



**FURG**

**Dissertação de Mestrado**

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA EM LIPOSSOMOS  
E ATIVIDADE OXIDANTE DO EXTRATO DA *Rapanea  
ferruginea***

---

**Desirée Magalhães dos Santos**

**PPGQTA**

**Rio Grande, RS - Brasil**

**2016**

# CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA EM LIPOSSOMOS E ATIVIDADE OXIDANTE DO EXTRATO DA *Rapanea ferruginea*

Por

**Desirée Magalhães dos Santos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande (RS), como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA.

PPGQTA

Rio Grande, RS – Brasil

2016

Universidade Federal do Rio Grande  
Escola de Química e Alimentos  
Programa de Pós-Graduação em Química  
Tecnológica e Ambiental

A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Dissertação de Mestrado

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA EM LIPOSSOMOS E  
ATIVIDADE OXIDANTE DO EXTRATO DA *Rapanea ferruginea***

elaborado por

**Desirée Magalhães dos Santos**

Como requisito parcial para a obtenção do título de  
**Mestre em Química**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Darlene Correia Flores (FURG - RS)

---

Prof. Dr. Gabriel Jorge Sagrera Darelli (UdeLAR –UY)

---

Profa. Dra. Neusa Fernandes de Moura ( FURG- RS)

---

Profa. Dra. Vânia Rodrigues de Lima (FURG - RS)

Rio Grande, 01 de abril de 2016.

*Dedico este trabalho a meus pais, que me incentivaram a lutar e ir atrás dos meus sonhos.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, por me dar forças e por sempre guiar meus passos.

A minha orientadora e amiga, Prof<sup>a</sup> Vânia Rodrigues de Lima, pelo incentivo, amizade, apoio e dedicação nestes dois anos. Muito obrigada!

A minha co-orientadora Prof<sup>a</sup> Neusa Fernandes de Moura, pela oportunidade e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do GIIMM, especialmente a meus amigos Marinalva, Carla, Amanda, Alessandro e Nichole, Leonardo e Valéria, pelo auxílio, apoio e amizade.

Aos professores Gabriel J. S. Darelli (UdeLAR- UY), Eliana Furlong (FURG), Ana Paula Horn (FURG) e sua doutoranda Elita Silveira pelas contribuições neste trabalho.

Aos membros da banca, professores Alex F. C. Flores (FURG), Darlene C. Flores (FURG) e Gabriel J. S. Darelli (UdeLAR- UY), pela disposição, contribuições e pela atenção dispensada.

À Universidade Federal do Rio Grande, à Escola de Química e Alimentos e ao Programa de Pós Graduação em Química Tecnológica e Ambiental, pela formação e oportunidade de aprimorar meus conhecimentos.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPERGS pelo auxílio financeiro.

A meus pais Thelmo e Kátia, pelo incentivo e dedicação. Serei sempre grata, por vocês serem meus melhores amigos, pelo amor incondicional e pelo carinho que tive e sempre terei na minha vida. Amo vocês!

As minhas irmãs Gabriele e Paola e a meus cunhados Lindemberg e Gabriel, obrigada pela amizade, carinho e incentivo.

A meu sobrinho Miguel, que mesmo sem entender, com seu sorriso e carinho, torna os meus dias mais alegres.

A todos os amigos que me apoiaram nestes dois anos, principalmente nestes últimos meses, obrigada!

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b>	<b>xi</b>
<b>RESUMO</b>	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xiv</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>4</b>
<b>2.1 ESTRESSE OXIDATIVO</b>	<b>4</b>
<b>2.2 COMPOSTOS FENÓLICOS</b>	<b>7</b>
<b>2.3 <i>Rapanea ferruginea</i></b>	<b>11</b>
<b>2.4 LIPOSSOMOS</b>	<b>14</b>
<b>2.5 CARACTERIZAÇÃO DA DINÂMICA MOLECULAR DAS MEMBRANAS</b>	<b>18</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
<b>3.1 OBJETIVO GERAL</b>	<b>20</b>
<b>3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>20</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>22</b>
<b>4.1 REAGENTES</b>	<b>22</b>
<b>4.2 MÉTODOS</b>	<b>22</b>
4.2.1 Obtenção do extrato	22
4.2.2 Identificação estrutural do extrato	23
4.2.2.1 Determinação dos compostos fenólicos por HPLC-DAD	23
4.2.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de DPPH	24
4.2.4 Preparação dos lipossomos e incorporação do extrato	25
4.2.5 Ensaio de peroxidação lipídica (TBARS)	25
4.2.6 Inibição da enzima α-amilase, para avaliação de possível atividade antifúngica	26
4.2.7 Ensaio Antitumoral in vitro: MTT Ensaio de Viabilidade Celular	27
4.2.8 Análise Estatística	28
4.2.9 Ensaios de HATR-FTIR	28
4.2.10 Experimentos com RMN	28
4.2.11 Medidas de DSC	28
4.2.12 Medidas de Turbidez	29
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>30</b>

<b>5.1 DETERMINAÇÃO dos compostos fenólicos por HPLC-DAD</b>	<b>30</b>
<b>5.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE DPPH</b>	<b>34</b>
<b>5.3 INFLUÊNCIA DO EXTRATO SOBRE A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA IN VITRO EM LIPOSSOMOS DE ASO</b>	<b>36</b>
<b>5.4 INIBIÇÃO DA <math>\alpha</math>AMILASE</b>	<b>40</b>
<b>5.5 ENSAIO ANTITUMORAL IN VITRO: MTT ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR</b>	<b>41</b>
<b>5.6 INFLUÊNCIA DO EXTRATO DA FOLHA DA <i>Rapanea ferruginea</i> NA DINÂMICA DOS LIPOSSOMOS DE ASOLECITINA DE SOJA</b>	<b>42</b>
5.6.1 Interação do extrato com a região polar dos lipossomos de ASO	44
5.6.2 Interação do extrato com a região interfacial dos lipossomos de ASO	47
5.6.3 Influência do extrato na região apolar dos lipossomos de asolecitina de soja	48
<b>5.7 MEDIDAS DE TURBIDEZ, ATRAVÉS DE ESPECTROFOTOMETRIA DE ULTRAVIOLETA VISÍVEL (UV-Vis)</b>	<b>50</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>53</b>
<b>7. PERSPECTIVAS</b>	<b>55</b>
<b>8. REFERÊNCIAS</b>	<b>56</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplos representativos de compostos fenólicos.....	2
Figura 2. Esquema de lipoperoxidação em ácidos graxos poli-insaturados.....	5
Figura 3. Reação de Fenton e Reação de Haber-Weiss.....	5
Figura 4. Etapas (iniciação, propagação e terminação) da lipoperoxidação .....	6
Figura 5. Classificação dos compostos fenólicos naturais .....	8
Figura 6. Estrutura básica dos flavonoides .....	9
Figura 7. Estabilização dos compostos fenólicos por ressonância .....	9
Figura 8. Atividade antioxidante dos flavonóides .....	10
Figura 9. Atividade pró-oxidante dos flavonoides.....	11
Figura 10. Árvore, frutos e folhas da Rapanea ferruginea.....	13
Figura 11. Estrutura dos ácidos mirsinóicos A e B .....	14
Figura 12.Esquema de um corte transversal de um lipossomo e sua bicamada fosfolipídica .....	15
Figura 13. Esquema de uma molécula de fosfatidilcolina .....	16
Figura 14. Estrutura da fosfatidilcolina de soja, onde R ou R1 = ácido oléico (C 18:1), linoleico (C 18:2) e linolênico ( C 18:3).....	16
Figura 15. Estruturas dos ácidos oléico, linoleico e linolênico:.....	17
Figura 16. Representações esquemáticas das MLV, LUV e SUV .....	17
Figura 17. Reação de oxidação do radical DPPH para sua forma reduzida .....	24
Figura 18. Método de Hidratação de Vesículas para formação de MLV .....	25
Figura 19. Reação entre o malonildialdeído produto majoritário da lipoperoxidação e TBA .....	26
Figura 20. Fluxograma do experimento da determinação da atividade de inibição da α amilase.....	27
Figura 21. Estrutura do ácido siringico .....	30
Figura 22. Estrutura do ácido gálico .....	31
Figura 23. Estrutura química do ácido trans-cinâmico .....	32
Figura 24. Estrutura da quercetina .....	33
Figura 25. Estrutura da quercestrina .....	33
Figura 26. Estrutura da catequina .....	33
Figura 27. Atividade do extrato da folha da Rapanea ferruginea observado em ensaio de DPPH .....	34
Figura 28.Porcentagem de peroxidação lipídica em lipossomos, induzida por radical hidroxil ( $\text{HO}^\bullet$ ), em função do aumento das concentrações do extrato livre em lipossomos de ASO, obtida pelo método de TBARS.....	36
Figura 29. Porcentagem de peroxidação lipídica em lipossomos, induzida por radical hidroxil ( $\text{HO}^\bullet$ ), em função do aumento das concentrações do extrato incorporado em lipossomos de ASO, obtida pelo método de TBARS.....	37

Figura 30. Esquema representativo da interação dos compostos fenólicos (CF) com lipossomos .....	39
Figura 31. Influência do extrato, na forma livre em diferentes concentrações, na viabilidade celular das linhagens de glioma .....	41
Figura 32. Espectros de HATR-FTIR de ASO puro (linha vermelha) e contendo extrato (linha preta) .....	43
Figura 33. Ampliação do espectro de HATR-FTIR na região do estiramento simétrico do grupo fosfato .....	45
Figura 34. Tempo de relaxação longitudinal ( $T_1$ ) $^1\text{H}$ da colina de ASO na ausência (círculos abertos) e na presença (triângulos abertos) de extrato de <i>R. ferruginea</i> .....	46
Figura 35. Ampliação do espectro de HATR-FTIR na região do pico de estiramento do grupo carbonila.....	47
Figura 36. Ampliação do espectro de HATR-FTIR na região do estiramento simétrico do grupo metileno.....	49
Figura 37. Curvas de DSC para ASO puro e na presença do extrato .....	50
Figura 38. Esquema representativo dos efeitos provocados pela interação do extrato com a membrana .....	54

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.Compostos fenólicos identificados por HPLC –DAD no extrato da folha da <i>R. ferruginea</i> .....	30
Tabela 2. Percentual de atividade antioxidante do extrato da folha da <i>Rapanea ferruginea</i> observado em ensaio de DPPH. ....	35
Tabela 3. Ação contra a atividade da $\alpha$ -amilase .....	40
Tabela 4. Número de onda ( $\nu$ ) de HATR-FTIR de lipossomos de ASO provocados pela incorporação do extrato.....	43
Tabela 5. Valores da variação de entalpia e temperaturas de transição de fase .....	50
Tabela 6. Valores de turbidez para ASO puro e na presença do extrato .....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

EROs, espécies reativas de oxigênio.

MDA, malonildealdeído.

ASO, asolecitina de soja, do inglês asolectin soybean.

MLV, vesículas multilamelares grandes, do inglês multilamellar large vesicles.

LUV, vesículas unilamelares grandes, do inglês large unilamellar vesicles.

SUV, vesículas unilamelares pequenas, do inglês small unilamellar vesicles.

HATR-FTIR, infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada horizontal, do inglês Horizontal attenuated total reflectance fourier transform infrared spectroscopy.

DSC, calorimetria de varredura diferencial, do inglês differential scanning calorimetry.

RMN, espectroscopia de ressonância magnética nuclear.

$\nu_{as}$ , estiramento assimétrico.

$\nu_s$ , estiramento simétrico

$T_1$ , tempo de relaxação longitudinal.

$T_c$ , tempo de correlação

$\Delta H$ , variação de entalpia

$T_m$ , temperatura de transição de fase

UV-Vis, espectroscopia no ultravioleta visível, do inglês ultraviolet–visible spectroscopy.

HPLC, cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês high performance liquid chromatography

DAD, arranjo de diodo acoplado, do inglês diode array detector

DPPH, radical 2,2 difenil 1- picrilhidrazila, do inglês 2,2-diphenyl-1picrylhydrazyl

TBARS, substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico, do inglês thiobarbituric acid reactive substances.

## RESUMO

**Título: Caracterização físico- química em lipossomos e atividade oxidante do extrato da *Rapanea ferruginea***

Autor: Desirée Magalhães dos Santos

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vânia Rodrigues de Lima

Co-orientador : Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Neusa Fernandes de Moura

Neste estudo, avaliou-se a atividade antioxidante *in vitro* do extrato da folha da *Rapanea ferruginea* pelo método de DPPH e por ensaios de peroxidação lipídica. Também avaliou-se a interação de tal extrato com modelos de membrana lipossomal, sendo a dinâmica molecular deste investigada por técnicas instrumentais como Infravermelho com transformada de Fourier com refletância total horizontal atenuada, ressonância magnética nuclear, calorimetria de varredura diferencial e espectroscopia de ultravioleta – visível. Através do ensaio de DPPH, determinou-se a IC<sub>50</sub> do extrato em 7,8 µg/mL para inibição da oxidação do radical. Os resultados de inibição da peroxidação pelo método de TBARS, indicaram um valor de IC<sub>50</sub> do extrato na forma livre de 1,43 µg/mL. Por outro lado, através desse ensaio, detectou-se que o extrato na forma incorporada em lipossomos se comportou como pró-oxidante em função de sua concentração. Tais resultados foram associados à composição fenólica do extrato foram identificados por HPLC-DAD, o ácido siríngico, ácido cinâmico, ácido gálico, quercetina, quercetrina e catequina. Em função de sua concentração, alguns destes compostos podem apresentar caráter pró-oxidante. Avaliou-se a influência do extrato na dinâmica molecular das membranas, onde verificou-se que o extrato provocou um aumento do grau de hidratação no grupo fosfato, presente na região polar lipídica. Na região de interface lipídica, resultados de HATR-FTIR demonstraram que o extrato provocou uma diminuição da largura da banda de estiramento axial da carbonila lipídica em 25 cm<sup>-1</sup>, indicando um aumento do ordenamento nessa região. Na região hidrofóbica lipídica, o extrato provocou um aumento no valor da frequência do pico referente ao estiramento simétrico do grupo metileno em 1,83 cm<sup>-1</sup>, indicando um aumento da desordem nessa região. Este resultado foi confirmado por análises de DSC, onde foi observada a diminuição da variação da entalpia em 0,029 J/g e da temperatura de transição de fase em 4,43 °C para o lipídio após interação como o

extrato. O aumento da turbidez em 54% indicou que o extrato pode ter aumentado o tamanho dos lipossomos ou gerou agregação das vesículas. Os resultados obtidos através dos ensaios de caracterização da dinâmica molecular foram correlacionados à atividade oxidante do extrato.

## ABSTRACT

**Title: Physicochemical characterization of liposomes and oxidant activity *Rapanea ferruginea* extract**

Author: Desirée Magalhães dos Santos

Advisors: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vânia Rodrigues de Lima and Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Neusa Fernandes de Moura

In this work, it was evaluated the antioxidant activity of the *Rapanea ferruginea* leaf extract by DPPH method and lipid peroxidation assay (TBARS). It was also investigated the interaction of this extract with liposomal membrane models, and the latest molecular dynamics was investigated by instrumental techniques such as horizontal attenuated total reflectance infrared Fourier transform (HATR-FTIR), nuclear magnetic resonance (NMR), differential scanning calorimetry (DSC), ultraviolet - visible spectroscopy (UV-vis). Through the DPPH assay, the IC<sub>50</sub> was determined as 7.8 µg / mL to the inhibition of radical-induced oxidation. The results of peroxidation inhibition by TBARS method indicated that the free extract has an IC<sub>50</sub> value of 1.43 µg / mL .By this test, it was found that the liposome-loaded extract behaved as a pro-oxidant in a concentration-dependent way. This behavior may be related to the extract chemical composition,HPLC-DAD results demonstrated the extract phenolic composition as been syringic acid , cinnamic acid, gallic acid, quercetin, catechin and quercetin. Evaluating the extract influence on the membrane molecular dynamics, one can verify that the extract increase the hydration degree of the lipid phosphate polar region. In the lipid interface region, the extract caused a decrease in the HATR-FTIR carbonyl band width of 25 cm<sup>-1</sup>, indicating an increase in the group motion. With respect to the hydrophobic lipid region, the extract resulted in an increase of the peak frequency releted to the symmetrical stretching of methylene groups in 1.83 cm<sup>-1</sup>, indicating a disorder in this region. This behavior was also observed by DSC analysis, since the extract was responsible for a reduction of 0.029 J / g in the enthalpy variation and of 4.43 ° C in the phase transition temperature. An extract-induced turbidity increase of 54% indicated that the extract may increase the size of lipids, or their agglomeration. All the physico-

chemical characterization results obtained were correlated to the observed biological activity of the extract.

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, séries de evidências têm associado os agentes oxidantes, como as espécies reativas de oxigênio e outras espécies reativas, a pelo menos 50 doenças ou eventos patológicos, tais como câncer, processos inflamatórios e doenças neurodegenerativas (BAST; HAENEN; DOELMAN, 1991; BOVERIS *et al.*, 1986). Tais agentes, que incluem os radicais livres, quando em excesso em comparação aos agentes de defesa do organismo, respondem pelos efeitos do chamado estresse oxidativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990).

A formação de radicais livres ocorre continuamente no organismo durante os processos metabólicos. Esses, quando em quantidades homeostáticas, atuam como mediadores na transferência de elétrons em várias reações bioquímicas do organismo. Porém, em excesso, podem causar danos oxidativos nas biomoléculas, com consequente perda das suas funções biológicas. O sistema protetor antioxidante do organismo tem a função de controlar, inibir e/ ou reduzir os efeitos dos agentes oxidantes.

Esse sistema contém substâncias de origem endógena, como as enzimas e outras de origem exógena, como as provindas da dieta alimentar (KOURY e DONANGELO, 2003; CLARKSON e THOMPSON, 2000). Agentes exógenos podem ser usados assim para prevenir e tratar doenças associadas às espécies reativas e radicais livres, tais como câncer, processos inflamatórios, mal de Alzheimer e Parkinson, dentre outras (CASTELLI *et al.*, 1997).

Por outro lado, estudos demonstraram que a ação pró-oxidante de substâncias exógenas também está associada a atividades biológicas benéficas ao organismo, como por exemplo, à ação antibacteriana e antifúngica. Tal atividade pró-oxidante pode assim, ser uma importante ferramenta no combate à resistência bacteriana aos antibióticos existentes e também como controle de fitopatógenos (FURLAN, 1998). Visto que, o estresse oxidativo tem envolvimento na atividade antimicrobiana de drogas, como por exemplo, os antibióticos ciprofloxacina e fluorquinolanas, que tem sua atividade antibacteriana através de espécies reativas (ALBESA *et al.*, 2004). Também pode atuar em mecanismos antitumorais, induzindo a apoptose, como já reportados para células de glioblastomas humanos (SAKAGAMI e SATOH, 1997).

Neste sentido, é necessária a investigação de novas substâncias com propriedades oxidantes (anti ou pró-oxidantes), que tenham uma toxicidade reduzida. Assim, pesquisas referentes à química dos produtos naturais são de grande importância, visto que a natureza é a responsável pela produção da maior parte das substâncias orgânicas conhecidas (GOTTILIEB e BORIN, 2012; MONTANARI e BOLZANI, 2001).

Até a atualidade, umas das principais e importantes formas de prevenção e tratamento de doenças, é a ingestão de ervas e partes de plantas diretamente, ou sob a forma de infusão (DJERASSI *et al.*, 1961; WESSMAN, 1991; YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001).

Dentre as substâncias encontradas nas plantas, destacam-se os compostos fenólicos. A classe de compostos fenólicos abrange grande diversidade de estruturas simples e complexas, como as que são definidas por um anel aromático com, no mínimo, um hidrogênio substituído por um grupamento hidroxila. De acordo com a sua estrutura, podem ser classificados em grupos, como por exemplo os ácidos fenólicos, ácidos cinâmicos, ligninas e flavonoides, Figura 1 (SIMÕES *et al.*, 2000). A importância destes compostos está relacionada tanto com sua capacidade antioxidante, bem como com a sua atividade pró-oxidante (ANDERSEN e JORDHEIM, 2006).

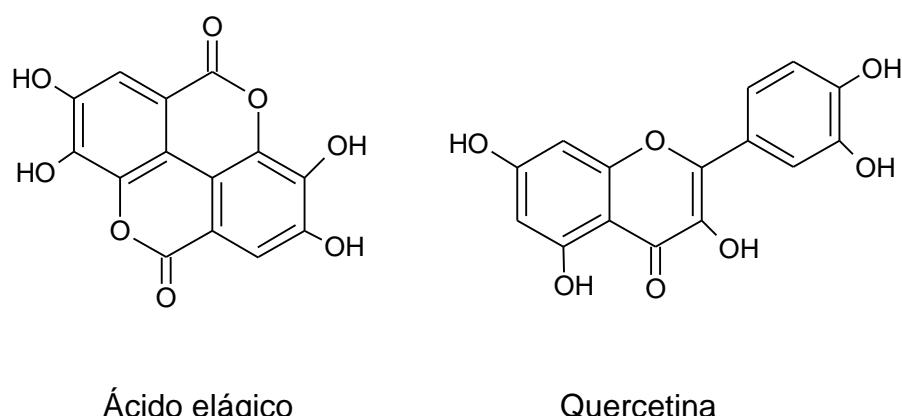


Figura 1. Exemplos representativos de compostos fenólicos

Estudos constataram que espécies do gênero *Rapanea* (*R. lancifolia*, *R. guianensis* e *R. umbelata*) apresentam compostos fenólicos em sua composição, o que torna a *Rapanea ferruginea* um alvo para estudos da atividade oxidante. Conhecida

popularmente como canela-azeitona e azeitona do mato, a *Rapanea ferruginea* é uma espécie típica de ambientes úmidos, nativa do Brasil. É uma árvore de porte médio, e seus extratos são utilizados na medicina popular como diurético, no combate de afecções da via urinária e também como depurativo (LORENZI, 2000).

