

**MARCIA ANDREIA BERTOZ**

**Síntese de derivados da mangiferina, avaliação do potencial antialérgico e efeitos na membrana biológica**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

**Orientadora:** Profa. Dra. Rose Mary Zumstein Georgetto Naal

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas em 05/09/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto  
2018

## RESUMO

BERTOZ, M. A. **Síntese de derivados da mangiferina, avaliação do potencial antialérgico e efeitos na membrana biológica**. 2018. 182f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

As doenças alérgicas representam um problema de saúde pública mundial, sendo a rinite e a asma as doenças mais comuns. Essas doenças exigem o uso contínuo de medicamentos cujos efeitos colaterais comprometem a qualidade de vida dos alérgicos e justifica a busca por novos fármacos, ou formulações, relevantes no tratamento das alergias. Neste contexto, destaca-se a planta medicinal *Mangifera indica* L. cujo extrato aquoso, o Vimang®, tem sido utilizado para o tratamento de diversas patologias. O estudo fitoquímico deste extrato levou ao isolamento de vários compostos fenólicos, dentre os quais a mangiferina (Mgf) é a majoritária (~46 %) e responsável por propriedades farmacológicas importantes tal como a antialérgica. Esta molécula é metabolizada no intestino e transformada na sua aglicona, o noratiriol (Nrt), que é encontrada no plasma em maior concentração que a Mgf. Como a relação estrutural-atividade destas substâncias ainda é pouco explorada, este estudo propôs a síntese de novas moléculas, a partir do esqueleto da Mgf, com modificações estruturais em seus substituintes para avaliação, *in vitro*, do potencial antialérgico. Foram sintetizadas moléculas análogas da Mgf (compostos 4, 5 (Nrt) e 6), através de modificações pontuais de hidroxilas do anel xantônico, por meio de uma estratégia sintética que proporcionou maior rendimento reacional. O Nrt apresentou maior potencial antialérgico que a Mgf sugerindo que o açúcar, de fato, interfere na biodisponibilidade. A presença de hidroxilas nas posições 6 e 7 do anel xantônico (grupo catecol) é crucial para a bioatividade, pois estes substituintes influenciam consideravelmente a solubilidade da molécula. Os grupos hidroxila nas posições 1 e 3 do anel xantônico também são importantes, uma vez que a substituição da hidroxila, apenas na posição 3, inibiu totalmente a bioatividade. Como a Mgf e o Nrt (os mais bioativos) são pouco solúveis em água e susceptíveis à oxidação química, ou degradação enzimática, foi planejada a incorporação em nanocarreadores lipossomais, a fim de melhorar a biodisponibilidade. O estudo da melhor formulação foi desenvolvido para a Mgf pela maior quantidade disponível e por seu merecido destaque nas mais diversas aplicações biológicas. Os lipossomos de PC:PE:COL (52:28:20), nas concentrações lipídicas de 2,9; 14,5 e 29 mmol/L, foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico em diferentes razões Mgf/lipídeo (0,01; 0,02; 0,04 e 0,10), nos pHs 6,5; 7,0 e 7,4. Todas as formulações foram estáveis no período de 29 dias, com tamanhos ao redor de 100 nm e índices de polidispersividade ao redor de 0,3, apropriados para aplicação intravenosa. A formulação com maior capacidade de carga (3,4 %) foi a de 2,9 mmol/L de lipídeos totais e razão Mgf/lipídeo de 0,1 a qual foi mantida nos ensaios biológicos. A formulação lipossomal manteve o perfil de inibição da desgranulação observado para os bioativos livres. Este resultado é relevante para a aplicação biológica, uma vez que o bioativo está protegido de degradação química e ainda exerce suas propriedades farmacológicas. Como os lipossomos são sistemas que mimetizam a membrana biológica, a localização da Mgf e os efeitos na membrana foram estudados por anisotropia de fluorescência, DSC e RPE, no pH 7,4. Os resultados mostraram que a Mgf interage com a membrana lipídica, aumentando sua fluidez e diminuindo a cooperatividade lipídica, reforçando a bioatividade dessa molécula vinculada à sua ação em proteínas de membrana, o que é comum para moléculas polifenólicas.

Palavras-chave: Alergias. Mangiferina. Noratiriol. Lipossomos.

*Introdução*

---

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Alergias

#### 1.1.1 Prevalência das doenças alérgicas

Alergias são reações de hipersensibilidade do sistema imune a substâncias normalmente inofensivas denominadas alérgenos ou antígenos. Algumas destas substâncias incluem poeira, pólen, pelos de animais, alimentos, mofo, medicamentos e venenos de insetos (HOLGATE; POLOSA, 2008; DIAMANT et al., 2010; SIMONS et al., 2015; LARSEN; BROGE; JACOBI, 2016).

As doenças alérgicas tais como asma, rinoconjuntivite, sinusite, alergias alimentares, dermatites, entre outras, têm alcançado proporções epidêmicas mundialmente, com constante crescimento de suas taxas de incidência e prevalência (RING et al., 2001; PAWANKAR et al., 2011; HAAHTELA et al., 2013; WHEATLEY et al., 2015; WORLD ALLERGY ORGANIZATION, 2018), representando um problema de saúde da sociedade moderna, principalmente em países industrializados (WHEATLEY et al., 2015; GREENHAWT, 2016; VENTER et al., 2016). As alergias afetam todos os grupos etários e podem aparecer a qualquer momento, mas seu aumento é preocupante em crianças e adultos jovens (BERGER, 2003; ASHER et al., 2006; HOLGATE; POLOSA, 2008). Estudos recentes estimam que 10 a 30 % dos adultos e 20 a 40 % das crianças apresentam rinite alérgica (BERGER, 2003; BAROODY, 2003; PAWANKAR et al., 2011; WORLD ALLERGY ORGANIZATION, 2018). No entanto, a asma é considerada a maior causa de hospitalização e visitas a centros de emergência, além de ser o maior motivo de ausência na escola e no trabalho (WORLD ASTHMA DAY – NIH, 2016; AKINBAMI; SIMON; SCHOENDORF, 2016). Pode-se dizer que, atualmente, as doenças alérgicas respiratórias são as doenças crônicas mais comuns entre crianças e adultos jovens (RING, 2012; CALDERON et al., 2012) e isso é mais preocupante no caso das crianças devido ao prognóstico de doença crônica e, frequentemente, agravante (PAPADOPOULOS et al., 2012).

O Brasil faz parte do grupo de países que apresentam as maiores taxas de prevalência de asma e rinite alérgica, doenças que se encontram entre as dez razões mais frequentes da procura de atendimento primário à saúde (IBIAPINA et al., 2008). De acordo com a Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) do Ministério da Saúde e Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2015), a asma atinge

aproximadamente 6,5 milhões de brasileiros com mais de 18 anos de idade. Anualmente ocorrem, no Brasil, cerca de 350 mil internações por asma, constituindo-se a quarta causa de hospitalização pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (IBIAPINA et al., 2008) e o terceiro maior valor gasto com uma doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015; WORLD ALLERGY ORGANIZATION, 2018). A Associação Brasileira de Alergia e Imunologia (Asbai) publicou, em março de 2015, dados alarmantes sobre a despesa gerada pela asma para o sistema de saúde no Brasil. Só os medicamentos consumiram mais da metade dos recursos de famílias com asmáticos e o custo da doença teve impacto importante na renda familiar (10 %).

Apesar do progresso na patofisiologia das alergias, e da disponibilidade de várias terapias nos últimos anos (FRITSCHER; SOLÉ; ROSÁRIO, 2002; GALLI et al., 2008) como o uso de medicamentos anti-histamínicos, corticosteroides e imunoterapia, a cura para essas doenças ainda não foi alcançada (CHAUHAN et al., 2015). Para a maioria das pessoas, as estratégias usadas para tratar os sintomas alérgicos, ou prevenir as doenças, têm se mostrado ineficientes e impraticáveis, o que enfatiza a necessidade da descoberta de novos fármacos e novas alternativas que possam intervir nas respostas imunológicas de forma mais eficiente (HOLGATE; POLOSA, 2008; TOSCA et al., 2018; WORLD ALLERGY ORGANIZATION, 2018).

### **1.1.2 Tratamento das doenças alérgicas**

As diretrizes clínicas no tratamento de alergias recomendam uma combinação entre a orientação ao paciente, a redução do contato com os alérgenos, a farmacoterapia e a imunoterapia da alergia. No cotidiano, é difícil controlar os sintomas apenas evitando contato com os alérgenos e, com isso, muitos pacientes fazem uso de medicamentos. Embora fármacos seguros e acessíveis estejam disponíveis para o tratamento dos sintomas das alergias, muitos pacientes relatam alívio insuficiente e efeitos colaterais desagradáveis, principalmente quando são usados os corticosteroides, muitas vezes inevitáveis (ROLLAND; GARDNER; O'HEHIR, 2009; PANERARI; GALENDE, 2018). Além disso, a farmacoterapia disponível no mercado não tem efeito sobre a progressão da doença e o tratamento tem que ser administrado muitas vezes enquanto houver a prevalência dos sintomas, o que significa terapia de longa duração.

Os medicamentos mais usados são aqueles contendo anti-histamínicos, estabilizadores de mastócitos, leucotrienos e corticosteroides (MELTZER, 2011;

MELVIN; PATEL, 2011; CHAABAN; COREY, 2012), disponíveis nas formas nasal, ocular, oral, tópica, aerossol, entre outras. Dependendo do paciente, da gravidade da doença alérgica, e tempo de uso, estes medicamentos podem resultar em efeitos colaterais desagradáveis tais como fadiga, tontura, boca seca, irritabilidade, insônia, tremor e aumento de peso. No caso dos corticosteroides, os efeitos colaterais são mais drásticos e incluem úlcera gástrica, aumento de pressão arterial, fraqueza muscular, atraso no crescimento infantil, além de glaucoma (via ocular) e sangramento (via nasal) (MELVIN; PATEL, 2011; MEHTA et al., 2016).

A imunoterapia da alergia é, atualmente, uma forma de tratamento promissora no alívio dos sintomas alérgicos (REISACHER; SCHWANKE, 2016; KUMAR et al., 2015; REIG et al., 2017). Ela é baseada na administração lenta, por via injetável ou sublingual, de pequenas doses de anticorpos, os quais afetam os mecanismos imunológicos básicos e resultam na indução de tolerância imunológica e alívio dos sintomas alérgicos por um longo período (LARCHÉ; AKDIS; VALENTA, 2006; BURKS et al., 2013; LARSEN; BROGE; JACOBI, 2016). No entanto, as mudanças no sistema imunológico associadas com a imunoterapia são complexas e os mecanismos responsáveis pela eficácia clínica deste tipo de tratamento ainda estão sendo investigadas (HANCI et al., 2016).

Apesar dos bons resultados alcançados com a imunoterapia, esta não é para todos, uma vez que é contraindicada para portadores de asma grave, pacientes em uso de betabloqueadores, pacientes com doenças autoimunes, ou malignas, doentes psiquiátricos e idosos. Ressalta-se o risco de choque anafilático e morte, que aparecem em pequenas porcentagens, mas não podem ser desconsideradas (NELSON et al., 1997; SENTI; VON MOOS; KÜNDIG, 2014).

Apesar da disponibilidade de várias terapias nos últimos anos (GALLI et al., 2008; CHAUHAN et al., 2008; MELTZER, 2011; SEIBERLING et al., 2012; YANAI et al., 2012; MELTZER, 2013; BENEDÉ et al., 2016; MEHTA et al., 2016), o controle dos sintomas alérgicos, para muitos pacientes, permanece em níveis subótimos. Portanto, tratamentos adicionais com o uso de novos medicamentos e mecanismos de ação diferenciados são muito importantes. Por essa razão, a patofisiologia continua sendo amplamente estudada, de forma que este conhecimento seja revertido para a descoberta de novos medicamentos e/ou formulações que possam modular as respostas alérgicas e contribuir para melhor qualidade de vida da população alérgica. Neste contexto, o desenvolvimento de inibidores que atuem de

forma eficiente sobre diferentes pontos da cascata bioquímica de células do sistema imune promete a melhora das respostas alérgicas agudas, representando uma oportunidade terapêutica relevante (KOVAROVA; RIVERA, 2004).

### 1.1.3 Reações de hipersensibilidade

As reações de hipersensibilidade ocorrem quando o sistema imune do indivíduo reage de maneira excessiva, ou indesejável, mediante a presença de um antígeno, que pode ser próprio, ambiental ou referente a microrganismos, causando algum tipo de distúrbio (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Essas reações, de acordo com o tipo de resposta imune e os mecanismos que as desencadeiam, foram classificadas em quatro tipos: I, II, III e IV (RAJAN, 2003), como mostra a Figura 1.

As reações de hipersensibilidade do tipo I, ou imediata, são mediadas por anticorpos imunoglobulina E (IgE), que são produzidos em resposta a antígenos ambientais específicos. Nessa reação, o componente celular é o mastócito ou o basófilo, os quais apresentam receptores específicos para IgE, levando a uma ligação cruzada com subsequente liberação de substâncias farmacologicamente ativas (RAJAN, 2003; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

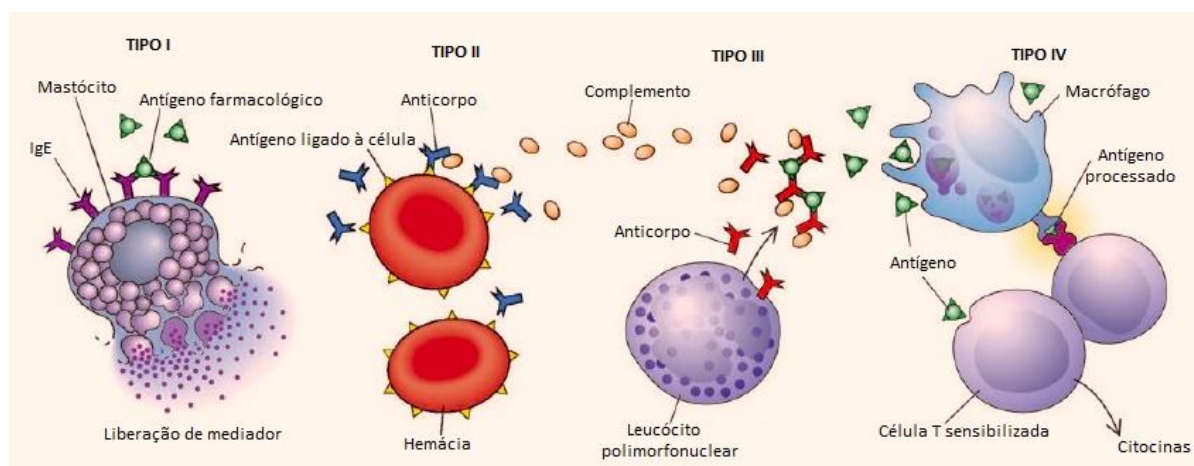
As reações de hipersensibilidade do tipo II são reações autoimunes, mediadas por anticorpos IgG e IgM, que podem causar lesão tecidual pela ativação do sistema complemento, recrutando células inflamatórias e alterando as funções celulares (RAJAN, 2003).

Nas reações de hipersensibilidade do tipo III, a mediação ocorre por imunocomplexos formados contra antígenos estranhos ou próprios. Estas reações acontecem devido à excessiva formação ou à dificuldade de remoção desses imunocomplexos, que acabam se depositando em algum lugar do organismo, particularmente nas paredes dos vasos sanguíneos, gerando uma reação inflamatória local com recrutamento de células e ativação do complemento com posterior destruição tecidual (RAJAN, 2003).

Finalmente, as reações de hipersensibilidade do tipo IV são mediadas por linfócitos T auxiliares CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>. Nesse tipo de reação, os linfócitos podem reconhecer antígenos próprios via apresentação de uma célula apresentadora de antígenos (APC) ou pela própria célula do tecido normal ou, ainda, pela ligação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> nesse tecido, culminando, em ambos os casos, com secreção de

citocinas, as quais levam à reação inflamatória, lesão e morte tecidual (RAJAN, 2003).

Figura 1 - Os quatro tipos de reações de hipersensibilidade. Nas reações de tipo I (anafilaxia), os anticorpos IgE ligam-se ao antígeno realizando ligação cruzada com IgE adjacentes, liberando mediador. Nas reações de tipo II (citotóxicas), anticorpos IgG ou IgM reconhecem o antígeno associado às membranas celulares, ativando o sistema complemento. Nas reações de tipo III (imunocomplexo), há formação de complexos antígeno-anticorpo. Nas reações de tipo IV (hipersensibilidade tardia), há mediação por linfócitos sensibilizados.



Fonte: Medicina Net (2018).

