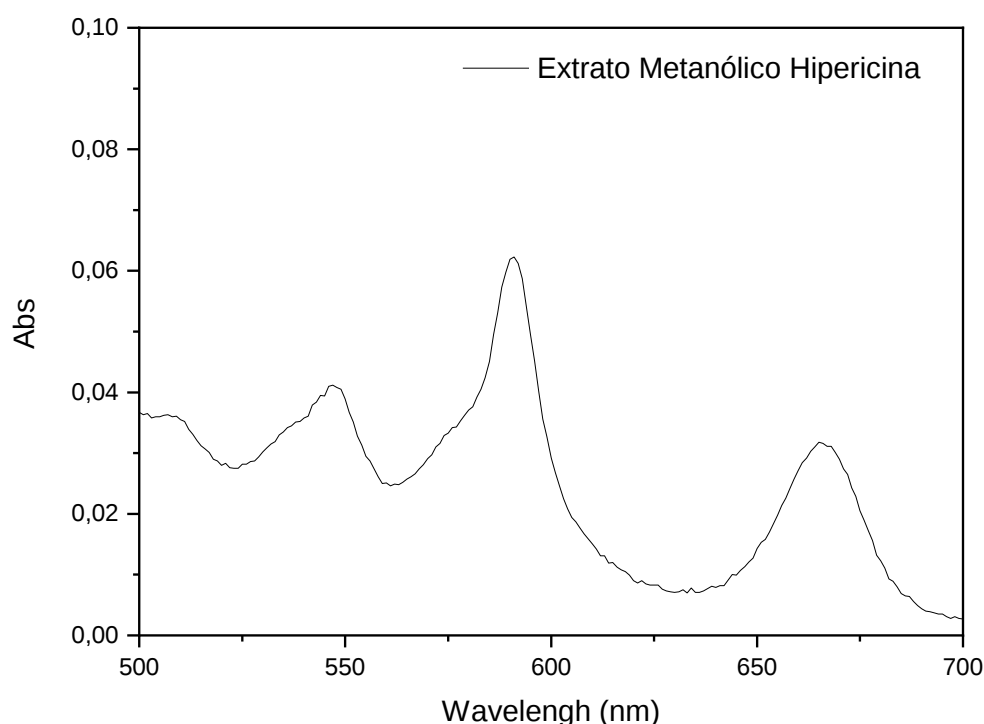


FIGURA 2. Espectros de absorção do extrato de Hipericina não purificado.

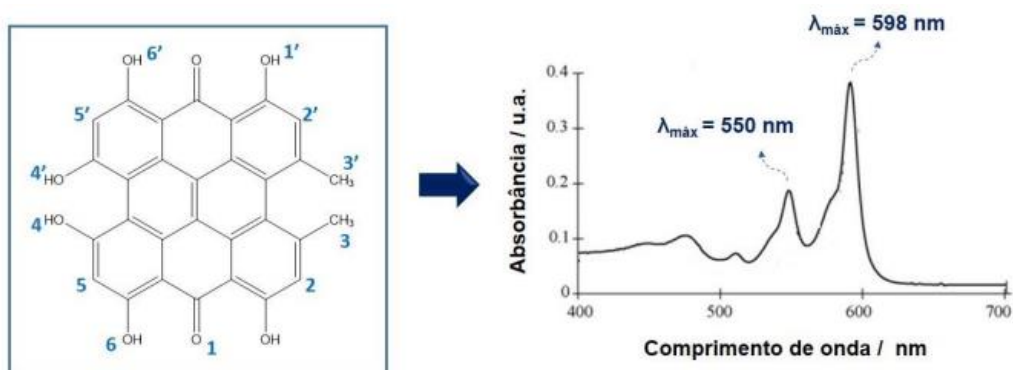


FIGURA 3. Representação da fórmula estrutural da Hipericina e seu espectro de absorção. (Gusmão, 2019).

Pela similaridade das bandas entre 540 e 600nm de ambos espectros, é possível assumir que o extrato metanólico de fato apresenta o FS de interesse do projeto. No entanto, com base nas bandas acima de 600nm, também é plausível supor que há diversas outras substâncias indesejadas presentes no extrato, como a clorofila, que apresenta um pico próximo à 680nm. Por isso, foi-se necessário passar pelo processo de purificação.