Como dito anteriormente, a utilização de plantas com objetivos medicinais é bastante difundida em todo mundo. Porém, muitas vezes não se tem as informações científicas das propriedades destas plantas medicinais. Assim, é importante conhecer quais extratos são realmente ativos biologicamente, como podem ser preparados e quando devem ser prescritos (MACIEL *et al.*, 2002).

Este trabalho teve como objetivo investigar a composição fenólica, bem como as propriedades oxidante, antifúngicas e antitumorais do extrato das folhas da *Rapanea ferruginea*. Adicionalmente, foi realizado um estudo sobre os efeitos do extrato, bem como sua localização na dinâmica molecular em membranas contendo fosfolipídios de origem natural, utilizando técnicas não invasivas como infravermelho com transformada de fourier (FTIR), ressonância magnética nuclear (RMN), calorimetria de varredura diferencial (DSC) e ultravioleta-visível (UV-vis). Os resultados preliminares antifúngicos e antitumorais *in vitro* podem estar relacionados com a atividade oxidante do extrato.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo ocorre em função do desequilíbrio entre a quantidade de agentes oxidantes e do sistema de defesa do organismo (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004).

Estes agentes oxidantes podem ser os radicais livres e/ou outras espécies reativas, tais como as espécies reativas de oxigênio (EROs). Estas espécies reativas são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em um metabolismo celular aeróbio, o oxigênio ( $O_2$ ) se reduz formando água ( $H_2O$ ). Durante este processo, são formados intermediários como os radicais superóxido ( $O_2^{\bullet}$ ), hidroperoxila ( $HO_2^{\bullet}$ ) e hidroxila ( $HO^{\bullet}$ ), e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (HALLIWELL, 1999; CHATGILIALOGLU e O'NEILL, 2001; WISEMAN; KAUR; HALLIWELL, 1995; CADET *et al.*, 1999).

De uma forma simplificada, radical é o termo dado à moléculas ou átomos altamente reativos, que contêm um número ímpar de elétrons na sua última camada eletrônica. Este não emparelhamento de elétrons na última camada eletrônica, confere a esses átomos ou moléculas alta reatividade (SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004).

Todos os componentes celulares são susceptíveis a ações das espécies reativas, porém as membranas celulares destacam-se ao sofrer mais danos. Isto deve-se à peroxidação lipídica, que pode provocar alterações na estrutura e permeabilidade das membranas celulares. Neste processo, há formação de produtos citotóxicos, tal como o malonildealdeído (MDA), Figura 2 (GARDNER, 1989; KOPPENOL, 1990) que provoca a morte celular. A peroxidação lipídica é associada aos mecanismos de envelhecimento e de câncer (HERSHKO, 1989).

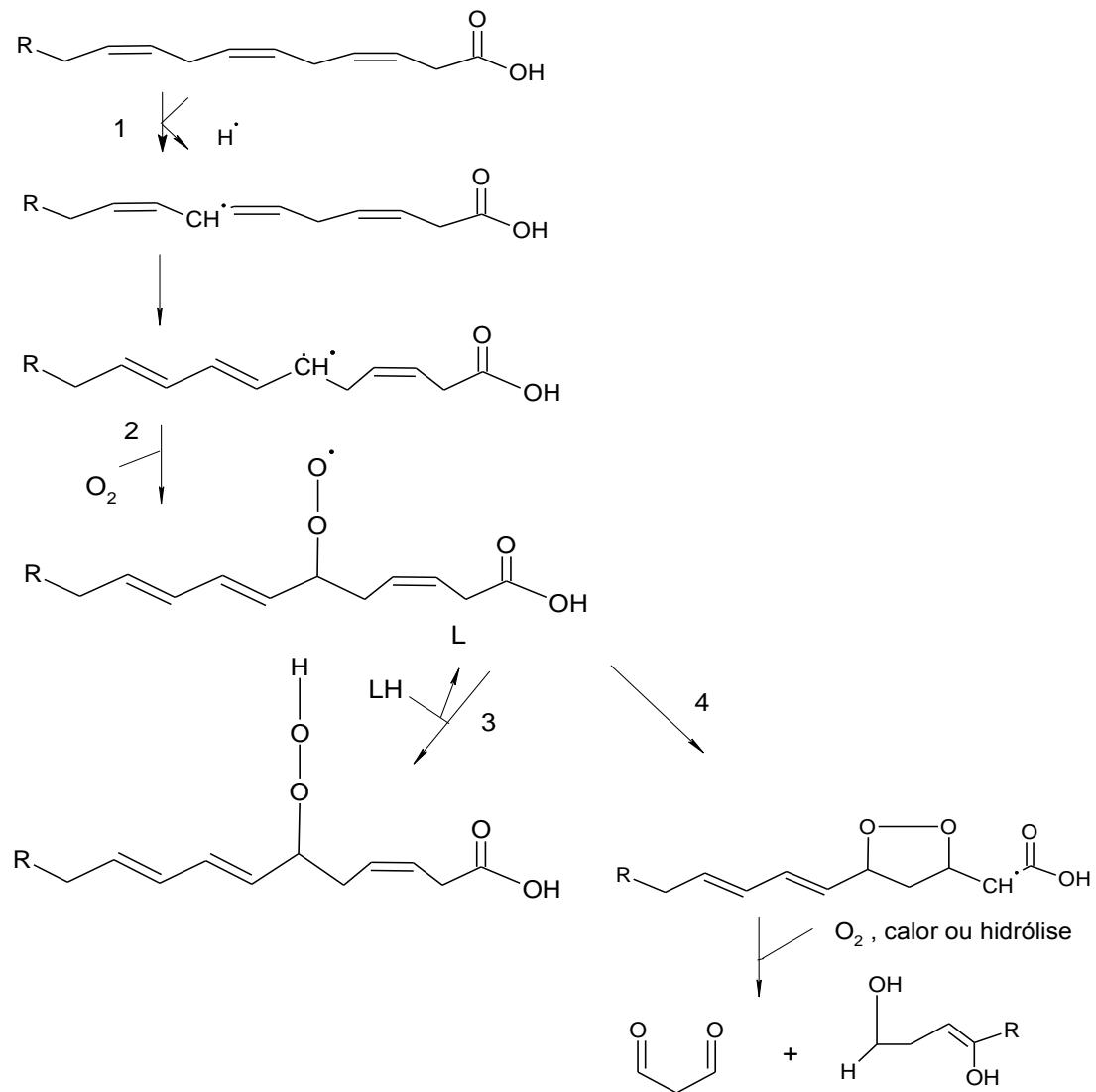


Figura 2. Esquema de lipoperoxidação em ácidos graxos poli-insaturados

A lipoperoxidação pode ser catalisada por íons de ferro. O papel dos metais na formação *in vitro* das EROs é constatado pelas reações de Fenton e Haber- Weiss representadas na Figura 3 (BORG e SCHAICH, 1988).

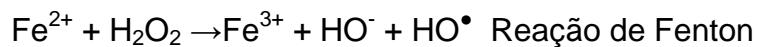


Figura 3. Reação de Fenton e Reação de Haber-Weiss

A lipoperoxidação ocorre em três etapas representadas na Figura 4, onde L representa o lipídio: iniciação, propagação e terminação (GARDÈS-ALBERT; JORE; FERRADINI, 1991).

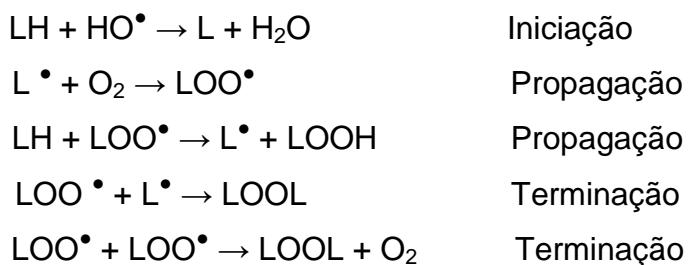


Figura 4. Etapas (iniciação, propagação e terminação) da lipoperoxidação

Na etapa de iniciação ocorre o sequestro do hidrogênio pertencente ao ácido graxo poliinsaturado (LH) da membrana celular. Este sequestro pode ser realizado pelo  $HO^\bullet$ , formando o radical lipídico ( $L^\bullet$ ). Na etapa de propagação, o radical lipídico reage rapidamente com o  $O_2$ , resultando em radical peroxila, que sequestra um novo hidrogênio do ácido graxo polinsaturado, formando novamente o radical lipídico ( $L^\bullet$ ). A terminação ocorre quando os radicais ( $L^\bullet$  e  $LOO^\bullet$ ), produzidos anteriormente reagem até formarem espécies neutras (GARDNER, 1989; KOPPENOL, 1990).

Quando os mecanismos antioxidantes se tornam ineficientes por diversos fatores como, por exemplo, o envelhecimento ou doenças, suplementos alimentares antioxidantes podem ser utilizados para ajudar o organismo a reduzir os danos oxidativos (YANG *et al.*, 2000).

Substâncias antioxidantes são aquelas que, em baixas concentrações em relação ao substrato oxidante, previne ou atrasa a ação destes. Porém, substâncias antioxidantes podem se comportar como pró-oxidantes, possuindo a capacidade de oxidar moléculas alvo, dependendo de sua concentração. Embora substâncias pró-oxidantes sejam vistas como perigosas para a saúde, estudos mostraram que a atividade pró-oxidante está relacionada com a ação antibacteriana e antifúngica (PESARICO *et al.*, 2013).

Também pode atuar em mecanismos antitumorais, induzindo a apoptose, como já reportados para células de glioblastomas humanos (SAKAGAMI e SATOH, 1997). O aumento de EROS, adicional a um efeito enzimático, está documentado como sendo

um mecanismo para a morte, caspase-dependente, de células cancerosas de colo, induzido por derivados de chalconas (KELLO *et al.*, 2016).

Compostos fenólicos são exemplos destas substâncias que apresentam comportamento dual, ou seja, em certas condições estes compostos podem oferecer mais potencial oxidativo do que antioxidante (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002).

## 2.2 COMPOSTOS FENÓLICOS

O estudo de plantas medicinais tem sido incentivado pela Organização Mundial da Saúde desde 1977, com intuito de avaliar cientificamente os benefícios e riscos da utilização de medicamentos fitoterápicos (YUNES e CECHINEL FILHO, 2001).

O uso de extratos vegetais com propriedades biológicas conhecidas apresenta importância nos tratamentos terapêuticos. Tais propriedades biológicas se devem aos compostos sintetizados pelo metabolismo secundário das plantas em resposta a condições de estresse, tais como ferimentos, radiações UV entre outros. Os metabólitos secundários também têm a função de proteger os vegetais contra patógenos e predadores (NACZK e SHAHIDI, 2006). Dentre estes metabólitos, citam-se os compostos fenólicos (NUNAN *et al.*, 1985; LOCHER, *et al.*, 1995; NASCIMENTO *et al.*, 2000).

Os compostos fenólicos contribuem para o sabor, odor e coloração de muitos vegetais, sendo que as principais fontes desses compostos são as frutas cítricas como limão, laranja, e tangerina, além de outras frutas e vegetais como tomate, uva, mamão, ameixa, brócolis, pimenta verde, entre outros (ANGELO e JORGE, 2007; DEGASPARI e WASZCZYNSKY, 2004). Estes compostos podem ser classificados segundo a descrição presente na Figura 5 (SHAHIDI e AMBIGAIPALAN, 2015).

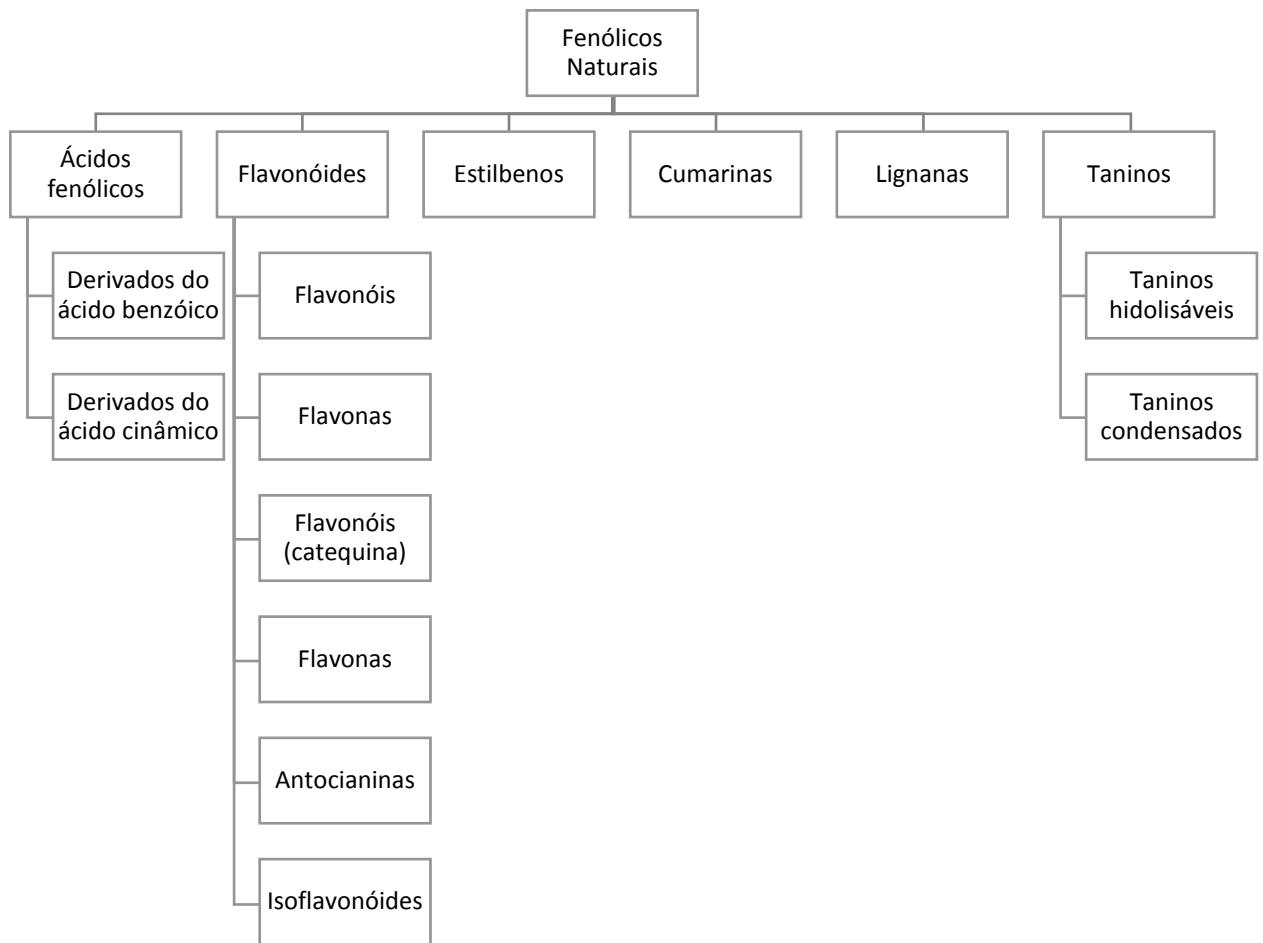


Figura 5. Classificação dos compostos fenólicos naturais

Fonte: Adaptado de Shahide e Ambigapalan, (2015).

Por exemplo, os flavonoides apresentam um esqueleto de difenilpropano, com dois anéis aromáticos (A e B) ligados a um anel pirano (C), Figura 6. O esqueleto apresenta substituintes hidroxilas em diferentes posições. Por exemplo, a quercetina apresenta tais substituintes nas posições 3, 5, 7, 3' e 4' (HAVSTEEN, 2002).

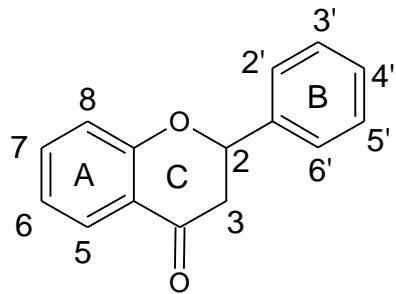


Figura 6. Estrutura básica dos flavonoides

Por apresentarem atividades biológicas como anti-inflamatória, anticarcinogênica, antifúngica, antioxidante, e pró-oxidantes, os compostos fenólicos despertam grande interesse para o emprego farmacêutico (SIMÕES *et al.*, 2000; AJILA; LEELAVATHI; RAO, 2008; PAGNUSSAT *et al.*, 2014). Os compostos fenólicos têm a capacidade antioxidante, não só por doarem hidrogênios e elétrons e serem quelantes de metais, mas por também formarem radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de ácidos graxos e óleos em alimentos (RAFECAS *et al.*, 1998).

A capacidade antioxidante dos compostos fenólicos vai depender do número e da disposições dos grupos hidroxilas presentes nas moléculas (CAO; SOFIC; PRIOR; 1997; SANG *et al.*, 2002). O radical fenoxido é estabilizado por deslocalização de seus elétrons desemparelhados em torno do anel benzênico (Figura 7).

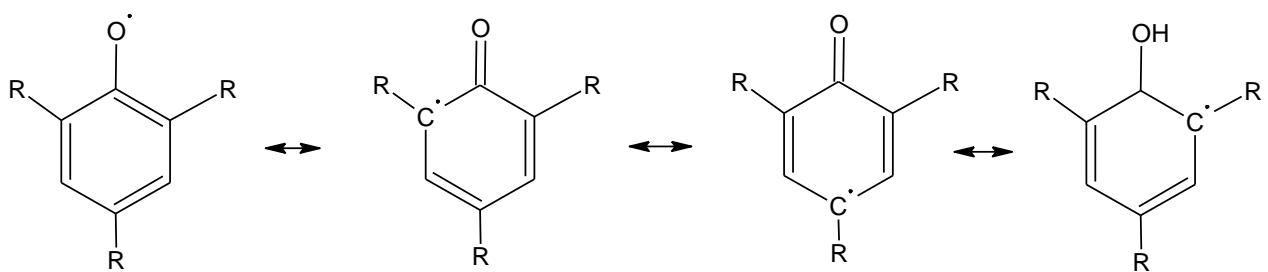


Figura 7. Estabilização dos compostos fenólicos por ressonância

A capacidade antioxidante, bem como a auto-oxidação, dependem de fatores como condições de oxidação e da natureza da substância a ser oxidada (SHAHIDI e NACZK, 2004).

Os flavonóides são capazes de eliminar os radicais livres diretamente por doação de um átomo de hidrogênio, conforme pode ser visto na figura 8, onde  $R\cdot$  é um radical livre e  $Fl-O^\bullet$  é um radical fenóxido.

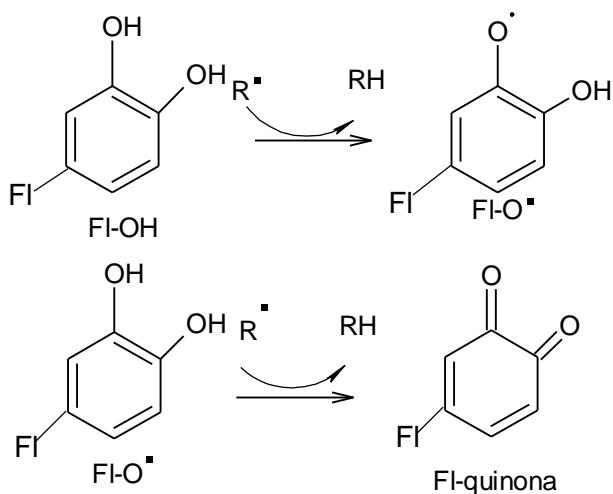


Figura 8. Atividade antioxidante dos flavonóides

Os flavonóides também podem ter efeitos pró-oxidantes, que estão associados ao número total de grupos hidroxilas na molécula. Por exemplo, séries de mono e dihidroxiflavonoides não demonstraram atividade pró-oxidante detectável, enquanto que flavonoides com vários grupos hidroxilas, aumentaram a produção de  $HO^\bullet$  na reação de Fenton (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002; HANASAKI; OGAWA; FUKUI, 1994).

Outro mecanismo pró-oxidante dos flavonoides foi relacionado à interação do radical fenóxido com o oxigênio na presença de níveis elevados de metais de transição, gerando quinonas e  $O_2^\bullet$ . Um exemplo está demonstrado na Figura 9 (AMIĆ *et al.*, 2007).