### 1.1.3.1 Reações de hipersensibilidade do tipo I

As reações de hipersensibilidade do tipo I são, também, conhecidas como imediata, anafilática, alérgica ou atópica, pois é uma resposta rápida, que pode causar diversos efeitos locais ou sistêmicos. Exemplos de consequências patológicas ou hipersensibilidade do tipo I são as alergias comuns, nas quais o indivíduo é alérgico a um determinado antígeno em virtude de componentes genéticos, geográficos e ambientais. Os antígenos mais comuns, como já mencionados, estão relacionados ao pólen, ácaros, alimentos, medicamentos, fungos e pelos de animais. Em geral, estes antígenos são proteínas, ou produtos químicos ligados às proteínas, de baixo a médio peso molecular (5 – 70 kDa), estáveis, glicosilados, de alta solubilidade em fluidos corporais, e não causam reação imunológica em indivíduos que não sejam alérgicos àquela substância.

Na hipersensibilidade do tipo I, ocorrem as reações alérgicas imediatas, que se desenvolvem minutos após a exposição ao alérgeno, e as reações alérgicas de fase tardia, que levam a um processo inflamatório o qual ocorre de forma mais lenta (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Estas reações alérgicas se diferem quanto aos



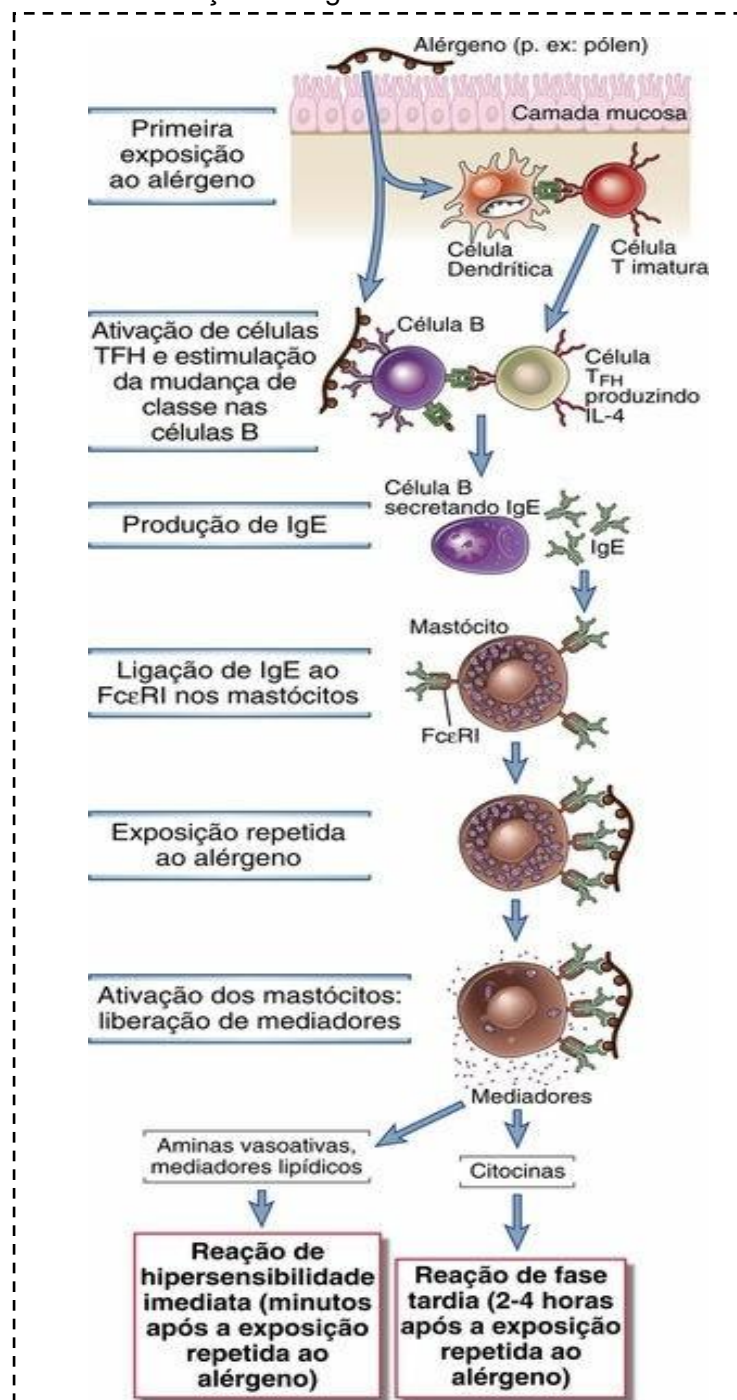
tipos de antígenos e manifestações clínicas, mas todas apresentam características comuns e são iniciadas por uma mesma sequência de eventos divididos em fase de sensibilização, fase de ativação e fase efetora, como mostra a Figura 2.

No momento em que o indivíduo entra pela primeira vez em contato com o alérgeno o qual penetrou o tecido epitelial, a APC (p. ex. célula dendrítica) realiza a captura deste antígeno, o transporte para o linfonodo, o processamento e a apresentação aos linfócitos T CD4<sup>+</sup> imaturos, os quais vão se diferenciar em células Th2 ou em células T foliculares auxiliares (T<sub>FH</sub>). As células Th2 diferenciadas migram para os tecidos nos locais de exposição aos alérgenos contribuindo para a fase inflamatória, enquanto que as células T<sub>FH</sub> permanecem nos órgãos linfoides e secretam citocinas Th2 (IL-4 e IL-13), as quais estimulam a mudança de classe dos anticorpos de linfócitos B para produção de IgE. Esta imunoglobulina reconhece receptores FcεRI específicos presentes na membrana dos mastócitos, permitindo a sua sensibilização (primeira fase) (HOLLOWKA; BAIRD, 1996; MINAI-FLEMINGER; LEVI-SCHAFFER, 2009).

Se não houver novo contato do indivíduo com este alérgeno, nenhuma reação ocorrerá. No entanto, se houver um segundo contato, inicia-se a fase de ativação na qual o alérgeno liga-se à IgE na membrana dos mastócitos provocando a ativação desta célula, o que culmina com a terceira fase, a efetora, na qual ocorre a desgranulação mastocitária e liberação do conteúdo granular para os tecidos. Neste processo, são liberados mediadores pré-formados que incluem aminas biogênicas (histamina) e macromoléculas de grânulos secretórios (proteases, carboxipeptidase A, catepsina G, heparina), e os mediadores recém-sintetizados que incluem mediadores lipídicos (PGD<sub>2</sub>, LTC<sub>4</sub>, PAF) e citocinas (TNF, IL-4, IL-5, IL-13).

As aminas biogênicas e os mediadores lipídicos levam ao aumento da permeabilidade vascular, à vasodilatação, broncoconstrição e hipermotilidade intestinal, que são eventos da resposta imediata. A liberação de citocinas promove o recrutamento de outras células para o local, como neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, basófilos, e linfócitos T do tipo Th2. Essas células são ativadas e liberam enzimas que, juntamente com as macromoléculas contidas nos grânulos secretórios dos mastócitos já ativados, causam reação inflamatória, lesão e remodelamento tecidual no local, culminado com a reação de fase tardia, que acontece de 2 a 4 horas depois da reação imediata, sendo menos intensa e mais duradoura (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Figura 2 – Eventos indutores da hipersensibilidade tipo I. Em presença de um alérgeno, há estímulo de células T auxiliares, que produzem IL-4, e estimulam células B a produzirem IgE. Esse anticorpo sensibiliza os mastócitos por meio da ligação ao receptor FcεRI, e a partir de uma segunda exposição ao alérgeno, os mastócitos são ativados e secretam mediadores responsáveis pelas reações patológicas da hipersensibilidade tipo I, coletivamente chamadas de reações alérgicas.



Fonte: Abbas, Lichtman e Pillai (2015).

Como exemplos de reações de hipersensibilidade do tipo I, ou reações alérgicas, pode-se citar a rinite alérgica e a asma que são as doenças mais comuns. A rinite alérgica é causada pela exposição aos alérgenos, como pólen de plantas ou

ácaros de poeira doméstica, os quais entram em contato com o organismo por meio de inalação e localizam-se no trato respiratório superior. Neste caso, a mucosa nasal se torna irritada, com edema, infiltração de leucócitos e eosinófilos, secreção de muco e obstrução nasal, levando o paciente a desenvolver tosse, espirro, coceira, corrimento nasal e dificuldade para respirar (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Caso a reação alérgica ocorra nas vias aéreas inferiores, tem-se uma situação mais grave, a chamada asma brônquica. Nessa enfermidade, há repetidas reações alérgicas de hipersensibilidade de fase imediata e de fase tardia, no pulmão, as quais levam à obstrução intermitente e reversível das vias aéreas, inflamação crônica dos brônquios, hipertrofia das células do músculo liso brônquico e hiperreatividade aos broncoconstritores (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). A constrição brônquica e a secreção aumentada de muco dificultam a passagem do ar, enquanto a inflamação crônica, em virtude do recrutamento de eosinófilos, leva ao remodelamento tecidual, diminuição do lúmen das vias aéreas inferiores e agravamento do quadro do indivíduo asmático.

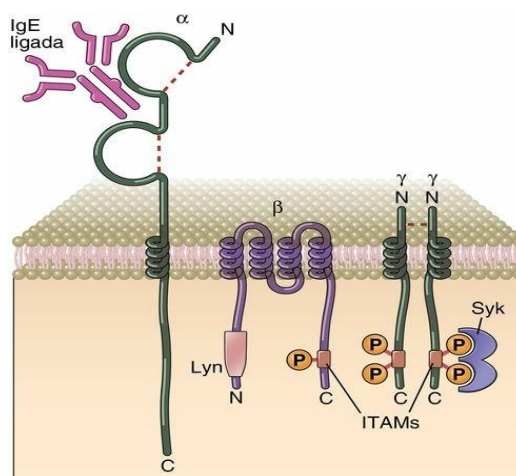
## 1.2 Mastócitos como alvo terapêutico

Os mastócitos são células do sistema imune intimamente relacionadas aos processos alérgicos (HOLOWKA; BAIRD, 1996; HIRANO et al., 2006; LIU et al., 2010). Os mastócitos estão localizados no tecido conectivo de uma variedade de mucosas e órgãos vascularizados tais como pulmão, pele, mucosa do intestino e conjuntiva, onde eles estão em contato com o ambiente externo (KINET, 2007; METZ; SIEBENHAAR; MAURER, 2008; ZHANG et al., 2016; WAWRZYNIAK et al., 2016). Estas células estão estrategicamente posicionadas para atuarem como uma das primeiras células de defesa no ataque a antígenos, toxinas ambientais, bactérias e vírus (GALLI; TSAI, 2010; WALKER; HATFIELD; BROWN, 2012; SILVA; JAMUR; OLIVER, 2014; MOON; BEFUS; KULKA, 2014).

Nas doenças alérgicas, os mastócitos são ativados por um mecanismo que depende de IgE, devido ao grande número de receptores de alta afinidade para IgE (FcεRI) que estas células expressam (BARSUMIAN, 1981). Os anticorpos IgE solúveis se ligam aos receptores FcεRI de maneira praticamente irreversível, com uma constante de dissociação, K<sub>d</sub>, na ordem de  $1 \times 10^{-10}$  M (ISERSKY et al., 1979; HOLOWKA; BAIRD, 1996).

O  $Fc\epsilon RI$  (Figura 3) é um receptor tetramérico membro da família de receptores de reconhecimento imune multicadeia (MIRR) (KEEGAN; PAUL, 1992). Este receptor é constituído por uma cadeia  $\alpha$  que se liga à IgE, por uma cadeia  $\beta$  responsável por amplificar o sinal (LIN et al., 1996), e por duas cadeias  $\gamma$  que são ligadas entre si por uma ligação dissulfeto e são responsáveis pela competência sinalizadora deste receptor (NADLER et al., 2000). A capacidade de sinalização é possível em virtude da presença de um segmento de aminoácidos chamado segmento de ativação do receptor baseado na tirosina (ITAM) (CAMBIER et al., 1995), o qual possui resíduos canônicos de tirosina que são fosforilados quando o receptor, ocupado pela IgE, reconhece o alérgeno.

Figura 3 - Estrutura do receptor de alta afinidade para IgE ( $Fc\epsilon RI$ ). A molécula é composta por 3 subunidades,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , sendo a cadeia  $\alpha$  responsável pelo reconhecimento do antígeno e as demais cadeias responsáveis pela transdução do sinal. As tirosina quinases, Lyn e Syk, ligam-se às cadeias  $\beta$  e  $\gamma$ , participando dos eventos de sinalização.



Fonte: Abbas, Lichtman e Pillai (2015).

A ligação de IgE ao receptor  $Fc\epsilon RI$  sensibiliza os mastócitos para um alérgeno específico (MASUDA; SHIMITZ, 2008). A exposição subsequente dos mastócitos sensibilizados ao mesmo alérgeno resulta na ligação cruzada e agregação dos imunocomplexos os quais particionam para domínios da membrana, denominados *lipid rafts* (SIMONS; IKONEN, 1997; HOLOWKA; SHEETS; BAIRD, 2000; SIMONS; TOOMRE, 2000), onde ocorrem os eventos iniciais da ativação dos mastócitos e da transdução de sinais. Após a agregação dos imunocomplexos, ocorre a fosforilação dos ITAMs, das cadeias  $\beta$  e  $\gamma$  do receptor, pela proteína tirosina quinase da família Src chamada Lyn (PAOLINI; JOUVIN; KINET, 1991; BOLEN et al, 1992; PRIBLUDA;

PRIBLUDA; METZGER, 1994), iniciando uma cascata de sinalização celular como mostra a Figura 4.

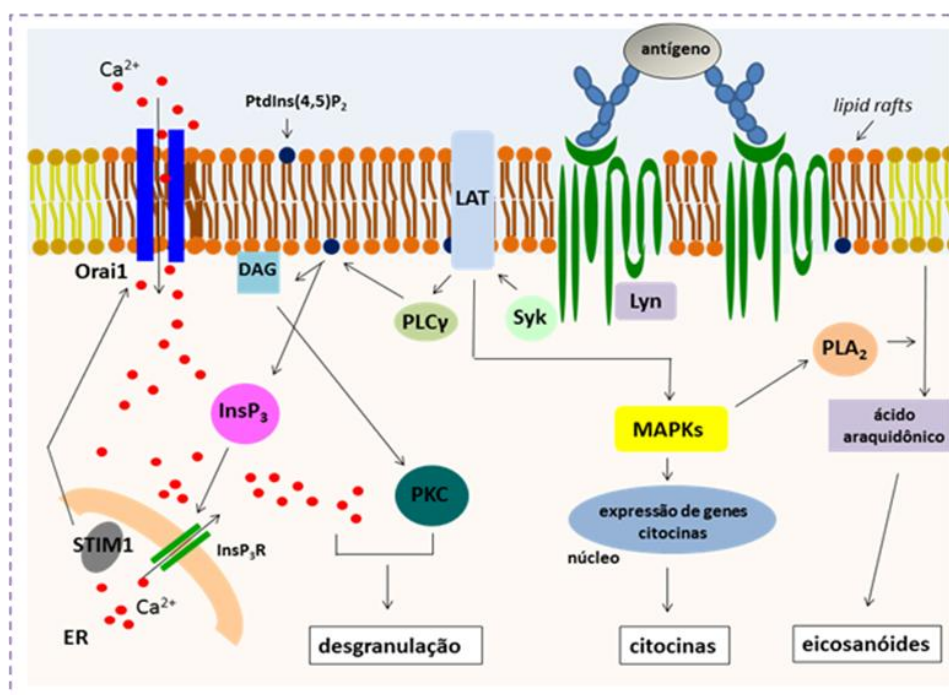
A fosforilação dos ITAMs, na subunidade  $\gamma$  do receptor, cria um novo sítio de ligação para outra proteína tirosina quinase chamada Syk, que se associa ao receptor através de seus dois domínios SH2. O recrutamento de Syk pelos ITAMs fosforilados resulta na fosforilação da LAT (Linker for Activation of T cells), uma proteína localizada nos *lipid rafts* da membrana plasmática. A partir da fosforilação da LAT, diferentes cascatas de sinalização são desenvolvidas as quais levam à liberação de mediadores alérgicos de natureza diversa. Estes mediadores, como já comentado, são divididos em três classes de moléculas bioativas: eicosanoides (prostaglandinas, leucotrienos), citocinas (IL-4, TNF- $\alpha$ ) e conteúdo dos grânulos citoplasmáticos (histamina, serotonina, proteases,  $\beta$ -hexosaminidase) (GALLI et al., 2008).

