UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional
Tecnologia em Química e Bioquímica

DANIELA RODRIGUES SILVA

Extratos vegetais na proteção de membranas
contra o dano fotoinduzido

Versão original da dissertação defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
20/07/2016

DANIELA RODRIGUES SILVA

**Extratos vegetais na proteção de membranas
contra o dano fotoinduzido**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências, Área de Concentração
Tecnologia em Química e Bioquímica*

Orientador (a): Prof. Dr. Maurício da Silva Baptista

São Paulo

2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Silva, Daniela Rodrigues

S586d Extratos vegetais na proteção de membranas contra o dano
fotoinduzido / Daniela Rodrigues Silva. -- São Paulo, 2016.
79p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador : Baptista, Maurício da Silva

1. Membrana lipídica : Peroxidação: Biologia 2. Terapia
fotodinâmica I. T. II. Baptista, Maurício da Silva, orientador.

574.875 CDD

À minha mãe, Sueli...

***Por confiar em mim;
Me mostrar que é possível;
Me manter firme nos momentos difíceis;***

***Por todo amor, dedicação e incentivo.
Te amo!***

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar o caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Ao Prof. Dr. Maurício Baptista, pela orientação, oportunidade, auxílio, amizade e, principalmente, pela paciência até aqui.

A todos dos Laboratórios em estive por esses anos de estudo onde conheci pessoas admiráveis. Em especial às Prof. Ana Carmona, Iolanda Cuccovia e Rosangela Itri, obrigada pela assistência em experimentos durante o caminho.

À minha querida amiga, Waleska Kerllen Martins Gardesani, por acreditar em mim, por não permitir que eu me desviasse do caminho lembrando-me que Deus tem um propósito que as vezes não entendemos, mas que um dia fará sentido... Me mostrar o caminho da ciência, fazer parte da minha vida nos momentos bons e ruins, por ser um exemplo de profissional e de mulher que estará sempre guardada na minha memória e coração.

Aos colegas do Laboratório de Processos Fotoinduzidos: Alan, Ale, Alessandra, Cleidi, Patty, Roberta, Vinny, Guilherme, Chris, Divinomar, Helena, Tay, Isabel, André, Mari, Décio, Orlando, Michelle e Nayra por fazerem parte dessa minha trajetória aprendi um pouco com cada um de vocês.

Em especial, Ana (“Anitta”), Alice, Raul, “estrelas do meu coração”, obrigada por todo apoio, incentivo, risadas, descontração, choros e conflitos, aprender com vocês fez toda a diferença, afinal, a amizade sempre faz!

Aos amigos da Walter Belian que fizeram parte dos momentos, em especial, Raquel, Leandro, Tainá e Mila vocês não imaginam o quanto foram importantes para que eu seguisse nas horas difíceis, jamais esquecerei de vocês.

À Raquel Boeira Rizzi, e Patty Munekata, que acompanhou por longos meses, em nossas viagens diárias na Airton Senna, minhas histórias e o desenrolar até aqui! Serei eternamente grata pelas risadas, paciência e puxões de orelha que me deram.

À Mariana Ramos, minha querida amiga de longa data, o meu muito obrigada, as vezes quase 20 anos de amizade, um ouvido e um chá da tarde repleto de cumplicidade é tudo que precisamos para manter a sanidade mental.

Aos amigos do Aché, principalmente 2 turno, Bonny, Pri, Fê, Beth, Johnny, Eglá, Diego, Dani, sem esquecer, claro, Mila e Karen por fazerem meus dias mais loucos e divertidos.

E, finalmente, ao Nestor (Farma Service), por permitir que seus extratos fossem utilizados nesse trabalho de pesquisa. Apesar de todo contratempo, muito obrigada.

“Jamais permita que os impasses da vida o perturbem. Afinal, ninguém pode escapar dos problemas, nem mesmo santos ou sábios...”

Buda Nitiren Daishoniu

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."

José de Alencar

RESUMO

(Silva, D.R) **Extratos vegetais na proteção de membranas contra o dano fotoinduzido**. 2016. Número de páginas do trabalho (79p). Dissertação (Mestrado Profissional) - Programa de Pós-Graduação de Tecnologia em Química e Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O mercado de produtos cosméticos, especialmente aqueles que têm na sua composição constituintes naturais, está em franca expansão. Uma das razões desta expansão é que os extratos vegetais têm eficácia na proteção contra os efeitos da exposição solar, sendo que o mecanismo de ação envolve principalmente o efeito antioxidante, diminuindo ou inibindo os danos gerados pelos radicais livres e/ou por outros compostos oxidantes. Este efeito protetor dos extratos vegetais tem motivado o interesse das indústrias do ramo, especialmente no entendimento dos mecanismos de dano e proteção. Além do efeito antioxidante, demonstrou-se recentemente que compostos vegetais podem também exercer efeito protetor através da proteção de membranas. No entanto, a relação entre a capacidade antioxidante desses compostos e a eficiência de proteção de membranas ainda não foi estabelecida. Neste trabalho, pretende-se quantificar a eficácia relativa dos extratos vegetais em termos de proteção de membranas.

Palavras-chave: Membrana lipídica, extratos vegetais, dano fotoinduzido, antioxidantes.

ABSTRACT

(Silva, D.R) **Plant extracts in membrane protection against photoinduced damage**. 2016. (79p). Dissertation (Professional Master) - Graduate Program of Technology in Chemistry and Biochemistry . Institute of Chemistry University of São Paulo, São Paulo.

The market of cosmetics, especially those who have in their composition natural constituents, is booming. One reason for this increase is that the plant extracts are effective in protecting against the effects of solar exposure, and the mechanism of action involves mainly the antioxidant effect, decreasing or inhibiting the damage caused by free radicals and / or other oxidizing compounds. This protective effect of plant extracts has motivated the interest of the sector industries, especially in the understanding of the mechanisms of injury and protection. In addition to the antioxidant effect, it was demonstrated recently that plant compounds may also exert a protective effect by the protective membrane. However, the relationship between the antioxidant capacity of these compounds and membranes protecting efficiency has not been established. In this work, it is intended to quantify the relative efficacy of the plant extracts in terms of membrane protection.

Keywords: membrane lipidic, plant extracts, photoinduced damage, antioxidants.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DMMB: Dimetil Azul de Metileno

TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity

AG: Ácido gálico

DPPH: Método anti radicalar (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

PFT: Polifenol total

FS: Fotossensibilizador

Lista de figuras

Figura 1 – Espectro da radiação solar e perfil de penetração na pele humana; (KIRCHOFF, 1995).

Figura 2: Esquema representativo das reações de fotossensibilização do tipo I e tipo II de um fotossensibilizador (FS). [Ochsner, 1997; Viola e Dall'Acqua, 2006].

Figura 3. Distribuição eletrônica dos orbitais moleculares (π^*) do oxigênio do estado singlete excitado ($^1\Delta_g$, destacado em vermelho) e fundamental triplete ($^3\Sigma_g$).

Figura 4. Esquema simplificado de reações "eno" (1) e "dieno"(2) envolvendo o oxigênio singlete ($^1\Delta_g$)O₂. (Schaich, 1992)

Figura 5. Esquema simplificado das reações envolvidas na peroxidação lipídica e o envolvimento da adição de oxigênio singlete($^1\Delta_g$) O₂ por reações "ene" (1) e "dieno" (2). (Ayala e col, 2014)

Figura 6. Esquema simplificado do mecanismo de ação antioxidante da vitamina E (à direita) na redução de lipídeos oxidados (à esquerda). (Niki, 2015)

Figura 7. Estrutura molecular do Trolox. (Sigma Aldrich, 2015), acessado em 2015.

Figura 8. Estrutura do Ácido Gálico(Sigma Aldrich, 2015), acessado em 2015

Figura 9. Estrutura genérica da quercetina encontrada no extrato de *F. vulgare* onde R= (-H ou -OH) e R₁= (galactose ou glicose). (Badgujar e col, 2014; Gowami e Chatterjee, 2014).

Figura 10. Estrutura molecular do polifenol apigenina. (Ranjbar et al, 2014; Singh et al 2011; Munir et al, 2014).

Figura 11. Estrutura da catequina (Portella et al, 2013; Espinola et al, 1997).

Figura 12. Estrutura do ácido elágico. (Sigma Aldrich, 2015), acessado em 2015

Figura 13. Estrutura da punicalagina. (Sadheguipour et al, 2014)

Figura 14. Estrutura da trealose. (Sigma Aldrich, 2015), acessado em 2015.

Figura 15. Estrutura da ligação 1,3-b,D-galactopiranosídica presente na cadeia de polissacarídeos da goma arábica (Al-Yahya et al, 2009; Hilmi et al, 2014).

Figura 16. Monômero de hialurano (Rocha de Souza et al, 2007)

Figura 17. Estrutura monomérica básica dos xilo-glicanos (onde G = glicose, X = xilose) (DENIS U. DE LIMA, 2000)

Figura 18. Modelo de membrana segundo o modelo do Mosaico Fluido: Bicamada fosfolipídica (A), Colesterol (B), Proteínas intrínsecas (C) e extrínsecas (D), glicoproteínas (E), Glicolipídeos (F) e Glicocálice (G). (Michel, M et al, 2006).

Figura 19. Estrutura molecular da fosfatidilcolina. (Julita, A et al, 2001).

Figura 20. Estrutura química do 1,9-Dimetil-Azul de Metileno (DMMB). (Sigma Aldrich, 2015)

Figura 21. Modelo proposto para avaliação de dano e proteção de membranas.

Figura 22. Espectro de emissão do LED- determinação da banda espectral para irradiação do fotossensibilizador.

Figura 23. Espectro de absorbância do 1,9 Dimetil Azul de Metileno (DMMB)- Determinação da banda espectral.

Figura 24: Separação do marcador fluorescente CF livre das vesículas contendo o marcador encapsulado por coluna de gel filtração sephadex (G-50).

Figura 25 - Redução do Radical DPPH após reação com supressores de radicais livres (Liang, N.; Kitts, D., 2014)

Figura 26 - Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu (Huang, D. et al)

Figura 27 – Esquema representativo do procedimento para determinação da concentração de extratos vegetais após ligação em membranas (Adaptado de Junqueira, H.C, 2008)

Figura 28- Banda de emissão do irradiador de LEDs vermelho (Página, 38)

Figura 29 - Intensidade de fluorescência da CF em função do tempo de lipossomos incubados com tampão (esquerda) e na ausência e presença de Triton X (direita). (lambda de excitação=480nm, lambda de emissão 517nm). (Página, 39)

Figura 30- Intensidade de fluorescência em função do tempo de irradiação em lipossomos de lecitina de soja. (lambda de excitação=480nm, lambda de emissão de 517nm). [DMMB]=15µM, pH=8.0 (Pagina, 41)

Figura 31- Intensidade de fluorescência em função do tempo de irradiação, obtido para vesículas encapsuladas com a sonda carboxifluoresceína com as variadas concentrações de ácido gálico. (lambda de excitação=480nm, lambda de emissão de 517nm). [DMMB]=15µM, pH=8.0. (Pagina 43)

Figura 32- Porcentagem de proteção de membrana em função da concentração de ácido gálico. (Pagina, 44)

Figura 33- Intensidade de fluorescência em função do tempo de irradiação em membranas na presença de extratos vegetais (a) Erva doce; (b) Camomila (c) Guaraná (d) Nogueira (e) Romã. (lambda de excitação=480nm, lambda de emissão de 517nm). [DMMB]=15µM, pH=8.0. (Pagina 45)

Figura 33 A- Eficiência de proteção de membrana após irradiação de membranas na presença compostos fenólicos (a) Erva doce; (b) Camomila (c) Guaraná (d) Nogueira (e) Romã. (Pagina 45)

Figura 34- Intensidade de fluorescência em função do tempo de irradiação, obtido para vesículas encapsuladas com a sonda carboxifluoresceína com as variadas concentrações de trealose, padrão sacarídeo utilizado no estudo. (lambda de excitação=480nm, lambda de emissão de 517nm). [DMMB]=15µM, pH=8.0. (Página, 46)

Figura 34 A- Intensidade proteção após do tempo de irradiação, obtido para vesículas encapsuladas com a sonda carboxifluoresceína com as variadas concentrações de trealose, padrão sacarídeo utilizado no estudo. (Página, 47)

Figura 35 - Intensidade de fluorescência em função do tempo de irradiação, obtido para vesículas encapsuladas com a sonda carboxifluoresceína em variadas concentrações de extratos vegetais sacarídeos (a) Aloe Vera; (b) Plantcol (c) Tamariliz (d) Alga Fucus

Figura 35 A- Eficiência de proteção de membrana após irradiação de membranas na presença de extratos vegetais sacarídeos (a) Aloe Vera; (b) Plantcol (c) Tamariliz (d) Alga Fucus.