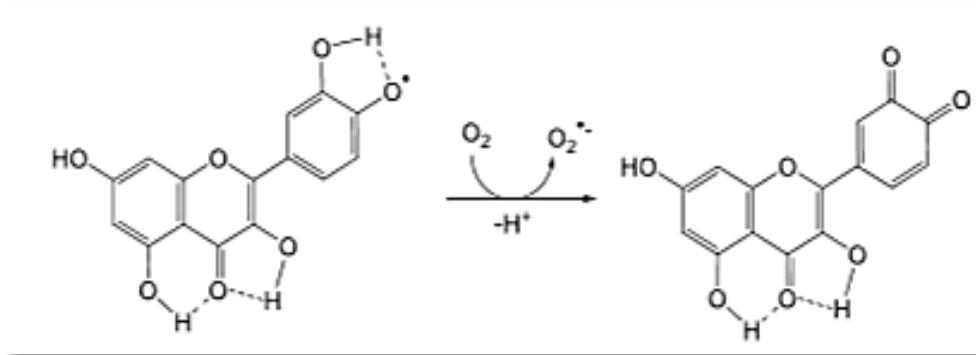


Figura 9. Atividade pró-oxidante dos flavonoides

Como dito anteriormente, compostos fenólicos pró-oxidantes atuam como agentes citotóxicos seletivos contra células cancerosas, através da obtenção de níveis tóxicos das EROs (LEÓN-GONZÁLEZ *et al.*, 2015). Estudos também relacionaram a atividade pró-oxidante com atividade antibacteriana e antifúngica (PESARICO *et al.*, 2013).

Diversos benefícios à saúde foram observados, quando esses compostos são consumidos dentro de suas matrizes de alimentos naturais, tais como em vegetais. Porém, como os compostos não se apresentam em forma isolada, é necessário compreender sua disponibilidade (MCKEVITH, *et al.*, 2003).

### **2.3 *Rapanea ferruginea***

A família *Myrsinaceae* apresenta distribuição pantropical, com cerca de 49 gêneros e aproximadamente 1.500 espécies. No Brasil, totaliza cerca de 100 espécies subordinadas aos gêneros *Ardisia*, *Cybianthus* (*Conomorpha*), *Stylogyne* e *Rapanea* (*Myrsine*) (SOUZA e LORENZI, 2005). O extrato de plantas do gênero *Rapanea* é popularmente usado para pruridos, erupções cutâneas, urticárias, eczemas, reumatismos e doenças hepáticas (LORENZI, 1992).

Apesar do gênero *Rapanea* ser bastante difundido no Brasil e algumas espécies apresentarem propriedades biológicas importantes, não se tem muitas informações referentes à composição química das plantas desse gênero. Estudos já realizados demonstraram que espécie *Rapanea lancifolia* contém flavonoides em sua composição quercetina e taxifolina, (LEITE *et al.*, 2010). Porém, são poucas as referências sobre o

isolamento de compostos em gêneros como *Rapanea* (ORJALA et al., 1993; BLUNT; CHEN; WIEMER, 1998; BALDOQUI et al., 1999; GREEN; TREADWELL; WIEMER, 1999; CHEN et al., 2000; FELD; RICROFT; ZAPP, 2004).

A *Rapanea ferruginea*, (Figura 10) é conhecida popularmente como canela-azeitona, azeitona-do-mato, capororoca e capororoquinha. É uma espécie típica de ambientes úmidos, nativa do Brasil. Compreende árvores de porte médio. Tais árvores são utilizadas para a alimentação da fauna, produção de carvão, na construção civil e na recuperação de áreas degradadas (LORENZI, 2000). O chá das folhas ou decocção da casca é usado na medicina popular como diurético, no combate às afecções de via urinária, e também constitui um bom depurativo (LORENZI, 2000). Já a concocção da casca, raízes e frutas é realizada para tratamentos antihelminticos (KOKWARO, 1993).

O extrato da sua casca tem uso potencial no tratamento de dor e inflamações (BACCARIN et al., 2011). Foram também atribuídas a esta espécie as atividades antiinflamatórias, antinociceptivas e antimicrobianas (CRUZ et al., 2013; BACCARIN et al., 2011; MAKABE, 2003).

Em função das propriedades anti-inflamatórias, que podem estar associadas ao cancer, e antimicrobianas, bem como da presença de compostos fenólicos no gênero *Rapanea* a *Rapanea ferruginea* torna-se uma planta alvo para estudos da sua composição fenólica e de sua atividade oxidante (LEITE et al., 2010).



Figura 10. Folhas da *Rapanea ferruginea*

Com relação à composição química da planta, a partir da *Rapanea ferruginea* já foram isolados os ácidos mirsinóicos A e B (Figura 11). O ácido mirsinóico B: 5-carboxi-7(3",3"-dimetil)-2-(1'-hidroxi-1',5'-dimetilex-4'-enil) 2,3-diidrobenzeno-furano parece ser responsável pela atividade anti-inflamatória, antinociceptiva (BACCARIN *et al*, 2011; BLUNT; CHEN; WIEMER, 1998).

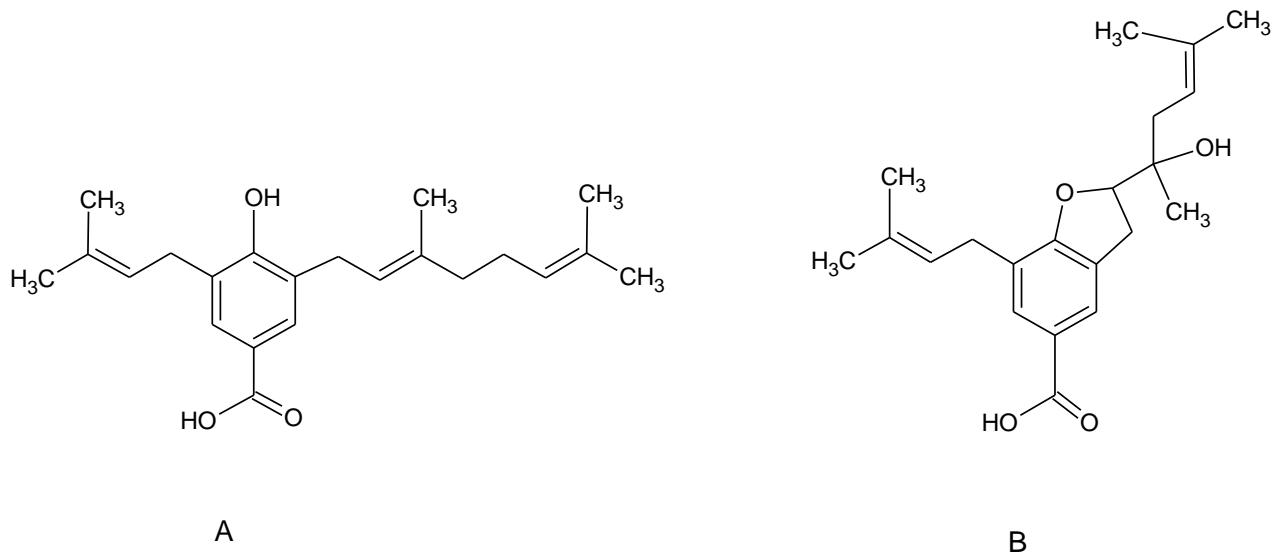


Figura 11. Estrutura dos ácidos mirsinóicos A e B

Para a compreensão das atividades oxidantes dos extratos de *Rapanea ferruginea*, bem como de seu mecanismo de ação em sistemas biológicos, tornam-se importantes os estudos com modelos de membranas biológicas simplificados, tais como os lipossomos (MANSILHA, 2002).

## 2.4 LIPOSSOMOS

O uso de modelos é útil para estudar o efeito de substâncias ativas, em membranas biológicas, visto que esses não apresentam a complexidade das membranas celulares, constituídas por mais de 2000 tipos de lipídios. Os modelos de membranas biológicas são sistemas simplificados, que viabilizam a precisão e interpretação dos dados obtidos a partir destes. Além deste tipo de estudo, alguns modelos de membrana podem ser usados como sistemas carreadores de substâncias ativas, ou fármacos. Sabe-se que, durante um tratamento terapêutico, para obter o efeito desejado, grandes quantidades de substâncias ativas ou fármacos são administrados, o que pode acarretar em um aparecimento de efeitos tóxicos decorrente da ação do fármaco em células ou tecidos saudáveis (de LIMA, 2009). A liberação prolongada de fármacos em sistemas carreadores, constituídos de membranas biológicas, pode potencializar e/ou viabilizar as atividades biológicas das substâncias

extraídas e isoladas de plantas, bem como contribuirá para a redução de sua toxicidade (de LIMA, 2009).

Dentre os modelos de membrana e sistemas carreadores, os lipossomos são estruturas constituídas principalmente de lipídios, como os fosfolipídios, organizados em bicamadas ou lamelas (Figura 12). Cada bicamada possui característica e estrutura de membrana, permitindo a permeação, e difusão das substâncias encapsuladas (RANSON *et al.*, 1997).

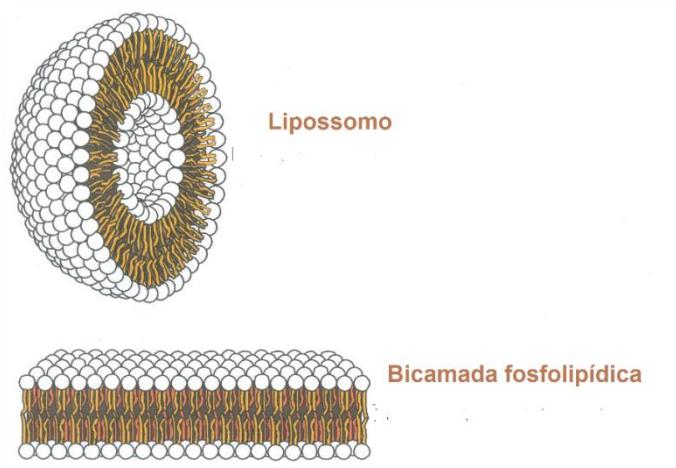


Figura 12. Esquema de um corte transversal de um lipossomo e sua bicamada fosfolipídica

Dentre as matrizes que podem constituir as membranas dos lipossomos, estão as fosfatidilcolinas, fosfolipídios que apresentam uma grande vantagem devido à sua biocompatibilidade, pois são constituintes majoritários das membranas celulares. Também apresentam uma estrutura anfipática, o que permite a associação de compostos de natureza hidrofílica, hidrofóbica e anfifílica tanto no seu interior e como ao longo da bicamada (TIBERG, 2005).

A porção hidrofílica das fosfatidilcolinas, conhecida como cabeça polar, é formada pelo grupo fosfocolina e a porção hidrofóbica, conhecida como cauda apolar, é composta de duas cadeias de ácidos graxos, que podem ser insaturadas ou não, Figura 13 (MERTINS *et al.*, 2008).

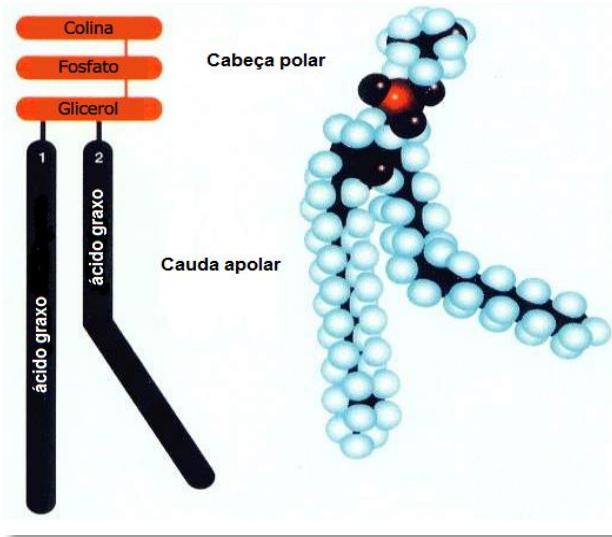


Figura 13. Esquema de uma molécula de fosfatidilcolina

Fonte: Adaptado Torres (2008).

A asolecitina de soja (ASO) é mistura de fosfolipídios, de fonte natural, que contém fosfatidilcolina, mas também fosfatidilinositol fosfato e fosfatidiletanoamina. As fosfatidicolinas presentes na ASO (Figura 14), apresentam ácidos oleico (C 18:1), linoleico (C 18:2) e linolênico (C 18:3) como cadeias hidrofóbicas (Figura 15).

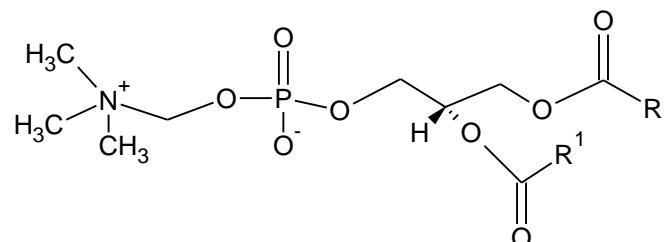


Figura 14. Estrutura da fosfatidilcolina de soja, onde R ou R1 = ácido oléico (C 18:1), linoleico (C 18:2) e linolênico ( C 18:3)

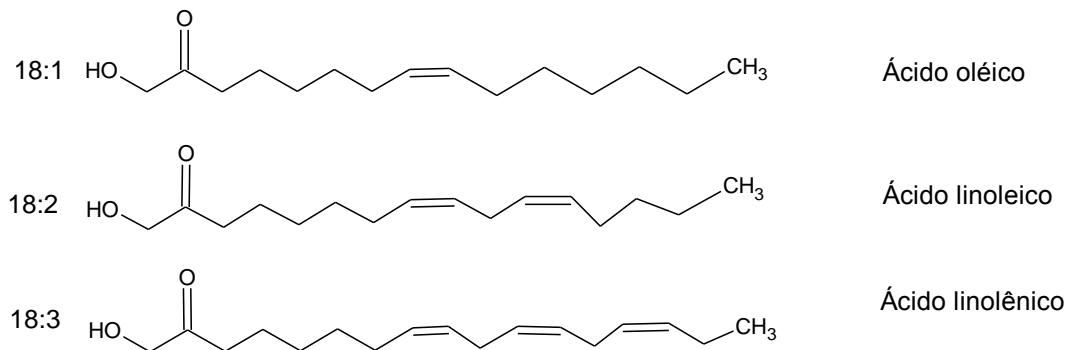


Figura 15. Estruturas dos ácidos oléico, linoleico e linolênico:

De acordo com seu tamanho e número de bicamadas, como pode ser visto na Figura 16, os lipossomos podem ser classificados em vesículas multilamelares grandes multilamelar large vesicles- MLV) que apresentam várias bicamadas e diâmetro variando de 300 a 3500 nm, vesículas unilamelares grandes (unilamelar large vesicles- LUV) que possuem uma única bicamada e diâmetro variando de 200 a 1000 nm e vesículas unilamelares pequenas (small unilamelar vesicles- SUV), que contém uma única bicamada com diâmetro variando de 20 a 50 nm (HOPE *et al.*, 1986).

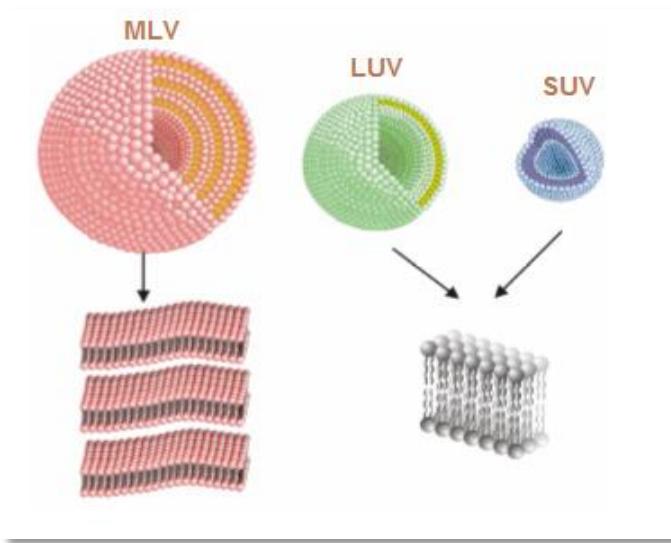


Figura 16. Representações esquemáticas das MLV, LUV e SUV

A incorporação de substâncias ativas em lipossomos baseados em matrizes lipídicas pode alterar a dinâmica destas membranas. Esta dinâmica pode ser conformacional, vibracional, rotacional e translacional. A dinâmica dos lipídios pode ser caracterizada por técnicas não invasivas como Espectroscopia de Infravermelho com

Transformada de Fourier (FTIR), Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

## 2.5 CARACTERIZAÇÃO DA DINÂMICA MOLECULAR DAS MEMBRANAS

Através da técnica de FTIR, utilizando o modo de refletância total horizontal atenuada (HATR-FTIR), é possível obter dados sobre os efeitos da incorporação de substâncias ativas no comportamento dos picos característicos referentes a modos vibracionais de grupos lipídicos presentes nos lipossomos. Para isto, faz-se a análise do número de onda de tais picos, bem como da sua largura.

Para os fosfolipídios, costuma-se analisar os picos referentes a: a) o estiramento axial assimétrico do grupo fosfato ( $\nu_{as}$  PO<sup>2-</sup>, na faixa de 1260-1220 cm<sup>-1</sup>) b) o estiramento axial assimétrico do grupo colina ( $\nu_{as}$  CN<sup>+</sup>C) c) o estiramento axial do grupo carbonila ( $\nu$  C=O, entre 1725 – 1740 cm<sup>-1</sup>) e d) os estiramentos axiais simétrico e assimétrico dos grupo metileno presentes na cadeia acil ( $\nu_s$  CH<sub>2</sub> em 2850 cm<sup>-1</sup> e  $\nu_{as}$  CH<sub>2</sub> em ~ 2920 cm<sup>-1</sup>) (MANRIQUE-MORENO *et al.*, 2010).

Com a técnica de RMN de hidrogênio (<sup>1</sup>H RMN), através das medidas do tempo de relaxação longitudinal (T<sub>1</sub>) é possível analisar alterações na mobilidade dos grupos colina, bem como dos metileno presentes nas cadeias apolares nos lipídios. Os valores de T<sub>1</sub> se relacionam ao tempo de correlação (τ<sub>c</sub>) que é o tempo médio que uma molécula leva para girar em 1 radiano (de LIMA, 2009).

Através da técnica de DSC é possível analisar a variação de entalpia (ΔH) e a temperatura de transição de fase (T<sub>m</sub>) dos lipídios. A temperatura de transição de fase (T<sub>m</sub>) é a temperatura na qual a membrana se encontra em 50% numa fase gel, na qual a cadeia acil está em um estado ordenado, e 50% em uma fase líquido-cristalino, onde as moléculas ficam com movimentos mais livres e os grupos hidrofílicos agrupados tornam-se hidratados tornando a membrana mais fluída (FRÉZARD *et al.*, 2005; LASIC, 1998). A variação de entalpia é o parâmetro que mede a energia, no caso o calor, necessário para que a transição da fase gel para líquido- cristalina se complete.

Durante a análise de DSC é feito um monitoramento da temperatura em função do tempo, onde se obtém uma taxa de aquecimento constante do sistema. Através da

integração da área do pico das curvas de DSC é possível determinar o valor da variação de entalpia durante a transição de fase (de LIMA, 2009).

As transições de fase fosfolipídicas também podem estar associadas às medidas de turbidez. Essas medidas referem-se à densidade óptica, a 400 nm ( $\lambda$  do fosfato lipídico) sendo os espectrômetros de UV-Vis os mais recomendados para realizar essas medidas (YI e MACDONALD, 1973).

Tais técnicas podem fornecer uma caracterização detalhada do efeito do extrato de *Rapanea ferruginea* em lipossomos, que pode complementar ou justificar a sua atividade oxidante.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Obter e caracterizar a composição fenólica, bem como as propriedades oxidantes do extrato de folhas da *Rapanea ferruginea*, na forma livre ou incorporada em lipossomos. Estudar seus efeitos nas propriedades físico-químicas e dinâmica molecular de lipossomos e correlacionar com a atividade biológica.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o extrato a partir das folhas da *R. ferruginea*;
- Determinar e quantificar os compostos fenólicos do extrato por HPLC – DAD;
- Estudar a atividade antioxidante do extrato pelo método de DPPH;
- Determinar a influência do extrato na peroxidação *in vitro* de lipossomos de ASO, induzida por HO<sup>•</sup>, através do ensaio de TBARS;
- Determinar o efeito do extrato sob a inibição da enzima α- amilase;
- Investigar o efeito do extrato da *R. ferruginea* na forma livre em diferentes concentrações na viabilidade celular das linhagens de Glioma através de ensaio de MTT;
- Caracterizar os efeitos dos extratos incorporados em lipossomos através das técnicas de:
  - Infravermelho com Transformada de Fourier, monitorando o número de onda (ou frequência) e alargamento dos picos referentes aos estiramentos axiais presentes em regiões específicas dos lipídios;
  - Ressonância Magnética Nuclear, medindo-se o tempo de relaxação ( $T_1$ ) de hidrogênios presentes na região colina e nos metilenos da cadeia acil dos lipídios;

- Calorimetria de Varredura Diferencial a partir da análise de parâmetros termodinâmicos de variação de entalpia e temperatura de transição de fase dos lipídios.
- Ensaios de turbidez, realizados por espectroscopia de UV-vis nos lipossomos puros ou contendo o extrato incorporado.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 REAGENTES

Para o desenvolvimento do presente trabalho, o lipídio asolecitina de soja (ASO), contendo 25% de PC, e água deuterada foram obtidos da SIGMA-ALDRICH (São Paulo, Brasil). Os solventes clorofórmio e metanol foram obtidos através da SYNTH do Brasil (São Paulo, Brasil). Os demais reagentes utilizados são de grau de pureza analítica.