A ativação da LAT propicia o translocamento da enzima fosfolipase  $C\gamma$  (PLC $\gamma$ ) do citosol para a membrana plasmática, onde a PLC $\gamma$  catalisa a hidrólise de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) para formar os mensageiros inositol-1,4,5-trifosfato (InsP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG) (BERRIDGE, 1993). O InsP<sub>3</sub> liga-se a seu receptor no retículo endoplasmático e determina a liberação das reservas de Ca<sup>2+</sup> para o citoplasma. A proteína STIM1 (Stromal Interaction Molecule 1), localizada no retículo endoplasmático, funciona como um sensor para Ca<sup>2+</sup> e, devido à depleção das reservas deste íon, mediada por InsP<sub>3</sub>, STIM1 sofre alteração conformacional e oligomerização seguidos pela translocação desta proteína para regiões de justaposição entre o retículo endoplasmático e a membrana plasmática (LIOU et al., 2005). Nestas junções, STIM1 acopla-se ao canal de Ca<sup>2+</sup> Orai1/CRACM1 (Ca<sup>2+</sup> Release Activated Channel) para induzir o influxo de Ca<sup>2+</sup> por meio de um processo denominado SOCE (Store Operated Ca<sup>2+</sup> Entry) (LEWIS, 2007). O aumento da concentração intracelular de Ca<sup>2+</sup> e a geração de diacilglicerol (DAG) induzem a ativação da proteína quinase C (PKC), com consequente desgranulação dos mastócitos e liberação de mediadores químicos pré-formados responsáveis pela resposta alérgica imediata e sintomas de rinite, conjuntivite, dermatite, asma entre outros (WERNERSSON; PEIJLER, 2014; LUNDEQUIST e PEIJLER, 2011; GALLI et al., 2008).

Finalmente, a LAT ativada permite, ainda, a ativação da via das MAP quinases com consequente produção de citocinas e fatores de crescimento (TNF- $\alpha$ , IL-4), secretados horas após o estímulo antigênico, que propagam a produção de IgE e resultam na inflamação alérgica. Pela mesma via das MAP quinases ocorre a ativação da fosfolipase A2 (PLA<sub>2</sub>), a qual catalisa a conversão de fosfolípidos de membrana em mediadores inflamatórios lipídicos como as prostaglandinas e leucotrienos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Em resumo, a ativação dos mastócitos e a consequente desgranulação com liberação de mediadores químicos leva às reações de hipersensibilidade do tipo I, ou seja, às reações alérgicas, imediata ou tardia, responsáveis por todos os sintomas alérgicos já mencionados. Portanto, tratamentos adicionais que façam uso de novas moléculas, ou formulações, com mecanismos de ação diferenciados e que atuem nos diferentes pontos da cascata de sinalização celular são altamente desejáveis.

Figura 4 - Sinalização celular dos mastócitos. O intercruzamento de receptores Fc $\epsilon$ RI por um antígeno leva ao deslocamento dos receptores agregados para os *lipid rafts*, onde o receptor é fosforilado pela forma ativa de Lyn. O recrutamento para o receptor e ativação de Syk leva à fosforilação da LAT, a qual permite que a transdução de sinais seja dividida em cascatas que levarão à síntese e secreção de mediadores lipídicos e citocinas, através da ativação de MAP quinases, além da ativação da PLC $\gamma$ , que inicia a via de desgranulação dos mastócitos.



Fonte: Adaptado de Santos (Tese de Doutorado, 2012).

### 1.3 Modelo biossensor baseado em mastócitos

Os biossensores são dispositivos analíticos que integram um componente biológico com um transdutor eletrônico, o qual converte o sinal biológico em uma resposta elétrica mensurável (NAAL et al., 2003; NAAL et al., 2004; CURTIS et al., 2008; TURNER, 2013). O transdutor de sinais pode ser eletroquímico, óptico, acústico ou eletrônico (SCHELLER et al., 2001; SHRUTHI; AMITHA; MATHEW, 2014).

Os biossensores que empregam células como componente biológico constituem uma ferramenta promissora, com inúmeras aplicações, incluindo monitoramento ambiental (BANERJEE; BHUNIA, 2010; WANG et al., 2015; SUN et al., 2015), diagnóstico clínico (JIANG et al., 2016; ALVES et al., 2016; YANASE et al., 2016) e triagem de moléculas com potencial farmacológico (ZANG et al.; 2012; RAMASAMY; BENNET; KIM, 2014; PRÉVEL et al., 2014).

Para os dispositivos biossensores baseados em células, é importante destacar as vantagens que os colocam à frente de biossensores baseados somente em enzimas ou anticorpos. Nos biossensores celulares, os caminhos enzimáticos já estão otimizados e os cofatores, substratos e reagentes estão disponíveis, uma vez que as células são produtoras de proteínas sinalizadoras as quais se encontram em seu ambiente natural, e cujas sensibilidades aos analitos são inquestionáveis em função de sua capacidade de reconhecimento (MCCORMACK et al., 1998; NAAL et al., 2004; CURTIS et al., 2008). Além disso, os receptores celulares e as proteínas sinalizadoras são mantidos e regenerados pela própria célula conforme necessário (PANCRAZIO et al., 1999).

As células do sistema imune têm sido utilizadas como elemento sensível em biossensores celulares, uma vez que estas células reconhecem antígenos com alta sensibilidade e especificidade (WANG e LIU, 2010). Os mastócitos apresentam um excelente potencial para a aplicação em biossensores, uma vez que estas células são robustas e podem ser facilmente sensibilizadas para reconhecer antígenos específicos, gerando sinais biológicos mensuráveis quando expostos aos antígenos (PAGE; PIZZICONI, 1997; STENGER et al., 2001; WANG; LIU, 2010; WANG et al., 2015; JIANG et al., 2016; YANASE et al., 2016).

A linhagem de células RBL-2H3 (Rat Basophilic Leukemia), derivada de mastócitos de ratos, é bem apropriada para o emprego em biossensores celulares (NAAL et al., 2004; CURTIS et al., 2008). Estas células crescem em cultura,

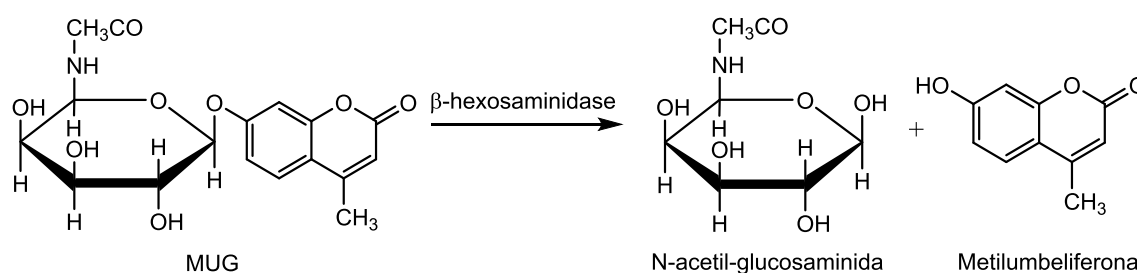
associadas a substratos sólidos e podem expressar mais que  $1 \times 10^5$  receptores Fc $\epsilon$ RI por célula. Ao contrário de mastócitos nativos, cujos receptores já são ligados a anticorpos IgE de especificidade desconhecida, as células RBL podem ser marcadas com IgE exógenas de especificidade conhecida para o antígeno desejado, de acordo com o interesse da análise (XU et al., 1998). Como a ligação de IgE ao Fc $\epsilon$ RI é forte, o receptor pode ser totalmente ocupado em concentrações de IgE menores que  $5 \times 10^{-10}$  M (aproximadamente 1  $\mu$ g/mL) (HOLLOWKA; BAIRD, 1996). Além disso, somente poucas centenas de moléculas de Fc $\epsilon$ RI na membrana celular precisam ser intercruzadas para disparar a transdução de sinais em mastócitos e a desgranulação.

Durante a desgranulação, diversos mediadores alérgicos, como a histamina, são secretados e entre eles está a enzima  $\beta$ -hexosaminidase ( $\beta$ -hex), cujo papel ainda não é bem esclarecido, mas há indícios de que esteja envolvida na degradação de glicoproteínas e proteoglicanas da matriz extracelular, remodelando tecidos inflamados (LUNDEQUIST; PEIJLER, 2011). Como a enzima  $\beta$ -hexosaminidase é liberada junto com a histamina, esta enzima tem sido usada como marcador biológico para a desgranulação mastocitária, e bioensaios têm sido conduzidos com base nesta liberação (HUANG et al., 2014). Estes bioensaios são apropriados para monitorar o potencial antialérgico de novas moléculas, potenciais novos fármacos (GRANBERG; FOWLER; JACOBSSON, 2001; SANTOS et al, 2013 a,b; HUANG et al., 2014; JUCKMETA, THONGDEEYING; ITHARAT, 2014; SEUANES et al., 2015).

A quantificação da  $\beta$ -hexosaminidase pode ser feita através de substratos enzimáticos colorimétricos (SEREBRIISKII; GOLEMIS, 2000; AKETANI et al., 2001) ou fluorimétricos (DEMO et al., 1999; FISCHER; DE MOL, 1999). Neste estudo, foi utilizado o substrato fluorogênico 4-metilumbeliferil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida (MUG), o qual reage com a enzima  $\beta$ -hexosaminidase para formar o produto fluorescente metilumbeliferona, como ilustra a Figura 5.



Figura 5 - Reação de clivagem do substrato fluorogênico metilumbeliferil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida (MUG) pela enzima  $\beta$ -hexosaminidase liberada no processo de desgranulação mastocitária, gerando o produto fluorescente metilumbeliferona.



Fonte: Naal e colaboradores (2004).

O ensaio clássico empregado para quantificar a desgranulação de mastócitos é chamado, por nós, como ensaio padrão, como mostra a Tabela 1. Este ensaio consiste em um número significativo de etapas, as quais incluem a sensibilização das células com IgE, estímulo celular por um antígeno, alíquotamento do sobrenadante celular para a reação enzima-substrato ( $\beta$ -hexosaminidase/MUG) e medida de fluorescência da metilumbeliferona produzida. A reação enzima-substrato, para este ensaio, é conduzida em pH 4,4, o qual é ótimo para a atividade da  $\beta$ -hexosaminidase, e a reação é inibida pelo aumento do pH reacional de 4,4 para 10. O considerável número de etapas que envolvem este bioensaio, incluindo a transferência do sobrenadante das células aderidas, torna o ensaio padrão inapropriado para análises que requeiram alta capacidade de processamento (high-throughput analysis). Para adaptar as condições deste ensaio a um modelo que permitisse a triagem, em tempo hábil, de muitas amostras, foi desenvolvido o ensaio direto para a quantificação da  $\beta$ -hexosaminidase de modo que não houvesse perda de seletividade e capacidade para detecção da desgranulação e de sua inibição (NAAL et al., 2004). Este ensaio direto trata-se de um ensaio conduzido *in situ*, realizado em um número significativamente reduzido de etapas (Tabela 1), que pode ser utilizado como um modelo biossensor baseado em mastócitos capaz de analisar um número significativo de amostras com alta sensibilidade e reprodutibilidade (NAAL et al., 2004).

Devido à sensibilidade dos mastócitos e seu papel nas alergias, esse modelo biossensor pode ser usado, ainda, para avaliar se novas moléculas, ou novas formulações, estimulam a desgranulação e os processos alérgicos. Além da viabilidade para o *screening* de moléculas com potencial farmacológico, o biossensor baseado em mastócitos pode ser usado para a detecção de toxinas

químicas e biológicas, desde que as células sejam sensibilizadas com anticorpos específicos para o reconhecimento de tais toxinas.

Tabela 1 - Etapas para a quantificação da enzima  $\beta$ -hexosaminidase pelo ensaio padrão e direto (modelo biossensor).

Ensaio Padrão	Ensaio Direto (Biossensor)
Sensibilização celular com anticorpo	Sensibilização celular com anticorpo
↓	↓
Adição do bioativo com potencial antialérgico	Adição do bioativo com potencial antialérgico
↓	↓
Incubação a 37°C por 20 minutos	Incubação a 37°C por 20 minutos
↓	↓
Estímulo com antígeno	Estímulo com antígeno
↓	↓
Incubação a 37°C por 60 minutos	Incubação a 37°C por 60 minutos
↓	↓
Parada da desgranulação no gelo	Parada da desgranulação no gelo
↓	↓
Aliquotamento do sobrenadante	
↓	↓
Adição do substrato fluorogênico	Adição do substrato fluorogênico
↓	↓
Incubação a 37°C por 30 minutos	Incubação a 37°C por 30 minutos
↓	↓
Parada da reação com tampão pH 10	
↓	↓
Leitura de fluorescência	Leitura de fluorescência

Fonte: Adaptado de Naal e colaboradores (2004).

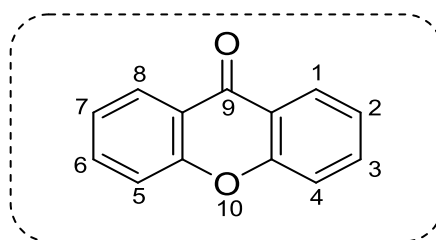
#### 1.4 Substâncias naturais: as xantonas como alternativa terapêutica

As substâncias naturais, ou também chamadas metabólitos secundários, são moléculas originadas a partir do metabolismo secundário de uma dada espécie ou família de plantas, podendo ser empregadas como marcador taxonômico (BRUM, 2012; GONÇALVES; LIMA, 2016). Essas substâncias não são consideradas essenciais para a sobrevivência das plantas, mas podem fornecer uma vantagem competitiva importante. Por apresentarem diversas atividades biológicas, tais substâncias têm sido utilizadas como fármacos para o tratamento de muitas doenças (KINGSTON; NEWMAN, 2002; BOLDI, 2004; JACHAK; SAKLANI, 2007; VYAS et al., 2012; VO; NGO; KIM, 2012; NEWMAN; CRAGG, 2012; BELLIK et al., 2012, 2013;

NEGI et al., 2013; CRAGG et al., 2014; KHAN; GILANI, 2015), além de que suas estruturas básicas relevantes servem de protótipos para o desenvolvimento de novas moléculas sintéticas (BAKER; ALVI, 2004; BUTLER, 2008).

Uma classe importante de compostos naturais são as xantonas, ou dibenzo- $\gamma$ -pironas (Figura 6), cuja estrutura é constituída por heterociclos oxigenados (PINTO; SOUSA; NASCIMENTO, 2005; VYAS et al., 2012; MIRZA; CHI; CHI, 2013; NEGI et al., 2013; WEZEMAN; BASE; MASTERS, 2015; YANG et al., 2016), podendo ser classificadas em xantonas oxigenadas simples, xantonas glicosiladas, xantonas preniladas, bisxantonas, xantonolignoides e xantonas mistas (PERES et al., 2000; PINTO; SOUSA; NASCIMENTO, 2005).

Figura 6 – Estrutura química básica da xantona.



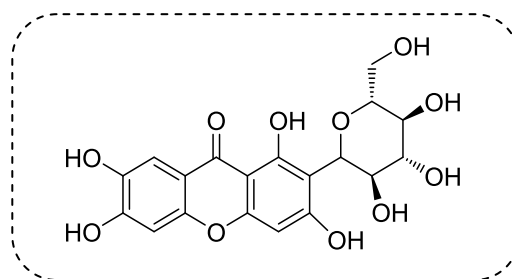
Fonte: Ahmad e colaboradores (2016).

As atividades biológicas desta classe de compostos são relacionadas ao esqueleto tricíclico e variam conforme a natureza e/ou posição dos substituintes no esqueleto xantônico (NEGI et al., 2013). As xantonas glicosiladas são divididas em C-glicosídicas e O-glicosídicas, e as ligações C-C e C-O ligam a molécula de açúcar ao núcleo xantônico.

As C-glicosídeo xantonas são mais resistentes à hidrólise ácida e enzimática, são mais raras e possuem poucas estruturas identificadas, comparadas às O-glicosídeo xantonas (NEGI et al. 2013). A isomangiferina e a mangiferina são exemplos de C-glicosídeo xantonas, sendo que neste estudo a mangiferina é nosso foco de interesse.

A mangiferina (2-C- $\beta$ -D-glicopiranosil-1,3,6,7-tetrahidroxixantona) (Mgf) (Figura 7) foi inicialmente isolada de árvores da popular mangueira, da família Anacardiaceae, do gênero *Mangifera indica* Linn. Foi a primeira xantona a ser farmacologicamente investigada e, no ano de 1968, foram descobertas propriedades cardiotônicas e diuréticas relacionadas a ela (FINNEGAN et al., 1968).