Figura 36- Raio hidrodinâmico (nm) de lipossomos sem irradiação e após irradiação (1hora e 2 horas) na ausência e na presença de extratos contendo compostos polifenólicos. (Pag, 50)

Figura 37- Raio hidrodinâmico (nm) de lipossomos sem irradiação e após irradiação (1hora e 2 horas) na ausência e na presença de extratos contendo compostos sacarídeos. (Pag,50).

Figura 38 - Porcentagem remanescente do radical DPPH• após submissão à soluções antioxidantes (a) Trolox e (b) Extrato Camomila, determinação do EC₅₀. Todas as análises de teste foram realizadas em triplicata. (Pag, 52)

Figura 39 – Quantificação do equivalente de Trolox (1,12g) por quilo de extrato (Camomila), em função do tempo de reação. (Pág, 53)

Figura 40 – Absorbância de soluções com contendo concentrações crescentes de ácido gálico, submetidas ao reagente de Folin–Ciocalteu. Os resultados de quantificação de polifenóis totais são expressos como equivalentes de ácido gálico (EAG) por Kg de extrato, através de curva de calibração, obtendo-se a concentrações equivalente de padrão de ácido gálico que fornece a mesma absorbância do extrato. (pág, 54)

Figura 41. Proteção de membranas de extratos vegetais que tem capacidade antioxidante e que se ligam bem em membranas (Romã e Camomila) e do extrato de Cereja que tem valores desprezíveis de atividade antioxidante (GAE=0.1 e TEAC=0.5). (Pág, 59)

Figura 42. Aumento de fluorescência de CF na ausência de trealose (TMP+LIP+FS) e na presença de concentrações crescentes de trealose. (pág, 60)

Figura 43. ESQUERDA: (A) membrana modelo com moléculas de trealose proximas e (B) membranas com trealose ligada. Obtida de (Villarreal MA1, Díaz SB, Disalvo EA, Montich GG. Molecular dynamics simulation study of the interaction of trehalose with lipid membranes. Langmuir. 2004 Aug 31;20(18):7844-51). DIREITA. Estrutura molecular de trealose.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Reações de fotossensibilização, estresse redox e antioxidantes.....	17
1.2 Fotoenvelhecimento da pele e estratégias antioxidantes.....	23
1.3 Polifenóis.....	25
1.4 Sacarídeos.....	29
2. MEMBRANAS BIOLÓGICAS.....	32
2.1 Lipossomos.....	34
2.2 Fotossensibilização do 1,9-dimetil-azul de metileno como modelo para estudos de danos às membranas.....	35
3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	36
4. OBJETIVO.....	36
5. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	37
6. METODOLOGIA.....	38
6.1 Fotossensibilizador.....	38
6.2 Lipossomos.....	39
6.3 Preparação da solução de carboxifluoresceína.....	40
6.4 Preparação da coluna de Sephadex-G50.....	40
6.5 Preparação do tampão eluente (10mM Tris, 300mM NaCl, pH=8)...	40
6.6 Separação de lipossomos encapsulados com carboxifluoresceína..	40
6.7 Quantificação de vazamento do lipossomo.....	41
6.8 Análises complementares.....	43
6.9 Tratamento de dados.....	47
7. RESULTADOS	47
7.1. Caracterização do irradiador	47
7.2. O modelo experimental: Estabilidade da suspensão de lipossomos sem e com irradiação e o cálculo da percentagem de dano.....	48
7.3 Eficiência de proteção de membranas.....	51

7.3.1. Compostos fenólicos.....	52
7.3.2. Sacarídeos.....	55
7.4 Estrutura dos lipossomos oxidados e protegidos.....	58
7.5 Ensaio complementares.....	60
7.5.1 Atividade antiadicalar.....	60
7.5.2 Polifenol total.....	62
7.5.3 Ligação em membranas.....	65
8. DISCUSSÃO.....	67
9. CONCLUSÃO.....	71
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

1. INTRODUÇÃO

A indústria de cosméticos constitui um dos segmentos mais importantes da economia mundial e é particularmente forte no Brasil. Atualmente, o Brasil ocupa a terceira posição no ranking mundial do mercado cosmético, sendo o primeiro na América Latina. A pesquisa nesse setor acompanhou com rigor o desenvolvimento do mercado com novas tecnologias [1]. Bioativos naturais, que atuam diretamente na pele, são cada vez mais frequentes em produtos cosméticos [2]. Descobertas de mecanismos moleculares destes ativos levaram ao desenvolvimento de novas tecnologias cosméticas, atuando não somente na modificação da aparência da pele e do cabelo, mas também influenciando positivamente na saúde destes tecidos.

No desenvolvimento de novos produtos de origem natural, destaca-se a farmacognosia, ciência multidisciplinar que estuda compostos naturais com ação terapêutica analisando suas propriedades físicas, químicas, bioquímicas e biológicas [3]. Somente para dar um exemplo, segundo Newman e Cragg [4], nos últimos 70 anos identificaram-se 175 moléculas com capacidade antitumoral, das quais cerca de 50% correspondiam a produtos naturais ou compostos derivados diretamente da fonte natural [4].

Um desafio frequente nesta área de pesquisa é identificar novas plataformas de testes para estes ativos, sem utilizar, se possível, organismos vivos. Nesse cenário, a pesquisa básica e translacional tem se empenhado na obtenção de modelos miméticos para o estudo de tais compostos em todos os níveis, desde membranas e lipossomas até o nível das células em cultura e das tecnologias *in-vitro* de reconstrução de pele. Neste trabalho almejamos principalmente desenvolver uma plataforma que possa quantificar a proteção

de membranas biológicas exercidas por diversos ativos usados na indústria cosmética. Antes de abordar este objetivo, preparamos a revisão de diversos temas relevantes neste assunto.

1.1 Reações de fotossensibilização, estresse redox e antioxidantes

A radiação solar, que apresenta um largo espectro frequências, é a principal fonte de energia no nosso planeta. Essa radiação pode ser dividida em duas regiões principais de acordo com a capacidade de ionização que causa na matéria: radiação ionizante e radiação não ionizante. A radiação ionizante é subdividida em raios-X e raios gama, enquanto a radiação não-ionizante (Figura 1) subdivide-se em radiação ultravioleta (UV), luz visível e radiação infravermelha. Felizmente a radiação ionizante, que pode ser altamente prejudicial aos seres vivos, não penetra na atmosfera terrestre [5].

Figura 1 – Espectro da radiação solar e perfil de penetração na pele humana

O espectro de radiação não ionizante é comumente classificado de acordo com a faixa de comprimento de onda (λ), em função da faixa espectral que os seres humanos enxergam. A radiação UV é a parte do espectro eletromagnético compreendida entre a radiação ionizante e a radiação visível ($100\text{nm} < \lambda < 400\text{nm}$). Essa radiação é subdividida em UVC ($100\text{nm} < \lambda < 280\text{nm}$), UVB ($280\text{nm} < \lambda < 320\text{nm}$) e UVA ($320\text{nm} < \lambda < 400\text{nm}$) (Baptista, 2011).

A radiação UVC é muito energética e induz processos químicos degradativos da matéria biológica. UVC é absorvida praticamente na sua totalidade na estratosfera, sendo que a intensidade de UVC é desprezível no nível do mar. Já as radiações UVB, UVA, visível e infra-vermelho chegam à superfície terrestre e têm penetrabilidade considerável na pele, merecendo atenção e cuidados quanto à exposição exagerada.

É importante mencionar que a interação com a radiação UV não é somente maléfica para a pele. Esta é de fato fundamental para a manutenção da homeostase dos seres humanos. A radiação UVB, por exemplo, é importante para a ativação da vitamina D, necessária para uma eficiente absorção de cálcio, magnésio, ferro, fosfato e zinco, dentre outros efeitos. Com efeito, a ausência da radiação UV tem se mostrado um fator crítico para aparecimento de desordens psicológicas como a depressão sazonal recorrente na Europa [6].

Em contrapartida, biomoléculas como ácidos nucleicos e proteínas absorvem diretamente radiação UVB, formando produtos característicos como dímeros de pirimidina (CPD) e fotoprodutos 6-4 (6-4P), no caso de DNA. Estes produtos são considerados lesões químicas no DNA e podem ser genotóxicos

[7]. O UVA, não obstante, também é capaz de excitar fotossensibilizadores endógenos tais como as melaninas e as flavinas, gerando espécies reativas de oxigênio, levando a quadros de stress oxidativo e de morte celular [8]. Assim, a exposição excessiva às radiações UV resultam na formação de espécies reativas em excesso às defesas anti-oxidantes, causando danos celulares e promovendo o aparecimento de queimaduras e processos inflamatórios, envelhecimento precoce da pele e o aparecimento de diversas patologias [9].

A interação da radiação com os cromóforos naturais, também chamados fotossensibilizadores (FS), desencadeia uma série de processos fotofísicos e fotoquímicos [10]. Dentre esses processos, a formação de estados excitados de tempo de vida longos (espécies tripletes) facilita a formação de espécies reativas que promovem stress oxidativo na célula (Figura 2) e estes processos têm sido separado em mecanismos Tipo I e Tipo II.

No tipo I. o estado triplete transfere energia ou elétron a outras moléculas do substrato celular formando radicais livres ou outros estados excitados. Já na fotossensibilização do tipo II, a transferência de energia do fotossensibilizador no estado triplete se dá ao oxigênio triplete ($^3\text{O}_2$), excitando este ao estado singlete ($^1\text{O}_2$), que pode adicionar a dupla ligação, ao contrário do oxigênio fundamental (triplete) [11]. As reações de fotossensibilização do tipo I e tipo II ocorrem em paralelo de acordo com diversos fatores, incluindo, por exemplo, a concentração de oxigênio do meio. De fato, foi observado que com o aumento da concentração de oxigênio, há um aumento das reações do tipo II, onde há a formação de oxigênio singlete e de várias outras espécies reativas de oxigênio. No entanto, em condições fisiológicas as concentrações

de oxigênio podem ser pequenas, chegando a 7,5 μM ou menos, e as reações do tipo I podem ser preferenciais [12].

Figura 2: Esquema representativo das reações de fotossensibilização do tipo I e tipo II de um fotossensibilizador (FS). Onde: 1) Absorção de luz 2) Conversão interna 3) Fluorescência 4) Cruzamento intersistema 5) Fosforescência 6) Transferência de energia 7) Transferência de prótons e elétrons.

As reações tipo I e II também levam à formação de diferentes espécies reativas e, possivelmente, diferentes modos e intensidades em que os processos oxidativos se desencadeiam em um ambiente biológico. O oxigênio singleto, fruto da reação do tipo II nesse caso, é altamente reativo, apresentando um curto tempo de vida em água e grande potencial oxidativo (Figura 3).

Estado	Orbitais π^*	Energia (kcal/mol)
$1\Sigma_g^+$	$\uparrow \downarrow$	37,5
$1\Delta_g$	$\uparrow \downarrow$ —	22,5
$3\Sigma_g^-$	$\uparrow \uparrow$	

Figura 3. Distribuição eletrônica dos orbitais moleculares (π^*) do oxigênio do estado singlete excitado ($1\Delta_g$, destacado em vermelho) e fundamental tripleto ($3\Sigma_g$).

Essa reatividade aumentada em relação ao oxigênio no estado fundamental tripleto ($3\Sigma_g$) é explicada pela presença de um orbital π^* vazio (Figura 3), possibilitando reações de adição a duplas ligações. Pode-se então originar hidroperóxidos (reação 1 do tipo "ene") e peróxidos cíclicos (reação 2 do tipo "dieno") em uma única etapa de deslocamento eletrônico conforme esquematizado nas reações da figura 4 [13].

Figura 4. Esquema simplificado de reações "eno" (1) e "dieno"(2) envolvendo o oxigênio singlete ($1\Delta_g$) O_2 .

Já o mecanismo de oxidação fotossensibilizada do Tipo I forma preferencialmente espécies radicalares. As membranas são ricas em ligações duplas e duplas conjugadas e, portanto, um alvo fácil tanto aos processos de oxidação tipo I e tipo II. No caso de duplas simples após a adição de 1O_2 um

passo adicional de reação é necessário, que é a abstração de hidrogênio ou formação de radical para que haja a etapa de iniciação da peroxidação lipídica.

Após a etapa de iniciação, a reação de peroxidação lipídica segue de forma encadeada produzindo peróxidos e cicloperóxidos até que haja uma reação de terminação radicalar. Em ambiente biológico, reações de peroxidação lipídica geram pequenos fragmentos de aldeído tais como o 4-hidróxi-nonenal e o malonodialdeído e esses podem ser quantificados como marcadores da extensão das reações de peroxidação (Figura 5) [15].

Figura 5. Esquema simplificado das reações envolvidas na peroxidação lipídica e o envolvimento da adição de oxigênio singlete($^1\Delta_g$) O_2 por reações "ene" (1) e "dieno" (2).