Os materiais e vidrarias utilizados foram compostos por itens de uso convencional no laboratório, como: bêqueres, erlenmeyers, pipetas, funis simples, provetas, balões volumétricos de 10 mL e 25 mL, garras, suportes, espátulas, eppendorfs, bastões de vidro, dentre outros.

Os equipamentos utilizados neste trabalho foram: placa de aquecimento e agitação magnética modelo 752A Fisatom com potência de 650W (de 120 a 1800 rpm), evaporador rotatório modelo 801A Fisatom de 70W, bomba de vácuo mod. XKM60-1 1/2HP FAMAC, espectrofotômetro de UV-visível Shimadzu UV-2550, espectrofotômetro de FTIR Shimadzu – IR Prestige-21 e espectrômetro de RMN Anasazi Instruments (60 MHz), disponíveis na Universidade Federal do Rio Grande- FURG; calorímetro de varredura diferencial Shimadzu DSC-60 ,disponível na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 Obtenção do extrato

A obtenção do extrato foi realizada no laboratório de pesquisa coordenado pela Prof<sup>a</sup> Neusa de Moura (EQA – FURG-SAP) e foi gentilmente cedido para a realização desse trabalho. As folhas da *Rapanea ferruginea* coletadas no município de Santo Antônio da Patrulha, Rio Grande do Sul, foram secos em estufa com circulação de ar e com temperatura máxima de 35 °C. Após, foram moídas e extraídas com etanol: água (9:1) a frio até a exaustão. O solvente foi evaporado em evaporador rotativo para a obtenção do extrato bruto (extrato hidroalcólico).

#### **4.2.2 Identificação estrutural do extrato**

A identificação estrutural do extrato foi realizada pelo grupo de pesquisa da Prof<sup>a</sup> Neusa de Moura (EQA- FURG-SAP).

##### **4.2.2.1 Determinação dos compostos fenólicos por HPLC-DAD**

As amostras foram diluídas com água destilada e armazenado a 10 °C durante 2 horas, antes de o material foi filtrado através de um papel de filtro Whatman N ° 1.

Alíquotas (5,0 ml) foram carregadas para dentro do cartucho de EFS-C18, o qual foi pré-condicionada sucessivamente com 3,0 mL de metanol e 10 mL de água destilada. Depois que os cartuchos foram ativados e carregadas com o extrato, previamente filtrado com sulfato de sódio anidro, que foram eluídos com metanol. A fração obtida foi armazenada em frascos âmbar, sob N<sub>2</sub> a -18 ° C até a análise cromatográfica. As frações de cromatografia líquida de alta eficiência foram secas sob gás de N<sub>2</sub>, ressuspensas em 500 µL de acetonitrila e filtradas através de um filtro de nylon de 0,22 µm (SCORDINO *et al.*, 2011).

A determinação qualitativa e quantitativa dos compostos fenólicos utilizada na cromatografia líquida de elevado rendimento acoplado com detecção de diodo (CLAE-DAD / UV-Vis) foi realizada com o sistema HPLC final 3000 (Thermo Scientific), final da bomba 3000, compartimento de amostra final de 3000, detector de fotodiodo e software de Chromeleon. A coluna de fase inversa Acclaim ® 120, 5 mm C18 120A (4,6 mm x 250 mm) foi utilizada para a separação de compostos fenólicos. A coluna foi mantida a 40 ° C e analisadas para os seguintes comprimentos de onda de interesse: 280, 300 e 320 nm. O volume de injeção foi de 10 L. As fases móveis foram de água acidificada com ácido fosfórico e 1% de metanol. A eluição dos compostos fenólicos foi realizada utilizando o seguinte modo de gradiente: 0-15% de B durante 2 min, 15-25% de B durante 5 min, 25-30% de B durante 10 min; 30-35% de B durante 15 min; 35 - 50% de B durante 25 min; 50-60% de B durante 30 min; 60-80% de B durante 35 min; 80-100% de B durante 45 min e 100-5% de B durante 60 min. Os compostos fenólicos foram identificados e quantificados a partir da análise de padrões de compostos fenólicos (Sigma-Aldrich, 98% de pureza) em condições analíticas idênticas utilizadas nas amostras. Os parâmetros de identificação aplicados foram semelhança espectral,

coincidindo com os tempos de retenção e a pureza espectral dos picos para os tempos de retenção de interesse. A quantificação foi realizada usando padrões externos e curvas de diluição de 6 pontos (feito em triplicata) e um  $R^2$  0,9 para cada padrão individual.

#### 4.2.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de DPPH

Para se determinar a atividade antioxidante do extrato foi utilizado o método do radical DPPH (2,2,-difenil-1-picrilhidazila). Neste método, a amostra reage com o radical DPPH, que tem uma coloração púrpura, reduzindo-o a 2,2-difenil-1-picrilhidrazina, de coloração amarela, conforme reação apresentada na Figura 17. Esta mudança de coloração pode ser monitorada pela medidas das absorvâncias em espectrômetro na região do visível.

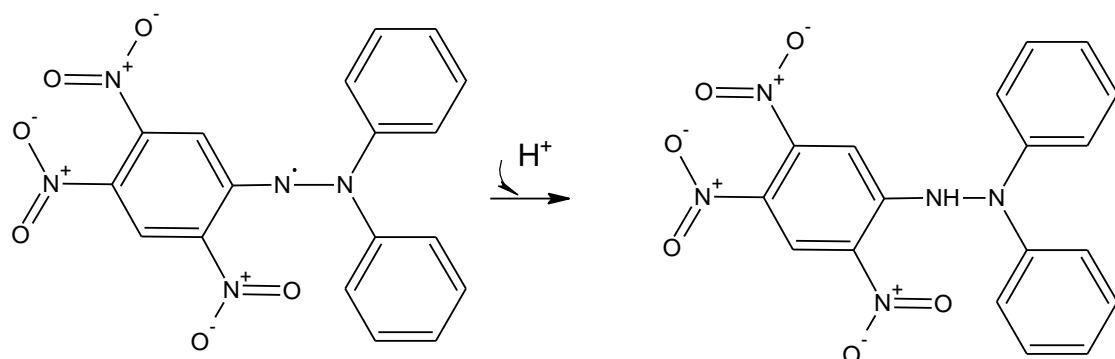


Figura 17. Reação de oxidação do radical DPPH para sua forma reduzida

Assim sendo, em tubos de ensaio, foi adicionado 2,5 mL de solução do extrato e metanol e 1mL do padrão de DPPH ( $1 \times 10^{-4}$  mo/L), de modo que o volume total final fosse de 3,5 mL, utilizando-se metanol para as sucessivas diluições. As leituras das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro de UV- Vis a 517 nm, e convertida para percentagem de atividade antioxidante (% AA) através da equação 1 (SAURA-CALIXTO et al.,2007).

$$\% AA = 100 - \left\{ \left[ \frac{\text{Abs DPPH amostra} - \text{Abs amostra}}{\text{Abs DPPH } 100\%} \right] \right\} \quad (\text{Equação 1})$$

#### 4.2.4 Preparação dos lipossomos e incorporação do extrato

Os lipossomos de ASO foram preparados em determinadas concentrações (descritas nos métodos a seguir) através do método de hidratação de vesículas (HOPE *et al.*, 1986), que consta na co-solubilização dos lipídios em solventes orgânicos, seguido da evaporação do solvente e formação de um filme lipídico a ser hidratado com água. Este, após agitação em vortex, formou vesículas multilamelares grandes. O extrato foi incorporado durante as etapas iniciais do preparo dos lipossomos, em função de sua polaridade (Figura 18).

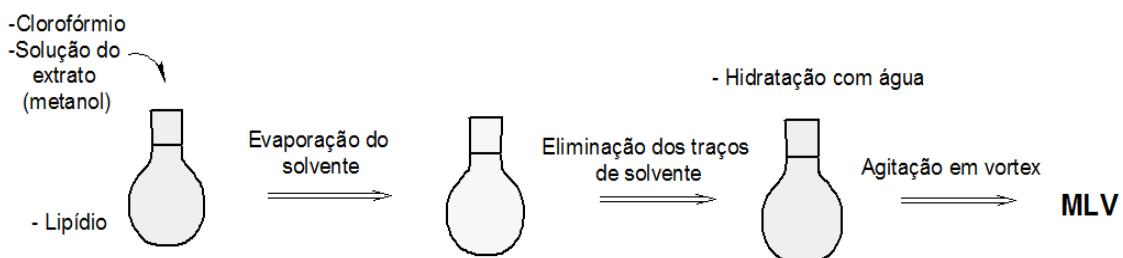


Figura 18. Método de Hidratação de Vesículas para formação de MLV

#### 4.2.5 Ensaio de peroxidação lipídica (TBARS)

A peroxidação lipídica nos lipossomos de ASO foi induzida por geração de radical hidroxil ( $\text{HO}^\bullet$ ), via reação de Fenton. Adicionou-se tampão fostato de potássio 10 mM pH 7,4, cloreto férrico 0,02 mM, ascorbato 0,1 mM e peróxido de hidrogênio 2,8 mM a um meio reacional contendo lipossomos (12,5 mg/mL de fosfolipídios). A avaliação da inibição da peroxidação lipídica foi feita através da adição de diferentes concentrações da solução do extrato neste meio. Para isso, foram feitos dois experimentos controle. O primeiro continha todos os reagentes no meio reacional, exceto os lipossomos, para que os valores das absorbâncias foram subtraídos dos valores detectados com os lipossomos, para o tratamento de dados. No segundo

controle, foi avaliado os valores de absorvâncias relativos a peroxidação basal, induzida pelo oxigênio do ar, na ausência das espécies oxidantes no meio de reação. Esses valores também foram descontados dos valores obtidos com as amostras contendo os lipossomos e o extrato. As amostras e os controles foram incubados durante 30 minutos a 37 °C (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000; BIRD e DRAPER, 1984). As amostras foram então avaliadas pelo método de TBARS, que detecta a formação de um complexo de coloração rósea através da reação entre o malonildialdeído, produto majoritário da lipoperoxidação, e ácido tiobarbitúrico (TBA) em pH ácido, obtido pela adição de ácido tricloroacético (TCA) (Figura19).

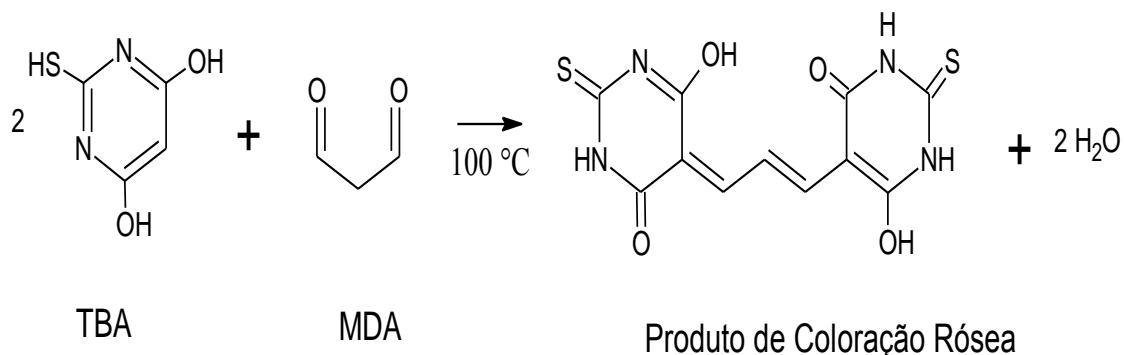


Figura 19. Reação entre o malonildialdeído produto majoritário da lipoperoxidação e TBA

A extensão da lipoperoxidação nas membranas foi então detectada se quantificando-se as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico usando espectroscopia de UV-Visível a um comprimento de onda de 535 nm (BIRD e DRAPER, 1984).

#### **4.2.6 Inibição da enzima $\alpha$ -amilase, para avaliação de possível atividade antifúngica**

A atividade de inibição de  $\alpha$ -amilase foi conduzida conforme descrito na Figura 20, realizando-se 2 experimentos principais. No experimento 1, foi avaliada a atividade enzimática de  $\alpha$ -amilase sem a presença do inibidor, adicionando água ao invés do inibidor. No experimento 2 foi verificada a inibição da enzima em presença do extrato. O percentual de inibição foi avaliado pela diferença das absorvâncias entre o experimento 1 e 2. O tampão utilizado foi tampão de ácido cítrico-fosfato de sódio 0,1M (pH 6,0).

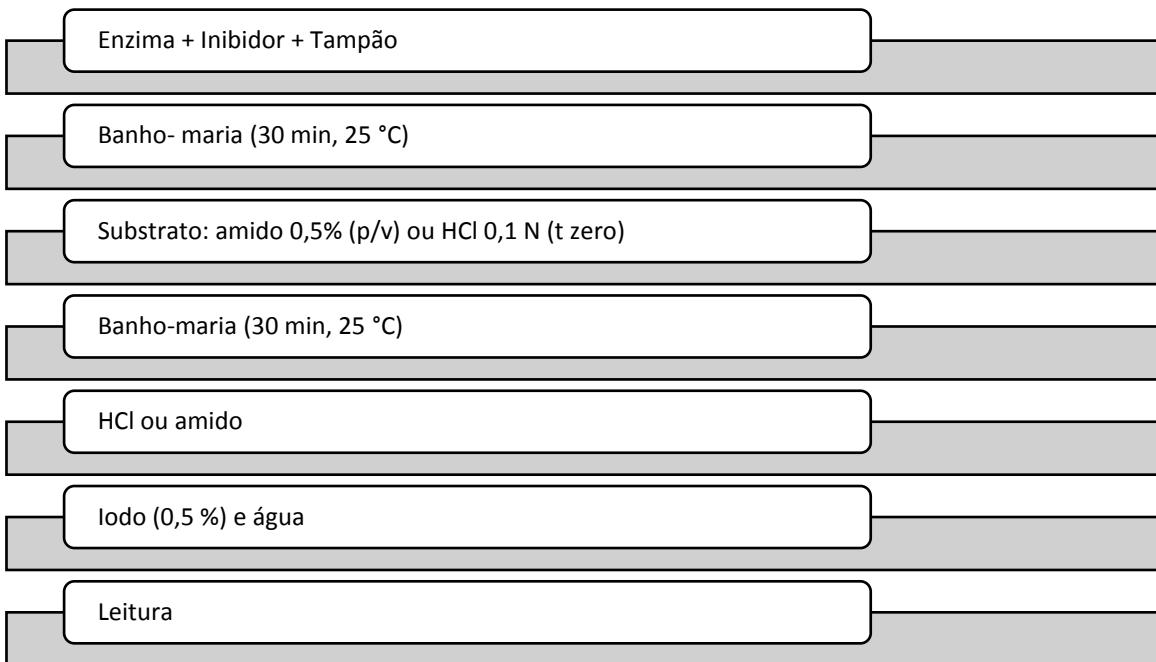


Figura 20. Fluxograma do experimento da determinação da atividade de inibição da α-amilase

Para determinar o efeito do extrato das folhas de *R. ferruginea* na inibição da α-amilase, foram utilizados alíquota de 100 µL do extrato livre e incorporado em lipossomos diluídas em 900 µL de água destilada e testados 200 µL contra a atividade da α-amilase

#### 4.2.7 Ensaio Antitumoral in vitro: MTT Ensaio de Viabilidade Celular

O ensaio antitumoral in vitro realizado foi o MTT (3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio), um ensaio colorimétrico de proliferação celular, que consiste na quantificação da habilidade das células viáveis reduzirem o sal amarelo de tetrazólio a cristais de formazan (cristais púrpura), usando uma enzima mitocondrial denominada succinato desidrogenase. O ensaio detecta células metabolicamente ativas (MOSMANN, 1983).

O ensaio foi então feito através da redução colorimétrica do MTT à formazan. Resumidamente, as linhagens celulares C6 (glioma murino) foram subcultivadas em placas de 96 poços de cultura de tecidos contendo  $1 \times 10^3$  células por poço, por 24h de cultura. Em seguida, as células foram expostas ao tratamento com o extrato na concentração de 100 µM. Depois de 48 h de tratamento, o ensaio de MTT foi realizado

de acordo as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos como absorvância a 492 nm.

#### **4.2.8 Análise Estatística**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e submetidos à análise one-way de variância (ANOVA) seguida do teste post-hoc de Tukey-Kramer (para múltiplas comparações). As diferenças entre os valores médios foram considerados significativos quando  $P < 0,05$ .

#### **4.2.9 Ensaios de HATR-FTIR**

Os espectros de FTIR dos modelos de membranas puros na concentração de 100 mg/mL e contendo o extrato a 10 mg/mL (razão 1:10 m/m, extrato lipídio) foram obtidos em espectrofotômetro Shimadzu-IR Prestige-21 (disponível na FURG), com cristal de refletância total atenuada horizontal (HATR). Os interferogramas foram obtidos através de 50 varreduras a uma resolução de  $2\text{ cm}^{-1}$ , com leituras na região de 4000 a  $400\text{ cm}^{-1}$ . Foi analisada a variação do valor da frequência e alargamento a 75% da altura de picos referentes aos estiramentos axiais dos grupos presentes em regiões de grupos característicos dos lipossomos, tais como: a) o estiramento axial assimétrico do grupo fosfato ( $\nu_{\text{as}} \text{PO}_4^{2-}$ , na faixa de  $1260\text{-}1220\text{ cm}^{-1}$ ) b) o estiramento axial assimétrico do grupo colina ( $\nu_{\text{as}} \text{CN}^+\text{C}$ ) c) o estiramento axial do grupo carbonila ( $\nu \text{C=O}$ , entre  $1725\text{ - }1740\text{ cm}^{-1}$ ) e d) os estiramentos axiais simétrico e assimétrico dos grupo metileno presentes na cadeia acil ( $\nu_s \text{CH}_2$  em  $2850\text{ cm}^{-1}$  e  $\nu_{\text{as}} \text{CH}_2$  em  $\sim 2920\text{ cm}^{-1}$ ) (MANRIQUE-MORENO *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2000).

#### **4.2.10 Experimentos com RMN**

As medidas de  $T_1$  de  $^1\text{H}$  dos grupos presentes nos lipossomos, foram obtidas em equipamento Anasazi Instruments 60 MHz (disponível na FURG). Os lipossomos de 100 mg/mL e contendo o extrato a 10 mg/mL (razão 1:10 m/m, extrato lipídio) contendo solvente  $\text{H}_2\text{O}: \text{D}_2\text{O}$  (80:20, v,v) foram analisados aplicando-se uma sequência de pulsos de recuperação da inversão nas amostras (de LIMA *et al.*, 2007; FEIGENSON e CHAN, 1974).

#### **4.2.11 Medidas de DSC**

Os ensaios de DSC foram realizados em calorímetro de varredura diferencial Shimadzu DSC-60 , disponível na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os lipossomos de ASO a 100 mg/mL e contendo o extrato a 10 mg/mL (razão 1:10 m/m, extrato lipídio) foram depositados em recipientes de alumínio e foram submetidos a varreduras efetuadas a uma velocidade de 10 °C/min, em faixa de temperatura -40 ° C a -5 ° C, tendo como referência um recipiente de alumínio vazio. Foram analisados os parâmetros referentes à variação de entalpia e a temperatura de transição de fase (de LIMA *et al.*, 2007; FEIGENSON e CHAN, 1974).

#### **4.2.12 Medidas de Turbidez**

As medidas da turbidez de lipossomos contendo ASO de 100 mg / mL, puros ou contendo extrato 10 mg/mL (razão 1:10 m/m, extrato lipídio) foram realizadas a 400 nm por meio de espectroscopia de UV-vis em um aparelho Shimadzu UV-2550 disponível na FURG. Foram utilizadas células de quartzo com um caminho óptico de 1 cm (HOPE *et al.*, 1986).

## 5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS POR HPLC-DAD

A Tabela 1 mostra os compostos fenólicos identificados no extrato da folha da *R. ferruginea* obtidos por HPLC-DAD.

Tabela 1.Compostos fenólicos identificados por HPLC –DAD no extrato da folha da *R. ferruginea*

Compostos fenólicos identificados	mg/100 g de peso seco
Ácido siríngico	1290
Ácido trans-cinâmico	424
Ácido gálico	50
Quercetina	209
Quercetrina	390
Catequina	270

Entre os compostos encontrados no extrato da folha da *Rapanea ferruginea*, estão os derivados do ácido benzoico, ácido cinâmico, e flavonoides. Estes compostos estão amplamente distribuídos no reino vegetal (SIMÕES *et al.*, 2000).

Entre os derivados do ácido benzoico, estão o ácido siríngico e o ácido gálico. O ácido siríngico (ácido 4- hidroxi-3,5-dimetoxibenzólico), cuja estrutura está representada na Figura 21, é obtido em plantas após a hidrólise ácida de folhas de gimnospermas e angiospermas e possui estreita relação com a composição da lignina (SIMÕES *et al.*, 2000).