Figura 7 – Estrutura química da mangiferina.



Fonte: Garcia-Rivera e colaboradores (2011).

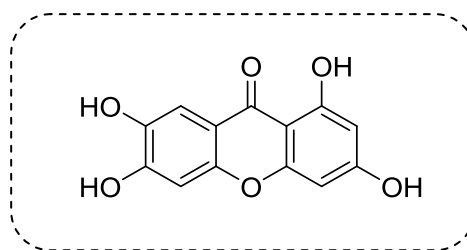
Em Cuba, a mangiferina é encontrada como composto majoritário do Vimang® (NÚÑEZ-SÉLLES et al., 2002), um extrato padronizado e registrado pelas Autoridades Cubanas Reguladoras de Saúde como um fitomedicamento anti-inflamatório (PARDO-ABREU et al., 2006; GARCIA-RIVERA et al., 2011). Ela é também recomendada pelo Sistema Indiano de Medicina para o tratamento de doenças imunodeficientes tais como artrite, diabetes e hepatite (MIRZA; CHI; CHI, 2013). Além destas, outras atividades biológicas têm sido relatadas para a mangiferina tais como antialérgica (MATKOWSKI et al., 2013; NÚÑEZ-SELLÉS; VILLA; RASTRELLI, 2015; RIVERA et al., 2006), antitumoral (RAJENDRAN et al., 2015; LI et al., 2016), antiviral (MASIBO; QIN, 2008), antioxidante (FERREIRA et al., 2013), antimicrobiana (MASIBO; QIN, 2009), imunomoduladora e radioprotetora (MASIBO; QIN, 2008; PRABHU et al., 2009; VYAS et al., 2012; MATKOWSKI et al., 2013; BENARD; CHI, 2015). Em modelos animais de alergias, a mangiferina reduz significativamente os níveis de IgE, as reações anafiláticas, as reações alérgicas cutâneas induzidas por histamina e inibe a proliferação de linfócitos (RIVERA et al., 2006). Segundo Guo e colaboradores (2014), a mangiferina pode exercer efeito antiasmático, pois reduz consideravelmente o número de células inflamatórias, a infiltração de eosinófilos, a produção de IgE e de prostaglandina D2. É capaz, ainda, de diminuir a produção de citocinas relacionadas à resposta de células Th2 e de aumentar as respostas relacionadas às células Th1, devido à inibição da via de sinalização de STAT-6 (GUO et al., 2014).

A aglicona da mangiferina é a molécula de noratiriol (1,3,6,7-tetrahidroxi-9H-xanten-9-ona) (Nrt) (Figura 8) obtida pela clivagem da ligação C-glicosídeo da mangiferina por ação de bactérias intestinais do gênero *Bacteroides* (SANUGUL et al., 2005). A transformação da mangiferina em noratiriol é seguida pela absorção do

noratiriol no cólon com consequente passagem para a circulação sanguínea (BOCK; MUNOZ-FURLON; SAMPSON, 2001), o que pode explicar as propriedades farmacológicas da mangiferina, administrada por via oral, e a maior concentração de noratiriol no plasma comparado à mangiferina.

O noratiriol inibe a liberação, *in vitro*, de mediadores produzidos por mastócitos peritoneais de ratos (WANG et al., 1994a) e suprime o extravasamento cutâneo de plasma, *in vivo*, causado por mediadores inflamatórios (WANG et al., 1994b). Além disso, inibe o câncer de pele causado por radiação UV (LI et al., 2012) e atua como potente radioprotetor sem nenhum efeito colateral conhecido (LEI et al., 2012).

Figura 8 – Estrutura química do noratiriol.



Fonte: Sanugul e colaboradores (2005).

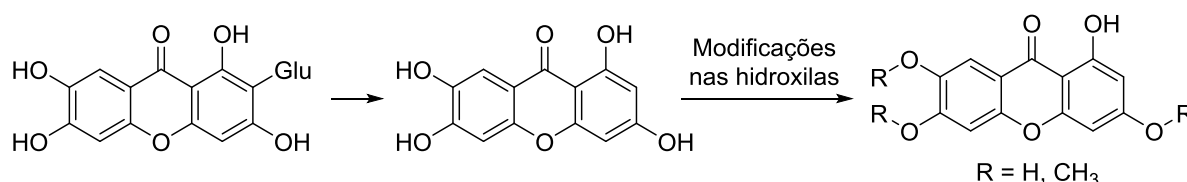
Apesar do conhecido potencial antialérgico da mangiferina (RODEIRO; DELGADO; GARRIDO, 2014; NÚÑEZ-SÉLLES; VILLA; RASTRELLI, 2015) assim como de seu derivado, o noratiriol, nada se sabe sobre a importância dos grupos substituintes no potencial farmacológico destas moléculas, o que justifica a síntese de novos compostos baseados na estrutura química da mangiferina, a fim de investigar perfis terapêuticos diversos.

Assim, foram realizadas a síntese do noratiriol e de compostos com modificações pontuais nas hidroxilas fenólicas como mostra o Esquema 1. É importante destacar, como já mencionado, que o noratiriol é formado no organismo a partir da clivagem da mangiferina, por ação de bactérias, e este estudo mostra a obtenção do noratiriol por meio de estratégias sintéticas que independem da ação de microrganismos.

A obtenção de novas moléculas baseadas no esqueleto xantônico da mangiferina permite explorar o potencial antialérgico, através do modelo biossensor

baseado em mastócitos (NAAL et al, 2003), e estabelecer uma relação da estrutura com a bioatividade.

Esquema 1 - Evolução de moléculas a serem investigadas quanto ao potencial antialérgico, baseada na estrutura química da mangiferina como modelo.



Fonte: Elaborada pelo autor.

### 1.5 Biodisponibilidade da mangiferina

A estrutura química da mangiferina, de acordo com a regra de Lipinski, atende aos quatro requisitos que favorecem alta biodisponibilidade oral, tais como massa molar menor que 500 g/mol, menos que 5 doadores de ligações de hidrogênio, menos que 10 aceptores de ligações de hidrogênio e logP calculado inferior a +5 (logP Mgf = +2,73) (NÚÑEZ-SELLÉS, 2005; VYAS et al., 2012). No entanto, a biodisponibilidade de uma substância depende da acessibilidade, solubilidade nos fluidos gastrointestinais, internalização celular, metabolismo, transporte através das membranas e eficiência na circulação (CARBONELL-CAPELLA et al., 2014; MCCLEMENTS; LI; XIAO, 2015).

Assim, apesar das características químicas estruturais da mangiferina serem favoráveis para um bom candidato a fármaco, a mesma é classificada, segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), como um composto pertencente à classe IV, ou seja, de baixa solubilidade e baixa permeabilidade na membrana (WANG et al., 2013; KHURANA et al., 2018), o que limita a sua entrega por via oral.

Muitos estudos relatam os problemas da administração oral da mangiferina. Segundo Wang e colaboradores (2013), a solubilidade aquosa do composto, em 37°C, é 0,16 mg/mL, com um coeficiente de partição óleo-água (logP) experimental, em tampão fosfato (pH 6,8), igual a 0,15 (WANG et al., 2013). Tais valores sugerem baixa solubilidade aquosa, pobre lipofilicidade e permeabilidade intestinal e, conseqüentemente, baixa biodisponibilidade (HAN et al., 2010). Em modelos animais, a biodisponibilidade oral da mangiferina foi avaliada pela administração de doses diferentes de solução do bioativo (25, 50 e 100 mg/Kg). A análise subsequente de amostras sanguíneas, em diferentes tempos (0 a 12 horas) após tratamento, mostrou que a sua biodisponibilidade absoluta foi menor que 1 %,

diminuindo da menor para a maior dose empregada. Em humanos, após 1 hora da administração de 0,9 g da mangiferina, foi encontrada a concentração plasmática máxima de, apenas,  $38,64 \pm 6,75$  ng/mL (HOU et al., 2012), considerada muito baixa frente à dose administrada. Além da baixa solubilidade, ressaltam-se, ainda, problemas decorrentes de oxidação química, ou fotodegradação, que podem contribuir para a redução da eficiência da mesma como um bioativo (ALEXOPOULOU et al., 2006).

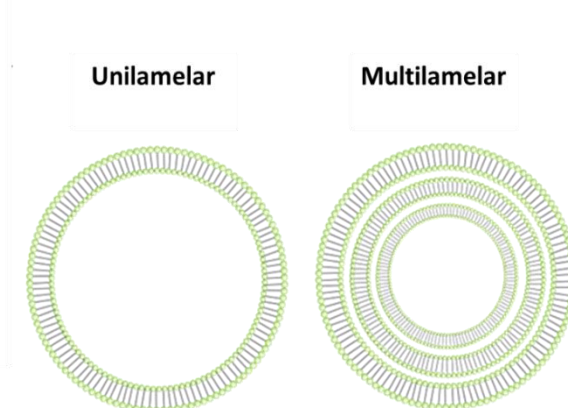
Como consequência, o uso clínico da mangiferina é, atualmente, limitado e evidencia a importância da incorporação em sistemas nanocarreadores, a fim de aumentar sua biodisponibilidade, estabilidade e, conseqüentemente, sua eficácia terapêutica (GORDON; ROEDIG-PENMAN, 1998; TARDI et al., 2000; NOBLE et al., 2009; YANG et al., 2009).

## 1.6 Lipossomos

### 1.6.1 Características dos lipossomos

Os lipossomos são vesículas que podem ser constituídas por uma ou mais bicamadas fosfolipídicas orientadas concentricamente em torno de um compartimento aquoso, sendo denominados de uni ou multilamelares dependendo do número de bicamadas como mostra a Figura 9 (PIERRI; GREMIÃO, 1999; BATISTA et al., 2007).

Figura 9 - Representação da organização estérica dos lipossomos compostos por uma única bicamada lipídica (unilamelar) ou várias bicamadas lipídicas concêntricas (multilamelar).



Fonte: Adaptado de Mirus Transfectopedia® (2018).

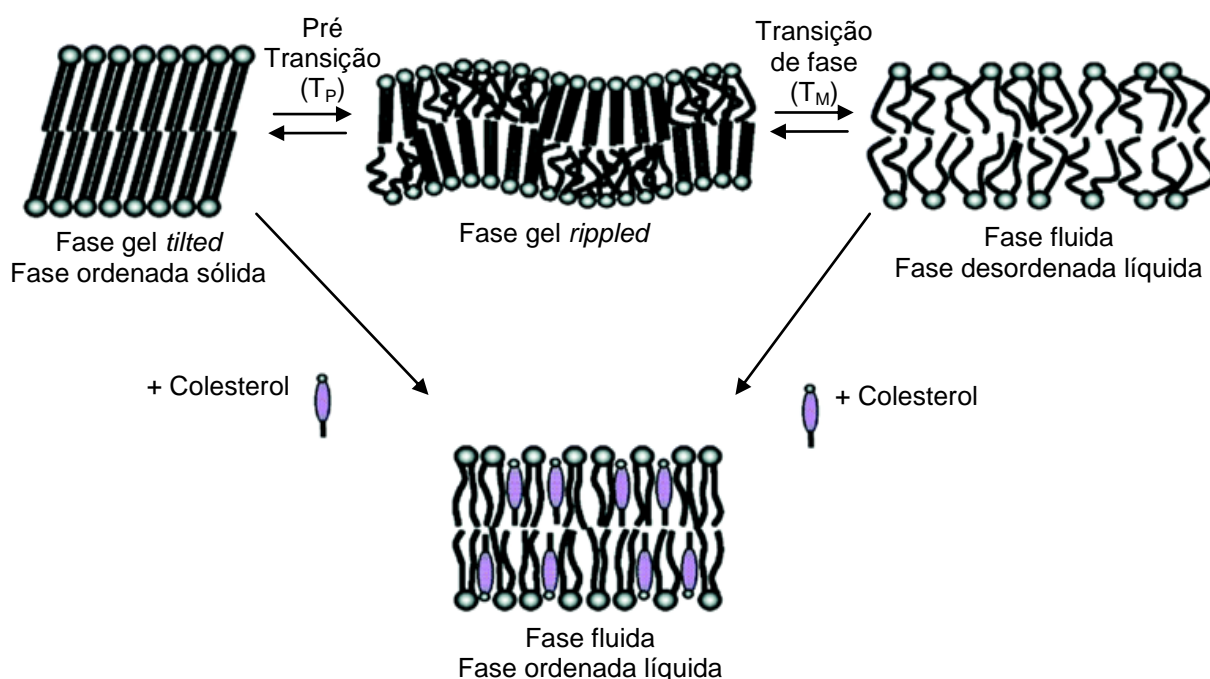
A composição básica dos lipossomos é de fosfolipídeos, com maior proporção de fosfatidilcolinas as quais são exemplos de lipídeos que se estabilizam em solução

aquosa em amplas faixas de pH e concentração iônica (KOYNOVA; CAFFREY, 1998).

Um dos critérios utilizados na caracterização dos fosfolípidos é a temperatura de transição de fases ( $T_M$ ) (Figura 10), que é a temperatura na qual ocorre a transição de um estado mais ordenado das cadeias hidrocarbônicas, chamado fase gel *tilted*, para um estado de maior movimentação das moléculas, chamado fase de cristal-líquido ou fluida. Uma fase intermediária entre esses dois estados é a chamada fase gel *rippled*, que tem a aparência de ondulações e é identificada por uma temperatura de pré-transição ( $T_P$ ) (Figura 10). Os tipos de lípidos que compõem as membranas alteram a fluidez da mesma e exercem influência significativa nos valores da  $T_M$ , sendo que abaixo deste valor a permeabilidade da camada lipídica é menor que aquela observada acima da  $T_M$ .

O colesterol é um componente lipídico importante nos lipossomos e sua presença leva ao aumento da rigidez das membranas no estado cristal-líquido, e à diminuição da rigidez no estado gel, de modo a deixar a membrana em estado de fluidez intermediária, eliminando a transição de fase, como mostra a Figura 10 (LASIC, 1998; FRÉZARD et al., 2005; BATISTA et al., 2007; HASAN, 2017).

Figura 10 - Diferentes fases de membranas lipídicas saturadas, hidratadas e contendo colesterol (*tilted* = inclinada; *rippled* = ondulada).



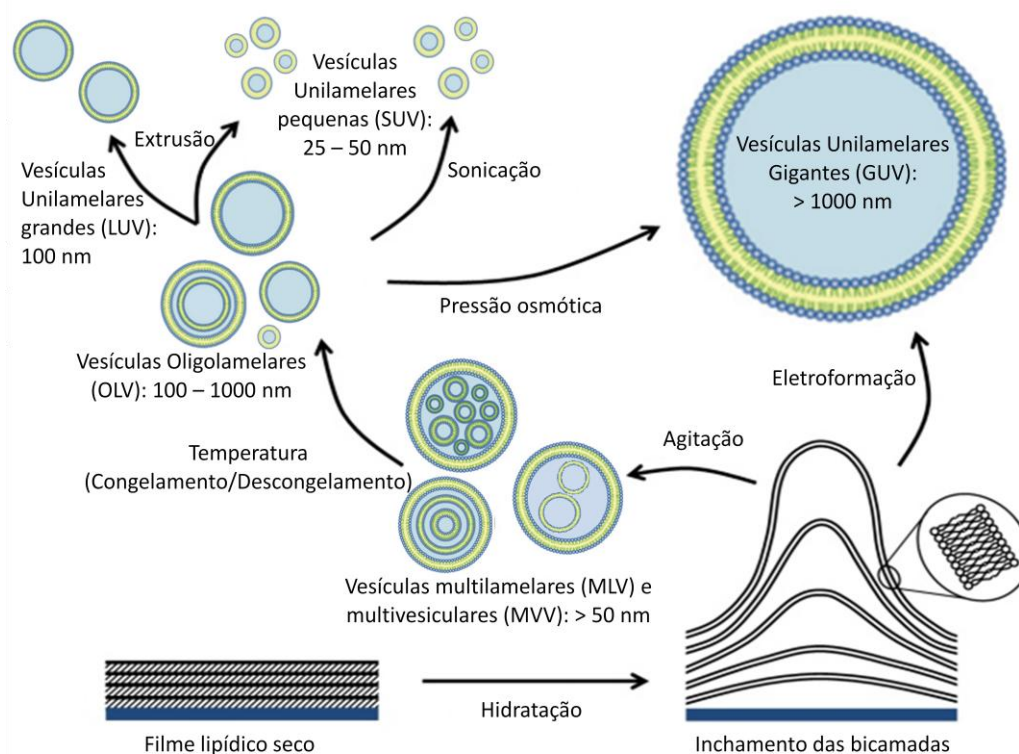
Fonte: Adaptado de Hasan (2017).