1.2. Fotoenvelhecimento da pele e estratégias antioxidantes

O fotoenvelhecimento da pele é um processo fisiológico complexo, que afeta praticamente todas as camadas da pele, sendo que o dano maior é observado no tecido conectivo da derme [16], atribuindo às pessoas aparência mais velha, devido a perda de firmeza e tonicidade, bem como, o aparecimento de rugas [17]. O fotoenvelhecimento da pele está relacionado com o aparecimento de outras enfermidades mais graves como as lesões cancerígenas e pré-cancerígenas [18]. Estratégias antioxidantes são frequentemente utilizadas para evitar o câncer de pele e o envelhecimento precoce da pele, através da inibição/propagação de reações foto-oxidativas. Suplementação com compostos de origem vegetal e com moléculas puras com reconhecido potencial anti-oxidante, são bastante frequentes [19].

A incidência solar por períodos prolongados na superfície cutânea causa um desequilíbrio entre a atividade de moléculas oxidantes e a atividade das defesas anti-oxidantes. A radiação solar provoca a geração excessiva de radicais livres e de outras espécies oxidantes, sendo que os mecanismos antioxidantes naturais não são suficientes para neutralizá-la, causando desbalanço redox, morte celular, danos teciduais, processos inflamatórios, culminando com o envelhecimento precoce da pele [20].

Um dos processos de defesa antioxidante endógeno bastante conhecido e importante na proteção de membranas celulares, é o da vitamina E [21]. A vitamina E se intercala na membrana e é oxidada pelo lipídeo radicalar doando um hidrogênio e interrompendo o processo de peroxidação lipídica. A renovação da vitamina E oxidada ocorre pela doação de um hidrogênio por

outro oxidante tal como a vitamina C ou pela ação de enzimas redutoras como a glutatona redutase, fazendo-a ativa novamente (Figura 6).

Figura 6. Esquema simplificado do mecanismo de ação antioxidante da vitamina E (à direita) na redução de lipídeos oxidados (à esquerda).

No presente estudo, utilizou-se o análogo solúvel da vitamina E, Trolox (Figura 7) [22], como padrão de comparação no cálculo da atividade antioxidante dos extratos vegetais. Os extratos vegetais foram subdivididos em duas classes principais de acordo com seus compostos constituintes, a saber, polifenóis e sacarídeos.

Figura 7. Estrutura molecular do Trolox.

1.3. Polifenóis

Os polifenóis são por definição compostos que tem mais de um grupo fenol na sua estrutura [23]. Fenóis tem reconhecida capacidade anti-oxidante por serem capaz de doar hidrogênio, neutralizando radicais e outros compostos oxidantes e formando radicais mais estáveis. Nos polifenóis as duplas conjugadas e os anéis fenólicos agem de maneira sinérgica aumentando a capacidade de interagir com compostos excitados como oxigênio singlete ou tripleto, inativando-os ao seu estado fundamental num processo chamado de supressão física [24]. Além disso, o hidrogênio alílico ou fenílico age na redução de espécies oxidantes, interrompendo processos oxidativos como o de peroxidação lipídica. Abaixo descrevemos alguns compostos puros, que foram utilizados como padrões neste trabalho, bem como, alguns extratos vegetais que foram estudados, além dos principais compostos químicos polifenólicos presentes nestes.

Ácido Gálico: O ácido gálico (Figura 8) [25], é um poderoso polifenol encontrado na planta do chá (*Camellia sinensis*), uvas, *berries* e vinho. É comumente utilizado como padrão em análises de polifenóis totais no teste de Folin-Ciocalteu [26]. Sua atividade protetora em relação às reações de peroxidação lipídica é bem estabelecida. O ácido gálico mostra-se inclusive mais eficiente que o TROLOX em ensaios de supressão de radicais hidroxila ($\text{OH}\cdot$) e peroxila ($\text{OOH}\cdot$) [27]. Tem-se demonstrado também efeitos positivos através da administração do ácido gálico no tratamento de doenças como o diabetes e alzheimer [28].

Figura 8. Estrutura do Ácido Gálico

Extrato de Erva Doce: A Erva Doce (*Foeniculum vulgare*) é uma planta cujas propriedades farmacológicas são bem conhecidas da medicina popular. Seu extrato é conhecido pelas propriedades ansiolíticas e anti-inflamatórias. Entretanto, a literatura científica mostra que os extratos da *F. vulgare* também possuem propriedades antimicrobianas, antivirais, antioxidantes e antienvelhecimento [29]. O extrato é rico no polifenol quercetina, cuja estrutura pode ser observada na figura 9. A quercetina geralmente é encontrada conjugada com algum açúcar na posição R₁, podendo essa, ser substituída por galactose ou glicose.

Figura 9. Estrutura genérica da quercetina encontrada no extrato de *F. vulgare* onde R= (-H ou -OH) e R₁= (galactose ou glicose).

Extrato de Camomila: A camomila (*Matricaria chamomilla*) também é uma antiga conhecida da medicina popular por sua atividade sedativa e ansiolítica em chás da planta. Seu extrato vegetal também foi reportado por sua atividade antioxidante, antidiabética, anti-inflamatória e antimicrobiana, além de reduzir o

dano causado pela peroxidação lipídica [30][31] O principal ativo dos extratos e chás de camomila é a apigenina [32] (Figura 10) [33].

Figura 10. Estrutura molecular do polifenol apigenina

Extrato de Guaraná: O extrato do guaraná (*Paulinia cupana*) é um ótimo potencializador de habilidades motoras e cognitivas *in vivo*. Além disso, estudos clínicos indicam uma menor prevalência de doenças do coração em pacientes suplementados com extrato de guaraná. Sobretudo, aponta-se o extrato de guaraná como um protetor eficaz contra a oxidação de lipídeos [34][35]. Sua composição é rica em catequinas, um importante polifenol (Figura 11) [36].

Figura 11. Estrutura da catequina

Extrato de Nogueira: O extrato da nogueira (*Juglans regia*) tem sido associado à proteção de lipídeos em processos oxidativos e à diminuição de

doenças do coração em estudos clínicos [37]. Seu principal componente polifenólico é o ácido elágico [38] cuja estrutura se observa na figura 12.

Figura 12. Estrutura do ácido elágico.

Extrato de Romã: O extrato da romã (*Punica granatum*) tem atividade antioxidante e anti-inflamatória poderosa, além de ser anticancerígeno e antidiabético [39][40]. Sua composição contém, além de antocianinas e ácido elágico, isômeros de punicalagina, um polifenol complexo como se pode observar na figura 13 [41].

Figura 13. Estrutura da punicalagina.

1.4. Sacarídeos

Os sacarídeos, por sua vez, também podem atuar como protetores celulares, mas através de mecanismos variados. Podem ser redutores, no caso de açúcares com terminação contendo aldeído livre. Sua força antioxidante reside na capacidade de doar hidrogênio para interromper processos oxidativos, oxidando-se no lugar dos lipídeos e terminando o processo encadeado de peroxidação lipídica. Além disso, alguns sacarídeos têm demonstrado a capacidade de proteger membranas, não apenas pela ação antioxidante, mas também por oferecer uma proteção física da integridade das membranas [42].

Trealose: A trealose [43] (Sigma Aldrich, 2015), (Figura 14) é um dissacarídeo constituído por 2 unidades de glicose conectadas por uma ligação α,α -1,1. Seu papel biológico é de grande importância em bactérias, auxiliando na sustentação da parede celular e termotolerância [44][45][46]. Apresenta atividade de resistência ao estresse oxidativo pela diminuição da peroxidação lipídica. Estudos apontam que esse efeito protetor se deve à eficiente ligação entre a trealose e os lipídeos de membranas [47]. Vale ressaltar que a trealose não é um açúcar redutor por não ter aldeído livre.

Figura 14. Estrutura da trealose.

Extrato de Aloe Vera: O extrato de Aloe Vera é muito utilizado na medicina popular como anti-inflamatório em queimaduras e lesões na pele, além ser um

ótimo hidratante natural [48]. Sua composição depende do método de extração [49]. Extratos aquosos, como é o caso do extrato aqui estudado, é rico principalmente em polissacarídeos [50][51].

Extrato de goma arábica: O extrato etanólico da Acácia senegal, uma planta cujo potencial cosmético vem sendo observado pela indústria farmacêutica e do cabelo, comumente conhecido como "goma arábica" é constituído quimicamente de polissacarídeos naturais. Após a hidrólise parcial, o extrato apresenta diversos açúcares, como arabinose, galactose, glucose, ramnose, xilose e ácidos urônicos, na forma de sais de cálcio, magnésio e outros cátions. A maioria das gomas são hidrossolúveis e formam soluções mais ou menos viscosas. Suas principais aplicações são no preparo de emulsões, pastilhas, como fixador para cabelos, pós compactos, cremes e outros produtos cosméticos [52]. Sua estrutura principal é composta por polissacarídeos com ligações 1,3-b,D-galactopiranosil (Figura 15) e sua aplicação farmacêutica tem relatada a eficácia no tratamento de infecções na mucosa intestinal e seu uso como calmante tópico [53][54] .

Figura 15. Estrutura da ligação 1,3-b,D-galactopiranosídica presente na cadeia de polissacarídeos da goma arábica

Extrato de Alga Fucus: A *Fucus vesiculosus* é uma alga utilizada para problemas de tireoide, asma, tosse, distúrbios estomacais, doenças urinárias, diabetes, colesterol alto, desequilíbrio hormonal, dores de cabeça e úlceras. Além disso, no ramo cosmético vem sendo utilizado como antioxidante e anti-envelhecimento [55][56][57]. Os polissacarídeos de sua composição contêm principalmente mucopolissacarídeos (ou glucosaminoglicanos) como o hialurano (Figura 16), por exemplo.

Figura 16. Monômero de hialurano

Extrato do Tamarindo: O extrato do Tamarindo (*Tamarindus indica*) também tem propriedades antioxidantes, que têm se mostrado eficientes na redução de taxas de peroxidação lipídica [58][59][60]. Além disso, seu efeito inibidor sobre enzimas como metaloproteínases e hialuronidases têm chamado atenção para o seu uso cosmético. Os polissacarídeos de sua composição são principalmente xilo-glicanos (Figura 17) [61].

Figura 17. Estrutura monomérica básica dos xilo-glicanos (onde G = glicose, X = xilose).

2. MEMBRANAS BIOLÓGICAS

As membranas biológicas são formadas por uma dupla camada de fosfolípídeos contendo também outras classes de lipídeos, proteínas e açúcares (Figura 18). As proporções molares das moléculas constituintes das membranas varia de célula para célula e de acordo com as condições em que as células se encontram [62].

Proteínas podem ser associadas à membrana de duas formas: incluídas na bicamada lipídica, sendo estas chamadas de proteínas intrínsecas de membranas; ou apenas aderidas a uma das faces da membrana, sendo estas chamadas de proteínas extrínsecas de membranas[63]. Já os carboidratos presentes nas membranas são encontrados como produtos de glicosilação de proteínas ajudando em suas funções ou ligados a fosfolípídeos na forma de glicocálice, ajudando na adesão e no reconhecimento célula-célula. A composição lipídica também pode ser bastante variada com o tipo de membrana ou com a condição fisiológica das células [63].

Figura 18. Modelo de membrana segundo o modelo do Mosaico Fluido: Bicamada fosfolipídica (A), Colesterol (B), Proteínas intrínsecas (C) e extrínsecas (D), glicoproteínas (E), Glicolipídios (F) e Glicocálice (G).

Os fosfolipídios são moléculas anfipáticas, ou seja, são constituídos por uma parte hidrofílica polar (grupo fosfato) e uma parte hidrofóbica apolar (cadeia carbônica), unidas por um grupo glicerol (figura 19). O tamanho e a presença de duplas ligações na cadeia alifática dos fosfolipídeos estão relacionados com a eficiência do empacotamento desses fosfolipídeos e, conseqüentemente, com a fluidez da membrana [64].

Figura 19. Estrutura molecular da fosfatidilcolina.

Além dos fosfolipídeos há diversos outros lipídeos presentes nas membranas, como esteróis e glicolipídios. Os fosfolipídios mais abundantes são aqueles ligados à colina (fosfatidilcolina e esfingomielina) e os aminofosfolipídios (fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina). Destaca-se também o fosfatidilglicerol, o fosfatidilinositol e a cardiolipina que, embora presentes em menores quantidades, apresentam funções fundamentais de sinalização e ancoramento às proteínas da membrana. A distribuição desses lipídeos pelas

duas camadas da bicamada é assimétrica, o que pode refletir em diferentes estruturas e funções das duas superfícies da membrana [65].