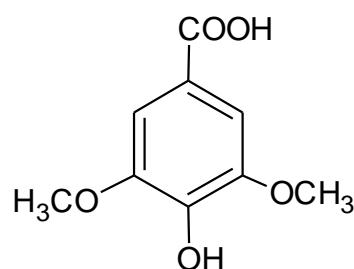


Figura 21. Estrutura do ácido siríngico

Muthukumaran *et al.*, (2013), sugeriram em seu trabalho que o ácido siringico isolado da *Alpinia calcarata Roscoe*, uma planta bem conhecida na medicina tradicional indiana, tem um efeito antidiabético em diabetes experimental.

O ácido gálico (ácido 3,4,5-tridroxibenzólico), Figura 22, um composto fenólico trihidroxilado, é um intermediário do metabolismo secundário, e provindo dos taninos hidrolisáveis nas plantas (GRUNDHÖFER *et al.*, 2001).

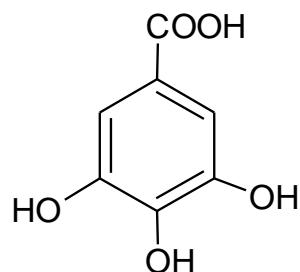


Figura 22:Estrutura do ácido gálico

O ácido gálico pode ser obtido a partir da hidrólise ácida de taninos hidrolisáveis, (da SILVA 1970). Guven e colaboradores (1974) obtiveram o ácido gálico a partir de plantas. Chien-Chin e colaboradores (1985), isolaram ácido gálico na *Bauhinia championni*. Carlos e colaboradores (2005), encontraram ácido gálico nos extratos metanólicos e etanólicos da *Davilla elliptica*.

Plantas ricas em taninos são utilizadas na medicina popular no tratamento diarreia, hipertensão, reumatismo entre outros (SIMÕES *et al.*, 2000). Foi relatado que o ácido gálico apresenta atividade antimarialária (THOMPSON; MOORE; REINERTSON, 1953) como também atividade antifúngica (MAHADEVAM e REDDY, 1968). Foi também relatada a atividade de antimutagenicidade e antitumoral no ácido gálico, para células de glioblastoma humano e de leucemia (SAKAGAMI & SATOH, 1997; INOUE *et al.*, 1995).

O ácido cinâmico (3-fenil-2-ácido propenoíco), Figura 23, é um ácido aromático de ocorrência natural em plantas superiores e encontrado em óleo de canela (*Cinnamomum verum*) e folhas de coca (*Erythroxylum coca*). A estrutura de sua molécula normalmente é encontrada na configuração trans.

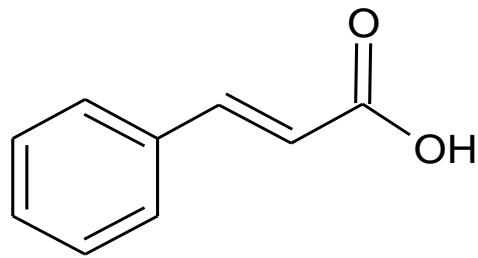


Figura 23. Estrutura química do ácido trans-cinâmico

Ekmekcioglu, Feyertag e Marktl, (1998), mostraram que o ácido cinâmico é um eficaz agente terapêutico antimicrobiano e antifúngico. O ácido cinâmico também é um dos principais componentes do óleo do cravo da índia, que possui atividade antimicrobiana relatada frente a inúmeros micro-organismos (DORMAN e DEANS, 2000).

Ekmekcioglu, Feyertag e Marktl, (1998), mostraram que o ácido cinâmico é um eficaz agente terapêutico antimicrobiano e antifúngico. O ácido cinâmico também é um dos principais componentes do óleo do cravo da índia, que possui atividade antimicrobiana relatada frente a inúmeros micro-organismos (DORMAN e DEANS, 2000).

A queracetina, quercetrina e a catequina fazem parte do grupo do grupo dos flavonóides, presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários dos vegetais. Os flavonóides representam um dos grupos fenólicos mais importantes entre os produtos de origem natural e é amplamente distribuída no reino vegetal (SIMÕES *et al.*, 2000).

A queracetina ( 3,5,7,3',4' pentahidroxi flavona) cuja estrutura está representada na Figura 24, é um dos principais flavonóides presentes na dieta humana (MATDUBARA & RODRIGUEZ-AMAYA, 2006; HERTOG *et al.*, 1993). A queracetina parece ser um agente em potencial para o tratamento de câncer primário de fígado (BRITO *et al.*, 2016).

Também foi documentado que a queracetina aumenta a sensibilidade linhagens celulares de medulloblastoma à radioterapia, ou seja, é um radiosensibilizador (LAGERWEIJ *et al.*, 2016).

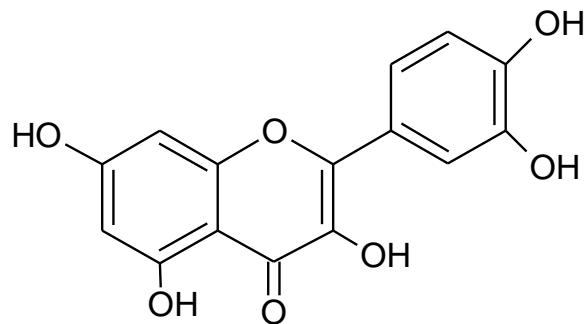


Figura 24. Estrutura da quercentina

A quercentrina (Figura 25) é um flavonóide amplamente encontrado nas plantas e um componente comum da dieta humana.

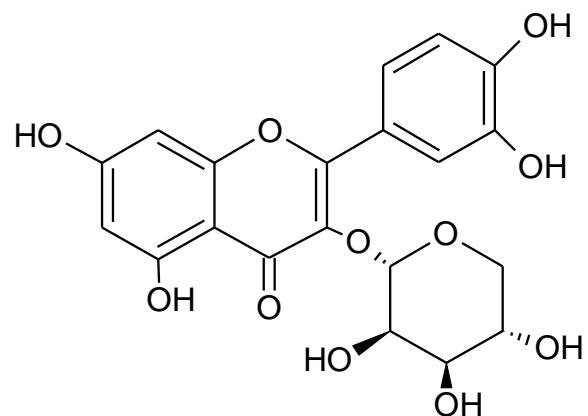


Figura 25: Estrutura da quercentrina

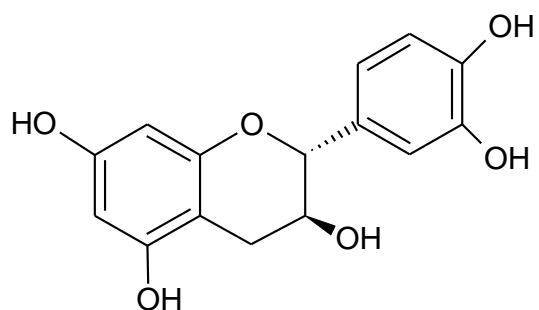


Figura 26: Estrutura da catequina

Catequinas (Figura 26) são flavonóides do tipo flavon-3-ol são os principais componentes dos chás verdes, constituem de 25 a 30 % do peso seco das folhas do chá, que lhe conferem um sabor amargo e adstringente (RUAN *et al.*, 2007b; HIGDON

e FREI, 2003). Catequinas inibem a proliferação de linhagens de câncer de mama por morte celular via apoptose, através de um mecanismo envolvendo a geração de espécies reativas de oxigênio, ou seja, pró-oxidante (FARHAN *et al.*, 2016).

As atividades biológicas descritas para os componentes fenólicos apontam ser importante obter informações sobre as atividades biológicas, tais como oxidantes, anti-fúngicas e antitumorais, do extrato das folhas da *R. ferruginea*.

## 5.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE DPPH

Os resultados dos ensaios de DPPH do extrato da folha da *Rapanea ferruginea* na forma livre (não incorporado em lipossomos) estão apresentados na Figura 27 e Tabela 2.

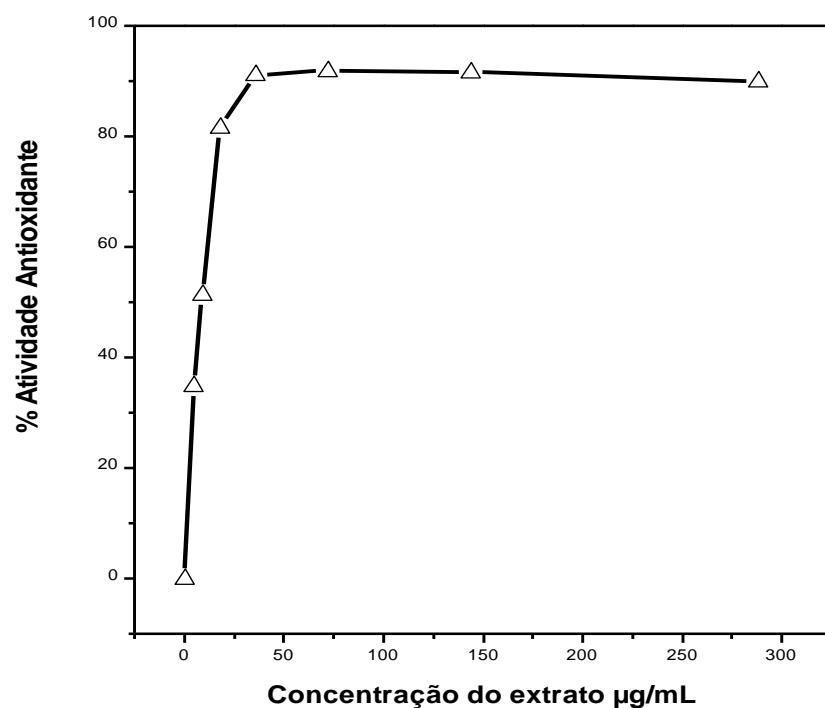


Figura 27. Atividade do extrato da folha da *Rapanea ferruginea* observado em ensaio de DPPH

Tabela 2.Percentual de atividade antioxidante do extrato da folha da *Rapanea ferruginea* observado em ensaio de DPPH.

Experimento	Concentração do extrato µg/ mL	% Atividade Antioxidante
Controle	-	-
Experimento 1	4,5	34,88
Experimento 2	9	51,37
Experimento 3	18	81,60
Experimento 4	36	91,20
Experimento 5	72	91,75
Experimento 6	144	91,54
Experimento 7	288	90,06

Através do gráfico (Figura 27) que relaciona a percentagem da atividade antioxidante com as concentrações do extrato, bem como os dados expressos na Tabela 2, pode-se observar que, à medida que a concentração do extrato foi aumentada, ocorreu também um aumento da atividade antioxidante do extrato. Este comportamento ocorreu até a concentração de 72 µg/mL, onde atingiu a saturação e a partir desse ponto a atividade antioxidante do extrato se torna constante. A partir da Figura 27 pode-se determinar a da concentração máxima inibitória para metade da ação antioxidante do extrato ( $IC_{50}$ ) como sendo a de 7,8 µg/ mL. Isto indica que o extrato da folha da *Rapanea ferruginea* possui um elevado potencial redutor quando na forma livre. Sousa *et al.*, (2007), determinaram a atividade antioxidante de cinco plantas medicinais brasileiras. Este estudo demonstrou que a relação da atividade antioxidante e conteúdo fenólico foi positiva e significativa para *T. brasiliensis*, *C. macrophyllum* e *C. Cerifera*. Soares *et al.*, (2008), também demonstraram a relação do conteúdo fenólico total da casca das uvas Niáraga (*Vitis labrusca*) e Isabel (*Vitis labrusca*) com a atividade antioxidante das mesmas. Assim, a alta capacidade antioxidante do extrato

da *Rapanea ferruginea* está relacionada com o conteúdo de compostos fenólicos do extrato.

### 5.3 INFLUÊNCIA DO EXTRATO SOBRE A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA IN VITRO EM LIPOSSOMOS DE ASO

Para determinar a influência do extrato da folha sobre a peroxidação *in vitro* em membranas, lipossomos de ASO puro e contendo extratos na forma livre e incorporada em diferentes concentrações (variando de 0 a 5 µg/ mL) foram submetidos a oxidação via radical hidroxil ( $\text{HO}^\bullet$ ) e após foram medidas as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA). As Figuras 28 e 29 mostram o efeito das quantidades crescentes de extrato, na forma livre e incorporada, respectivamente, na porcentagem de peroxidação *in vitro* em lipossomos de ASO.

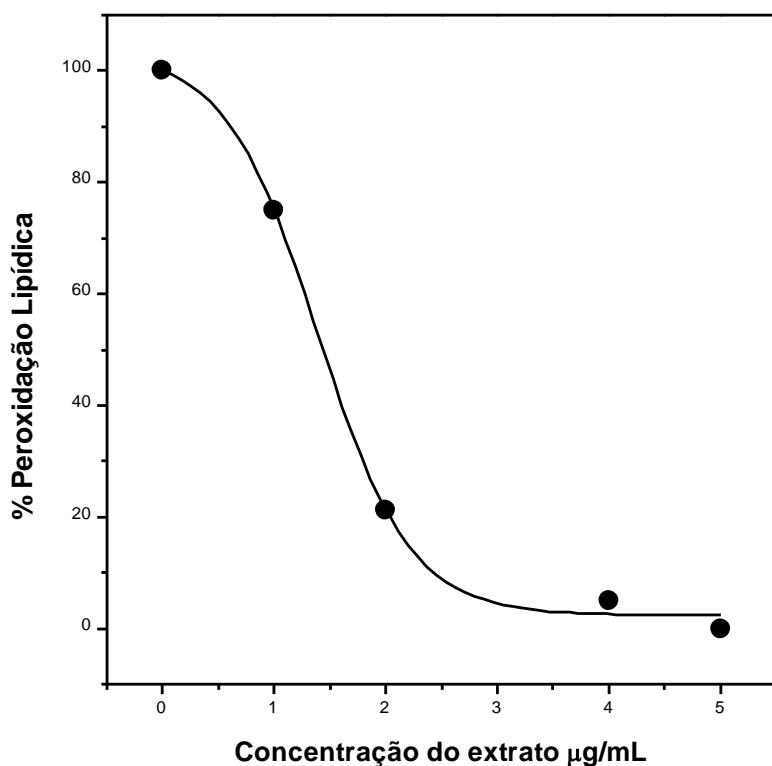


Figura 28. Porcentagem de peroxidação lipídica em lipossomos, induzida por radical hidroxil ( $\text{HO}^\bullet$ ), em função do aumento das concentrações do extrato livre em lipossomos de ASO, obtida pelo método de TBARS

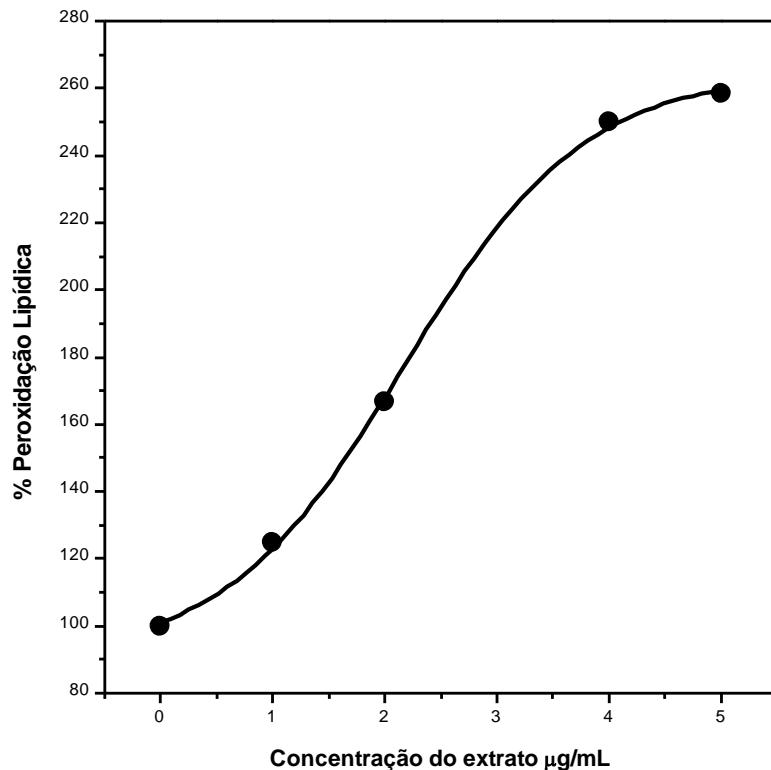


Figura 29. Porcentagem de peroxidação lipídica em lipossomos, induzida por radical hidroxil ( $\text{HO}^\bullet$ ), em função do aumento das concentrações do extrato incorporado em lipossomos de ASO, obtida pelo método de TBARS

Na forma livre (Figura 28), a concentração do extrato inibitória para a peroxidação lipídica em 50 % ( $\text{IC}_{50}$ ) foi atingida em 1,43 µg/mL. Com a adição de 3 µg/mL do extrato, houve uma redução de 95% nos níveis de peroxidação lipídica. Pode-se observar que na forma livre à medida que a concentração do extrato foi aumentada, ocorreu também um aumento na atividade antioxidante. Vale ressaltar que em extratos de olivas, uma redução da peroxidação lipídica induzida por cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) de 94% foi obtida e relacionada com um conteúdo total de fenóis de 150mg/ g de extrato. O conteúdo fenólico de tal extrato refere-se a tirosol, oleuropeína, ácido siríngico, ácido gálico, dentre outros (MCDONALD *et al.*, 2001). Assim, é possível que a atividade antioxidante do extrato das folhas esteja relacionado ao tipo de composto fenólico presente em seu conteúdo.

Compostos fenólicos podem atuar como antioxidantes por eliminação de radicais, no qual eles quebram a reação em cadeia de radicais livres através da reação de doação de um átomo de hidrogênio. Outro mecanismo possível é através da

quelação de metais, restringindo o acesso desses íons metálicos na participação de reações tipo Fenton (LARSON, 1988; RATYY; SUNAMOTO; DAS, 1988; SHARMA, 1976).

Entretanto, o extrato da folha de *Rapanea ferruginea*, quando na forma incorporada em lipossomos apresentou caráter pró-oxidante, diretamente proporcional a sua concentração como pode-se observar no gráfico da Figura 29.

O efeito pró-oxidante se dá por auto-oxidação molecular podendo também danificar macro moléculas (OCHIAI *et al.*, 1984; SAWA *et al.*, 1999; CHENG; LI; CHANG, 2003). Estudos mostraram que a presença de metais de transição ou de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode reduzir a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos. O aumento na atividade na atividade pró-oxidante de fenóis na presença de Fe(III) ou Cu(II) foi associada com a sua capacidade para reduzir o íon metálico Fe<sup>2+</sup> e Cu<sup>1</sup> que podem ser reoxidados em reações de Fenton, formando assim radicais hidroxilas e outras EROs (RODTJER; SKIBSTED; ANDERSEN, 2006; KUMAMOTO *et al.*, 2001).

Hu, Zhong e Kitts, (2000), relataram em seu trabalho um efeito oxidante duplo para o extrato da folha de Bambu (*Phyleosta chys niagra*) que apresentou tanto uma atividade antioxidante, que foi atribuída à eliminação de radicais livres e uma atividade pró-oxidante resultante do poder redutor de compostos fenólicos de plantas na presença de metais de transição.

Fukumoto e Mazza, (2000), relataram que ácidos benzóicos e derivados do ácido cinâmico, podem se comportar como substâncias pró-oxidantes dependendo de sua concentração. Em ensaios de lipoperoxidação pelo método de TBARS, tais autores, relataram que o ácido siríngico apresentou atividade pró-oxidante na concentração de 5 µM.

Os flavonóides, assim como os ácidos fenólicos, podem atuar como pró-oxidantes, sob certas condições. As propriedades pró-oxidantes dos flavonoides também dependem da sua concentração. Por exemplo, a quercetina nas concentrações de 1-50 µM reduziu os níveis de lesões oxidativas ao DNA induzidas pelo ânion superóxido, enquanto a 100 µM a quantidade de danos a biomoléculas foi aumentada por ação pro-oxidante (WILMS *et al.*, 2008). Assim atividade anti/ pró-oxidante do extrato vai depender de diversos fatores como concentração do íon metálico de transição e concentração dos compostos fenólicos.

Sendo assim, é possível que o comportamento anti/ pró-oxidante do extrato possa ser atribuído às concentrações dos compostos fenólicos identificados no extrato. Outro fator a ser considerado no efeito pró-oxidante do extrato da folha de *R. Ferruginea* é a sua interação com os lipossomos.

Krilov, Kosovic e Serec (2014), propuseram em seu estudo espectroscópico sobre a interação do alfa tocoferol com lipossomos e a sua influência na oxidação das membranas que, dependendo da localização que se encontra no lipossomo, o alfa tocoferol se comportou como antioxidante ou pró-oxidante. Quando incorporado na membrana esse composto tem maior interação com os grupos metilenos, que estão abaixo da superfície, já quando é adicionado após a formação das vesículas de lipossomos é parcialmente incorporado na camada da superfície.

A atividade antioxidant do extrato na forma livre e pró-oxidante na forma incorporada em lipossomos estão relacionadas às alterações provocadas pelas membranas, que pode servir como “barreira”, na interação entre radical livre e componente do extrato. Na forma livre, o extrato pode interagir mais rapidamente com o radical HO<sup>•</sup>, inibindo o efeito oxidante nas membranas. Já na forma incorporada, o extrato, através de seus componentes que podem atuar como pró-oxidantes, permite a oxidação da membrana ou, ao oxidar-se após interação com o radical, pode atuar como radical livre nas membranas (Figura 30). Em função deste efeito duplo, é possível modular o efeito do extrato (de anti- para pró-oxidante), a partir de sua incorporação em membranas biológicas.