### 1.6.2 Métodos de preparo dos lipossomos

Os lipossomos podem ser preparados por diferentes metodologias (PIERRI; GREMIÃO, 1999). O método de hidratação do filme lipídico é o método mais comum que se baseia na dissolução dos lipídeos em solventes orgânicos, evaporação do solvente e obtenção do filme lipídico (BATISTA et al., 2007). A hidratação deste filme, feita em solução aquosa, sob agitação, leva à formação de lipossomos majoritariamente multilamelares, os quais são estruturas difíceis de serem estudadas em virtude do número de compartimentos internos e heterogeneidade. Assim, para a redução do número de bicamadas, eles podem ser submetidos, após a hidratação, a processos de sonicação, extrusão, congelamento-descongelamento, eletroformação e variação da pressão osmótica (Figura 11) (BATISTA et al., 2007). O processo de transformação dos lipossomos multilamelares em unilamelares é importante principalmente no caso de aplicações biológicas, uma vez que as partículas unilamelares menores são opsonizadas mais lentamente pelos macrófagos, permanecendo por mais tempo na circulação sanguínea e permitindo a liberação mais prolongada do bioativo (IMMORDINO; DOSIO; CATTEL, 2006).

Figura 11 - Obtenção de lipossomos uni ou multilamelares a partir da hidratação do filme lipídico seguida de processos mecânicos e eletrostáticos.



Fonte: Adaptado de Rani (2013), Vahed e colaboradores (2017) e Lélia (2018).

Vesículas unilamelares de menor tamanho, em relação às aquelas obtidas pelo filme lipídico, podem ser produzidas pelo método de injeção de etanol. Neste método, os lipídeos são dissolvidos em etanol e injetados, por meio de uma seringa de vidro ou bomba peristáltica, em uma solução aquosa aquecida sob agitação, seguida de evaporação do solvente (LASIC, 1993; SHARMA; SHARMA, 1997; PIERRI; GREMIÃO, 1999; BATISTA et al., 2007; TEJERA-GARCIA et al., 2011).

Com relação ao tamanho, as vesículas unilamelares, constituídas por uma única bicamada, podem ser pequenas (small unilamellar vesicles, SUV; 25 – 50 nm), grandes (large unilamellar vesicles, LUV; 100 nm) ou gigantes (giant unilamellar vesicles, GUV; > 1000 nm). Quando as vesículas apresentam mais que uma bicamada, elas podem ser classificadas como vesículas multilamelares (multilamellar large vesicles, MLV; > 50 nm), multivesiculares (multivesicular vesicles, MVV; > 50 nm) ou oligolamelares (oligolamellar vesicles, OLV; 100 – 1000 nm) (RANI, 2013).

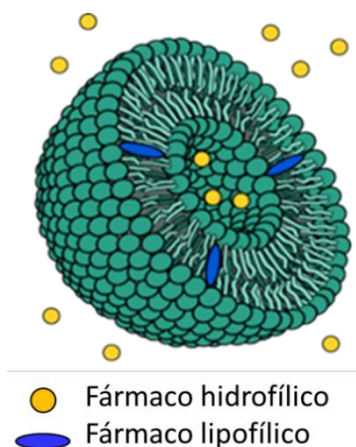
O tamanho das vesículas e o método escolhido deve ser adaptado para o tipo de fármaco a ser incorporado e os objetivos do estudo (TANDRUP SCHMIDT et al., 2016).

### **1.6.3 Lipossomos como nanocarreadores**

A formulação de lipossomos propicia a aplicação destes sistemas como nanocarreadores de substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas, em que as primeiras se localizam no compartimento aquoso e as lipofílicas se inserem ou adsorvem na membrana lipídica como mostra a Figura 12 (BATISTA et al., 2007; ALLEN e CULLIS, 2013; MONTEIRO et al., 2014).

Os lipossomos como nanocarreadores apresentam uma série de vantagens. Eles são formados por substâncias biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicas, altamente versáteis para a terapia clínica (BATISTA et al., 2007; HILLAIREAU e COUVREUR, 2009). Outras vantagens incluem semelhança com a membrana biológica, coalescência com as membranas celulares, proteção das substâncias encapsuladas da degradação enzimática e liberação gradual do fármaco encapsulado, aumentando o seu tempo de ação no organismo (LARIONOVA et al., 2008).

Figura 12 - Representação do lipossomo como nanocarreador de substâncias hidrofílicas ou lipofílicas inseridas, respectivamente, em regiões polares e apolares.



Fonte: Elaborada pelo autor

Vários parâmetros de uma formulação tais como composição lipídica, proporção bioativo/lipídeo, técnicas de preparo, meio tamponante, estrutura e propriedades físico-químicas do bioativo podem interferir na eficiência de encapsulação, na estabilidade dos lipossomos, na interação com a membrana plasmática e na liberação do bioativo. Portanto, a escolha de uma composição lipídica para carrear um bioativo não é uma tarefa fácil, e muito se tem para ser explorado, o que justifica a intensa pesquisa em nanotecnologia nos últimos anos (MOVILEANU; NEAGOE; FLONTA, 2000; LANDI-LIBRANDI et al., 2012; MIGNET et al., 2012; MIGNET; SEGUIN; CHABOT, 2013; KERDUDO et al., 2014; GARG, 2016; SOUKOULIS; BOHN, 2018).

Devido à sua versatilidade, o uso de lipossomos como carreadores de fármacos tem sido empregado em estudos relacionados a anestésicos (FRACETO e DE PAULA, 2006; ROGOBETE et al., 2015), anti-inflamatórios (MANCONI et al., 2009), antioxidantes (CHAUDHURI et al., 2007; KERDUDO et al., 2014; APOSTOLOVA; VICTOR, 2015), antivirais (KUMAR et al., 2015), antialérgicos (ELSAYED et al., 2007; LOPES; COELHO; OLIVERA, 2015) e anticânceres (XIAO et al., 2009; SEGUIN et al., 2013; PÉREZ-HERREO; FERNÁNDEZ-MEDARDE, 2015).

No caso específico dos polifenóis, grande parte dos estudos com lipossomos estão focados na atividade antioxidante (VAN DIJK; DRIESSEN, 2000; ALEXOPOULOU et al., 2006; PAWLIKOWSKA-PAWLEGA et al., 2007; KERDUDO et al., 2014) ou anticâncer (GONIOTAKI et al., 2004; MIGNET; SEGUIN, CHABOT, 2013; JEETAH; BHAW-LUXIMON; JHURRY, 2014; BENJAKUL ete al., 2015;

ESTANQUEIRO et al., 2015) e nenhum trabalho até o presente momento tem se dedicado à avaliação do potencial antialérgico, tampouco envolvendo xantonas tal como a mangiferina proposta para este estudo. Assim, a incorporação da mangiferina e derivados pode representar um avanço para a terapia clínica.

#### **1.6.4 Lipossomos como modelos de membranas biológicas**

O alvo para compostos bioativos encontra-se em diferentes localizações nas células do corpo humano. De forma geral, os bioativos atuam tanto em nível de diferentes membranas biológicas quanto dentro de compartimentos limitados por estas membranas (TARAHOVSKY et al., 2008; MARCZAK, 2009). Mesmo no último caso, o bioativo deve interagir com a membrana, e atravessá-la para atingir o alvo. Por este motivo, a hidrofobicidade de compostos biologicamente ativos é uma das características farmacológicas mais importantes, e sua interação com a membrana tem um papel crucial na atividade biológica (HENDRICH, 2006; GABRIELSKA et al., 2006; LONDOÑO-LONDOÑO et al., 2010).

Para os polifenóis, tem sido postulado que estes são hábeis em controlar os mecanismos de sinalização celular por meio de receptores na superfície celular, ou pela intercalação nas bicamadas lipídicas da membrana (TARAHOVSKY et al., 2008). Gamet-Payraastre e colaboradores (1999) revelaram que etapas de sinalização na membrana relacionadas com proteínas quinases, tais como fosfoinositídeo-3-quinase e proteína quinase C, são moduladas por polifenóis (GAMET-PAYRASTRE et al., 1999). Particularmente interessante para nossos estudos é o fato de que as propriedades antialérgicas dos polifenóis são atribuídas à sua capacidade para interferir na proteína FcεRI, localizada na membrana plasmática, e responsável pela ativação dos mastócitos em um processo alérgico (FUJIMURA et al. 2004; TARAHOVSKY et al., 2008; SANTOS et al., 2013 a,b).

No caso da mangiferina (e derivados), pouco se sabe sobre seu mecanismo de atuação em nível celular. Portanto, o conhecimento da localização da mangiferina na membrana biológica após administração e a sua interferência na fluidez da bicamada são fatores importantes para compreender o potencial biológico e relacionar a estrutura com a bioatividade. Assim, neste estudo utilizando os lipossomos como modelo de membrana biológica, tais respostas foram investigadas por meio das técnicas de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), anisotropia de fluorescência e Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE).

*Conclusões*

---

## 5. CONCLUSÕES

A síntese dos análogos da mangiferina pela rota sintética 02 foi mais eficiente comparado à rota sintética 01, uma vez que possibilitou a produção dos compostos **4** (1,3-dihidroxi-6,7-dimetoxi-9H-xanten-9-ona), **5** (noratiriol) e **6** (1-hidroxi-3,6,7-trimetoxi-9H-xanten-9-ona) por meio de critérios reacionais importantes, tais como número menor de etapas e maior rendimento global.

O noratiriol (**5**) mostrou maior potencial antialérgico em relação à mangiferina, sugerindo que a presença do anel glicosídico prejudica a interação com a membrana biológica e, conseqüentemente, diminui a bioatividade. A substituição dos grupos hidroxila do noratiriol por grupos metoxila nos compostos **4** e **6** diminuiu a solubilidade e o potencial antialérgico, sugerindo dificuldades de interação com os alvos celulares.

O potencial antialérgico da mangiferina e do noratiriol, livres ou incorporados nos lipossomos, aumentou com a concentração dos bioativos, ou seja, é dependente da concentração. No entanto, foi observada menor porcentagem de inibição da desgranulação mastocitária para os bioativos incorporados nos lipossomos. Concluiu-se que esse resultado é decorrente do tempo curto de exposição da formulação às células, que se limita a 60 minutos, para garantir a viabilidade celular. Porém, o fato de a formulação ter mantido o perfil de inibição dos bioativos reforça sua relevância, porque parte das moléculas estão mais solúveis e protegidas de degradação química, que faz diferença no potencial farmacológico final. Finalmente, ressalta-se que nem os lipossomos e nem os bioativos estimularam a desgranulação mastocitária, sugerindo que a formulação não apresenta propriedades alergênicas.

A formulação lipossomal **L4** (PC:PE:COL, 52:28:20; concentração lipídica total de 2,9 mmol/L; razão bioativo/lipídeo de 0,1; temperatura de hidratação de 75°C; pH fisiológico de 7,4) escolhida para carrear a mangiferina apresentou eficiência de encapsulação de 29 %, maior capacidade de carga (3,4 %) e estabilidade físico-química no período de 29 dias (tamanho de partícula ao redor de 100 nm, Pdl de 0,3 e potencial Zeta de 30 mV, em módulo), sendo recomendável para aplicações intravenosas. Além disso, a estabilidade da formulação foi mantida após a liofilização, sendo que o crioprotetor de trealose 10 % foi o mais apropriado.

A mangiferina interagiu com a membrana biológica aumentando a fluidez da fase gel e diminuindo a fluidez da fase líquido cristalina, em um papel similar ao do colesterol. Além disso, diminuiu a cooperatividade entre as cadeias lipídicas, que é um parâmetro claro de interação de moléculas com a membrana biológica. Estes resultados reforçam a bioatividade da mangiferina, cuja ação pode estar associada à interação com receptores localizados na superfície celular ou intercalados na membrana, que é um comportamento característico dos polifenóis.

Finalmente, podemos concluir que nossos objetivos foram alcançados, uma vez que nossos estudos contribuíram para o desenvolvimento de uma formulação estável que pode ser promissora para o tratamento de alergias, com boas perspectivas para novos estudos e para aplicações *in vivo*.

## *Referências Bibliográficas*

---



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Alergia. **Imunologia Celular e Molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, Cap. 20, p. 417-435, 2015.

AHMAD, I. et al. Recent insight into the biological activities of synthetic xanthone derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 116, p. 267-280, 2016.

AHN, S.; YUN, H.; HAN, Y. T. An Improved C-Deglycosylation of Mangiferin to Norathyriol. **Organic Preparations and Procedures International**, v. 50, n. 1, p. 91-94, 2018.

AKETANI, S. et al. Correlation between cytosolic calcium concentration and degranulation in RBL-2H3 cells in the presence of various concentrations of antigen-specific IgEs. **Immunology letters**, v. 75, n. 3, p. 185-189, 2001.

AKINBAMI, L. J.; SIMON, A. E.; SCHOENDORF, K. C. Trends in allergy prevalence among children aged 0–17 years by asthma status, United States, 2001–2013. **Journal of Asthma**, v. 53, n. 4, p. 356-362, 2016.

ALEXOPOULOU, E. et al. Preparation and characterization of lyophilized liposomes with incorporated quercetin. **Journal of Liposome Research**, v.16, p.17-25, 2006.

ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 36-48, 2013.

ALVES, R. C. et al. New trends in food allergens detection: Toward biosensing strategies. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 56, n. 14, p. 2304-2319, 2016.

ALVES, A. C. et al. Influence of doxorubicin on model cell membrane properties: insights from in vitro and in silico studies. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 6343, 2017.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166. Guia para validação de métodos analíticos. **Diário Oficial União**, 2017.

APOSTOLOVA, N.; VICTOR, V. M. Molecular strategies for targeting antioxidants to mitochondria: therapeutic implications. **Antioxidants & redox signaling**, v. 22, n. 8, p. 686-729, 2015.

ASHER, M. I. et al. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. **The Lancet**, v. 368, n.9537, p. 733-743, 2006.

ATTWOOD, D.; FLORENCE, A. T. Emulsões, suspensões e dispersões. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia**. 3 ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, Cap.7, p.345-411, 2003.

AURELL, M. J. et al. The Synthesis of 1, 8-Dihydroxy-2, 3, 4, 6-tetramethoxyxanthone and 1, 6-Dihydroxy-3, 5, 7, 8-tetramethoxy-xanthone, a Confirmation of Structure. **Journal of Natural Products**, v. 52, n. 4, p. 852-857, 1989.

AVANTI POLAR LIPIDS, INC., 2018. Disponível em: <<https://avantilipids.com/product/700100/>>. Acesso em 25 abr. 2018.

AXEL, F. S. Biophysics with nitroxyl radicals. **Biophysics of Structure and Mechanism**, v. 2, n. 3, p.181-218, 1976.

BABU, A. et al. Synthesis of ( $\pm$ )-Pisonivanone and Other Analogs as Potent Antituberculosis Agents. **Journal of Chemistry**, v. 2013, 2012.

BAKER, D. D.; ALVI, K. A. Small-molecule natural products: new structures, new activities. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, p.576-583, 2004.

BANERJEE, P.; BHUNIA, A. K. Cell-based biosensor for rapid screening of pathogens and toxins. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 1, p. 99-106, 2010.

BAROODY, F. M. Allergic rhinitis: Broader disease effects and implications for management. **Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, v. 128, n. 5, p. 616-631, 2003.

BARSUMIAN, E. L. et al. Ige-Induced Histamine-Release from Rat Basophilic Leukemia-Cell Lines - Isolation of Releasing and Non-Releasing Clones. **European Journal Immunology**, v. 11, p. 317-323, 1981.

BATISTA, C. M. et al. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, p.167-179, 2007.

BELLIK, Y. et al. Phytochemicals to prevent inflammation and allergy. **Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery**, v. 6, p. 147-158, 2012.

BELLIK, Y. et al. Molecular mechanism underlying anti-inflammatory and anti-allergic activities of phytochemicals: an update. **Molecules**, v. 18, p. 322-353, 2013.

BENARD, O. B.; CHI, Y. Medicinal Properties of Mangiferin, Structural Features, Derivative Synthesis, Pharmacokinetics and Biological Activities. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 582, 2015.

BENEDÉ, S. et al. The rise of food allergy: Environmental factors and emerging treatments. **EBioMedicine**, v. 7, p. 27-34, 2016.

BENJAKUL, R. et al. Cytotoxic effect and mechanism inducing cell death of  $\alpha$ -mangostin liposomes in various human carcinoma and normal cells. **Anti-cancer drugs**, v. 26, n. 8, p. 824-834, 2015.

BERGER, W. E. Overview of allergic rhinitis. **Annals of allergy, asthma & immunology**, v. 90, n. 6, p. 7-12, 2003.