As membranas fornecem barreiras físicas para separar o meio externo do interno de células e organelas, além de mediar a entrada e a saída das mais diversas substâncias necessárias para a manutenção da homeostase celular. Consequentemente, a integridade dos lipídeos das membranas afeta diretamente o equilíbrio homeostático das células. A oxidação dos lipídeos altera a conformação destes na membrana, alterando as propriedades das membranas das células e das organelas, podendo levar ao aumento de permeabilidade e a alteração na seletividade no fluxo íons e de outras moléculas e, consequentemente, podendo causar a morte das células [66],[67]

2.1. Lipossomos

Lipossomos, ou vesículas de fosfolipídios, são estruturas esféricas compostas por bicamadas lipídicas que encapsulam parte do meio em que se encontram. São formadas predominantemente por moléculas anfifílicas, insolúveis em água, que quando em ambientes aquosos formam dispersões coloidais [68]. Formam-se pela auto-organização de fosfolipídeos e têm sido utilizados há várias décadas como modelos simplificados de membranas e como carreadoras de fármacos.

Nesse projeto utilizamos lipossomos de leticina de soja como mimético de membrana para quantificar dano e proteção da membrana. O lipossomo é preparado contendo uma sonda fluorescente, que fica auto suprimida, no compartimento interno, a lesão demonstra dano na membrana por aumento de fluorescência. Lecitina é a designação dada a uma mistura de glicolipídios, triglicerídios e fosfolipídios, por exemplo: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e

fosfatidilinositol. No entanto, em bioquímica, o termo lecitina é, usualmente, utilizado como sinônimo de fosfatidilcolina pura, um fosfolipídio que constitui o principal componente da fração fosfatada que se obtém da gema de ovo ou de grãos de soja, de onde é extraída por meios mecânicos ou químicos, utilizando hexano [69].

2.2. Fotossensibilização do 1,9-dimetil-azul de metileno como modelo para estudos de danos às membranas

Como foi descrito acima, os danos por fotossensibilização contribuem significativamente para lesões em membranas celulares. Esses danos são desencadeados por compostos que geram tripletes e que podem induzir tanto mecanismo Tipo I quanto Tipo II. No presente estudo utilizou-se o fotossensibilizador sintético 1,9-dimetil-azul de metileno (DMMB - Figura 20) [70] para causar danos em membranas modelos, ocasionando uma magnitude mensurável e reproduzível de vazamento. DMMB é relativamente hidrofóbico e se liga em membranas, gerando tripletes que atuam tanto pelos mecanismos tipo I quanto pelo tipo II [71].

O DMMB tem demonstrado ser um eficiente fotossensibilizador, tendo sido utilizado em estudos de terapia fotodinâmica, a qual se baseia no princípio de que a interação entre a luz em comprimento de onda adequado com um fotossensibilizador e com o oxigênio fundamental (O_2) resultando na formação de diversas espécies reativas (EROs), [72],[73],[74], que são capazes de danos oxidativos em biomoléculas.

DMMB

Figura 20. Estrutura química do 1,9-Dimetil-Azul de Metileno (DMMB)

3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

As possíveis estratégias de proteção de membranas podem ajudar a indústria cosmética a desenvolver novos conceitos de proteção da pele e do cabelo contra danos oxidativos. Pretendemos desenvolver um protocolo simples para quantificar dano e proteção de membrana.

4. OBJETIVO

Desenvolver um protocolo experimental que possa avaliar dano das membranas por fotossensibilização e proteção destas por extratos vegetais (Figura 21).

Figura 21. Modelo proposto para avaliação de dano e proteção de membranas.

A geração de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) causa danos em membranas, que são quantificados usando a emissão da carboxifluoresceína [CF], que está auto-suprimida no interior do lipossomo, mas cuja fluorescência aumenta significativamente no meio externo após diluição. A eficácia de extratos vegetais (EV) na proteção de modelos de membranas pode ser então quantificada em comparação com padrões anti-oxidantes como ácido gálico. Além disso, pretende-se usar este método para caracterizar outros mecanismos de proteção de membranas além do efeito anti-oxidante.

5. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Reagentes: O DPPH (1,1'-difenil-2-picril-hidrazil), o Trolox, a Carboxifluoresceína o ácido gálico foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Tris-NaCl, Sephadex-G50, Clorofórmio, 1,9- Dimetil Azul de Metileno foram adquiridos da Merck. O Folin-Ciocalteu foi adquirido da Haloquímica. Os extratos vegetais e a Lecitina de soja foram fornecidos pela empresa Farma Service Bioextract. Água utilizada foi bi-destilada e deionizada.

Equipamentos: Os espectros de absorbância foram obtidos em espectrofotômetro Shimadzu UV-VIS 2400. O espalhamento de luz foi realizada em equipamento da Malvern e as medidas fluorométricas foram realizados utilizando-se um leitor de placas Infinite M200-Tecan (RCHISTO). A irradiação foi realizada utilizando conjuntos de LED vermelhos construídos Novatecnica Brasil (Figura 22). O comprimento de onda de máximo de emissão era de 639 nm, com 34 W.m^2 de irradiância a uma distância de 10 cm, garantindo efetividade e homogeneidade de irradiação por toda placa.

Figura 22. Espectro de emissão do LED- determinação da banda espectral para irradiação do fotossensibilizador.

6. METODOLOGIA

6.1. Fotossensibilizador

Para o preparo da solução do DMMB, uma quantidade pequena e indefinida (alguns miligramas) do corante foi solubilizada em água. Após completa solubilização, diluiu-se com etanol em torno de 30 vezes. Uma vez que não há dímeros de DMMB em etanol, pode-se determinar a concentração da solução baseando-se diretamente no valor de absorbância. A leitura de absorbância foi realizada no espectrofotômetro Shimadzu UV-VIS 2400. O fotossensibilizador foi utilizado na concentração final de 15 μM .

Inicialmente caracterizamos as propriedades fotofísicas do DMMB em etanol (Figura 23). O coeficiente de absortividade molar (ϵ) foi obtido a partir da aplicação da *Lei de Lambert Beer*.

$$A = \varepsilon bc$$

(Equação 1)

Onde, A é a absorbância, ε o coeficiente de absorção molar, b a concentração do composto e c o caminho óptico da cubeta.

Figura 23. Espectro de absorbância do 1,9 Dimetil Azul de Metileno (DMMB)- Determinação da banda espectral.

6.2. Lipossomos

Preparamos lipossomos multilamelares de lecitina de soja com carboxifluoresceína encapsulada no compartimento interno. Os lipossomos foram produzidos adicionando-se clorofórmio a de lecitina de soja em um tubo de ensaio obtendo-se a concentração final de 30mg/mL. Removia-se o solvente com fluxo de argônio, enquanto girava-se o tubo de maneira inclinada, até que fosse obtida a formação de um filme em suas paredes. Hidratava-se o filme com solução de carboxifluoresceína (vide item 6.3) e agitava-se em um vórtex. Após 10 minutos de sonicação em sonificador de banho, o sistema era novamente agitado em um vórtex. Filtrava-se a suspensão obtida em uma

coluna de Sephadex G-50 (item 6.4), usando tampão Tris (item 6.5) como eluente. A fração contendo lipossomos com carboxifluoresceína encapsulada no compartimento interno era facilmente visualizada na coluna de Sephadex e era recolhida em um tubo de ensaio.

6.3. Preparação da solução de carboxifluoresceína

Preparou-se a solução de carboxifluoresceína adicionando-se 1,882 g de carboxifluoresceína sólida a 100 mL de uma solução aquosa contendo 60,57 g de tampão Tris. Adicionou-se hidróxido de sódio até que pH alcançasse o valor de 8 e armazenava-se ao abrigo da luz.

6.4. Preparação da coluna de Sephadex-G50

A preparação da coluna de separação consistiu na pesagem de 2g de Sephadex-G50 e transferência do sólido para um kitassato. Verteu-se 100 mL de água destilada ao recipiente, que foi mantido em repouso por 30 minutos. O conteúdo do kitassato foi então transferido para uma coluna de vidro em cuja extremidade inferior, foi previamente introduzido um pequeno pedaço de algodão. Simultaneamente à decantação do Sephadex, introduziu-se tampão na coluna e, assim que a decantação foi concluída, os lipossomos foram adicionados.

6.5. Preparação do tampão eluente (10mM Tris, 300mM NaCl, pH=8)

A preparação do tampão consistiu na adição de de Tris e NaCl a 1L de água destilada. Adicionou-se ácido clorídrico até obtenção de pH igual a 8.

6.6 Separação de lipossomos encapsulados com carboxifluoresceína

Separou-se os lipossomos contendo carboxifluoresceína no compartimento interno da carboxifluoresceína remanescente no exterior dos

lipossomos através do método de filtração e adsorção molecular em coluna de sephadex (G-50) (Figura 24).

Figura 24: Separação do marcador fluorescente CF livre das vesículas contendo o marcador encapsulado por coluna de gel filtração sephadex (G-50).

A cromatografia de filtração molecular é um método de cromatografia em coluna pelo qual as moléculas se separam em solução segundo seu peso molecular e a velocidade de migração das partículas é tanto menor quanto menor for seu tamanho, devido a uma maior penetração na rede de poros que constitui a fase estacionária. As moléculas de maior tamanho que os poros farão o caminho mais curto, já que nunca entram à malha da fase estacionária. Já as moléculas pequenas podem difundir dentro da matriz. Quanto menor é seu tamanho, maior é a probabilidade de que entre em um poro. Assim, a menor tamanho da molécula, mais longo o caminho que seguirá dentro da malha da fase estacionária (Figura 23).

6.7. Quantificação de vazamento do lipossomo

Mediu-se a intensidade total de fluorescência da CF liberada pela lise dos lipossomos com solução de Triton X a 5% (v/v). O conteúdo de CF liberado dos lipossomos (porcentagem de liberação) foi calculado dividindo-se a intensidade de fluorescência inicial, pela intensidade total de CF liberada.

$$\% \text{ Liberação} = [1 - (IF_{\text{inicial}} / IF_{\text{total}})]$$

O experimento de quantificação do dano na membrana modelo consistiu em comparar a ação do fotossensibilizador na permeabilização dos lipossomos. O estudo foi conduzido em placas de fluorescência de 96 poços, sendo 8 poços destinados ao branco (apenas tampão, vide item IV.7.3), 8 poços destinados ao controle (apenas lipossomos e tampão) e os restantes a lipossomos e quantidades variáveis de tampão, fotossensibilizador e compostos vegetais em estudo. O volume de suspensão de lipossomos adicionado foi sempre 7 μL e o volume final mantido constante em 300 μL . A irradiação foi realizada com LED's $\lambda_{\text{emissão}} = 639 \text{ nm}$, em arranjo que será determinado de forma a tornar máxima a dosagem de luz. A determinação da intensidade de fluorescência foi realizada utilizando-se um leitor de placas Infinite M200-Tecan (RCHISTO), $\lambda_{\text{excitação}} = 480 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{emissão}} = 517 \text{ nm}$, adequados às propriedades foto físicas da carboxifluoresceína.

6.8. Análises complementares

Para o melhor entendimento dos resultados obtidos no teste de proteção de membrana, foi necessário realizar testes complementares com os extratos, tais como:

- i. Método anti radicalar (DPPH);
- ii. Medidas de polifenóis (PFT);
- iii. Ligação de extratos em membranas;
- iv. Espalhamento de luz;

Método anti radicalar (DPPH): O método do DPPH consiste em avaliar a capacidade antioxidante via atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), que possui coloração púrpura, absorvendo em um comprimento de onda máximo de aproximadamente 515nm (Figura 25). O método de DPPH é muito utilizado para se determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas como: compostos fenólicos, fenólicos totais, flavonóis, cumarinas, quitosana com diferentes pesos moleculares, antocianinas, etc. Os espectros de absorção foram obtidos no leitor Tecan-Infinite 200M, monitorados na região do visível, utilizando placa de 96 poços obtendo uma curva de supressão do radical em função da concentração dos antioxidantes. Por ação de um supressor de radicais livres, o DPPH• é reduzido, formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância [75]. A partir dos resultados obtidos, determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional. A

percentagem de DPPH• remanescente no estado estacionário foi calculada utilizando a fórmula:

$$[1 - (\text{controle Abs} - \text{Abs amostra}) / \text{controle Abs}] \times 100$$

A capacidade de eliminação de radicais foi definida como a quantidade de anti-oxidante necessário para diminuir o DPPH• inicial concentração de 50% (concentração eficiente = EC₅₀), que foi estimada utilizando um algoritmo de regressão linear. Todas as análises de teste foram realizadas em triplicata. Trolox (ácido 6-hydroxy-2,5,7,8-tetra-metil-chromasn-2carboxilic) foi usada como um controle positivo e para a calibração de uma curva padrão (0,0125-0,075 mg mL⁻¹).

Figura 25 - Redução do Radical DPPH após reação com supressores de radicais livres.