Figura 30. Esquema representativo da interação dos compostos fenólicos (CF) com lipossomos

Como dito anteriormente, o extrato estudado pode ter sua atividade oxidante em membranas associada a atividades antimicrobiana, antifúngica e antitumoral. Testes in

vitro preliminares foram realizados neste trabalho como a inibição da alfa-amilase (para testes antifúngicos) e ensaios de viabilidade celular (para teste antitumoral).

#### **5.4 INIBIÇÃO DA ALFA AMILASE**

Os resultados da percentagem de inibição de  $\alpha$ -amilase por 100  $\mu\text{g}$  do extrato por minuto estão expressos na Tabela 3.

Tabela 3. Ação contra a atividade da  $\alpha$ -amilase

Reação	% de inibição de $\alpha$ -amilase /100 $\mu\text{g}$ do extrato/ min
ASO puro	1,9
Extrato na forma livre	3,2
Extrato em lipossomos	4,5

Sabe-se que as enzimas presentes nos fungos são principalmente constituídas de proteases como a amilase, que degrada o amido. Assim sendo, um efeito de uma substância ativa na inibição de amilase indica um promissor efeito antifúngico da primeira (TREMACOLDI *et al.*, 2004). Estes resultados indicam que o extrato, quando incorporado em lipossomos, inibiu de forma mais eficiente a enzima  $\alpha$ -amilase (4,5 %). Isto demonstra que, quando incorporado, o extrato tem maior probabilidade de ter uma ação antifúngica. Está estabelecido que a presença de substratos fenólicos induzem enzimas fúngicas para a sua degradação. Derivados de ácido cinâmico são responsáveis por rápida retenção nuclear de uma proteína fúngica de fusão, a GFP-ChAP1. A 5  $\mu\text{M}$ , o ácido cinâmico foi responsável por inibir em 90% o crescimento de várias espécies de *Cândida*. Um dos mecanismos propostos seria que os compostos fenólicos interferissem na resposta antioxidante que protege o patógeno fúngico de um ataque por EROS. Por exemplo, mutantes da enzima superóxido dismutase, que desmuta o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e água, é sensível ao ácido cinâmico. O tratamento de *S. Cerevisiae* com polifenóis resultou na retenção nuclear de um fator de transcrição redox-sensível, o que sugere uma atividade pró-oxidante dos compostos fenólicos (KIM *et al.*, 2006; SHALABY e HORWITZ, 2014). Neste contexto,

é possível que o ácido cinâmico e a atividade pró-oxidante dos compostos fenólicos presentes no extrato da folha da *R. Ferruginea* quando incorporado em lipossomos tornem a sua atividade antifúngica promissora (TREMACOLDI; WATANABE; CARMONA, 2004; SHALABY e HORWITZ, 2015; KIM *et al.*, 2006).

## 5.5 ENSAIO ANTITUMORAL IN VITRO: MTT ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Para se determinar o efeito do extrato da *R. ferruginea* sob a viabilidade celular das linhagens de glioma GL261, estas foram expostas ao extrato na forma livre em diferentes concentrações (10, 100 e 1000 µM) durante 48 h. Foi realizado então o ensaio de MTT, como mostra Figura 31. O extrato nas concentrações de 10 e 100 µM reduziu em 37,5 e 40 % respectivamente, a viabilidade celular. Já na concentração de 1000 µM, a percentagem de redução de viabilidade celular diminui para 27,5%. Estes resultados sugerem que quando se aumenta a concentração do extrato, diminui-se a atividade antitumoral, o que pode estar ligado a um aumento da atividade anti-oxidante para as duas primeiras concentrações e alguma interferência por ação pró-oxidante para a terceira.

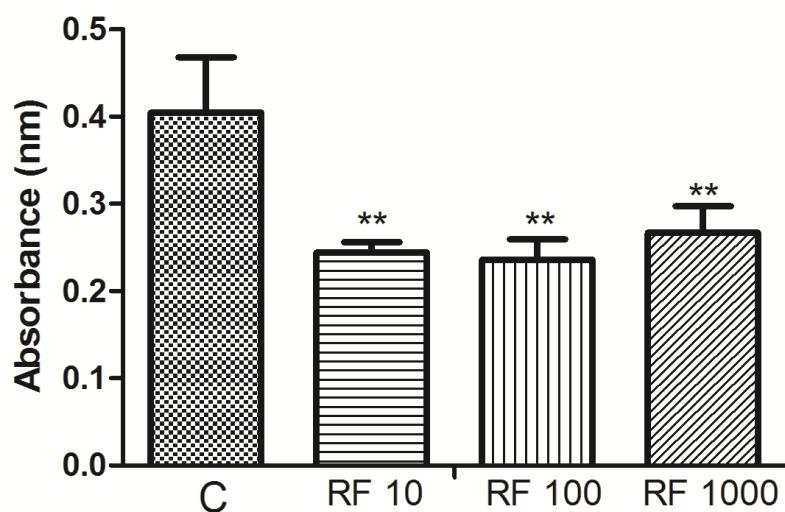


Figura 31. Influência do extrato, na forma livre em diferentes concentrações, na viabilidade celular das linhagens de glioma

Considerando-se o extrato metanólico da *R. ferruginea*, até a concentração de 100 µM este apresentou eficiência em sua propriedade antitumoral, entretanto não concentração dependente. Os resultados obtidos mostram a necessidade de mais estudos.

## 5.6 INFLUÊNCIA DO EXTRATO DA FOLHA DA *RAPANEA FERRUGINEA* NA DINÂMICA DOS LIPOSSOMOS DE ASOLECITINA DE SOJA

Os efeitos provocados pelo extrato da folha da *R. ferruginea* na dinâmica lipídica dos lipossomos foram investigados através das técnicas de HATR-FTIR, RMN, DSC e UV-visível. Utilizando essas técnicas, comparou-se a dinâmica dos lipossomos contendo o extrato com a dos lipossomos puros. Com o objetivo de detectar a localização dos componentes do extrato, bem como compreender a influência do mesmo na dinâmica das regiões específicas lipídicas, foram obtidos os espectros de HATR-FTIR para os lipossomos em questão, como mostra a Figura 32.

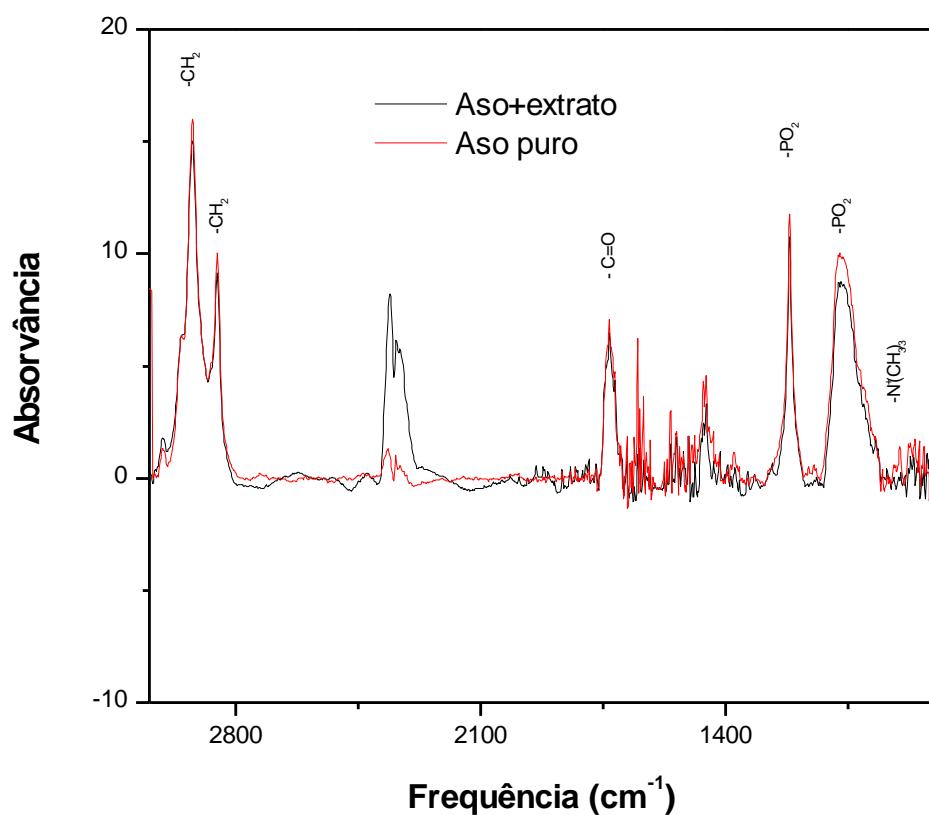


Figura 32. Espectros de HATR-FTIR de ASO puro (linha vermelha) e contendo extrato (linha preta)

Para a caracterização dos grupos lipídicos de lipossomos puros de ASO foram detectadas e analisadas os seguintes estiramentos axiais: (a)  $\nu_{as}$   $\text{PO}^{2-}$  1217,08  $\text{cm}^{-1}$ , (b)  $\nu_s$   $\text{PO}^{2-}$  1060  $\text{cm}^{-1}$  (c)  $\nu_{as}$   $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$  974,05  $\text{cm}^{-1}$ , (d)  $\nu$   $\text{C}=\text{O}$  a 1734,01  $\text{cm}^{-1}$ , (e)  $\nu_s$   $\text{CH}_2$  2854,05  $\text{cm}^{-1}$  (f)  $\nu_{as}$   $\text{CH}_2$  2924,09  $\text{cm}^{-1}$ . Tais valores de número de onda estão de acordo com os dados obtidos para os estiramentos axiais dos grupos característicos de lipossomos por Herec *et al.* (2007) e Manrique-Moreno *et al.* (2010).

Analizando os valores dos deslocamentos na frequência, ou número de onda, e a largura referente a 75% da altura de picos referentes aos estiramentos axiais dos grupos característicos presentes nos lipídios, pode-se obter informações sobre o grau de hidratação e mobilidade dos grupos funcionais presentes no lipossomo (MANRIQUE-MORENO *et al.*, 2010).

A Tabela 4 apresenta os valores de número de onda, ou frequência, de grupos localizados em regiões específicas (cabeça polar, região de interface e apolar) da fosfatidilcolina presente em lipossomos de ASO, puros ou na presença do extrato.

Tabela 4. Número de onda ( $\nu$ ) de HATR-FTIR de lipossomos de ASO provocados pela incorporação do extrato

Grupo	$\nu \text{ cm}^{-1}$		$\Delta \nu \text{ cm}^{-1}$
	Aso Puro	ASO : extrato	
$\nu_{as}$ $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	974,05	974,05	-
$\nu_s$ $\text{PO}_2^-$	1066,64	1064,71	$\downarrow 1,93$
$\nu_{as}$ $\text{PO}_2^-$	1219,01	1219,01	-
$\nu$ $\text{C}=\text{O}$	1734,01	1734,01	-
$\nu_s$ $\text{CH}_2$	2852,72	2854,55	$\uparrow 1,83$
$\nu_{as}$ $\text{CH}_2$	2924,09	2924,09	-

### 5.6.1 Interação do extrato com a região polar dos lipossomos de ASO

A interação do extrato de folhas da *R. ferruginea* com a região polar da membrana lipossomal foi avaliada a partir das análises dos grupos fosfato e colina lipídicos.

O grupo fosfato, por ser carregado negativamente, interage com a água presente no meio através de ligações de hidrogênio. O aumento no grau de hidratação, pode ser verificado pelo deslocamento da frequência dos picos de estiramento axial do fosfato para valores menores, sendo associado ou não ao alargamento desta banda (CASAL; MANTSCH; HAUSER, 1989; CHEN e TRIPP, 2008).

Como pode ser observado na Tabela 4, o extrato provocou uma diminuição no deslocamento da frequência do estiramento simétrico do grupo fosfato em cerca de  $2\text{ cm}^{-1}$  como pode ser visto na ampliação do espectro de HATR-FTIR apresentado na Figura 33. Tal deslocamento no número de onda indica que o extrato provoca um pequeno aumento nas ligações de hidrogênio, ou um aumento discreto no grau de hidratação da região.

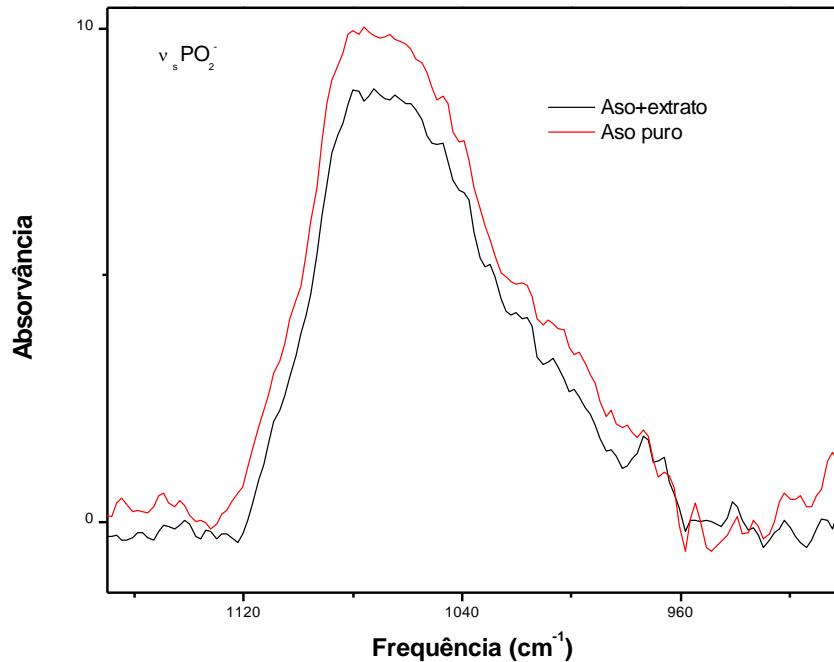


Figura 33. Ampliação do espectro de HATR-FTIR na região do estiramento simétrico do grupo fosfato

No entanto, para a interpretação dos dados, deve-se considerar a natureza do lipídio utilizado. Em lipídios presentes na ASO, a orientação do grupo fosfato presente na fosfatidilcolina pode ser afetada pela região polar de outros fosfolipídios presentes, tais como a fosfatidiletanolamina e fosfatidilinositolfosfato, bem como pela própria interação com o extrato. Isto pode favorecer o aumento no grau de hidratação do fosfato, caso ele seja orientado para a superfície da membrana. Vale ressaltar que os valores de deslocamento de frequência avaliados são referentes à fosfatidilcolina (SEVERCAN, 1997; SEVERCAN *et al.*, 2005). As ligações de hidrogênio, interações de Van der Walls do tipo dipolo-dipolo, devem- se à interação do grupo fosfato lipídico com a água presente no meio ou com os componentes do extrato. No segundo caso, tais interações se darão entre as hidroxilas dos compostos fenólicos e o grupo fosfato.

Já o grupo colina ( $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ), carregado positivamente, pode apresentar interações de Van der Walls do tipo dipolo-dipolo, que não ligações de hidrogênio, ou com a água presente no meio ou com regiões com carga parcial negativa de substâncias ativas incorporadas em um sistema lipossomal. Também poderá interagir de forma eletrostática com íons presentes no meio reacional ou com regiões com carga total negativa presentes nas substâncias ativas. O grupo colina também pode sofrer influência das interações das moléculas de água com o grupo fosfato do lipídio vizinho (MANRIQUE-MORENO *et al.*, 2009). Tais interações refletem-se em variações em frequencia e largura dos picos de HATR-FTIR referentes ao estiramento axial simétrico e assimétrico deste grupo funcional.

Analizando-se o grupo colina dos lipossomos de ASO, pode-se verificar que o extrato não provocou deslocamento de frequência nem alargamento no pico nessa região. Desta forma, é provável que o grupo colina não sofra alterações nas interações dipolo-dipolo ou eletrostáticas sob influência do extrato. Sendo assim, para se obter mais informações sobre a influência do extrato na região polar lipídica, foram realizadas as medidas de  $T_1$  de  $^1\text{H}$  do grupo colina, para analisar a influência do extrato na velocidade rotacional deste grupo (DUFOURC, 2006). Foram analisadas uma amostra de lipossomo de ASO puro e outra amostra contendo o extrato.

Os valores de  $T_1$  foram calculados a partir das curvas de recuperação do sinal de FID respectivas aos hidrogênios presentes no grupo colina (FEIGENSON & CHAN, 1974). Estas curvas associam a intensidade do pico de RMN de hidrogênios presentes na colina lipídica em sistemas lipossomais puros e na presença do extrato, ao tempo de intervalo entre pulsos de radiofrequência. As curvas respectivas para a colina de lipossomos de ASO na ausência e na presença de extrato ( $N^+(CH_3)_3$ , sinal do deslocamento a  $\delta = 3,2$  ppm) estão apresentadas na Figura 34.

A análise das curvas demonstrou que a presença do extrato não influenciou significantemente o  $T_1$  dos hidrogênios da colina de 0,61 s (valor referente aos lipossomos de ASO puro) para 0,63 s (valor referente aos lipossomos de ASO na presença do extrato). Como a variação de  $T_1$  está relacionada com a variação dos valores de tempo de correlação ( $T_c$ ), isso indica que o extrato não alterou a mobilidade nessa região. Esse resultado está de acordo com as análises de FTIR, onde não foi observada interação do extrato com a região do grupo colina.

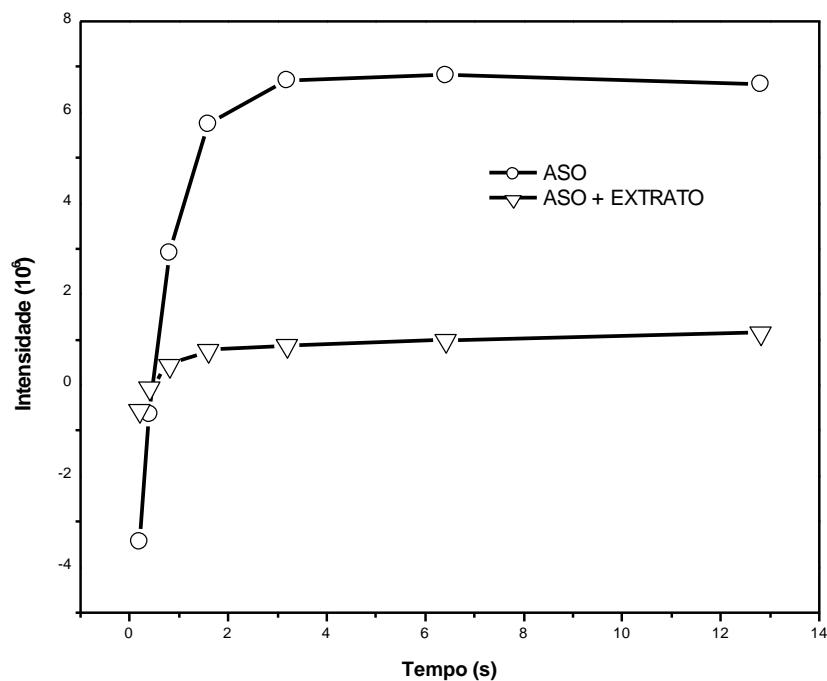


Figura 34.Tempo de relaxação longitudinal ( $T_1$ )  $^1H$  da colina de ASO na ausência (círculos abertos) e na presença (triângulos abertos) de extrato de *R. ferruginea*

### 5.6.2 Interação do extrato com a região interfacial dos lipossomos de ASO

Para o estudo da interação do extrato com a região interfacial dos lipossomos de ASO, foram analisados o deslocamento no número de onda e a largura a 75% do pico de HATR-FTIR referente ao estiramento do grupo carbonila de lipossomos na ausência e na presença do extrato. Os dados de FTIR indicaram que a presença do extrato não provocou deslocamento no número de onda do grupo carbonila (Tabela 4), o que pode indicar a não variação de ligações de hidrogênio e grau de hidratação, no grupo da carbonila lipídico, após interação com o mesmo (MANRIQUE-MORENO *et al.*, 2010).

A Figura 35 apresenta uma ampliação do espectro de HATR-FTIR na região do estiramento do grupo da carbonila ( $1734,01\text{ cm}^{-1}$ ). Através da análise da largura da banda referente ao grupo carbonila lipídico, observou-se que a presença do extrato promoveu uma redução na largura da banda em  $25\text{ cm}^{-1}$ . Isto indica que houve um ordenamento na região de interface dos lipossomos, induzida pelo extrato.