BERRIDGE, M. J. Inositol triphosphate and calcium signaling. **Nature**, v. 361, p. 347-350, 1993.

BHATIA, V. K.; SESHADRI, T. R. Synthesis of mangiferin. **Tetrahedron letters**, v. 9, n. 14, p. 1741-1742, 1968.

BOCK, S. A.; MUNOZ-FURLON, A.; SAMPSON, H. A. Fatalities due to anaphylactic reactions to foods. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 107, p. 191-193, 2001.

BOLDI, A. M. Libraries from natural product-like scaffolds. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.8, p.281-286, 2004.

BOLEN, J. B. et al. Engagement of the high-affinity IgE receptor activates src protein-related tyrosine kinases. **Nature**, v. 355, n. 6355, p. 78, 1992.

BORENSTAIN, V.; BARENHOLZ, Y. Characterization of liposomes and other lipid assemblies by multiprobe fluorescence polarization. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 64, p. 117-127, 1993.

BRUM, T. F. **Metabólitos secundários, composição química e atividade antioxidante do óleo essencial e das folhas de *Vitex megapotamica* (sprengel) moldenke**. 2012. 103 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

BURKS, A. W. et al. Update on allergy immunotherapy: American academy of allergy, asthma & immunology/European academy of allergy and clinical immunology/PRACTALL consensus report. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, n. 5, p. 1288-1296. e3, 2013.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Natural Product Reports**, v. 25, p. 475-516, 2008.

CALDERON, M. A. et al. EAACI: A European Declaration on Immunotherapy. Designing the future of allergen specific immunotherapy. **Clinical and translational allergy**, v. 2, n. 1, p. 20, 2012.

CAMBIER, J. C. New nomenclature for the Reth motif (or ARH1/TAM/ARAM/YXXL). **Immunology today**, v. 16, n. 2, p. 110, 1995.

CAMPBELL, R. B. et al. Phospholipid-cationic lipid interactions: influences on membrane and vesicle properties. **BBA-Biomembranes**, v. 1512, p. 27-39, 2001.

CANDEIAS, L. P. et al. The catalysed NADH reduction of resazurin to resorufin. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, n. 11, p. 2333-2334, 1998.

CANUTO, K. M. Propriedades químicas e farmacológicas de mangiferina: um composto bioativo de manga (*Mangifera indica* L.). **Embrapa Semiárido-Documentos (INFOTECA-E)**, 2009.

CARBONELL-CAPELLA, J. M. et al. Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 2, p. 155-171, 2014.

CASALS, E. et al. Physical stability of liposomes bearing hemostatic activity. **Chemistry and physics of lipids**, v. 125, n. 2, p. 139-146, 2003.

CHAABAN, M.; COREY, J. P. Pharmacotherapy of rhinitis and rhinosinusitis. **Facial Plastic Surgery Clinics**, v. 20, n. 1, p. 61-71, 2012.

CHAUDHURI, S. et al. Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: Antioxidant and antihemolytic effects. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, p. 42-48, 2007.

CHAUHAN, B. et al. Combination therapeutic approach for asthma and allergic rhinitis. **Current clinical pharmacology**, v. 3, n. 3, p. 185-197, 2008.

CHAUHAN, R. et al. A novel electrochemical piezoelectric label free immunosensor for aflatoxin B1 detection in groundnut. **Food Control**, v. 52, p. 60-70, 2015.

CHEN, C. et al. An overview of liposome lyophilization and its future potential. **Journal of Controlled Release**, v. 142, n. 3, p. 299-311, 2010.

CLOGSTON, J. D.; PATRI, A. K. NCL method PCC-2: measuring zeta potential of nanoparticles. **Nanotechnology Characterization Laboratory, NCL**. Ed, 2009. Disponível em: <[https://ncl.cancer.gov/sites/default/files/protocols/NCL\\_Method\\_PCC-2.pdf](https://ncl.cancer.gov/sites/default/files/protocols/NCL_Method_PCC-2.pdf)>. Acesso em: 08 maio 2018.

CORRÊA, R. S. et al. Host-guest interactions between xanthenes and water: the role of O-H... O, C-H... O, and  $\pi$ ...  $\pi$  contacts in the channel-and cage-type frameworks. **Structural Chemistry**, v. 23, n. 6, p. 1809-1818, 2012.

CRAGG, G. M. et al. New Horizons for Old Drugs and Drug Leads. **Journal of Natural Products**, v. 77, p. 703-723, 2014.

CROWE, J. H. et al. Stabilization of dry membranes by mixtures of hydroxyethyl starch and glucose: the role of vitrification. **Cryobiology**, v. 35, n. 1, p. 20-30, 1997.

CURTIS, T. et al. Development of a mast cell-based biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, n. 7, p. 1024-1031, 2008.

DAI, M. et al. Synthesis and biological evaluation of phenyl substituted polyoxygenated xanthone derivatives as anti-hepatoma agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 69, p. 159-166, 2013.

DEMO, S. D. et al. Quantitative measurement of mast cell degranulation using a novel flow cytometric annexin-V binding assay. **Cytometry**, v. 36, n. 4, p. 340-348, 1999.

DIAMANT, Z. et al. Biomarkers in asthma and allergic rhinitis. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**, v. 23, n. 6, p. 468-481, 2010.

EL-SAMALIGY, M. S.; AFIFI, N. N.; MAHMOUD, E. A. Increasing bioavailability of silymarin using a buccal liposomal delivery system: preparation and experimental design investigation. **International journal of pharmaceutics**, v. 308, n. 1-2, p. 140-148, 2006.

ELSAYED, M. M. A. et al. Deformable liposomes and ethosomes as carriers for skin delivery of ketotifen. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 62, n. 2, p. 133-137, 2007.

ENDERS, O. et al. Structural calorimetry of main transition of supported DMPC bilayers by temperature-controlled AFM. **Biophysical journal**, v. 87, n. 4, p. 2522-2531, 2004.

ESTANQUEIRO, M. et al. Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: the state of the art. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v. 126, p. 631-648, 2015.

FANG, R. et al. Effect of Controlled Ice Nucleation on Stability of Lactate Dehydrogenase During Freeze-Drying. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 107, n. 3, p. 824-830, 2018.

FATTAL, E. et al. Ampicillin-loaded liposomes and nanoparticles: comparison of drug loading, drug release and in vitro antimicrobial activity. **Journal of microencapsulation**, v. 8, n. 1, p. 29-36, 1991.

FERREIRA, F. R. et al. Antioxidant activity of the mangiferin inclusion complex with  $\beta$ -cyclodextrin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, p. 129, 2013.

FINNEGAN, R. A. et al. Occurrence of mangiferin in *Hiptage madablota* geartn. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 57, p. 1039-1040, 1968.

FISCHER, M. J. E.; DE MOL, N. J. Mechanism of action of the nonlipophilic antiallergic drug eclazolast (REV 2871) in the inhibition of mediator release in a mast cell model. **Inflammation Research**, v. 48, n. 11, p. 569-574, 1999.

FORRESTER, A. R.; THOMSON, R. H. Stable nitroxide radicals. **Nature**, v. 203, n. 4940, p. 74-75, 1964.

FRACETO, L. F.; DE PAULA, E. Interação de anestésicos locais com lipossomos determinada por espectroscopia de infravermelho. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 27, p. 27-35, 2006.

FRÉZARD, F. et al. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 511-518, 2005.

FRITSCHER, C. C.; SOLÉ, D.; ROSÁRIO, N. III Consenso Brasileiro no manejo da asma. **Journal of Pneumology**, v. 28, n. Supl 1, p. S4-S28, 2002.

FUJIMURA, Y. et al. Lipid raft-association catechin supresses the FcepsilonRI expression by inhibiting phosphorylation of the extracelular signal-regulated kinase 1/2. **FEBS Letters**, v. 556, p. 204-210, 2004.

GABRIELSKA, J. et al. Antioxidative effect of quercetin and its equimolar mixtures with phenyltin compounds on liposome membranes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 7735-7746, 2006.

GALLI, S. J. et al. The development of allergic inflammation. **Nature**, v. 454, p. 445-4554, 2008.

GALLI, S. J.; TSAI, M. Mast cells in allergy and infection: versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity. **European journal of immunology**, v. 40, n. 7, p. 1843-1851, 2010.

GAMET-PAYRASTRE, L. et al. Flavonoids and the inhibition of PKC and PI3-kinase. **General Pharmacology**, v. 32, p. 279-286, 1999.

GARCIA-RIVERA, D. et al. Gallic acid indanone and mangiferin xanthone are strong determinats of immunosuppressive anti-tumour effects of *Mangifera indica* L. bark in MDA-MB231 breast cancer cells. **Cancer Letters**, v. 305, p. 21-31, 2011.

GARG, T. Current nanotechnological approaches for an effective delivery of bio-active drug molecules in the treatment of acne. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 98-105, 2016.

GÓMEZ-ZALETA, B. et al. UV/vis, <sup>1</sup>H, and <sup>13</sup>C NMR spectroscopic studies to determine mangiferin pKa values. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 64, n. 4, p. 1002-1009, 2006.

GONÇALVES, A. P. S.; LIMA, R. A. Identificação das classes de metabólitos secundários do extrato etanólico de *Piper tuberculatum* JACQ. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 3, n. 2, 2016.

GONIOTAKI, M. et al. Encapsulation of naturally occurring flavonoids into liposomes: physicochemical properties and biological activity against human cancer cell lines. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, p. 1217-1224, 2004.

GORDON, M. H.; ROEDIG-PENMAN, A. Antioxidant activity of quercetin and myricetin in liposomes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 97, n. 1, p. 79-85, 1998.

GRANBERG, M.; FOWLER, C. J.; JACOBSSON, S. O. P. Effects of the cannabimimetic fatty acid derivatives 2-arachidonoylglycerol, anandamide, palmitoylethanolamide and methanandamide upon IgE-dependent antigen-induced beta-hexosaminidase, serotonin and TNF alpha release from rat RBL-2H3 basophilic leukaemia cells. **Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology**, v. 364, p. 66-73, 2001.

GREENHAWT, M. Food allergy quality of life and living with food allergy. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v.16, n. 3, p. 284-290, 2016.

GUO, H. W. et al. Mangiferin attenuates TH1/TH2 cytokine imbalance in an ovalbumin-induced asthmatic mouse model. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e100394, 2014.

HAAHTELA, T. et al. The biodiversity hypothesis and allergic disease: world allergy organization position statement. **World Allergy Organization Journal**, v. 6, p. 1-18, 2013.

HAN, D. et al. Determination of mangiferin in rat plasma by liquid-liquid extraction with UPLC-MS/MS. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 51, n. 1, p. 260-263, 2010.

HAN, S. H. et al. Synthesis of Succinimide-Containing Chromones, Naphthoquinones, and Xanthenes under Rh (III) Catalysis: Evaluation of Anticancer Activity. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 81, p. 12416-12425, 2016.

HANCI, D. et al. Immunotherapy in all aspects. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 273, n. 6, p. 1347-1355, 2016.

HASAN, I. Y.; MECHLER, A. Analytical approaches to study domain formation in biomimetic membranes. **Analyst**, v. 142, n. 17, p. 3062-3078, 2017.

HASANOVIC, A. et al. Improvement in physicochemical parameters of DPPC liposomes and increase in skin permeation of aciclovir and minoxidil by the addition of cationic polymers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, p. 148-153, 2010.

HENDRICH, A. B. Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 27, p. 27-40, 2006.

HILLAIREAU, H.; COUVREUR, P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, p. 2873-2896, 2009.

HIRANO, T. et al. Luteolin, a flavonoid, inhibits AP-1 activation by basophils. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 340, n. 1, p. 1-7, 2006.

HOLGATE, S. T.; POLOSA, R. Treatment strategies for allergy and asthma. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 3, p. 218, 2008.

HOLLOWKA, D.; BAIRD, B. Antigen-mediated IgE receptor aggregation and signaling: A window on cell surface structure and dynamics. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 25, p. 79-112, 1996.

HOLLOWKA, D.; SHEETS, E. D.; BAIRD, B. Interactions between Fc (epsilon) RI and lipid raft components are regulated by the actin cytoskeleton. **Journal of Cell Science**, v. 113, n. 6, p. 1009-1019, 2000.

HOU, S. et al. Pharmacokinetic study of mangiferin in human plasma after oral administration. **Food chemistry**, v. 132, n. 1, p. 289-294, 2012.

HUA, Z. Z. et al. Freeze-drying of liposomes with cryoprotectants and its effect on retention rate of encapsulated ftorafur and vitamin A. **Drying Technology**, v. 21, n. 8, p. 1491-1505, 2003.

HUANG, J. et al. The inhibitory effect of piperine from Fructus piperis extract on the degranulation of RBL-2H3 cells. **Fitoterapia**, v. 99, p. 218-226, 2014.

IBIAPINA, C. C. et al. Rinite alérgica: aspectos epidemiológicos, diagnósticos e terapêuticos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, n. 4, p. 230-240, 2008.

ILLINGER, D. et al. A comparison of the fluorescence properties of TMA-DPH as a probe for plasma membrane and for endocytic membrane. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1239, n. 1, p. 58-66, 1995.

IMMORDINO, M. L.; DOSIO, F.; CATTEL, L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. **International journal of nanomedicine**, v. 1, n. 3, p. 297, 2006.

ISERSKY, C. et al. The fate of IgE bound to rat basophilic leukemia cells. **The Journal of Immunology**, v. 122, n. 5, p. 1926-1936, 1979.

JACHAK, S. M.; SAKLANI, A. Challenges and opportunities in drug discovery from plants. **Current Science**, v. 93, p.121-1257, 2007.

JEETAH, R.; BHAW-LUXIMON, A.; JHURRY, D. Nanopharmaceutics: phytochemical-based controlled or sustained drug-delivery systems for cancer treatment. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 10, n. 9, p. 1810-1840, 2014.

JIANG, H. et al. A novel mast cell co-culture microfluidic chip for the electrochemical evaluation of food allergen. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 83, p. 126-133, 2016.

JOBIN, M. L. et al. The enhanced membrane interaction and perturbation of a cell penetrating peptide in the presence of anionic lipids: toward an understanding of its selectivity for cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1828, n. 6, p. 1457-1470, 2013.

JONES, W. D. et al. Antiallergic Agents. Xanthone-2,7-dicarboxylic Acid Derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 594-595, 1977.

JUCKMETA, T.; THONGDEEYING, P.; ITHARAT, A. Inhibitory Effect on  $\beta$ -Hexosaminidase Release from RBL-2H3 Cells of Extracts and Some Pure Constituents of Benchalokawichian, a Thai Herbal Remedy, Used for Allergy Disorders. Hindawi Publishing Corporation. In. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, Article ID 828760, 8 pgs., 2014.



KAISER, R. D.; LONDON, E. Location of diphenylhexatriene (DPH) and its derivatives within membranes: comparison of different fluorescence quenching analyses of membrane depth. **Biochemistry**, v. 37, n. 22, p. 8180-8190, 1998.

KANEHISA, M.; TSONG, T. Y. Cluster model of lipid phase transitions with application to passive permeation of molecules and structure relaxations in lipid bilayers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 100, n. 2, p. 424-432, 1978.

KEEGAN, A. D.; PAUL, W. E. Multichain immune recognition receptors: similarities in structure and signaling pathways. **Immunology today**, v. 13, n. 2, p. 63-68, 1992.

KERDUDO, A. et al. Encapsulation of rutin and naringenin in multilamellar vesicles for optimum antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 159, p. 12-19, 2014.

KHAN, A.; GILANI, A. Natural products useful in respiratory disorders: focus on side effect neutralizing combinations. **Phytotherapy Research**, v. 29, p. 1265-1285, 2015.

KHURANA, R. K. et al. Improving the biopharmaceutical attributes of mangiferin using vitamin E-TPGS co-loaded self-assembled phospholipidic nano-mixed micellar systems. **Drug delivery and translational research**, v. 8, n. 3, p. 617-632, 2018.

KINET, J. P. The essential role of mast cells in orchestrating inflammation. **Immunological reviews**, v. 217, n. 1, p. 5-7, 2007.

KINGSTON, D. G. I.; NEWMAN, D. J. Mother nature's combinatorial libraries; their influence on the synthesis of drugs. **Current Opinion in Drug Discovery & Development**, v. 5, p. 304-316, 2002.

KOUKOULITSA, C. et al. Comparison of thermal effects of stilbenoid analogs in lipid bilayers using differential scanning calorimetry and molecular dynamics: correlation of thermal effects and topographical position with antioxidant activity. **European Biophysics Journal**, v. 40, n. 7, p. 865-875, 2011.