Medidas de polifenóis totais (PFT): Compostos polifenólicos são importantes constituintes dietéticos, em virtude da sua elevada capacidade antioxidante, atribuída à sua habilidade em complexar íons metálicos, inativar reações radicalares em sistemas deslipidados, e prevenir conversão de hidroperóxido em oxirradicais reativos [76]. A quantificação desses compostos fenólicos é frequentemente realizada por meio do reagente de Folin Ciocalteau é o mais extensivamente empregado [77]. O método consiste de mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstico, na qual o molibdênio se encontra no estado de

oxidação (VI) (cor amarela no complexo $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados complexos molibdênio-tungstênio azuis $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^{4-}]$ [78], cuja coloração permite a quantificar a concentração das substâncias redutoras no comprimento de onda de 780 nm. A Figura 26 mostra a desprotonação dos compostos fenólicos em meio básico, gerando os ânions fenolatos, na qual, segundo Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós [79], o molibdênio, componente do reagente de Folin, sofre redução e o meio reacional muda de coloração amarela para azul.

Figura 26 - Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu

Caracterização da ligação de extratos a membranas: O estudo consistiu em preparar lipossomos, porém utilizando tampão em lugar de solução de carboxifluoresceína. Preparou-se as soluções dos extratos vegetais de modo que as concentrações dos mesmos não ultrapassassem 3% do ativo. Adicionou-se a solução de extratos nas soluções de lipossomos. A suspensão foi centrifugada, por 10 minutos a 13500 rpm, no qual as vesículas decantaram, com posterior remoção do sobrenadante. O pellet será ressuspensionado com tampão e novamente centrifugado, até que a fase superior se torne límpida quando da adição de tampão. Em seguida, o pellet novamente ressuspensionado no

mesmo volume, e a partir de então foi possível determinar a concentração de extrato vegetal através da medida de polifenóis totais restantes na solução (Figura 27).

Figura 27 – Esquema representativo do procedimento para determinação da concentração de extratos vegetais após ligação em membranas.

Determinou-se concentração final de extratos vegetais ligados na membrana através da formula abaixo:

$$[PFT]_{\text{inicial}} - [PFT]_{\text{final}} = [PFT]_{\text{ligado}}$$

Tamanho dos lipossomos por espalhamento de luz

É conhecido que em solução aquosa contendo partículas com diâmetro próximo a 200nm ou menores são capazes de se manter em suspensão coloidal sem precipitar. A fim de obter o tamanho médio das partículas obtidas em laboratório, utilizou-se da técnica de espalhamento dinâmico de luz (Dynamic Light Scattering), em que a amostra contendo os lipossomos é sujeito a medidas de espalhamento de luz resultantes do movimento translacional por difusão das partículas, ou por tamanho [80].

Para realização da análise dos lipossomos por espalhamento de luz, as vesículas foram preparadas conforme descrito anteriormente e submetidas à irradiação por um período de 2 horas. Inicialmente, as soluções foram analisadas sem irradiação, apenas com seus controles, lipossomos, extratos e o DMMB. No segundo momento a placa, com as respectivas soluções, foi submetida a leitura após 1ª hora e 2ª hora de exposição com LEDS vermelhos. A partir dos dados de espalhamento de luz, foi possível verificar se os lipossomos sofreram modificação após serem expostos ao estresse oxidativo por meio da irradiação.

6.9. TRATAMENTO DE DADOS

O software Origin 7.0 (OriginLab Corporation) será utilizado para o tratamento de dados e obtenção de gráficos.

7. RESULTADOS

7.1. Caracterização do irradiador

As características e propriedades fotofísicas e de interação com membranas do DMMB já eram conhecidas do grupo [81]. Neste trabalho o primeiro desafio foi encontrar uma fonte de luz barata e que pudesse irradiar o DMMB com eficiência. Propusemos então um projeto para a empresa Novatécnica (Brasil) desenvolver um conjunto de LEDs que pudesse excitar eficientemente o DMMB e homogeneamente em todos os 96 poços de uma placa de poliestireno com estas especificações. Note que o irradiador luz (LED) vermelho emite com máximo em 639nm e com largura de meia altura de ~15nm, o que se adequa muito bem para excitar o DMMB que tem máximo de

absorção em 651nm (Figura 28). Usando esse irradiador e um modelo de lipossomos com CF internalizado, pudemos testar a cinética de dano em membranas eficácia fotossensibilizador DMMB.

Figura 28- Banda de emissão do irradiador de LEDs vermelho

7.2. O modelo experimental: Estabilidade da suspensão de lipossomos sem e com irradiação e o cálculo da percentagem de dano

Antes de proceder aos experimentos de irradiação caracterizamos o modelo experimental da carboxifluoresceína auto suprimida no interior de lipossomos e o efeito de danos na membrana deste modelo. A eficiência fotodinâmica de dano em membrana foi determinada pelo método de liberação da sonda fluorescente carboxifluoresceína [CF], que inicialmente encontrava-se auto suprimida no compartimento interno das vesículas íntegras, sendo progressivamente liberada após geração de espécies reativas com consecutivo aumento da fluorescência da solução (Figura 21).

Quantificamos a Intensidade de fluorescência em função do tempo, sem irradiação na ausência e presença de Triton-X (Figura 29). Observa-se que os lipossomos são significativamente estáveis na ausência de irradiação, pois a intensidade de emissão da CF é pequena e apresenta um pequeno aumento em duas horas de observação. Nota-se que na presença de Triton X a 10% (10uL) ocorre a lise total dos lipossomos, caracterizando o aumento da intensidade total de fluorescência. Este valor de emissão (~7000) é muito maior do que o valor inicial (~1000), indicando que o vazamento da CF da vesícula causa o aumento significativo da sua fluorescência.

Figura 29 - Intensidade de fluorescência da CF em função do tempo de lipossomos incubados com tampão (esquerda) e na ausência e presença de Triton X (direita). (lambda de excitação=480nm, lambda de emissão 517nm).

Embora os lipossomos sejam relativamente estáveis o aumento da emissão de CF no escuro e na ausência de Triton evidencia que uma certa percentagem de lipossomos acaba vazando sozinho durante o experimente. Esta variação é praticamente desprezível na ausência de DMMB, mas torna-se significativa na presença do mesmo. O aumento que se observou na presença

de DMMB (em torno de 300 unidades de emissão de CF), é em torno de 5% do aumento que ocorre na presença do Triton (~6000 unidades de emissão de CF) e mantem-se relativamente constante em repetições experimentais. Então podemos concluir que o vazamento de em torno de 5% dos lipossomos pela presença do DMMB é um valor de sinal de fundo que precisamos considerar nas análises de cálculo de valor absoluto de vazamento de lipossomos. No entanto, neste trabalho as percentagens de vazamentos sempre foram consideradas em comparação com o valor de vazamento de DMMB com luz, e na presença de agentes que protegem as membranas. Esse valor de 5% estará presente tanto no vazamento do lipossomo com DMMB puro quanto no sistema com lipossomo, DMMB e agente protetor.

O passo seguinte foi caracterizar a cinética de aumento de fluorescência dos lipossomos com CF internalizada na presença do fotossensibilizador DMMB em função do tempo de irradiação (Figura 30). É possível notar que os lipossomos expostos à irradiação apresentam uma curva sigmoide com progressivo aumento da intensidade de fluorescência, caracterizando o dano gerado por espécies reativas de oxigênio gerado pelo DMMB. Essas espécies causam danos oxidativos em lipídeos e permeabilizam as membranas durante a irradiação. Neste trabalho usamos o valor final de emissão da CF (neste caso próximo de 5000 unidades de emissão de CF) em lipossomos irradiados como 100% de dano.

Figura 30- Intensidade de fluorescência em função do tempo de irradiação em lipossomos de lecitina de soja. (λ de excitação=480nm, λ de emissão de 517nm). [DMMB]=15 μ M, pH=8.0

7.3. Eficiência de proteção de membranas

Para facilitar a apresentação dos dados dividimos com agentes protetores em duas grandes famílias: polifenólicos e sacarídeos. Escolhemos como padrão dos compostos polifenólicos o ácido gálico, que está ele próprio presente em diversos extratos e que também é comumente usado como padrão em testes de quantificação de extratos. Como padrão dos sacarídeos, escolhemos a trealose. Como descrito acima, este dissacarídeo não redutor protege células de leveduras durante processos de estresse, tais como altas temperaturas, choque osmótico, efeitos tóxicos do etanol e desidratação [82]. Após a padronização do ensaio de mensuração do dano e proteção de membranas com compostos padrões, realizamos os testes de proteção de

membrana com os extratos vegetais propostos, visando relacionar a efetividade com a composição.

7.3.1 Compostos fenólicos

Na figura 31 está apresentado um dado típico de dano e proteção de membrana, neste caso realizado com o composto padrão, ácido gálico. Note que o lipossomo irradiado na presença de DMMB apresenta vazamento característico, sendo que o nível de emissão de CV alcança o valor típico de 5000 unidades de emissão de CF. Note também que os controles (tampão e lipossomo com tampão) exibem níveis irrelevantes de emissão de CF. Interessantemente, na presença de ácido gálico ocorre a diminuição da emissão de CF e essa diminuição fica mais significativa com o aumento da concentração de ácido gálico. O ácido gálico, como já era esperado é um potente agente anti-oxidante, impedimento a progressão das reações radicalares e impedindo e/ou retardando o processo de foto-oxidação. Note que ocorre aumento da percentagem de proteção com o aumento da concentração de ácido gálico. A concentração de 50% de proteção de membranas (7.5 μ M de ácido gálico) será usado como padrão de comparação com os extratos vegetais. Como já mencionado acima 15 μ M oferece nível de proteção próximo a ~80%.

Note também que na presença de 15 μ M de ácido gálico ocorre emissão no nível de 1100 unidades de CF, o que equivale a um dano aproximadamente 21%. Se o dano na ausência de ácido gálico era por definição 100% na presença do mesmo o dano foi de 21%, resultando em uma proteção de 79% das membranas. Para efeito deste trabalho consideraremos estes dois limites

de proteção: ~50% de proteção é equivalente a 7.5 μ M ácido gálico e ~80% de proteção é equivalente a 15 μ M de ácido gálico (Figura 32).

Figura 31- Intensidade de fluorescência em função do tempo de irradiação, obtido para vesículas encapsuladas com a sonda carboxifluoresceína com as variadas concentrações de ácido gálico. (λ de excitação=480nm, λ de emissão de 517nm). [DMMB]=15 μ M, pH=8.0.

Figura 32- Porcentagem de proteção de membrana em função da concentração de ácido gálico.

Quando se adiciona extratos vegetais ao sistema de lipossomos contendo DMMB, observa-se que há diferentes níveis de dano na membrana, dependendo do extrato e concentração (Figura 33). Os extratos de erva doce e camomila a 0.5% alcançam o nível de 50% de proteção (equivalente 7.5 μ M de ácido gálico), os extratos de guaraná e noqueira alcançam níveis de proteção acima de 80% a 0.1% e o extrato de romã, que é o mais eficiente protetor de membranas já testados, alcança um nível de proteção próximo de 100% (97%) de proteção na concentração de 0.01%. Extrapolando o dado de ácido gálico esse nível de proteção significa um extrato que tem o equivalente a 100 μ M de ácido gálico em termos de proteção de membranas, na concentração de 0.01%.

Figura 33- Intensidade de fluorescência em função do tempo de irradiação em membranas na presença de extratos vegetais (a) Erva doce; (b) Camomila (c) Guaraná (d) Noqueira (e) Romã. (λ de excitação=480nm, λ de emissão de 517nm). [DMMB]=15 μ M, pH=8.0.

Figura 33 A- Eficiência de proteção de membrana após irradiação de membranas na presença compostos fenólicos (a) Erva doce; (b) Camomila (c) Guaraná (d) Nogueira (e) Romã.

7.3.2 Sacarídeos

Da mesma forma que foi apresentada para os compostos polifenois, os lipossomos foram expostos à irradiação na presença de DMMB e na presença de concentrações crescentes de trealose (Figura 34). Note que o nível de CF fluorescência relativa a 100% de dano é neste caso 6000 unidades de CF fluorescência. Com o aumento da concentração de Trealose ocorre uma diminuição significativa no valor de CF fluorescência, indicando que ocorre proteção da membrana proporcional a concentração de trealose. Note na figura 35, que a percentagem de proteção aumenta proporcionalmente à concentração de trealose. O nível de proteção de 50% ocorre na concentração de 14,61mM e 80% de proteção a 29,21mM de Trealose.

Figura 34- Intensidade de fluorescência em função do tempo de irradiação, obtido para vesículas encapsuladas com a sonda carboxifluoresceína com as variadas concentrações de trealose, padrão sacarídeo utilizado no estudo. (lambda de excitação=480nm, lambda de emissão de 517nm). [DMMB]=15µM, pH=8.0.