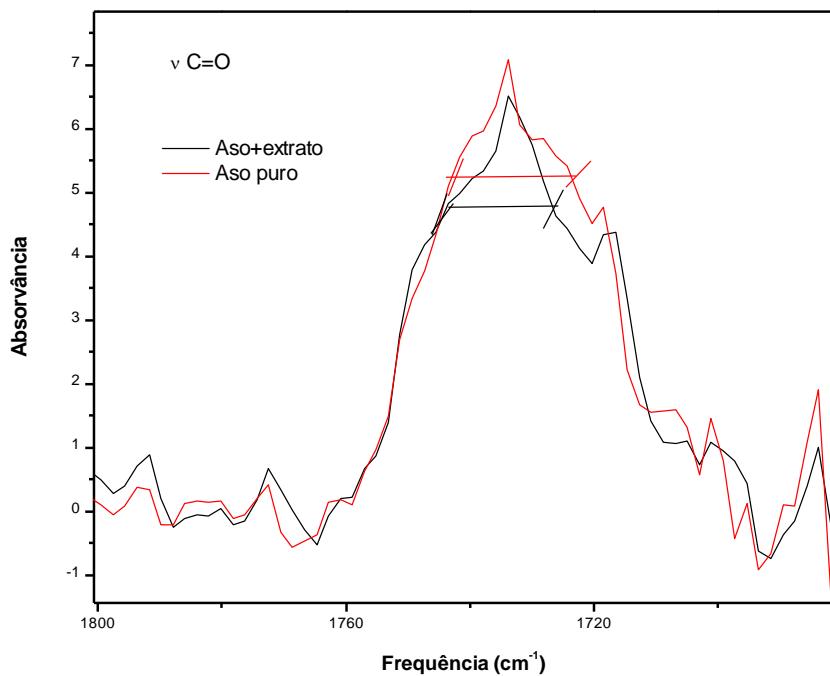


Figura 35: Ampliação do espectro de HATR-FTIR na região do pico de estiramento do grupo carbonila.

Outros compostos fenólicos apresentaram efeito semelhante na região de interface da membrana. Azambuja e colaboradores., (2015), relataram em seu trabalho que a genisteína (Gn) quando incorporada em lipossomos de asolecitina de soja, provocou um ordenamento na região interfacial dos lipossomos, o que pode dificultar a difusão de espécies reativas e radicais livres em direção à região apolar, onde iniciam-se as reações de peroxidação. Assim, é possível que o ordenamento provocado pelo extrato na região de interface da membrana influencie também no seu potencial antioxidante, quando não incorporado no sistema lipossomal.

### **5.6.3 Influência do extrato na região apolar dos lipossomos de asolecitina de soja**

As alterações provocadas pelo extrato no número de onda de picos referentes ao estiramento axial simétrico dos grupos metilenos da cadeia acil lipídica ( $\nu_s \text{CH}_2$  a  $2854,05 \text{ cm}^{-1}$ ), indicam que este extrato influencia no grau de ordem conformacional, e na isomerização trans/ gauche do sistema lipídico. O extrato provocou uma discreto aumento no número de onda em  $1,83 \text{ cm}^{-1}$ , como pode ser visto na ampliação do espectro de HATR-FTIR na região do estiramento simétrico do grupo do metileno (Figura 36). Isto indica um desordenamento na membrana nessa região, tornando-a mais fluída (MANRIQUE-MORENO *et al.*, 2010). Os valores de frequência dos grupos metilenos estão associados à transição de fase lipídica, numa fase mais ordenada, as bandas dos estiramentos dos metilenos estão localizadas em valores de frequências menores do que quando estão numa fase mais desordenada. Assim, quando os lipídios passam da fase gel para a líquido- cristalina há um aumento no valor das frequências nessa região (LEE e CHAPMAN, 1986; LEWIS e MCELHANEY, 1998; MANNOCK *et al.*, 2010).

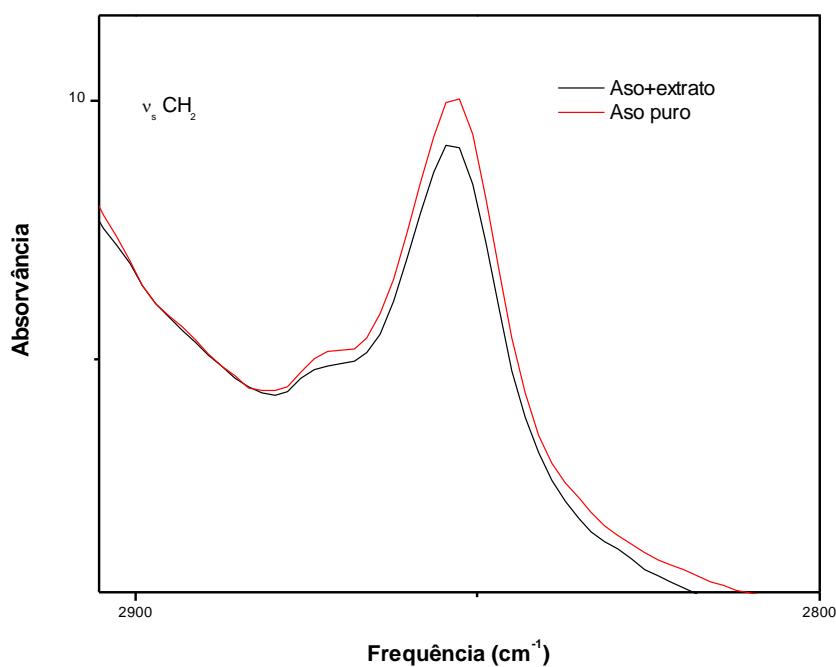


Figura 36. Ampliação do espectro de HATR- FTIR na região do estiramento simétrico do grupo metileno

A fim de obter mais informações sobre a interação do extrato com a região hidrofóbica dos lipossomos de ASO, foram realizadas medidas de DSC. Através das curvas de DSC das membranas de ASO puro e na presença do extrato (Figura 37) foram calculados os parâmetros  $T_m$  e  $\Delta H$ , valores expressos na Tabela 5.

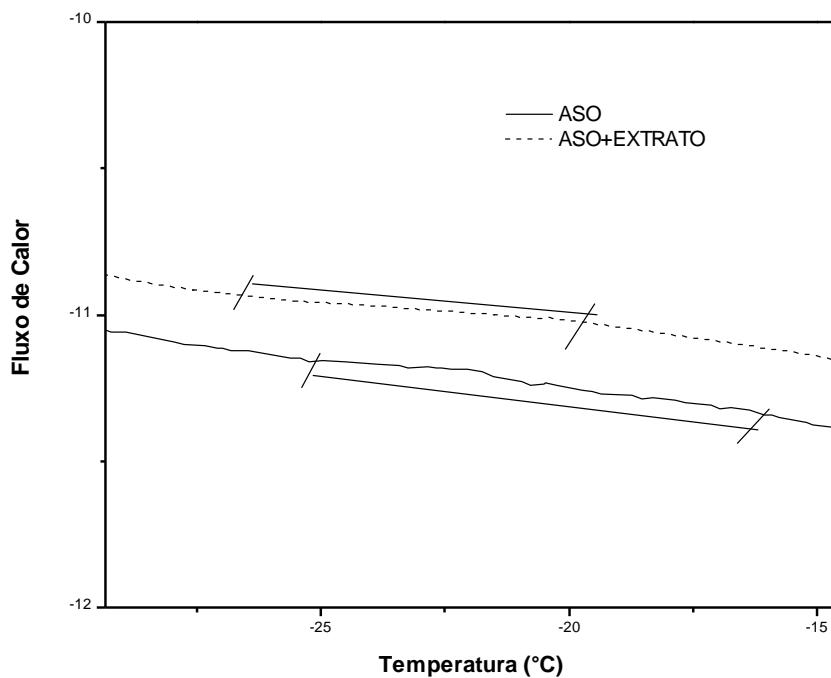


Figura 37. Curvas de DSC para ASO puro e na presença do extrato

Tabela 5. Valores da variação de entalpia e temperaturas de transição de fase

Amostra	$T_m$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)
ASO	-20,8	0,03062
ASO+ extrato	-25,23	0,001053
Variação	4,43	0,029

Pode-se observar que o extrato provocou uma diminuição da  $T_m$  assim como na  $\Delta H$  lipídicos, o que indica que esse extrato desordena a região dos metilenos dos lipossomos. Esse resultado corrobora com os resultados de FTIR.

## 5.7 MEDIDAS DE TURBIDEZ, ATRAVÉS DE ESPECTROFOTOMETRIA DE ULTRAVIOLETA VISÍVEL (UV-VIS)

O efeito do extrato na turbidez de lipossomos de ASO estão demostrados na Tabela 6.

Tabela 6. Valores de turbidez para ASO puro e na presença do extrato

	Valores turbidez	$\Delta$ valores de turbidez	% Turbidez
ASO puro	0,261		
ASO + extrato	0,574	0,313	↑ 54,000

Pode-se observar um aumento de 54 % nos valores de turbidez lipídica quando o extrato é incorporado. O aumento de turbidez está relacionado com um processo de aumento do tamanho da partícula, ou agregação lipossomal, que aumenta a medida de turbidez. Este aumento no tamanho lipossomal, ou efeito de agregação, após a incorporação do extrato depende da forma molecular, temperatura, preparação e condições ambientais (ELSAYED e CEVE, 2011; WAGNER e VORAUER-UHL, 2011).

As propriedades antioxidantes de substâncias ativas são influenciadas pela sua reatividade química e por sua distribuição entre as regiões hidrofílicas e hidrofóbicas dos lipossomos. A partir do extrato na sua forma livre, é possível que o ordenamento na região da carbonila impeça a difusão da espécie reativa para a região hidrofóbica do lipossomo, de forma a peroxidá-lo. Adicionalmente, um alto potencial redutor atribuído aos compostos fenólicos inibiria os danos provocados pela espécie reativa testada, no caso o  $\text{HO}^\bullet$ , conforme observado nos resultados de DPPH. Já quando o extrato está incorporado ao lipossomo, a velocidade da redução do radical livre por parte dos compostos fenólicos que difundem ao meio a partir do lipossomo é provavelmente mais lenta do que quando o extrato é adicionado ao meio externo. Neste caso, é possível também que, quando o radical consegue difundir até a região hidrofóbica insaturada do lipossomo, fonte de hidrogênios mais suscetíveis a serem abstraídos e mais desordenada em função do efeito do extrato, terá sua interação facilitada com os compostos fenólicos que, por sua vez, gerarão os produtos de auto-oxidação. Os componentes fenólicos oxidados poderão ter assim efeito pró-oxidante nas membranas. Dois fatores podem influenciar neste comportamento: a concentração de

compostos fenólicos disponíveis na região hidrofóbica do lipossomo, bem como a velocidade de reação entre o radical e estes compostos. Esta velocidade pode ser estudada através de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE), o que é uma das perspectivas deste trabalho. A incorporação ou não do extrato da folha de *R. Ferruginea* em lipossomos pode assim ser fator determinante para modular atividades biológicas opostas (anti- ou pró-oxidante) do primeiro, o que pode estar assim correlacionado com a localização e influência do extrato na dinâmica molecular dos lipossomos. Vale ressaltar que o estudo das atividades oxidantes do extrato da *R. ferruginea* pode também complementar investigações mais aprofundadas no que tange sua atividade antifúngica e antitumoral, visto que tais estudos ainda são inéditos para esta espécie.

Compreender a interação do extrato da *Rapanea ferruginea* com lipossomos contribui com os estudos de atividades biológicas e *insights* sobre o mecanismo de ação de uma planta ainda pouco estudada.

## 6. CONCLUSÕES

Neste trabalho realizou-se o estudo da atividade oxidante, bem como estudos preliminares antifúngicos e antitumorais, do extrato das folhas da *Rapanea ferruginea*. Realizou-se também a caracterização da influência deste extrato em diferentes regiões de lipossomos:

- O extrato apresentou uma elevada atividade antioxidant *in vitro* pelo método de sequestro e radicais pelo método de DPPH, a concentração inibitória em 50% ( $IC_{50}$ ) da oxidação foi encontrada na faixa de 7,8  $\mu\text{g/mL}$ .
- O extrato na forma livre reduz a peroxidação lipídica em 50 % na concentração de 1,43  $\mu\text{g/mL}$ . Na forma incorporada em lipossomos, o extrato demonstrou uma atividade pró-oxidante crescente em proporção a sua concentração.
- Foram identificados e quantificados no extrato os compostos fenólicos : ácido siríngico, ácido cinâmico, ácido gálico, quercetina, quercetrina e catequina.
- O extrato, quando incorporado em lipossomos, inibiu de forma mais eficiente a enzima  $\alpha$ - amilase (4,5 %), do que o extrato na forma livre , o que demonstra uma maior probabilidade de atividade antifúngica quando incorporado.
- A exposição das células de glioma nas concentrações de 10 e 100  $\mu\text{M}$  reduziu em 37,5 e 40 % respectivamente, a viabilidade celular

A influência do extrato na dinâmica lipídica foi avaliada de acordo com as regiões polar, interfacial e apolar dos lipossomos:

- Na região polar, o extrato aumentou o grau de hidratação da região do fosfato lipídico, como visto por HATR-FTIR. Através das análises por HATR-FTIR e RMN, pode-se concluir que o extrato não influenciou a região do grupo colina.
- Na região de interface, o extrato provocou um aumento do ordenamento na região da carbonila lipídica, diminuindo a mobilidade.
- Na região hidrofóbica, o extrato provocou um desordenamento na região dos grupos metilenos, aumentando-se assim, a fluidez desta região. Esse resultado foi confirmado por análise de DSC, onde a diminuição da variação da entalpia e da temperatura de transição de fase, indicaram um desordenamento na cadeia acil dos lipossomos.

Através das medidas de turbidez pode-se verificar que o extrato provocou um aumento no tamanho dos lipossomos.

Um esquema demonstrando os efeitos do extrato sob a dinâmica molecular dos lipossomos está representado na Figura 38.

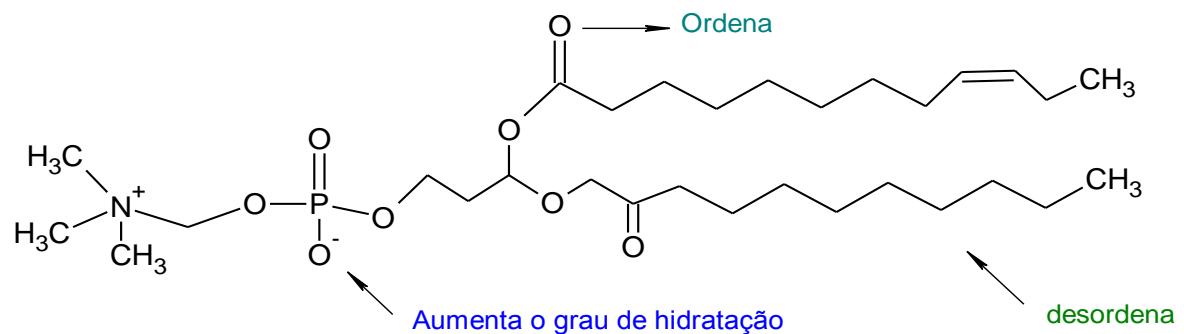


Figura 38. Esquema representativo dos efeitos provocados pela interação do extrato com a membrana

## 7. PERSPECTIVAS

Os resultados deste trabalho servem de base para novos estudos, como o ensaio antifúngico determinando a cinética de inibição de fungos do gênero *Aspergillus* assim como um estudo de velocidades de reação Radical-membrana e Radical: extrato através do ensaio de RPE e estudos da interação de cada composto fenólico identificado no extrato com modelos de membrana.

## 8. REFERÊNCIAS

- AJILA, C. M.; LEELAVATHI, K.; RAO, U. J. S. P. Improvement of dietary fiber content and antioxidant properties in soft dough biscuits with the incorporation of mango peel powder. *J. Cereal Sci.* 48, 319-326, 2008.
- ALBESA, I.; BECERRA, M.C.; BATTAN,P.C.; PÁEZ,P.L. Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics. *Biochem Bosphys Res Commun*, 317(2), 605-9,2004.
- AMIĆ, D.; DAVIDOVIĆ-AMIĆ, D.; BEŠLO, D.; RASTIJA, V.; LUČIĆ, B.; TRINAJSTIĆ, N. SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids. *Curr Med Chem.*, 14, 827–45, 2007.
- ANDERSEN, O. M.; JORDHEIM, M. The anthocyanins, in: MARKHAM, O. M. A. K. R. (Eds.), Flavonoids 2nd ed. Chemistry, biochemistry and applications, CRC Press. 452-471, 2006.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - Uma breve revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.* 66, n. 1, 232-240, 2007.
- AOAC-ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST. Official methods of analysis. 14.Ed, Washington, 1980.
- AZAMBUJA, C. R. L. D.; SANTOS, L. G. D.; RODRIGUES, M.R.; RODRIGUES, R. F. M.; SILVEIRA, E. F. D; AZAMBUJA, J. H.; FLORES, A. F. C.; HORN, A. P.; DORAC, C. L.; MUCCILLO-BAISCH, A. L.; BRAGANHOL, E.; PINTO, L. D. S.; PARIZE, A. L.; DE LIMA, V. R. Physico-chemical characterization of asolectin–genistein liposomal system: An approach to analyze its in vitro antioxidant potential and effect in glioma cells viability. *Chemistry and Physics of Lipids.*, 193, 24-35, 2015.
- BACCARIN, T.; MUCENEKCI, R. S.; BRESOLIN, T. M. B.; YUNES, R.A.; MALHEIROS, A.; valiLUCINDA-SILVA, R. M. Development and validation of na HPLC-PDA method for the determination of myrsinoic acid B in the extracts of *Rapanea ferruginea* Mez. *Talanta*, 85, 1221-1224, 2011.
- BALDOQUI, D.C.; KATO, M. J.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. da S.; YOUNG, M. C.; FURLAN, M. A chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. *Phytochemistry*, 51(7), 899-902, 1999.
- BAST, A.; HAENEN, G. R. M. M.; DOELMAN, C. J. A. Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am. J. Med.* 91, 2-13, 1991.
- BIRD, R. P.; DRAPER, A. H. Comparative studies on diferente methods of malondyaldehyde determination. *Methods Enzymol.*, 105, 295-305, 1984.

BLUNT, S. B.; CHEN, T. B.; WIEMER, D. F. Prenylated Benzoic Acids from *Rapanea myricoides*. J. Nat. Prod. 6, 1400-1403, 1998.

BORG, D. C; SCHAIKH, K.M. Iron and iron-derived radicals. In HALLIWELL, B. (ed): Oxygen radicals and tissue injury. Proceedings of a Brook Lodge Symposium; 1987 Apr 27-29; Bethesda (MLD): Upjohn/Federation of American Societies for Experimental Biology. 20-6, 1988.

BOVERIS, A.; CADENAS, E.; REITER, R.; CHANCE, B.; JAMIESON, D. The relation of free radical production to hyperoxia. Annu. Rev. Physiol. 48, 703-19, 1986.

BRITO, A. F.; RIBEIRO, M.; ABRANTES, A. M.; MAMEDE, A. C.; LARANJO, M.; CASALTA-LOPES, J. E.; GONÇALVES, A. C.; SARMENTO-RIBEIRO, A. B.; TRALHÃO, J.G.; BOTELHO, M.F. New approach for treatment of primary liver tumors: The role of quercetin, Nutrition and Cancer, 4, 17, 2016.

CADET, J.; DELATOUR, T.; DOUKI, T.; GASPARUTTO, D.; POUGET, J. P.; RAVANAT J. L.; SAUVAIGO, S. Hydroxyl radicals and DNA base damage. Mutat. Res. 424, 9-21, 1999.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. Free Radical Biology and Medicine. 22, 749–760, 1997.

CARLOS, I. Z.; LOPES, F. C. M.; BENZATTI, F. P.; CARLI, C. B. A.; MARQUES, M. F.; JORDÃO JUNIOR, C. M.; RINALDO, D.; CALVO, T.R.; SANTOS, L.C.; VILEGAS, W. Ação do extrato metanólico e etanólico de *Davilla elliptica* St. Hill. (Malpighiaceae) na resposta imune. Revista Brasileira de Farmacognosia, 15(1), 44-50, 2005.

CASAL, H.L; MANTSCH, H.H; HAUSER, H. Infrared and 31P-NMR studies of the interaction of Mg<sup>2+</sup> with phosphatidylserines: effect of hydrocarbon chain unsaturation. Biochim Biophys Acta.982(2),228–236, 1989.

CASTELLI, F.; TROMBETTA, D.; TOMAIANO, A.; BONINA, F.; ROMEO, G.; UCCELLA, N.; SAIJA, A. Dipalmitoylphosphatidylcholine/ linoleic acid mixed unilamellar vesicles as model membranes for studies on novel free-radical scavengers. JPM 37, 135–141, 1997.

CHATGILIALOGLU, C.; O'NEILL, P. Free radicals associated with DNA damage. Exp. Gerontol. 36, 1459, 2001.

CHEN, B.; KAWAZOE, K.; TAKAISHI, Y.; HONDA, G.; ITOH, M.; TAKEDA, Y.; KODZHIMATOV, O. K.; ASHURMETOV, O. Prenylated benzoic acid derivatives from *ferula huistanica*. J. Nat. Prod., 63 (3), 362-365, 2000.

CHEN, H.; MENDELSON, R.; REREK, M. E.; MORE, D. J. Fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry studies of fatty acid homogeneous ceramide 2. Biochim. Biophys. Acta. 1468, 293-303, 2000.