KOVAROVA, M.; RIVERA, J. A molecular understanding of mast cell activation and the promise of anti-allergic therapeutics. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 2083-2091, 2004.

KOYNOVA, R.; CAFFREY, M. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes**, v. 1376, n. 1, p. 91-145, 1998.

KOZAK, M. et al. Structural and spectroscopic studies of DMPC/cationic surfactant system. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 356, n. 11-17, p. 747-753, 2010.

KUHAKARN, C. et al. Friedel-Crafts-Type Alkylation with Bromodifluoro (phenylsulfanyl) methane through  $\alpha$ -Fluorocarocations: Syntheses of Thioesters, Benzophenones and Xanthenes. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2011, n. 29, p. 5911-5918, 2011.

KUMAR, L. et al. Nanotechnology: a magic bullet for HIV AIDS treatment. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 43, n. 2, p. 71-86, 2015.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**, 3. ed. Baltimore: Springer, 2006.

LANDI-LIBRANDI, A. P. et al, Inhibitory activity of liposomal flavonoids during oxidative metabolism of human neutrophils upon stimulation with immune complexes and phorbol ester. **Drug Delivery**, v. 19, n. 4, p. 177-187, 2012.

LARCHÉ, M.; AKDIS, C. A.; VALENTA, R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 10, p. 761, 2006.

LARIONOVA, N. I. et al. Development of micro- and nanosystems for drug delivery. **Russian Journal of General Chemistry**, v. 78 p. 2220-2229, 2008.

LARSEN, J. N.; BROGE, L.; JACOBI, H. Allergy immunotherapy: the future of allergy treatment. **Drug discovery today**, v. 21, n. 1, p. 26-37, 2016.

LASIC, D. D. **Liposomes: from physics to applications**. 1<sup>a</sup> ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V., cap.3, p.63-90, 1993.

LASIC, D. D. Novel applications of liposomes. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n.7, p. 307-321, 1998.

LEI, J. et al. Mangiferin aglycone attenuates radiation-induced damage on human intestinal epithelial cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 113, p. 2633-2642, 2012.

LÉLIA, P. Membrane Molecular Mechanisms: Création de GUV. Disponível em: <<http://www.lps.ens.fr/M3/author/gh107/>>. Acesso em: 04 maio 2018.

LENTZ, B. R. Membrane “fluidity” as detected by diphenylhexatriene probes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 50, n. 3-4, p. 171-190, 1989.

LEWIS, R. N. A. H.; MCELHANEY, R. N. The mesomorphic phase behavior of lipid bilayers. In: YEAGLE, P. L. **The Structure of Biological Membranes**. Boca Raton: CRC Press, p. 53-120, 1992.

LEWIS, R. S. The molecular choreography of a store-operated calcium channel. **Nature**, v. 446, p. 284287, 2007.

LI, J. et al. Norathyriol Suppresses Skin Cancers Induced by Solar Ultraviolet Radiation by Targeting ERK Kinases. **Cancer Research**, v. 72, p. 260-270, 2012.

LI, M. L. et al. Mangiferin inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human prostate cancer cells is correlated with downregulation of B-cell lymphoma-2 and upregulation of microRNA-182. **Oncology Letters**, v. 11, p. 817-822, 2016.

LIN, S. et al. The FcεRIβ subunit functions as an amplifier of FcεRIγ-mediated cell activation signals. **Cell**, v. 85, n. 7, p. 985-995, 1996.

LIPOID GMBH. Disponível em: <<http://www.lipoid.com/en/phospholipids>>. Acesso em: 25 abr. 2018.

LIU, C. et al. Molecular regulation of mast cell development and maturation. **Molecular Biology Reports**, v. 37, p.1993-2001, 2010.

LIU, C. et al. Synthesis and anticancer potential of novel xanthone derivatives with 3,6-substituted chains. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, p. 4263-4271, 2016.

LIU, J. et al. Incorporation of nitric oxide donor into 1, 3-dioxyxanthenes leads to synergistic anticancer activity. **European journal of medicinal chemistry**, v. 151, p. 158-172, 2018.

LONDOÑO-LONDOÑO, J. et al. Hesperidin and hesperetin membrane interaction: Understanding the role of 7-O-glycoside moiety in flavonoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 499, p. 6-16, 2010.

LOPES, C. M.; COELHO, P. B.; OLIVEIRA, R. Novel delivery systems for anti-allergic agents: allergic disease and innovative treatments. **Current drug delivery**, v. 12, n. 4, p. 382-396, 2015.

LS INSTRUMENTS, 2018. Disponível em: <[https://www.lsinstruments.ch/technology/dynamic\\_light\\_scattering\\_dls/](https://www.lsinstruments.ch/technology/dynamic_light_scattering_dls/)>. Acesso em: 07 maio 2018.

LUNDEQUIST, A.; PEIJLER, G. Biological implications of preformed mast cell mediators. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, p. 965-975, 2011.

MANCONI, M. et al. Development and characterization of liposomes containing glycols as carriers for diclofenac. **Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 342, p. 53-58, 2009.

MARCZAK, A. Fluorescence anisotropy of membrane fluidity probes in human erythrocytes incubated with anthracyclines and glutaraldehyde. **Bioelectrochemistry**, v. 74, p. 236-239, 2009.

MARSH, D.; WATTS, A.; KNOWLES, P. F. Cooperativity of the phase transition in single- and multibilayer lipid vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 465, p. 500-514, 1977.

MARSH, D. **Electron spin resonance**: spin labels. In: GRELL, E. Membrane spectroscopy. New York: Springer-Verlag, p. 51-142, 1981.

MASIBO, M.; QIN, H. Major mango polyphenols and their potential significance to human health. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 7, p. 309-319, 2008.

MASIBO, M.; QIN, H. In vitro antimicrobial activity and the major polyphenol in leaf extract of *Mangifera indica* L. **Malaysian Journal Microbiology**, v. 5, p. 73-80, 2009.

MASUDA, E. S.; SCHMITZ, J. Syk inhibitors as treatment for allergic rhinitis. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**, v. 21, n. 3, p. 461-467, 2008.

MATKOWSKI, A. et al. Mangiferina-A bioactive xanthonoid, not only from Mango and not just as antioxidant. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 439, 2013.

MAXFIELD, F. R.; TABAS, I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. **Nature**, v. 438, n. 7068, p. 612, 2005.

MCCLEMENTS, D. J.; LI, F.; XIAO, H. The nutraceutical bioavailability classification scheme: classifying nutraceuticals according to factors limiting their oral bioavailability. **Annual review of food science and technology**, v. 6, p. 299-327, 2015.

MCCORMACK, T. K. et al. **Biomaterial of Biosensors**. In: Diamond, D. (Ed.), Principles of Chemical and Biological Sensors. Wiley, New York, NY, 178-183, 1998.

MEDICINA NET. Disponível em: <[https://www.medicinanet.com.br/m/conteudos/acp-medicine/6364/alergias\\_farmacologicas.htm](https://www.medicinanet.com.br/m/conteudos/acp-medicine/6364/alergias_farmacologicas.htm)>. Acesso em: 26 abr. 2018.

MEHTA, A. B. et al. Topical corticosteroids in dermatology. **Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology**, v. 82, n. 4, p. 371, 2016.

MELTZER, E. O. The role of nasal corticosteroids in the treatment of rhinitis. **Immunology and Allergy Clinics**, v. 31, n. 3, p. 545-560, 2011.

MELTZER, E. O. Pharmacotherapeutic strategies for allergic rhinitis: matching treatment to symptoms, disease progression, and associated conditions. In: **Allergy and asthma proceedings**. OceanSide Publications, Inc, v. 34, p. 301-311, 2013.

MELVIN, T. A.; PATEL, A. A. Pharmacotherapy for allergic rhinitis. **Otolaryngologic Clinics of North America**, v. 44, n. 3, p. 727-39, x, 2011.

MERCK, 2018. Disponível em: [http://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Amicon-Ultra-0.5nbspmL-Centrifugal-Filters-for-DNA-and-Protein-Purification-and-Concentration,MM\\_NF-C82301?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com.br%2F&bd=1](http://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Amicon-Ultra-0.5nbspmL-Centrifugal-Filters-for-DNA-and-Protein-Purification-and-Concentration,MM_NF-C82301?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com.br%2F&bd=1)>. Acesso em: 02 maio 2018.

METZ, M.; SIEBENHAAR, F.; MAURER, M. Mast cell functions in the innate skin immune system. **Immunobiology**, v. 213, n. 3-4, p. 251-260, 2008.

MIGNET, N. et al. Development of a liposomal formulation of the natural flavonoid fisetin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, n. 1, p. 60-76, 2012.

MIGNET, N.; SEGUIN, J.; CHABOT, G. Bioavailability of Polyphenol Liposomes: A Challenge Ahead. **Pharmaceutics**, v.5, n. 3, p.457-471, 2013.

MINAI-FLEMING, Y.; LEVI-SCHAFFER, F. Mast cells and eosinophils: the two key effector cells in allergic inflammation. **Inflammation Research**, v. 58, p. 631-638, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS), 2015. Disponível em: <<http://www.blog.saude.gov.br/index.php/35040-asma-atinge-6-4-milhoes-de-brasileiros>>. Acesso em: 06 fev. 2018.

MIRUS TRANSFECTOPEDIA®, Methods, 2018. Disponível em: <<https://www.mirusbio.com/transfectopedia/methods>>. Acesso em: 21 jun. 2018.

MIRZA, R. H.; CHI, N.; CHI, Y. Therapeutic Potential of the Natural Product Mangiferin in Metabolic Syndrome. **Journal of Nutritional Therapeutics**, v. 2, n. 2, p. 74-79, 2013.

MONTEIRO, N. et al. Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 11, n. 101, p. 20140459, 2014.

MOON, T. C.; BEFUS, A. D.; KULKA, M. Mast cell mediators: their differential release and the secretory pathways involved. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 569, 2014.

MOVILEANU, L.; NEAGOE, I.; FLONTA, M. L. Interaction of the antioxidant flavonoid quercetin with planar lipid bilayers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 205, n. 1-2, p. 135-146. 2000.

MYKYTCZUK, N. C. S. et al. Fluorescence polarization in studies of bacterial cytoplasmic membrane fluidity under environmental stress. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, v. 95, p. 60-82, 2007.

NAAL, R. M. Z. G. et al. Antigen-Stimulated Trafficking from the Recycling Compartment to the Plasma Membrane in RBL Mast Cells. **Traffic**, v. 4, n. 3, p. 190-200, 2003.

NAAL, R. M. Z. G. et al. In situ measurement of degranulation as a biosensor based on RBL-2H3 mast cells. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, p. 791-796, 2004.

NADLER, M. J. S. et al. Signal transduction by the high-affinity immunoglobulin E receptor FcRI: Coupling form to function. **Advances in Immunology**, v. 76, p. 325-355, 2000.

NAKAGAWA, A. et al. Structure of cervinomycin, a novel xantone antibiotic active against anaerobe and mycoplasma. **The Journal of antibiotics**, v. 40, n. 3, p. 301-308, 1987.

NEGI, J. S. et al. Naturally Occurring Xanthenes: Chemistry and Biology. **Journal of Applied Chemistry**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

NELSON, H. S. et al. Treatment of anaphylactic sensitivity to peanuts by immunotherapy with injections of aqueous peanut extract. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 99, n. 6, p. 744-751, 1997.

NELSON, S. C. et al. Fluorescence anisotropy of diphenylhexatriene and its cationic trimethylamino derivative in liquid dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes: opposing responses to isoflurane. **BMC biophysics**, v. 5, n. 1, p. 5, 2012.

NEVES, A. R. et al. Effects of resveratrol on the structure and fluidity of lipid bilayers: A membrane biophysical study. **Soft Matter**, v. 12, n. 7, p. 2118-2126, 2016.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311-335, 2012.

NISHIOKA, H.; NAGASAWA, M.; YOSHIDA, K. Regioselective Dealkylation of 2-Alkoxybenzoic Acid and Its Amide Derivatives with Aliphatic Amines. **Synthesis**, v. 2000, n. 02, p. 243-246, 2000.

NOBLE, C. O. et al. Characterization of highly stable liposomal and immunoliposomal formulations of vincristine and vinblastine. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 64, p. 741-751, 2009.

NÚÑEZ-SELLÉS, A. J. et al., Isolation and quantitative analysis of phenolic antioxidants, free sugars, and polyols from mango (*Mangifera indica* L.) stem bark aqueous decoction used in Cuba as a nutritional supplement. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 762–766, 2002.

NÚÑEZ-SELLÉS, A. J. Antioxidant therapy: myth or reality?. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 4, p. 699-710, 2005.

NÚÑEZ-SELLÉS, A. J.; VILLA, D. G.; RASTRELLI, L. Mango Polyphenols and Its Protective Effects on Diseases Associated to Oxidative Stress. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 16, p. 272-280, 2015.

OHTAKE, S. et al. Effect of sugar–phosphate mixtures on the stability of DPPC membranes in dehydrated systems. **Cryobiology**, v. 48, n. 1, p. 81-89, 2004.

PAGE, D. L.; PIZZICONI, V. B. A cell-based immunobiosensor with engineered molecular recognition-Part II: Enzyme amplification systems. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 12, p. 457-466, 1997.

PANCRAZIO, J. J. et al. Development and application of cell-based biosensors. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 27, p. 697-711, 1999.

PANERARI, J.; GALENDE, S. B. Corticosteroides utilizados no tratamento da asma brônquica. **Revista UNINGÁ Review**, v. 24, n. 1, 2018.

PAOLINI, R.; JOUVIN, M. H.; KINET, J. P. Phosphorylation and dephosphorylation of the high-affinity receptor for immunoglobulin E immediately after receptor engagement and disengagement. **Nature**, v. 353, n. 6347, p. 855, 1991.

PAPADOPOULOS, N. G. et al. Research needs in allergy: an EAACI position paper, in collaboration with EFA. **Clinical and translational allergy**, v. 2, n. 1, p. 21, 2012.

PARDO-ABREU, L. G. L. et al., Vimang (*Mangifera indica* L. extracts) induces permeability transition in isolated mitochondria closely reproducing the effect of mangiferin, Vimang's main component. **Chemico-Biological Interactions**, v. 159, p. 141-148, 2006.

PAWANKAR, R. et al. World Allergy Organization (WAO) white book on allergy. **Wisconsin: World Allergy Organization**, 2011.

PAWLIKOWSKA-PAWLEGA, B. et al. Modification of membranes by quercetin, a naturally occurring flavonoid, via its incorporation in the polar head group. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1768, p. 2195-2204, 2007.

PERES, V. et al. Tetraoxygenated naturally occurring xanthenes. **Phytochemistry**, v. 55, p. 683-710, 2000.

PÉREZ-HERRERO, E.; FERNÁNDEZ-MEDARDE, A. Advanced targeted therapies in cancer: drug nanocarriers, the future of chemotherapy. **European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics**, v. 93, p. 52-79, 2015.

PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. F. **Purification of Laboratory Chemicals**. 3<sup>rd</sup> ed. Oxford; New York: Pergamon Press, 1988.

PFISTER, J. R.; FERRARESI, I. T.; ROOKS, W. H. Xanthone-2-carboxylic acids, a new series of antiallergic substances. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 1032-1035, 1972.

PIERRI, E. G.; GREMIÃO, M. P. D. MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE LIPOSSOMAS. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 11, n. 9/10, p. 60-66, 1999.

PILLAI, R. K. M. et al. Thermorubin II. 1, 3-Dihydroxy-9H-xanthenes and 1, 3-dihydroxy-9H-xanthenes. New methods of synthesis. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 51, n. 5, p. 717-723, 1986.

PINHEIRO, M. et al. Evaluation of the effect of rifampicin on the biophysical properties of the membranes: significance for therapeutic and side effects. **International journal of pharmaceuticals**, v. 466, n. 1-2, p. 190-197, 2014.

PINTO, M. M. M.; SOUSA, M. E.; NASCIMENTO, M. S. J. Xanthone Derivatives: New Insights in Biological Activities. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 2517-2538, 2005.

PO, H. N.; SENOZAN, N. M. The Henderson-Hasselbalch equation: its history and limitations. **Journal of Chemical Education**, v. 78, n. 11, p. 1499, 2001.

PRABHU, S. et al. Mechanism of Protective Action of Mangiferin on Suppression of Inflammatory Response and Lysosomal Instability in Rat Model of Myocardial Infarction. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 756-760, 2009.

PRÉVEL, C. et al. Fluorescent biosensors for high throughput screening of protein kinase inhibitors. **Biotechnology journal**, v. 9, n. 2, p. 253-265, 2014.