Figura 34 A- Intensidade proteção após do tempo de irradiação, obtido para vesículas encapsuladas com a sonda carboxifluoresceína com as variadas concentrações de trealose, padrão sacarídeo utilizado no estudo.

Os lipossomos também foram expostos à irradiação na presença de extratos vegetais que sabidamente são ricos em sacarídeos. Note que há um efeito protetor, pois ocorre diminuição da fluorescência em função do tempo de irradiação dos lipossomos suspensos. A 0.5% todos esses extratos apresentam proteção próxima a 50% e o extrato de tamarindo é o que apresenta nível de proteção próximo a 80%. É interessante notar que extratos que são constituídos basicamente de sacarídeos, ou seja, não possuem valores elevados de polifenóis também apresentam níveis consideráveis de proteção da membrana, sugerindo que o mecanismo de proteção talvez não seja somente anti-oxidante.

Figura 35 - Intensidade de fluorescência em função do tempo de irradiação, obtido para vesículas encapsuladas com a sonda carboxifluoresceína em variadas concentrações de extratos vegetais sacarídeos (a) Aloe Vera; (b) Plantcol (c) Tamariliz (d) Alga Fucus.

Figura 35 A- Eficiência de proteção de membrana após irradiação de membranas na presença de extratos vegetais sacarídeos (a) Aloe Vera; (b) Plantcol (c) Tamariliz (d) Alga Fucus

7.4 Estrutura dos lipossomos oxidados e protegidos

Muito embora o dado de vazamento de CF é bem estabelecido para medir danos em membranas, tornou-se importante caracterizar se o vazamento que ocorre com a foto-oxidação resulta em alterações na dimensão dos lipossomos suspensos. Alterações no raio hidrodinâmico dos lipossomos foi acompanhada por espalhamento de luz. Note que o espalhamento de luz é estável em lipossomos não irradiados. Na presença de DMMB e irradiação o raio hidrodinâmico aumenta quase 4 vezes (~150 nm para ~600nm) (Figuras 36 e 37). Essa diferença de raio hidrodinâmico indica que o sistema de lipossomo é severamente danificado durante a irradiação, desestabilizando as respectivas estruturas coloidais, que se transforma provavelmente em sistemas lamelares, que tendem a se organizar em multicamadas para evitar a exposição de cadeias carbônicas alquílicas à água. Os extratos vegetais conseguem evitar esse aumento significativamente. Note que na presença do

extrato de romã, lipossomos aumentam de 300nm para 350nm, em torno de 15% de aumento, ao invés de 4 vezes. O mesmo efeito pode ser observado na presença de extratos ou de sacarose, provando que os carboidratos também protegem as membranas (Figura 37). É importante enfatizar que os extratos afetam o tamanho do raio hidrodinâmico mesmo antes de se iniciar as medidas. Esse efeito deve ser devido a alterações na viscosidade e concentração iônica do meio pela presença dos extratos. Alteração nestes parâmetros afetam a difusividade média dos lipossomos em solução, que resulta em alteração no raio hidrodinâmico. Embora isso possa ser corrigido, não nos detemos a fazer esse ajuste nesse trabalho, pois somente queríamos demonstrar que a irradiação causa aumento do raio hidrodinâmico e que esse aumento pode ser revertido pela presença dos extratos.

Figura 36- Raio hidrodinâmico (nm) de lipossomos sem irradiação e após irradiação (1hora e 2 horas) na ausência e na presença de extratos contendo compostos poli fenólicos.

Figura 37- Raio hidrodinâmico (nm) de lipossomos sem irradiação e após irradiação (1hora e 2 horas) na ausência e na presença de extratos contendo compostos sacarídeos.

7.5. Ensaio complementares

Com o objetivo de caracterizar os extratos utilizados e para poder correlacionar a atividade de proteção de membranas com outras propriedades realizamos diversos outros ensaios, cujos resultados estão descritos abaixo.

7.5.1. Atividade antiradicalar

O radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazila DPPH• é suprimido por agentes antioxidantes, tais como o ácido gálico e Trolox, e essa supressão é comumente usada para quantificar a atividade de antioxidantes naturais [83]. Com este intuito, mede-se o percentual de radicais DPPH• que se mantem na forma radicalar em função do tempo, na ausência e na presença de compostos antioxidantes. A figura 38 traz dois exemplos destas medidas realizadas em

função da concentração de Trolox e de extrato de camomila, logo após a mistura e seguindo a absorção de DPPH• em função do tempo. A porcentagem de DPPH• remanescente no estado estacionário foi calculada utilizando a fórmula: $[1 - (\text{controle Abs} - \text{Abs amostra}) / \text{controle Abs}] \times 100$. A capacidade de eliminação de radicais é definida como a quantidade de antioxidante necessário para diminuir a concentração de DPPH• à 50% da concentração inicial (Eficiente concentração= EC₅₀). Trolox foi usado como controle positivo e para obtenção da curva padrão de supressão do DPPH• (0,0125-0,075 mg mL⁻¹).

Figura 38 - Porcentagem remanescente do radical DPPH• após submissão às soluções antioxidantes (a) Trolox e (b) Extrato Camomila, determinação do EC₅₀. Todas as análises de teste foram realizadas em triplicata.

Após obter-se o EC₅₀ das soluções é possível determinar a quantidade de equivalentes de Trolox por quilogramas de extrato (g/Kg) (Tabelas 1 e 2), representado simplificada por TEAC (do inglês, *Trolox equivalente antioxidant capacity*), através da equação: $TEAC(IC_{50}) = \text{Trolox (g)} / \text{Extrato (Kg)}$. Note que o valor de TEAC varia com o tempo de exposição (Figura 39), uma vez que a quantidade de moléculas de DPPH• suprimidas também depende do tempo de exposição. Consequentemente, as comparações de

capacidade anti-oxidante devem ser sempre realizadas com o mesmo tempo de incubação.

Figura 39 – Quantificação do equivalente de Trolox (1,12g) por quilo de extrato (Camomila), em função do tempo de reação. Obtido a partir das figura 38 A e 38 B.

7.5.2. Polifenol total

Um outro parâmetro importante de comparação de atividade dos extratos pode ser obtido pela quantificação do total de compostos polifenólicos. A concentração total de fenóis foi estimada usando o método de Folin-Ciocalteu com ligeiras modificações [84]. Após diluição (100 vezes) do padrão estoque inicial $[AG] = 5,000 \text{ g/L}$, para adequação da curva de calibração, obteve-se $[AG_{\text{final}}] = 0,0500 \text{ g/L}$. Uma alíquota da solução aquosa de extrato vegetal é misturada com 0,1M do reagente Folin & Ciocalteu (Sigma Aldrich) e 20% (m/v) de uma solução de carbonato de sódio. Após 2 horas de incubação à temperatura ambiente, a absorbância a 780 nm é obtida utilizando o leitor de microplacas. Os resultados são expressos como equivalentes de Ácido Gálico (g) por quilograma de extrato vegetal (kg)- (Tabelas 1 e 2).

Figura 40 – Absorbância de soluções com contendo concentrações crescentes de ácido gálico, submetidas ao reagente de Folin–Ciocalteu. Os resultados de quantificação de polifenóis totais são expressos como equivalentes de ácido gálico (EAG) por Kg de extrato, através de curva de calibração, obtendo-se a concentrações equivalente de padrão de ácido gálico que fornece a mesma absorbância do extrato.

Note na Tabela 1, que existe uma certa correlação entre os valores de TEAC e de GAE, uma vez que os polifenóis estão presentes nestes extratos. A correlação com os dados de proteção de membranas não é, no entanto, direta. Note que extrato de romã e de noqueira são os que respondem com valores maiores de TEAC e PFT e são os que de fato protegem melhor as membranas. No entanto, estes extratos apresentam praticamente os mesmos valores de TEAC, mas o extrato de romã é substancialmente superior ao de noqueira em termos de proteção de membrana. Com relação ao resultado de PFT, o extrato de romã apresenta maior valor de GAE (~2 vezes) ao de noqueira, mas mesmo assim, essa superioridade não pode explicar totalmente os dados quantitativos

de proteção de membranas (~10vezes), sugerindo que deve haver outro parâmetro que interfere na proteção de membranas, além do potencial antioxidante.

Outro exemplo interessante que merece comentário próprio é o da trealose e dos extratos que são baseados em sacarídeos (Tabela 2). Note que a trealose não suprime DPPH• como era esperado, uma vez que é um dissacarídeo não redutor e, portanto, não se espera que tenha atividade antiradicalar. Algumas preparações de Aloe Vera (AV) podem ter propriedades antioxidantes, uma vez que a composição química depende do método de extração, no entanto, o extrato AV aqui usada não mostrou eficiência na supressão de espécies de radicais. A falta de efeito antioxidante é quimicamente compatível com a baixa quantidade de polifenóis totais detectada nessa classe de extratos vegetais. No entanto, fica a questão, se estes extratos não têm atividade antioxidante, porque protegem as membranas?

Tabela 1: Valor de TEAC e GAE para ácido gálico e para extratos contendo polifenóis.

EXTRATOS	DPPH TEAC (g/Kg)	PFT GAE (g/Kg)
Ácido Gálico	0,72±0,13	0,55±0,11
Erva Doce	0,58±0,08	0,41±0,09
Camomila	1,12±0,10	0,89±0,17
Guaraná	5,44±0,81	1,54±0,21
Nogueira	9,02±0,74	4,04±0,84
Romã	9,87±0,93	7,34±0,87

Tabela 2: Valor de TEAC e GAE para extratos contendo carboidratos.

Extratos	DPPH TEAC (g/Kg)	PFT GAE (g/Kg)
Trealose	s/AOX	0,27±0,03
Alga Fucus	0,17±0,04	0,32±0,07
Aloe Vera	s/AOX	0,02±0,01
Tamariliz	0,10±0,03	0,17±0,01

7.5.3 Ligação em membranas

Um possível efeito que pode e deve interferir na eficiência de proteção de membranas é a eficiência de ligação do agente protetor à membrana. Ou seja, o composto pode ter uma atividade antioxidante proeminente, mas se não estiver fisicamente presente na membrana, a eficiência de proteção pode ser menor do que no caso de um agente com menor potencial antioxidante, mas que esteja em contato íntimo com a membrana. No entanto, a medição de ligação em membranas não é trivial. De fato, medir a interação de compostos puros com membranas já é difícil, o que dizer de misturas de centenas de compostos, presentes nos extratos.

Para superar esta dificuldade, desenvolvemos um ensaio paralelo adicional ao do PFT, mas que é baseado na mesma plataforma experimental. O ensaio baseia-se na medição do potencial de PFT de um certo extrato na presença e na ausência de membranas, para identificar quanto do valor de PFT deste extrato seria sequestrado pela membrana, ou seja, fornecendo dados de

quanto da reatividade dos extratos perante o reagente de Folin-Ciocalteu é perdido por ligação e membranas (Tabela 3). Vale ressaltar que todos os extratos testados são hidro alcoólicos, e consequentemente, tem grande tendência a ficar solubilizado na parte aquosa. A coluna da direita PFT (ligado) apresenta a diferença de PFT antes e após a adição de lipossomos e fornece uma ideia da parte do potencial PFT presente na membrana. Note que os extratos de guaraná, noqueira e romã são os que mais apresentam ligação em membranas, o que ajuda a justificar o potencial de proteção de membranas que estes extratos exercem. Observe também que extratos baseados em polissacarídeos também apresentaram eficaz ligação nos lipossomos, apesar de não possuírem em sua composição grupamentos fenólicos para inibir o processo oxidativo, nos levando a acreditar que seu mecanismo de proteção seja através de barreira física criada entre o fotossensibilizador e a membrana, impedindo que haja internalização do mesmo para que ocorra o dano.

Tabela 3: Estimativa da interação de extratos com membranas através da quantificação do GAE na ausência e presença de lipossomos.

Extratos	PFT (inicial) GAE (g/Kg)	PFT (final) GAE (g/Kg)	PFT (ligado) GAE (g/Kg)
Ácido Gálico 30uM	0,55±0,17	0,27±0,08	0,31
Erva Doce	0,41±0,12	0,31±0,08	0,10
Camomila	0,89±0,21	0,64±0,11	0,25
Guaraná	5,44±0,74	3,25±0,51	3,32
Noqueira	4,04±0,53	2,12±0,33	1,92
Romã	7,34±0,97	6,29±0,83	1,05

Tabela 4: Estimativa da interação de extratos com membranas através da quantificação do GAE na ausência e presença de lipossomos.