- CHEN, C; TRIPP, C. P. An infrared spectroscopic based method to measure membrane permeance in liposomes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1778, 2266-2272, 2008.
- CHENG, Z.; LI, Y.; CHANG, W. Kinetic deoxyribose degradation assay and its application in assessing the antioxidant activities of phenolic compounds in a Fenton-type reaction system. *Anal. Chim. Acta*, 478, 129-137, 2003.
- CHIEN-CHIH, C.; YUH-PAN, C.; HONG-YEN, H.; KUO-HSIUNG, L.; SHOHEI,T.; ANDREW, T. M. Bauhinin, a New Nitrile Glucoside from Bauhinia championii. *J. Nat. Prod.*, 48 (6), 933–937, 1985.
- CLARKSON, P. M.; THOMPSON, H. S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am. J. Nutr.* 72, 637-46, 2000.
- CRUZ, A. B.; KAZMIERCZAK, K.; GAZONI, V. F.; MONTEIRO, E. R.; FRONZA, L.M.; MARTINS, P.; YUNES, R. A.; BÜRGER, C.; TOMIO, T. A.; FREITAS, R. A.; MALHEIROS, A. Bio-guided isolation of antimicrobial compounds from Rapanea ferruginea and its cytotoxic and genotoxic potential, *Journal of Medicinal Plants Research*, 7, 1323-1329, 2013.
- da SILVA, J. B. Gallic acid, pyrogallol and pyrocatechol in the roots of *Byrsonima intermedia* Ad. Jussieu, form *Latifolia grisebach*. *Revista de farmácia e bioquímica da Universidade de São Paulo*, 8, 187-192, 1970.
- DEGASPARI, C. H.; WASZCZYNSKY, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão Acad.* 5, n. 1, 33-40, 2004.
- de LIMA, V. R. Desenvolvimento de estratégias para investigar a localização e efeitos de fármacos incorporados em membranas lipídicas. Santa Catarina: UFSC, 2009. 175 f. Tese (Doutorado); Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.
- de LIMA, V. R.; CARO, M. S. B.; MUNFORD, M. L.; TAVARES, M.I.B.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Melation location in egg phosphatidylcholine liposomes: possible relation to its antioxidant mechanisms. *J. Pineal Res.* 43, 276-282, 2007.
- de SOUZA, R.S.; NOGUEIRA, A.O.M.; MARQUES, V.G.; CLEMENTIN, R. M.; de LIMA, V. R. Effects of  $\alpha$ -eleostearic acid on asolectin liposomes dynamic: Relevance to its antioxidante activity. *Bioorganic Chemestry*. 51, 8-15, 2013.
- DJERASSI, C.; NAKANO, T.; JAMES, A. N.; ZALKOV, L. H.; EISENBRAUN, E. J.; SHOOLERY, J. N. Terpenoids. XLVII. The Structure of Genipin. *J. Org. Chem.* 26, 1192-1206, 1961.
- DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308-16, 2000.
- DUFOURC, E. J. Solid state NMR in Biomembranes. John Wiley & Sons, London, 2006.

- EL SAYED, M. M. A.; CEVC, G. Turbidity spectroscopy for characterization of submicroscopic drug carriers, such as nanoparticles and lipid vesicles: size determination. *Pharm. Res.* 28, 2204–2222, 2011.
- EKMEKIOGLU, C.; FEYERTAG, J.; MARKTL, W. Cinnamic acid inhibits proliferation and modulates brush border membrane enzyme activities in Caco-2 cells. *Cancer Lett.*, 128, 137-144, 1998.
- FARHAN, M.; KHAN, H.Y.; OVES, M.; AL-HARRASI, A.; REHMANI, N.; ARIF, H.; HADI, S. M.; AHMAD, A. Cancer Therapy by Catechins Involves Redox Cycling of Copper Ions and Generation of Reactive Oxygenspecies. *Toxins* 8, 37-53, 2016.
- FEIGENSON, G. W.; CHAN, S. I. Nuclear magnetic relaxation behavior of lecithin multilayers. *J. Am. Chem. Soc.*, 96, 1312-1319, 1974.
- FELD, H.; RICROFT, D. S.; ZAPP, J. Chromenes and Prenylated Benzoic Acid Derivatives from the Liver *Pedinophyllum interruptum*. *Naturforsch.*, 59(b), 825-828, 2004.
- FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D. A.; ROCHA, O. G. F.; DEMICHELI, C. Lipossomas: propriedades físicoquímicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. *Quim. Nova*, São Paulo, 28, p.511-518, 2005.
- FUKUMOTO, L.R.; MAZZA, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3597-3604, 2000.
- FURLAN, M. R. Cultivo de plantas medicinais. Vol. XIII. Coleção Agroindústria. Sebrae-MT, Cuiabá. 137, 1998.
- GARDÈS-ALBERT, M.; JORE, D.; FERRADINI, C. Membrane lipid peroxidation: pulse and  $\gamma$ -radiolysis in oxyradical research. In Vigo.Pelfrey. C (ed): *Membrane lipid oxidation*. 1th ed. Santa Clara, CRC Press, 2-30, 1991.
- GARDNER, H.W. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radic. Biol. Med.* 7, 65-86, 1989.
- GORDEN, M. H. The mechanism of antioxidant action *in vitro*. In. B. J. F. Hudson (Ed.), *Food antioxidants* 1–18, 1990.
- GOTTILIEB, O. R.; BORIN, M. R. Químico-biologia quantitativa: um novo paradigma? *Quim. Nova* 35, 2105-2114, 2012.
- GREEN, T.P.; TREADWELL, E. M.; WIEMER, D. F. Arieianal, a prenylated benzoic acid from *Piper arieianum*. *J. Nat. Prod.*, 62(2), 367-388, 1999.
- GRUNDHOFER, P.; NIEMETZ, R.; SCHILLING, G.; GROSS, G. G. Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolyzable tannins. *Phytochemistry*, 57, 915-927, 2001.

GUVEN K. C.; KOYUNCUOGLU H.; ULUBELEN A.; GUVEN, N. Studies on gallic acid esters formed by the extraction of *Paeonia peregrina* Mill. *Die Pharmazie*, 29, 350, 1974.

HALLIWELL, B. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutat. Res.* 443, 37-52, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine, New York, Oxford University Press, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186, 1-85, 1990.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 142(2), 231-55, 2004.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. 7. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry* , 30, 3864-3874, 1991.

HANASAKI, Y.; OGAWA, S. FUKUI, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med.*, 16, 845–50, 1994.

HAVSTEN, B.N. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Therapeut.* 96, 67-202, 2002.

HEREĆ, M.; ISLAMOV, A.; KUKLIN, A.; GAGOŚ, M.; GRUSZECKI, W.I. Effect of antibiotic amphotericin B on structural and dynamic properties of lipid membranes formed with egg yolk phosphatidylcholine. *Chem. Phys. Lipids*, 147, 78-86, 2007.

HERTOG, M. G. L.; HOLLMANN, P. C. H.; KATAN, M.B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 2379-2383, 1992.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure–activity relationships. *J Nutr Biochem.*, 13, 572–84, 2002.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. *Semin. Hematol.* 26, 277-85, 1989.

HERTOG, M.G.L et al. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr. Cancer*, 20(1), 21- 29, 1993.

HIGDON, J.V.; FREI, B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit. Rev. Food Sci.*, 43, 89-143, 2003.

- HOPE, M. J.; BALLY, M. B.; MAYER, L. D.; JANOFF, A. S.; CULLIS, P. R. Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles. *Chem. Phys. Lipids*, 89-107, 1986.
- HU, C.; ZHANG, Y.; KITTS, D. D. Evaluation of antioxidant and prooxidant activities of bamboo *Phyllostachys nigra* var. *Henonis* Leaf extract *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3170-3176, 2000.
- INOUE, M.; SUZUKI, R.; SAKAGUCHI, N.; LI, Z.; TAKEDA, T.; OGIHARA, Y.; JIANG, B. Y.; CHEN, Y. Selective induction of cell death in cancer cells by gallic acid. *Biological Pharmacology Bulletin*, 18, 1526–1530, 1995.
- KELLO, M.; DRUTOVIC, D.; PILATOVA, M.B.; TISCHLEROVA, V.; PERJESI, P.; MOJZIS, J. Chalcone derivatives cause accumulation of colon cancer cells in the G2/M phase and induce apoptosis. *Life Sci.* 150, 32-38, 2016.
- KIM, J. H.; CAMPBELL, B.C.; MAHONEY, N.; CHAN, K L., MAY, G. S. Targeting antioxidative signal transduction and stress response system: control of pathogenic *Aspergillus* with phenolics that inhibit mitochondrial function. *J Appl Microbiol* 101, 181–189, 2006.
- KOKWARO, J. O. *Medicinal Plants of East Africa*, Kenya Literature Bureau, 1993.
- KOPPENOL, W. H. Oxyradical reactions: from bond-dissociation energies to reduction potentials. *FEBS Lett.* 264, 165-167, 1990.
- KOURY, J. C.; DONAGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. *Rev. Nutr.* 16, 433-41, 2003.
- KRILOV, D.; KOSOVIC', M.; SEREC, K. Spectroscopic studies of alpha tocopherol interaction with a model liposome and its influence on oxidation dynamics. *Elsevier*, 129, 588- 593, 2014.
- KUMAMOTO, M.; SONDA, T.; NAGAYAMA, K.; TABATA, M. Effects of pH and metal ions on antioxidative activities of catechins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65, 126-132, 2001.
- LAGERWEIJ, T.; HIDDINGH, L.; BIESMANS, D.; CROMMENTUIJN, M.H.; CLOOS, J.; LI X. N.; KOGISO, M.; TANNOUS, B.A.; VANDERTOP, W.P.; NOSKE, D.P.; KASPERS, G.J.; WÜRDINGER, T.; HULLEMAN, E. A chemical screen for medulloblastoma identifies quercetin as a putative radiosensitizer. *Oncotarget* doi: 10.18632/oncotarget.7980, 2016.

- LASIC, D. D. *Liposomes: from physics to applications*, Elsevier, Amsterdam, 1993.
- LASIC, D. D. Novel applications of liposomes. *Tibtech.*, 16, 307-320, 1998.
- LEE, D C.; CHAPMAN, D. Infrared spectroscopic studies of biomembranes and model membranes. *Biosci. Rep.*, 6., 235-256, 1986.
- LEITE, A. C.; PLACERES NETO, A.; AMBROZIN, A. R. P.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; ALBUQUERQUE, S. Trypanocidal activity of flavonoids and limonoids isolated from Myrsinaceae and Meliaceae active plant extracts. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 20, 1-6, 2010.
- LEÓN-GONZÁLEZ, A. J.; AUGER, C.; SCHINI-KERTH, V. B. Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy. *Biochemical Pharmacology*, 2015.
- LEWIS, R. N A. H.; McELHANEY, R. N. The structure and organization of phospholipid bilayers as revealed by infrared spectroscopy. *Chem. Phys. Lipids.*, 96, 9-21, 1998.
- LOCHER, C.P. et al. Antimicrobial activity and anticomplement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, Limerick, 49, n.1, 23-32, 1995.
- LORENZI, H. *Árvores brasileiras*, Nova Odessa, 1992.
- LORENZI, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do brasil*, São Paulo, Nova Odessa- Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2000.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A.C.; VEIGA JR, V. F.; ECHEVARRIA, A.; GRYNBERG, N.F. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quim Nova* 25: 429-43, 2002.
- MAHADEVAN, A.; REDDY, M. K. Effect of phenolic compounds on growth, polygalacturonase production, and activity of *Fusarium oxysporum*. *Netherlands Journal of Plant Pathology.*, 74, 87-90, 1968.
- MCDONALD, S.; PRENZLER, P. D.; ANTOLOVICH, M.; ROBARDS, K. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food chemistry* 73, 73-84, 2001.
- MAKABE, H.; MIYAZAKI, S.; KAMO, T.; HIROTA, M. Myrsinoic acid E, an anti-inflammatory compound from *Myrsine seguinii*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67, 2038-2041, 2003.
- MANNOCK, D. A.; LEWIS, R. N. A. H.; MCELHANEY, R. N. A calorimetric and spectroscopic comparison of the effects of ergosterol and cholesterol on the thermotropic phase behavior and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1798, 376-388, 2010.

MANRIQUE-MORENO, M.; GARIDEL, P.; SUWALSKY, M.; HOWE, J.; BRANDENBURG, K. The membrane-activity of ibuprofen, diclofenac, and naproxen: a physico-chemical study with lecithin phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1788, 1296-1303, 2009.

MANRIQUE-MORENO, M.; HOWE, J.; SUWALSKY, M. GARIDEL, P.; BRANDENBURG, K. Physicochemical interaction study of non-steroidal anti-inflammatory drugs with dimyristoylphosphatidylethanolamine liposomes. *Left. Drug. Des. Discovery*, 7, 50-56, 2010.

MANSILHA, C. I. G.R. Estudo de participação e localização de fármacos em lipossomas por técnicas espectroscópicas. Departamento de Química. Porto. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Tese (Doutorado). 257f. 2002.

MCKEVITH, B. [et al]. "The Food Standards Agency's antioxidants in food programme - a summary.", *J. Hum. Nutr. Dietet.* 16, 257-263, 2003.

MERTINS, O.; SEBBEN, M.; SCHNEIDER, P. H.; POHLMANN, A. R.; da SILVEIRA, N. P. Caracterização da pureza de fosfatidil colina da soja através de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>31</sup>p. *Quim. Nova*, 31(7), 1856-1859, 2008.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Quim. Nova* 24, 105-111, 2001.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.*, 65, 55-63, 1983.

MUTHUKUMARAN, J.; SRINIVASAN, S.; VENKATESAN, R. S.; RAMACHANDRAN, V.; MURUGANATHAN, U. Syringic acid, a novel natural phenolic acid, normalizes hyperglycemia with special reference to glycoprotein components in experimental diabetic rats. *Journal of Acute Disease*, 2, 304-309, 2013.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41, 1523-1542, 2006.

NASCIMENTO, G.G.F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, 31, n.2, 247-256, 2000.

NUNAN, E.A. et al. Estudo da atividade antimicrobiana de extrato de folha de Aristolochia gigantea Mart. E Zucc. *Revista de Farmácia e Bioquímica*, Belo Horizonte, 6, n.1,33-40, 1985.

OCHIAI, M.; NAGAO, M.; WAKABAYASHI, K. SUGIMURA, T. Superoxide dismutase acts as an enhancing factor for quercetin mutagenesis in rat – liver cytosol by preventing its decomposition. *Mutat. Res.*, 129, 19-24, 1984.

ORJALA, J.; ERDELMEIER, C. A. J.; WRIGHT, A. D.; RALI, T.; STICHER, O. Five new prenynated p-hydroxybenzoic acid derivatives with antimicrobial and molluscicidal activity from *Piper auduncum* leaves. *Planta Medica*, 59, 546-551, 1993.

PAGNUSSATT, F. A.; DEL-PONTE, E. M.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Inhibition of *Fusarium graminearum* growth and mycotoxin production by phenolic extract from *Spirulina* sp. *Pestic Biochem Phys.* 108, 21 – 26, 2014.

PESARICO, A. P.; SARTORI, G.; SANTOS, C. F.A.; NETO, J. S. S.; BORTOLOTTO, V.; SANTOS, R.C. V.; NOGUEIRA, C. W.; PRIGOL, M. 2,2 -Dithienyl diselenide pro-oxidant activity accounts for antibacterial and antifungal activities. *Microbiological Research*, 168, 563–568, 2013.

PIETTA, P.; BRUNO, A.; MAURI, P.; RAVA, A. Separation of flavonol-2-O-glycosides from *Calendula officinalis* and *Sambucus nigra* by high-performance liquid and micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Chromatogr.*, 593(12):165-170, 1992.

RAFECAS, M.; GUARDIOLA, F.; ILLERA, M.; CODONY, R.; BOATELLA, J.; Liquid chromatographic determination of phenolic antioxidants in bakery products. *J. Chromatogr.* 822, 305-309, 1998.

RANSON, M. R.; CARMICHAEL, J.; O'BYRNE, K.; STEWART, S.; SMITH, D.; HOWELL, A. Treatment of advanced breast cancer with sterically stabilized liposomal doxorubicin: results of a multicentre, Phase II trial. *J. Clin. Oncol.*, 3185, 1997.

RODTJER, A.; SKIBSTED, L. H.; ANDERSEN, M. L. Antioxidative and prooxidative effects of extracts made from cherry liqueur pomace. *Food Chem.*, 99, 6-14, 2006.

RUAN, J. Y.; GERENDAS, J.; HARDTER, R.; SATTELMACHER, B. Effect of root zone pH and form and concentration of nitrogen on accumulation of quality-related components in green tea. *J. Sci. Food. Agric.* 87, 1505-1516, 2007b.

SAKAGAMI, H.; SATOH, K. Pro-oxidant action of two antioxidants: ascorbic acid and gallic acid. *Anticancer Research*, 17, 221–224, 1997.

SANG, S.; LAPSLY, K.; JEONG, W. S.; LACHANCE, P. A.; HO, C. T.; ROSEN, R. T. J. Antioxidative phenolic compounds isolated from almond skins (*Prunus amygdalus* Batsch). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2459–2463, 2002.

SAURA-CALIXTO, F. D.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAMPAIO, C. G.; MORAIS, S.M.; BRITO, E. S.; ALVES, R. E.; RUFINO, M. S. M. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH e ABTS – Metodologia Científica. EMBRAPA: Fortaleza, 2007.

SAWA, T.; NAKAO, M.; AKAIKE, T.; ONO, K.; MAEDA, H. Alkylperoxyl radical-scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: implications for the anti-tumor-promoter effect of vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 397-402 19, 1999.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev. Bras. Med. Esporte*.10, 308-313, 2004.

SCORDINO, M.; SABATINO, L.; TRAULO, P.; GARGANO, M.; PANTO, V.; GAGLIANO, G. HPLC-PDA/ESI-MS/MS detection of polymethoxylated flavones in highly degraded citrus juice: a quality control case study. *European Food Research and Technology*, 232, 275–280, 2011.

SEVERCAN, F. Vitamin E decreases the order of the phospholipid model membranes in the gel phase: an FTIR study. *Bioscience Reports.*, 17 (2), 1997.

SEVERCAN, F.; SAHIN, I.; KAZANCI, N. Melatonin strongly interacts with zwitterionic model membranes- evidence from Fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry, *Biochim. Biophys. Acta*. 1668, 215-222, 2005.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of Functional Foods* 2015.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Phenolics in food and nutraceuticals. Boca Raton, FL: CRC Press. 1- 558, 2004.

SHALABY, S.; HORWITZ, B. A. Plant phenolic compounds and oxidative stress: integrated signals in fungal-plant interactions. *Curr Genet* 61, 347-357, 2015.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia da planta ao medicamento, 2<sup>a</sup> ed rev, Porto Alegre/ Florianópolis: Ed Universidade UFRGS/ Ed da UFSC, 2000.

SOARES, M.; WELTER, L.; KUSKOSKI, E. M.; GONZAGA, L.; FETT, R. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas niágara e isabel. *Rev. Bras. Frutic.*, 30(1), 059-064, 2008.

SOUSA, C. M. M. S.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR., G.M.; AYRES, M. C. C; COSTA, C. L. S. D.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D.S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quim. Nova*, 30 (2), 351-355, 2007.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005.

THOMPSON, P. E.; MOORE, A. M.; REINERTSON, J. W.; Antimalarial activity of  $\alpha$ -resorcylic acid and analogs and reversal by p-hydroxybenzoic acid. *Antibiotics and Chemotherapy*, 3, 399-408, 1953.

TIBERG, F. Improving drug delivery by use of lipid self-assembly particle structures-beyond liposomes and emulsions. *Business Briefing Pharma. Outsourcing.*, 2005.

TORRES, I. M. S. Ceftazidima e cefepima encapsuladas em lipossomas unilamelares: obtenção, caracterização, e avaliação da atividade antimicrobiana in vitro contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Brasilia. Universidade de Brasilia. Tese (doutorado). 123 f. 2008.

TREMACOLDI, C. R.; WATANABE, N. K; CARMONA, E. C. Production of extracellular acid proteases by *Aspergillus clavatus*. *Wld. J. Microbiol. Biotech.*, 20: 639-642, 2004.

WAGNER, A.; VORAUER-UHL, K. Liposome technology for industrial purposes. *J. Drug Delivery*, 1-9, 2011.

WEISSMANN, G. Aspirin. *Scientific American*.58, 1991.

WILMS, L.C.; KLEINJANS, J. C.; MOONEN, E.J.; BRIEDÉ, J.J. Discriminative protection against hydroxyl and superoxide anion radicals by quercetin in human leucocytes in vitro. *Toxicol In Vitro*, 22, 301-7, 2008.

WISEMAN, H.; KAUR, H.; HALLIWELL, B. DNA damage and cancer: Measurement and mechanism. *Cancer Lett.* 93, 113-120, 1995.

YANG, J.; MAU, J.; KO, P.; HUANG, L. Antioxidant properties of fermented soybean broth. *Food Chem.*, 71, 249-254, 2000.

YI, P. N.; MACDONALD, R. C. Temperature dependence of optical properties of aqueous dispersions of phosphatidylcholine. *Chem. Phys. Lipids*. 11, 14-134, 1973.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: Sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: Yunes R. A., Calixto J.B. (org.) *Plantas medicinais sob à ótica da química medicinal moderna*. Chapecó, Brasil: Argos, 18-44, 2001.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Química Nova*, 24, 147-152, 2001.