PRIBLUDA, V. S.; PRIBLUDA, C.; METZGER, H. Transphosphorylation as the Mechanism by Which the High-Affinity Receptor for IgE Is Phosphorylated Upon Aggregation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 23, p. 11246-11250, 1994.

PUTAROV, N. B.; DE CARVALHO, E. M.; DE AGUIAR, A. P. Métodos de Síntese e Bioatividade de 3-Carboxi-quinolin-4 (1H)-onas. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 2, p. 374-395, 2014.

QIN, Q. X.; YANG, J.; YANG, B. A novel and efficient synthesis of norathyriol using Pd (II) as a catalyst. **Research on Chemical Intermediates**, v. 40, n. 4, p. 1633-1636, 2014.

RAJAN, T. V. The Gell–Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. **TRENDS in Immunology**, v. 24, n. 7, p. 376-379, 2003.

RAJENDRAN, P. et al. Mangiferin in cancer chemoprevention and treatment: pharmacokinetics and molecular targets. **Journal of Receptors and Signal Transduction Research**, v. 35, n. 1, p. 76-84, 2015.

RAMASAMY, S.; BENNET, D.; KIM, S. Drug and bioactive molecule screening based on a bioelectrical impedance cell culture platform. **International journal of nanomedicine**, v. 9, p. 5789, 2014.

RANI, D. T. Liposome as a potential drug delivery system: a review. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 4, p. 6-12, 2013.

REIG, A. R. et al. Perceived efficacy and satisfaction of patients with subcutaneous hypoallergenic high-dose house dust mite extract. **European annals of allergy and clinical immunology**, p. 100, 2017.

REISACHER, W. R.; SCHWANKE, T. New advances in allergy immunotherapy. **Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery**, v. 24, n. 3, p. 231-237, 2016.

RING, J. et al. Why are allergies increasing? **Current opinion in immunology**, v. 13, n. 6, p. 701-708, 2001.

RING, J. Davos declaration: allergy as a global problem. **Allergy**, v. 67, n. 2, p. 141-143, 2012.

RISKE, K. A.; PEREZ, K. R.; AMARAL, L. Q. (org.). Calorimetria aplicada a membranas e proteínas. **Entre sólidos e líquidos: uma visão contemporânea e**



**multidisciplinar, para formação de professores e divulgação do conhecimento.** São Paulo: Livraria da Física, Cap. 11, p. 167-191, 2014.

RIVERA, D. G. et al. Anti-allergic properties of *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and contribution of its glucosylxanthone mangiferin. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, p.385-392, 2006.

RODEIRO, I.; DELGADO, R.; GARRIDO, G. Effects of a *Mangifera indica* L. stem bark extract and mangiferin on radiation- induced DNA damage in human lymphocytes and lymphoblastoid cells. **Cell Proliferation**, v. 47, p. 48–55, 2014.

ROGOBETE, A. F. et al. Liposomal bupivacaine–New trends in Anesthesia and Intensive Care Units. **Egyptian Journal of Anaesthesia**, v. 31, n. 1, p. 89-95, 2015.

ROLLAND, J. M.; GARDNER, L. M.; O'HEHIR, R. E. Allergen-related approaches to immunotherapy. **Pharmacology & therapeutics**, v. 121, n. 3, p. 273-284, 2009.

SAIJA, A. et al. Flavonoid-biomembrane interactions: a calorimetric study on dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 124, n. 1, p. 1-8, 1995.

SANTOS, M. S. **Estudo da sinalização de mastócitos mediada por IgE: desenvolvimento de inibidores e efeito de níveis reduzidos de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato.** 2012. 138 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

SANTOS, M. S. et al. In situ screening of 3-arylcoumarin derivatives reveals new inhibitors of mast cell degranulation. **Archives of Pharmacal Research**, v.36, p.731-738, 2013a.

SANTOS, M. S. et al. In vitro anti-allergic activity of the fungal metabolite pyridovericin. **International immunopharmacology**, v. 15, n. 3, p. 532-538, 2013b.

SANUGUL, K. et al. Isolation of a human intestinal bacterium that transforms mangiferin to norathyriol and inducibility of the enzyme that cleaves a C-glucosyl bond. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, 1672 -1678, 2005.

SATO, H. et al. Discotic liquid crystals of transition metal complexes 45: parity effect of the number of d-electrons on stacking distances in the columnar mesophases of octakis-(m-alkoxyphenoxy) phthalocyaninato metal (II) complexes. **Journal Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 16, p. 1148-1158, 2012.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, p. 726-737, 2003.

SCHELLER, F. W. et al. Research and development in biosensors. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 35-40, 2001.

SEGUIN, J. et al. Liposomal encapsulation of the natural flavonoid fisetin improves bioavailability and antitumor efficacy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 444, p. 146-154, 2013.

SEIBERLING, K. et al. Cost of allergy immunotherapy: sublingual vs subcutaneous administration. In: **International forum of allergy & rhinology**. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, p. 460-464, 2012.

SENTI, G.; VON MOOS, S.; KÜNDIG, T. M. Epicutaneous immunotherapy for aeroallergen and food allergy. **Current treatment options in allergy**, v. 1, n. 1, p. 68-78, 2014.

SEREBRIISKII, I. G.; GOLEMIS, E. A. Uses of lacZ to study gene function: evaluation of  $\beta$ -galactosidase assays employed in the yeast two-hybrid system. **Analytical biochemistry**, v. 285, n. 1, p. 1-15, 2000.

SERNA, H.; PORRAS, M.; VERGARA, P. Mast Cell Stabilizer Ketotifen [4-(1-Methyl-4-piperidylidene)4H-benzo[4,5]cyclohepta[1,2-b]thiophen-10(9H)-one Fumarate] Prevents Mucosal Mast Cell Hyperplasia and Intestinal Dysmotility in Experimental *Trichinella spiralis* Inflammation in the Rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 319, p.1104-1111, 2006.

SEUANES, G. C. et al. Novel binuclear  $\mu$ -oxo diruthenium complexes combined with ibuprofen and ketoprofen: Interaction with relevant target biomolecules and anti-allergic potential. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 153, p. 178-185, 2015.

SHARMA, A.; SHARMA, U. S. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. **International journal of pharmaceutics**, v. 154, n. 2, p. 123-140, 1997.

SHI, Z. L. et al. In Vitro and In Vivo Effects of Norathyriol and Mangiferin on  $\alpha$ -Glucosidase. **Biochemistry Research International**, v. 2017, 2017.

SHRUTHI, G. S.; AMITHA, C. V.; MATHEW, B. B. Biosensors: a modern day achievement. **Journal of Instrumentation Technology**, v. 2, p. 26-39, 2014.

SILVA, E. Z. M.; JAMUR, M. C.; OLIVER, C. Mast cell function: a new vision of an old cell. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 62, n. 10, p. 698-738, 2014.

SILVER COLLOIDS, 2001-2012. Disponível em: <<http://www.silver-colloids.com/Tutorials/Intro/pcs21.html>>. Acesso em: 08 maio 2018.

SIMONS, K.; IKONEN, E. Functional rafts in cell membranes. **Nature**, v. 387, n. 6633, p. 569, 1997.

SIMONS, K.; TOOMRE, D. Lipid rafts and signal transduction. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 1, n. 1, p. 31, 2000.

SIMONS, F. E. R. et al. 2015 update of the evidence base: World Allergy Organization anaphylaxis guidelines. **World Allergy Organization Journal**, v. 8, n. 1, p. 1, 2015.

SOUKOULIS, C.; BOHN, T. A comprehensive overview on the micro-and nano-technological encapsulation advances for enhancing the chemical stability and bioavailability of carotenoids. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 58, n. 1, p. 1-36, 2018.

STENGER, D. A. et al. Detection of physiologically active compounds using cell-based biosensors. **TRENDS in Biotechnology**, v. 19, p. 303-309, 2001.

STRANDBERG, K.; WESTERBERG, S. Composition of phospholipids and phospholipid fatty acids in rat mast cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 11, p. 103-107, 1976.

SUN, J. Z. et al. Microbial fuel cell-based biosensors for environmental monitoring: a review. **Water Science and Technology**, v. 71, n. 6, p. 801-809, 2015.

SWINEHART, D. F. The beer-lambert law. **Journal of chemical education**, v. 39, n. 7, p. 333, 1962.

TANDRUP SCHMIDT, S. et al. Liposome-based adjuvants for subunit vaccines: formulation strategies for subunit antigens and immunostimulators. **Pharmaceutics**, v. 8, n. 1, p. 7, 2016.

TARAHOVSKY, Y. S. et al. Rafts making and rafts braking: how plant flavonoids may control membrane heterogeneity. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 314, p. 65-71, 2008.

TARDI, P. et al. Liposomal encapsulation of topotecan enhances anticancer efficacy in murine and human xenograft models. **Cancer Research**, v. 60, p. 3389-3393, 2000.

TAYLOR, M. D. et al. Preparation of anhydrous pyridine hydrochloride. **Journal of Chemical Education**, v. 32, n. 1, p. 39, 1955.

TECHNIQUES TO GO, 2014. Disponível em: <<https://technquestogo.wordpress.com/2014/05/25/protein-purification-and-concentration/>>. Acesso em: 02 maio 2018.

TEJERA-GARCIA, R. et al. Making unilamellar liposomes using focused ultrasound. **Langmuir**, v. 27, n. 16, p. 10088-10097, 2011.

TOSCA, M. A. et al. Immunotherapy and Asthma in Children. **Frontiers in Pediatrics**, v. 6, p. 231, 2018.

TREVORS, J. T. Fluorescent probes for bacterial cytoplasmic membrane research. **Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 57, p. 87-103, 2003.

TURCHIELLO, R. F. et al. How bradykinin alters the lipid membrane structure: a spin label comparative study with bradykinin fragments and other cations. **Biopolymers**, v. 54, n. 3, p. 211-221, 2000.

TURNER, A. P. F. Biosensors: sense and sensibility. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 3184-3196, 2013.

ULRIH, N. P. et al. Flavonoids and cell membrane fluidity. **Food chemistry**, v. 121, n. 1, p. 78-84, 2010.

VAHED, S. Z. et al. Liposome-based drug co-delivery systems in cancer cells. **Materials Science and Engineering: C**, v. 71, p. 1327-1341, 2017.

VAN DIJK, C.; DRIESSEN, A. J. The uncoupling efficiency and affinity of flavonoids for vesicles. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, p. 1593-1600, 2000.

VAN WINDEN, E. C. A.; CROMMELIN, D. J. A. Short term stability of freeze-dried, lyoprotected liposomes. **Journal of Controlled Release**, v. 58, n. 1, p. 69-86, 1999.

VARSHOSAZ, J. et al. Optimization of freeze-drying condition of amikacin solid lipid nanoparticles using D-optimal experimental design. **Pharmaceutical development and technology**, v. 17, n. 2, p. 187-194, 2012.

VENTER, C. et al. Prevalence and cumulative incidence of food hyper-sensitivity in the first 10 years of life. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 27, n. 5, p. 452-458, 2016.

VIEIRA, D. B.; GAMARRA, L. F. Avanços na utilização de nanocarreadores no tratamento e no diagnóstico de câncer. 2016.

VITIELLO, G. et al. Cholesterol modulates the fusogenic activity of a membranotropic domain of the FIV glycoprotein gp36. **Soft Matter**, v. 9, n. 28, p. 6442-6456, 2013.

VO, T. S.; NGO, D. H.; KIM, S. K. Marine Algae as a potential pharmaceutical source for anti-allergic therapeutics. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 386-394, 2012.

VYAS, A. et al. Perspectives on Medicinal Properties of Mangiferin. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 412-425, 2012.

WALKER, M. E.; HATFIELD, J. K.; BROWN, M. A. New insights into the role of mast cells in autoimmunity: evidence for a common mechanism of action?. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 1, p. 57-65, 2012.

WANG, S. et al. Orientational distribution of 1, 6-diphenyl-1, 3, 5-hexatriene in phospholipid vesicles as determined by global analysis of frequency domain fluorimetry data. **Biochemistry**, v. 30, n. 22, p. 5565-5572, 1991.

WANG, J. P. et al. Effect of norathyriol, isolated from *T. lanceolatum*, on A23187-induced pleurisy and analgesia in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 350, p. 90-95, 1994a.

WANG, J. P. et al. Effect of norathyriol, a xanthone from *T. lanceolatum*, on cutaneous plasma extravasation. **European Journal of Pharmacology**, v. 251, p. 35-42, 1994b.

WANG, H. et al. Identification and determination of four metabolites of mangiferin in rat urine. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 45, n. 5, p. 793-798, 2007.

WANG, P.; LIU, Q. **Cell-based biosensors**. Principles and Applications. In: *Engineering in Medicine and Biology*. Artech House, Boston, MA, USA, 2010.

WANG, X. et al. Increased absorption of mangiferin in the gastrointestinal tract and its mechanism of action by absorption enhancers in rats. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 39, n. 9, p. 1408-1413, 2013.

WANG, F. et al. Mangiferin and its aglycone, norathyriol, improve glucose metabolism by activation of AMP-activated protein kinase. **Pharmaceutical Biology**, v. 52, p. 68-73, 2014.

WANG, L. et al. B cells using calcium signaling for specific and rapid detection of Escherichia coli O157: H7. **Scientific reports**, v. 5, p. 10598, 2015.

WANG, Q. et al. Structure–activity relationships of diverse xanthenes against multidrug resistant human tumor cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 27, p.447-449, 2017.

WAWRZYNIAK, P. et al. Advances and highlights in mechanisms of allergic disease in 2015. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 137, n. 6, p. 1681-1696, 2016.

WERNERSSON, S.; PEIJLER, G. Mast cell secretory granules: armed for battle. **Nature**, v. 14, p. 478-494, 2014.

WEZEMAN, T.; BASE, S.; MASTERS, K. S. Xanthone dimers: a compound family which is both common and privileged. **Natural Product Reports**, v. 6, p. 32, 2015.

WHEATLEY, L. M. et al. Report from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases workshop on drug allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 136, p. 262, 2015.

WIKIPEDIA, 2018. Disponível em: <[https://en.wikipedia.org/wiki/Zeta\\_potential](https://en.wikipedia.org/wiki/Zeta_potential)>. Acesso em: 07 maio 2018.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane–solute–water systems. **Cryobiology**, v. 39, n. 2, p. 103-129, 1999.

WORLD ALLERGY ORGANIZATION (WAO), 2018. Disponível em: <<http://www.worldallergy.org/adrc/>>. Acesso em: 24 abr. 2018.

WORLD ASTHMA DAY (WAD) 2016 - National Institutes of Health. Disponível em: <<https://www.nih.gov/news-events/news-releases/nih-statement-world-asthma-day-2016>>. Acesso em: 22 jun. 2018.

WU, Z. et al. Synthesis of mangiferin, isomangiferin, and homomangiferin. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 75, p. 5725-5728, 2010.

XIAO, K. et al. A self-assembling nanoparticle for paclitaxel delivery in ovarian cancer. **Biomaterials**, v. 30, p. 6006-6016, 2009.

XU, K. et al. Stimulated release of fluorescently labeled IgE fragments that efficiently accumulate in secretory granules after endocytosis in RBL-2H3 mast cells. **Journal of Cell Science**, v. 111, p. 2385-2396, 1998.

XU, Y.; DU, Y. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. **International journal of pharmaceutics**, v. 250, n. 1, p. 215-226, 2003.

YANAI, K. et al. Safety considerations in the management of allergic diseases: focus on antihistamines. **Current medical research and opinion**, v. 28, n. 4, p. 623-642, 2012.

YANASE, Y. et al. Diagnosis of immediate-type allergy using surface plasmon resonance. **Optical Materials Express**, v. 6, n. 4, p. 1339-1348, 2016.

YANG, D. et al. The antimicrobial activity of liposomal lauric acids against *Propionibacterium acnes*. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 6035-6040, 2009.

YANG, J. et al. The First Total Synthesis of Tarennane, a Potent Antioxidant Chalcone Constituent from *Tarenna Attenuate* or *Magnolia Officinalis*. **Letters in Organic Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 258-263, 2011.

YANG, J. et al. Process for preparation of norathyriol. Faming Zhuanli Shenqing, 103936707, 23 Jul. 2014.

YANG, Z. et al. Protective effects of mangiferin on cerebral ischemia–reperfusion injury and its mechanisms. **European Journal of Pharmacology**, v. 771, p. 145-151, 2016.

ZANG, R. et al. Cell-based assays in high-throughput screening for drug discovery. **International Journal of Biotechnology for Wellness Industries**, v. 1, n. 1, p. 31-51, 2012.

ZHANG, T. et al. Mast cell stabilisers. **European journal of pharmacology**, v. 778, p. 158-168, 2016.