Extratos	PFT (inicial) GAE (g/Kg)	PFT (final) GAE (g/Kg)	PFT (ligado) GAE (g/Kg)
Trealose 2%	0,27±0,08	0,12±0,03	0,15
Alga Fucus	0,32±0,09	0,21±0,08	0,11
Aloe Vera	0,19±0,04	0,10±0,02	0,09
Tamariliz	0,17±0,04	0,11±0,02	0,08

8. DISCUSSÃO

Os dados de quantificação da atividade de proteção de membranas em função da quantidade de equivalentes de ácido gálico e de trealose parecem ser maneiras apropriadas para quantificar e comparar a capacidade de extratos vegetais, que tenham prevalência de polifenóis e de sacarídeos respectivamente. A quantificação da atividade de proteção de membranas pode ser um novo conceito para o aprimoramento de formulações cosméticas. Para dar apenas um exemplo próximo a nós, dados recentes mostraram que proteção de membrana é crítico para explicar o efeito de proteção do extrato de aloe vera contra luz UVA [84].

Nosso trabalho também trouxe contribuições para o entendimento dos parâmetros que afetam a proteção de membranas contra reações fotoinduzidas. Note que na figura 41 a percentagem de proteção de extratos varia com o tipo de extrato e com a concentração. Note que um extrato que tem baixa atividade anti-radicalar, sua atividade protetora é mínima. Já extratos

que tenham valores elevados de anti-oxidantes (Tabelas 1 e 2) e que tenham componentes que se ligam em membranas (Tabela 3), como os extratos de romã e de camomila, há capacidade significativa de proteção de membrana.

Figura 41. Proteção de membranas de extratos vegetais que tem capacidade antioxidante e que se ligam bem em membranas (Romã e Camomila) e do extrato de Cereja que tem valores desprezíveis de atividade antioxidante (GAE=0.1 e TEAC=0.5).

Além disso, é importante mencionar o caso dos carboidratos que tem atividade antioxidante insignificante, mas que também protegem as membranas. Com intuito de propor uma explicação mecanística é interessante comparar a proteção por aloe vera (Figura 42) com a proteção por trealose pura. A proteção pelo extrato de aloe vera é proporcional a concentração de extrato, assim como ocorre com a solução de sacarose. Note que ambas soluções protegem membranas e nenhuma delas é anti-oxidante, sugerindo que o mecanismo de ação não é por anti-oxidante. Embora trealose seja um modelo muito simples para reproduzir a ação do extrato de aloe vera, o fato de

ambos agirem de maneira semelhante, sugere que o mecanismo de ação seja equivalente.

Trealose é uma molécula que vem sendo usada por muitos anos como protetor da estrutura de membranas, agindo principalmente por um efeito físico de adsorção na parte polar dos lipídeos, protegendo-os por uma barreira física contra espécies reativas vindas da solução e ao mesmo tempo evitando que pequenas alterações nos lipídeos afetem a estrutura e a permeabilidade das membranas. A trealose estabelece ligações de hidrogênio com os grupos carbonil e de fosfato e substitui as moléculas de água a partir do grupo cabeça do lipídeo [85]. A interação da trealose foi recentemente modelada computacionalmente, mostrando a alta afinidade e especificidade da interação lipídeo/trealose (Figura 43) [86][87]. Desta forma, propomos que a interação física de carboidratos com membranas é um modo adicional de proteção das membranas contra danos oxidativos.

Figura 42. Aumento de fluorescência de CF na ausência de AloeVera (TMP+LIP+FS) e na presença de concentrações crescentes de Aloe Vera.

Figura 43. ESQUERDA: (A) membrana modelo com moléculas de trealose proximas e (B) membranas com trealose ligada. DIREITA. Estrutura molecular de trealose.

9. CONCLUSÃO

As indústrias de cosméticos, perfumes e de higiene pessoal vêm representando liderança do mercado de produtos naturais. As regras para a comercialização e aceitação no cenário atual dos produtos com ativos vegetais são severas e têm promovido um necessário desenvolvimento de procedimentos técnicos em seus processos produtivos, de controle de qualidade e de segurança e performance.

Os resultados para os extratos vegetais mostram que aqueles que possuem elevado teor de polifenóis e expressiva atividade antiradicalar e que interagem com membranas tem maior eficácia em proteger membranas contra estresse oxidativo. Por outro lado, observa-se também a eficácia dos extratos ricos em polissacarídeos, e acredita-se que o mecanismo envolvido seja uma barreira física em proteger a membrana da ação das espécies reativas geradas durante a irradiação.

O ensaio de quantificação de proteção de membranas, baseado na medida de equivalentes de ácido gálico ou de sacarose, foi desenvolvido para ser um ensaio simples e de custo reduzido, na esperança que esse método possa ser usado pela indústria cosmética. Sugerimos que estas mensurações sejam usadas para quantificar a eficiência de proteção de membranas de extratos que tenham polifenóis e sacarídeos, respectivamente. No caso de extratos que possuem ambos constituintes, ambas mensurações podem ser realizadas.

10. REFERÊNCIAS

- [1] Euromonitor International. GMID (Global market information database): cosmetics and toiletries global report. 2007. Disponível em <http://www.funcex.org.br/material/redemercosul> Acessado em Agosto, 2015.
- [2] SOUSA et al. - Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras. Laboratório de Produtos Naturais, Fortaleza, 1991. pg.: 55-162.
- [3] Sociedade Brasileira de Farmacognosia, O que é Farmacognosia?, 2014. Disponível em: <<http://www.sbfgnosia.org.br/farmacognosia.html>> Acesso em Setembro, 2015.
- [4] Benson KF¹, Newman RA², Jensen GS¹. Antioxidant, anti-inflammatory, anti-apoptotic, and skin regenerative properties of an Aloe vera-based extract of Nerium oleander leaves (nae-8(®)). Clin Cosmet Investig Dermatol. 2015 May 6;8:239-48. doi: 10.2147/CCID.S79871. eCollection 2015.
- [5] KIRCHHOFF, V. W. J. H. ³/₄ 1995 - Ozônio e Radiação UV ³/₄ B, Transtec Editorial, São José dos Campos, 149p.
- [6] Baggerly CA¹, Cuomo RE, French CB, Garland CF, Gorham ED, Grant WB, Heaney RP, Holick MF, Hollis BW, McDonnell SL, Pittaway M, Seaton P, Wagner CL, Wunsch A. Sunlight and Vitamin D: Necessary for Public Health. J Am Coll Nutr. 2015 Jul-Aug;34(4):359-65. doi: 10.1080/07315724.2015.1039866. Epub 2015 Jun 22.
- [7] Ikehata H¹, Ono T. The mechanisms of UV mutagenesis. J Radiat Res. 2011;52(2):115-25.
- [8] Bäumler A.J., Tsois R.M. & Heffron F. 1996. Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella* Typhimurium. Infect. Immun. 64(5):1862-1865
- [9] Grether-Beck S¹, Marini A, Jaenicke T, Krutmann J. Photoprotection of human skin beyond ultraviolet radiation. Photodermatol Photoimmunol Photomed. 2014 Apr-Jun;30(2-3):167-74. doi: 10.1111/phpp.12111. Epub 2014 Feb 19.
- [10] Williams, G. T.; Smith C. A. "Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death" Cell, 1993, 74, 777-779.
- [11] Viola G¹, Dall'Acqua F. Photosensitization of biomolecules by phenothiazine derivatives. Curr Drug Targets. 2006 Sep;7(9):1135-54.
- [12] Minami H, Sato K, Maeda T, Taguchi H, Yoshikawa K, Kosaka H, Shiga T, Tsuji T. Hypoxia potentiates ultraviolet A-induced riboflavin cytotoxicity. J Invest Dermatol. 1999 Jul;113(1):77-81.
- [13]. (Alan D. Elbein, Y.T. Pan, Irena Pastuszak, and David Carroll. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. Glycobiology 2003, vol. 13, no. 4 pp. 17R-27R.

- [14] Schaich KM¹ Metals and lipid oxidation. Contemporary issues. Lipids. 1992 Mar;27(3):209-18.
- [15] Ayala A¹, Muñoz MF¹, Argüelles S¹. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. Oxid Med Cell Longev. 2014;2014:360438. doi: 10.1155/2014/360438. Epub 2014 May 8.
- [16] Wlascheck et al., 2001; M. Wlascheck, I. Tantcheva-Poor, L. Naderi, W. Ma, S. Alexander, Z. Razi-Wolf, J. Shuller, K. Scharffetter-Kochanek Solar UV irradiation and dermal photoaging Journal of Photochemistry and Photobiology B, 63 (2001), pp. 41–51.
- [17] MURPHY, G.M. An update on photoprotection. Photodermatol. Photoimmunol. Photomed., v.18, p. 1-4, 2002.)
- [18] Casagrande R, Georgetti S, Verri Jr W, Dorta D, dos Santos A, Fonseca M. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. J Photochem Photobiol B Biol 2006;84:21–7
- [19] UITTO, J.; BROWN, D.B.; GASPARRO F. et al. Molecular aspects of photoaging. Eur. J. Dermatol., v. 7, n. 3, p.210-214, 1997
- [20] Kim K¹, Park H¹, Lim KM¹. Phototoxicity: Its Mechanism and Animal Alternative Test Methods. Toxicol Res. 2015 Jun;31(2):97-104. doi: 10.5487/TR.2015.31.2.097.
- [21] Niki Evidence for beneficial effects of vitamin E. Korean J Intern Med. 2015 Sep;30(5):571-9. doi: 10.3904/kjim.2015.30.5.571. Epub 2015 Aug 27.
- [22] (Sigma Aldrich, Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/> Acessado em Outubro, 2015.
- [23] FRANCIS, F.J. Anthocyanins and betalains: composition and applications. Cereal Foods World, v. 45, p. 208-213, 2000.
- [24] Van Tits LJ, Demacker PN, De Graaf J, Hak-Lemmers HL, Stalenhoef AF. Alpha-tocopherol supplementation decreases production of superoxide and cytokines by leukocytes ex vivo in both normolipidemic and hypertriglyceridemic individuals. Am J Clin Nutr 2000; 71:458-64.
- [25] (Sigma Aldrich, Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/> Acessado em Outubro, 2015.
- [26] Sadeghipour A¹, Eidi M², Ilchizadeh Kavgani A³, Ghahramani R⁴, Shahabzadeh S³, Anissian A⁵. Lipid Lowering Effect of Punica granatum L. Peel in High Lipid Diet Fed Male Rats. Evid Based Complement Alternat Med. 2014;2014:432650. doi: 10.1155/2014/432650. Epub 2014 Sep 10.
- [27] Marino T¹, Galano A, Russo N. Radical scavenging ability of gallic acid toward OH and OOH radicals. Reaction mechanism and rate constants from the density functional

theory. J Phys Chem B. 2014 Sep 4;118(35):10380-9. doi: 10.1021/jp505589b. Epub 2014 Aug 21.

[28] Ruitenberg A, van Swieten JC, Witteman JCM, Mehta KM, van Duijn CM, Hofman A & Breteler MMB (2002) Alcohol consumption and risk of dementia: the Rotterdam Study. Lancet, 359, p. 281–286.

[29] Badgujar SB¹, Patel VV¹, Bandivdekar AH¹.

Foeniculum vulgare Mill.: a review of botany, phytochemistry, pharmacology, contemporary application, and toxicology. Biomed Res Int. 2014;2014:842674. doi: 10.1155/2014/842674. Epub 2014 Aug 3.

[30] Ranjbar A¹, Mohsenzadeh F², Chehregani A², Khajavi F³, Zijoud SM⁴, Ghasemi H⁴. Ameliorative effect of *Matricaria chamomilla* L. on paraquat: Induced oxidative damage in lung rats. Pharmacognosy Res. 2014 Jul;6(3):199-203. doi: 10.4103/0974-8490.132595.

[31] Singh O¹, Khanam Z, Misra N, Srivastava MK. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview. Pharmacogn Rev. 2011 Jan;5(9):82-95. doi: 10.4103/0973-7847.79103.

[32] Munir N¹, Iqbal AS¹, Altaf I², Bashir R¹, Sharif N¹, Saleem F¹, Naz S¹. Evaluation of antioxidant and antimicrobial potential of two endangered plant species *Atropa belladonna* and *Matricaria chamomilla*. Afr J Tradit Complement Altern Med. 2014 Aug 23;11(5):111-7. eCollection 2014.

[33] (Sigma Aldrich, Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/> Acessado em Outubro, 2015. (Sigma Aldrich, 2015)

[34] Portella Rde L¹, Barcelos RP, da Rosa EJ, Ribeiro EE, da Cruz IB, Suleiman L, Soares FA. Guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) effects on LDL oxidation in elderly people: an in vitro and in vivo study. Lipids Health Dis. 2013 Feb 8;12:12. doi: 10.1186/1476-511X-12-12.

[35] Espinola EB, Dias RF, Mattei R, Carlini EA. Pharmacological activity of Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) in laboratory animals. J Ethnopharmacol. 1997 Feb;55(3):223-9 Espinola et al, 1997).

[36] (Sigma Aldrich, Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/> Acessado em Outubro, 2015. Sigma Aldrich, 2015).