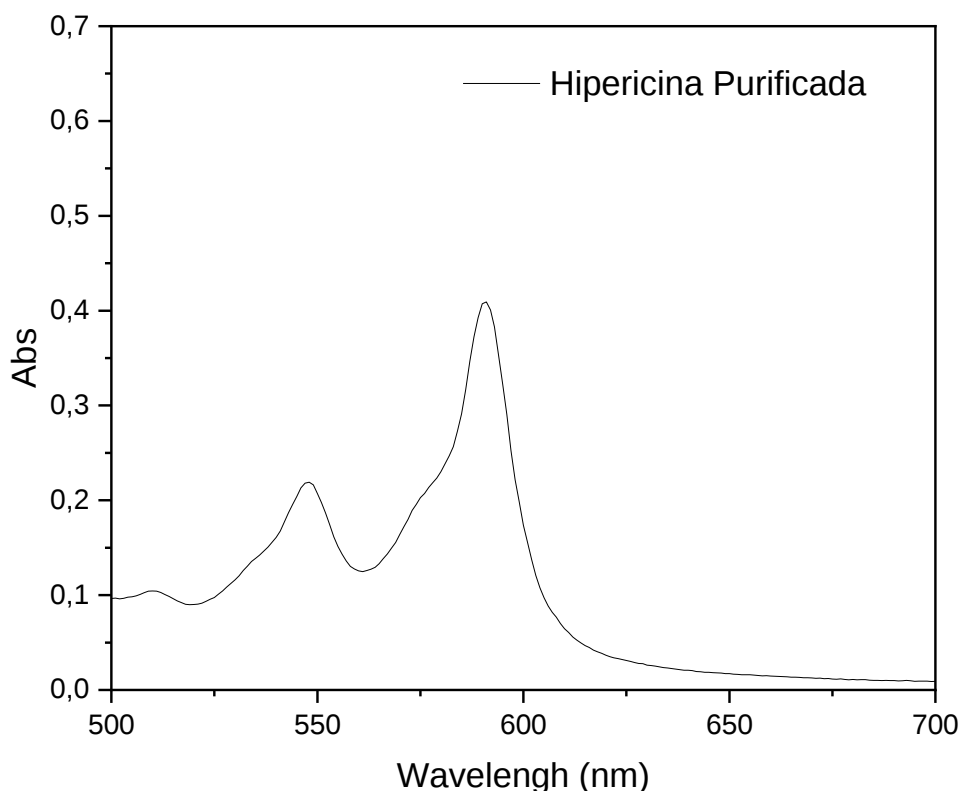


FIGURA 4. Espectro de absorção do extrato de Hipericina purificada.

Através da comparação da Figura 4 com a Figura 3, é possível concluir o sucesso do processo de purificação, tendo em vista que ambos os espectros se configuram de maneira praticamente idêntica. Ademais, é válido pontuar a efetiva separação da Hipericina das demais substâncias que não estão de acordo com o interesse do projeto.

A conjugação da Hipericina em NDs também teve resultados positivos, no entanto, por falta de testes, não se pode afirmar que os nanossistemas obtidos são eficazes em TFDs.

CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos, é possível concluir que as técnicas de extração e purificação de hipericina de flores de *Hypericum Perforatum* se demonstraram eficazes. O FS purificado apresentou espectros de absorção UV-vis e fluorescência semelhantes aos observados para a hipericina padrão. A intensidade de emissão de fluorescência após excitação em $\lambda=598\text{nm}$ demonstra que é adequado para aplicação em TFDs. Dessa maneira o FS demonstra potencial para conjugação à NPs como, por exemplo, os nanodiamantes e assim avaliar as características dos nanoconjugados ND-FS, na tentativa de minimizar agregação em meio biológico e assim aumentar a fotoatividade para aplicação em TFDs.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

C.R.H. contribuiu com a curadoria e análise dos dados. M.S.P. e G.F. procederam com a metodologia e experimentos. Todos os autores atuaram na redação, revisão do trabalho e aprovaram a versão submetida.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica e Tecnológica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (PIBIFSP) pela bolsa concedida para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

AGOSTINIS, P. et al., **Hypericin in cancer treatment more light on the way**. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2002, 34 (3), 221-241.

BUYTAERT, W. et al. **Molecular effectors and modulators of hypericin-mediated cell death in bladder cancer cells**. Oncogene, 2008, 27 (13), 1916-1929.

KLEEMANN, B. et al. **St John's wort (*Hypericum Perforatum* L.) photomedicine: hypericin-photodynamic therapy induces metastatic melanoma cell death**. PloS One, 2014, 9 (7), 1-20.

LAFFERS, W. et al. **Photosensitizing effects of hypericin on head neck squamous cell carcinoma in vitro**. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology, 2015, 3, 711-718.

MIRMALEK, S. A. et al. **Cytotoxicity and apoptogenic effect of hypericin: the bioactive component of *Hypericum Perforatum* on the MCF-7 human breast cancer cell line**. Cancer cell international, 2016, 16 (1), 1-9.

SIEWERT, B.; STUPPNER, H. **The photoactivity of natural products: An overlooked potential of phytomedicines?** Phytomedicine, 2019, 60, 152985.

YANG, H. et al. **Photosensitizer Nanoparticles Boost Photodynamic Therapy for Pancreatic Cancer Treatment**. Nano-Micro Lett., 2021, 13:35.

GUSMÃO, Luiza Araújo. **Inclusão supramolecular de Hipericina em β -ciclodextrina visando aplicação em terapia fotodinâmica**. São Carlos: USP, 2019.