[37] Anderson KJ¹, Teuber SS, Gobeille A, Cremin P, Waterhouse AL, Steinberg FM. Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation. J Nutr. 2001 Nov;131(11):2837-42.

[38] (Sigma Aldrich, Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/> Acessado em Outubro, 2015. (Sigma Aldrich, 2015, acessado em 2015)

- [39] Sadeghipour A¹, Eidi M², Ilchizadeh Kavgani A³, Ghahramani R⁴, Shahabzadeh S³, Anissian A⁵. Lipid Lowering Effect of Punica granatum L. Peel in High Lipid Diet Fed Male Rats. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014;2014:432650. doi: 10.1155/2014/432650. Epub 2014 Sep 10.
- [40] Middha SK¹, Usha T, Pande V. HPLC Evaluation of Phenolic Profile, Nutritive Content, and Antioxidant Capacity of Extracts Obtained from Punica granatum Fruit Peel. *Adv Pharmacol Sci*. 2013;2013:296236. doi: 10.1155/2013/296236. Epub 2013 Aug 1.
- [41] Modaeinama S¹, Abasi M, Abbasi MM, Jahanban-Esfahlan R. Anti Tumoral Properties of Punica Granatum (Pomegranate) Peel Extract on Different Human Cancer Cells. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(14):5697-701.
- [42] Connors, K. A.; *Binding Constants: The Measurement of Molecular Complex Stability*, Wiley-Interscience: New York, 1987, p. 143-168
- [43] (Sigma Aldrich, Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/> Acessado em Outubro, 2015). (Sigma Aldrich, 2015),
- [44] Echigo R¹, Shimohata N, Karatsu K, Yano F, Kayasuga-Kariya Y, Fujisawa A, Ohto T, Kita Y, Nakamura M, Suzuki S, Mochizuki M, Shimizu T, Chung UI, Sasaki N. Trehalose treatment suppresses inflammation, oxidative stress, and vasospasm induced by experimental subarachnoid hemorrhage. *J Transl Med*. 2012 Apr 30;10:80. doi: 10.1186/1479-5876-10-80.
- [45] Elbein AD¹, Pan YT, Pastuszak I, Carroll D. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*. 2003 Apr;13(4):17R-27R. Epub 2003 Jan 22.
- [46] Hu JH¹, Zan LS, Zhao XL, Li QW, Jiang ZL, Li YK, Li X. Effects of trehalose supplementation on semen quality and oxidative stress variables in frozen-thawed bovine semen. *J Anim Sci*. 2010 May;88(5):1657-62. doi: 10.2527/jas.2009-2335. Epub 2010 Jan 15.
- [47] Hu Y¹, Xu J, Hu Q. Evaluation of antioxidant potential of aloe vera (*Aloe barbadensis miller*) extracts. *J Agric Food Chem*. 2003 Dec 17;51(26):7788-91.
- [48] Boudreau MD¹, Beland FA. An evaluation of the biological and toxicological properties of *Aloe barbadensis miller*, *Aloe vera*. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoicol Rev*. 2006 Apr;24(1):103-54.
- [49] Rajasekaran S¹, Sivagnanam K, Subramanian S. Antioxidant effect of Aloe vera gel extract in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Pharmacol Rep*. 2005 Jan-Feb;57(1):90-6.
- [50] Benson KF¹, Newman RA², Jensen GS¹. Antioxidant, anti-inflammatory, anti-apoptotic, and skin regenerative properties of an Aloe vera-based extract of *Nerium*

oleander leaves (nae-8(®)).Clin Cosmet Investig Dermatol. 2015 May 6;8:239-48. doi: 10.2147/CCID.S79871. eCollection 2015.

[51] Hu Y¹, Xu J, Hu Q. Evaluation of antioxidant potential of aloe vera (*Aloe barbadensis miller*) extracts. J Agric Food Chem. 2003 Dec 17;51(26):7788-91. Hu et al, 2003

[52] (Martindale: The Complete Drug Reference. London: Pharmaceutical Press. 36th edition, Thomson Micromedex, Greenwood Village, Colorado, USA. 2003.

[53] Al-Yahya AA¹, Al-Majed AA, Gado AM, Daba MH, Al-Shabanah OA, Abd-Allah AR. Acacia Senegal gum exudate offers protection against cyclophosphamide-induced urinary bladder cytotoxicity. Oxid Med Cell Longev. 2009 Sep-Oct;2(4):207-13. doi: 10.4161/oxim.2.4.8878.

[54] Hilmi Y¹, Abushama MF, Abdalgadir H, Khalid A, Khalid H. A study of antioxidant activity, enzymatic inhibition and in vitro toxicity of selected traditional Sudanese plants with anti-diabetic potential. BMC Complement Altern Med. 2014 May 7;14:149. doi: 10.1186/1472-6882-14-149.

[55] Rocha de Souza MC, Marques CT, Guerra Dore CM, Ferreira da Silva FR, Oliveira Rocha HA, Leite EL. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. J Appl Phycol. 2007 Apr;19(2):153-160. Epub 2006 Nov 30.

[56] Fujimura T¹, Tsukahara K, Moriwaki S, Kitahara T, Sano T, Takema Y. Treatment of human skin with an extract of *Fucus vesiculosus* changes its thickness and mechanical properties. J Cosmet Sci. 2002 Jan-Feb;53(1):1-9.

[57] Lee H¹, Kim JS, Kim E. Fucoidan from seaweed *Fucus vesiculosus* inhibits migration and invasion of human lung cancer cell via PI3K-Akt-mTOR pathways. PLoS One. 2012;7(11):e50624. doi: 10.1371/journal.pone.0050624. Epub 2012 Nov 30.

[58] Nakchat O¹, Nalinratana N¹, Meksuriyen D¹, Pongsamart S¹. Tamarind seed coat extract restores reactive oxygen species through attenuation of glutathione level and antioxidant enzyme expression in human skin fibroblasts in response to oxidative stress. Asian Pac J Trop Biomed. 2014 May;4(5):379-85. doi: 10.12980/APJTB.4.2014C806.

[59] Nie W¹, Deters AM. Tamarind Seed Xyloglucans Promote Proliferation and Migration of Human Skin Cells through Internalization via Stimulation of Proproliferative Signal Transduction Pathways. Dermatol Res Pract. 2013;2013:359756. doi: 10.1155/2013/359756. Epub 2013 Sep

[60] Sundaram MS¹, Hemshekhar M², Santhosh MS³, Paul M¹, Sunitha K¹, Thushara RM¹, NaveenKumar SK¹, Naveen S⁴, Devaraja S⁵, Rangappa KS⁶, Kemparaju K¹, Girish KS⁷. Tamarind Seed (*Tamarindus indica*) Extract Ameliorates Adjuvant-Induced Arthritis via Regulating the Mediators of Cartilage/Bone Degeneration,

Inflammation and Oxidative Stress. Sci Rep. 2015 Jun 10;5:11117. doi: 10.1038/srep11117.

[61] Lima, D.U. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. Estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal Volume 12, Pág 137, 2000.

[62] MARZZOCO, Anita & TORRES, Bayardo Baptista – Bioquímica Básica. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2007. pp. 87-89.

[63] Polidori, M.C; Schulz, R.J. Nutritional contributions to dementia prevention: main issues on antioxidant micronutrientes. Genes Nutr. 2014 Mar; 9(2): 382. Published online 2014 Feb 18. doi: [10.1007/s12263-013-0382-2](https://doi.org/10.1007/s12263-013-0382-2)

[64] Milani M. e Julita, M.F. C. Utilização de Cultura de Anteras no Melhoramento de Plantas. Campina Grande, 2005 26p. (Embrapa Algodão. Documentos, 145) [65] (Higa e col, 2000).

[66] VACA, C.E., WILHEM, J., HARMS-RINGDAHL, M. Interaction of lipid peroxidation products with DNA. *Photochemistry and Photobiology*. 1987, Vol. 46, pp. 147-160.

[67] BARBER, A.D., HARRIS, S.R., Oxygen free radicals and oxidants: a review. Amer. Pharm., v.34, n.9, p.26-35, 1994.

[68] LASIC, D. D. Liposomes: from physics to applications. 1ª ed. Amsterdam: Lipossômicas Compósitas de Fosfatidilcolina de Lecitina de Soja. (LASIC, 1993)

[69] MERTINS, O. Desenvolvimento e Caracterização de Nanovesículas Quitosana. Dissertação de Mestrado em Química, UFRGS, Porto Alegre, 2004.

[70] (Sigma Aldrich, Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/> Acessado em Outubro, 2015. Sigma Aldrich, 2015).

[71] Bacellar O.L. Membrane Damage Efficiency of phenothiazinium Photosensitizers. Photochemical and Photobiological Sciences 2014, 90(4), 801-813)).

[72] EDWARDS, A. M., SILVA, E. Effect of visble light on selected enzymes, vitamins, and amino acids. Journal of Photochemistry and Photobiology, v. 48, p.36-41, 1999a.

[73] EDWARDS, *et al.*, Photochemical and pharmacokinetic properties of select flavins. Journal of Photochemistry and Photobiology, v. 63, p.126-131.

[74] CAETANO, W. ET AL.; 2007. Photo-induced destruction of giant vesicles in methylene blue solutions. *Langmuir*. 2007, Vol. 23(3), pp. 1307-1314.) Elsevier Science Publishers B. V., cap.3, p.63-90, 1993.

[75] Liang, N.; Kitts, D. Antioxidant Property of Coffee Components: Assessment of Methods that Define Mechanisms of Action, Food, Nutrition and Health, November 2014; DOI: 10.3390/molecules191119180 .

[76] Dimitrios, B.; Trends Food Sci. Technol. 2006, 17, 505. 119.

- [77] Abdille, M. D.; Singh, R. P.; Jayaprakasha, G. K.; Jena, B. S.; Food Chem. 2005, 90, 891.
- [78] Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. L.; J. Agric. Food Chem. 2005, 53, 1841 (Huang, D. et al)
- [79] Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R. S.; Methods in Enzymol. 1999, 299, 152.
- [80] Chu, B. - " Laser Light Scattering-Basic Principles and Practice" , AP, San Diego (1991)
- [81] Bacellar O.L. Membrane Damage Efficiency of phenothiazinium Photosensitizers. Photochemical and Photobiological Sciences 2014, 90(4), 801-813)).
- [82] ALCARDE, A.R.; BASSO, L.C.. Efeito da trealose na manutenção da viabilidade de células de leveduras desidratadas por liofilização. Sci. agric., Piracicaba, v.54, n.3, Sept. 1997. Disponível online em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90161997000200013&lng=en&nrm=iso . Acessado em 12 de Janeiro de 2016.
- [83] VAN DEN BERG, R.; HAENEN, G. R. M. M.; VAN DEN BERG, H.; BAST, A. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant 93 capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. Food Chemistry, v. 66, p. 511–517, 1999.
- [84] Rodrigues, D; Viotto AC, Checchia R, Gomide A, Severino D, Itri R, Baptista MS, Martins WK. Mechanism of Aloe Vera extract protection against UVA: Shelter of lysosomal membrane avoids photodamage Photochemical and Photobiological Sciences 2016, 15(3), 334-350).
- [85] Alan D. Elbein, Y.T. Pan, Irena Pastuszak, and David Carroll. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. Glycobiology 2003, vol. 13, no. 4 pp. 17R-27R.
- [86] Villarreal MA1, Díaz SB, Disalvo EA, Montich GG. Molecular dynamics simulation study of the interaction of trehalose with lipid membranes. Langmuir. 2004 Aug 31;20(18):7844-51);
- [87] Cristina S. Pereira, Roberto D. Lins, Indira Chandrasekhar, Luiz Carlos G. Freitas, and Philippe H. Hünenberger. Interaction of the Disaccharide Trehalose with a Phospholipid Bilayer: A Molecular Dynamics Study. Biophys J. 2004 Apr; 86(4): 2273–2285.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Daniela Rodrigues Silva
Irecê-BA, 23 de Março de 1989.

EDUCAÇÃO

Escola Técnica Walter Belian
São Paulo, Dezembro/2006.

Universidade Nove de Julho
São Paulo, Dezembro/2010.
Graduação em Farmácia e Bioquímica

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Escola Senai Fundação Zerrenner
Análises químicas Industriais
São Paulo, Julho/2008.

OCUPAÇÃO

Analista de Controle de Qualidade e Desenvolvimento Analítico na empresa
Aché-Laboratórios Farmacêuticos, São Paulo, 2014 até o presente.

ATIVIDADES PROFISSIONAIS

Rodrigues, D; Viotto AC, Checchia R, Gomide A, Severino D, Itri R, Baptista MS, Martins WK. Mechanism of Aloe Vera extract protection against UVA: Shelter of lysosomal membrane avoids photodamage Photochemical and Photobiological Sciences 2016, 15(3), 334-350).