

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

MARCIA ANDREIA BERTOZ

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

Ribeirão Preto
2018

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

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Bertoz, Marcia Andreia

Síntese de derivados da mangiferina, avaliação do potencial antialérgico e efeitos na membrana biológica. Ribeirão Preto, 2018.

156 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Naal, Rose Mary Zumstein Georgetto.

1. Alergias. 2. Mangiferina. 3. Noratiriol. 4. Lipossomos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: **Marcia Andreia Bertoz**

Título do trabalho: **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.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Aos meus pais, **Marcelo Bertoz** e **Regina Marcia de Lima Bertoz**, pelo amor incondicional e exemplos de vida. Por sempre estarem ao meu lado, incentivando a lutar e nunca desistir dos sonhos, pelo modelo de honestidade, perseverança e dedicação.

À minha irmã, **Ana Beatriz Bertoz**, por todo amor, companheirismo, amizade e ensinamentos compartilhados diariamente.

À minha orientadora, **Profa Dra. Rose Mary Zumstein Georgetto Naal**, por todo o entusiasmo, motivação, carinho e aprendizado na realização deste projeto.

Agradecimentos

Agradeço a **Deus** pelo dom da vida, por todas as oportunidades de aprendizado e pelo conhecimento de pessoas incríveis. Pela saúde, proteção e por sempre me guiar a agir com sabedoria, e ter força e coragem para enfrentar todos os obstáculos.

Aos meus pais, **Marcelo Bertoz** e **Regina Marcia de Lima Bertoz**, e minha irmã, **Ana Beatriz Bertoz**, que são a minha base, agradeço por todo o suporte, paciência e apoio com palavras de incentivo e amor para prosseguir nos estudos.

A todos os meus outros familiares, meus avós **Ildo Bertoz**, **Elza Luchesi Bertoz**, **Emygdio de Abreu Lima** e **Maria Zélia Ferri de Lima**, meus tios **Elisabete Bertoz**, **Régia Mara de Lima de Mello**, **Rangel Marcio de Lima**, **Clodoaldo Govani de Mello** e **Dalila Bertozzi** (*in memoriam*), e minhas primas **Maria Carolini de Lima de Mello**, **Clara Beatriz de Lima de Mello** e **Mirian Gabriele Bertoz Pereira**, por todo amor, orações, palavras e conselhos, buscando sempre ajudar e contribuir em algo para meu crescimento e aprendizado, pelos bons momentos compartilhados e por sempre terem torcido por mim.

Ao **Laboratório de Biossensores e Sistemas Nanoestruturados**, em especial à minha orientadora **Profa. Dra. Rose Mary Zumstein Georgetto Naal**, por ter me recebido de braços abertos e ter dado a oportunidade de desenvolver este trabalho, pelos ensinamentos e incentivos durante toda a caminhada. Ao **Prof. Dr. Zeki Naal** pelo suporte, apoio e conhecimentos compartilhados. Às técnicas, **Maria Perpétua Freire de Moraes Del Lama** e **Laila Aparecida Deliberto**, por toda ajuda, carinho, respeito e confiança na convivência diária. **A todos os alunos que fazem ou fizeram parte do grupo**, por toda a dedicação desempenhada essencial para o crescimento de todos, particularmente à **Bruna Carolina Massarioli**, pelo início dos estudos da síntese do noratiriol, e à **Amanda Bordonal Sustena** pela ajuda nos experimentos com lipossomos.

Ao **Laboratório de Química Heterocíclica e Medicinal**, e ao **Prof. Dr. Flávio da Silva Emery** pela oportunidade de conhecer um pouco mais sobre o mundo da síntese, pelo incentivo e conhecimento demonstrados. **A todos os alunos**

do grupo, de modo especial à **Gabriela Bianchi dos Santos** pelo suporte inicial aos experimentos, e ao **Paulo Eliandro da Silva Júnior**, ao **Miguel de Menezes Vaidergorn** e à **Shaiani Maria Gil de Melo** por toda a ajuda, paciência e atenção dedicadas, além da valiosa amizade cultivada. Agradeço ao técnico **Murilo Helder de Paula** por sua solicitude, carinho, disposição e análises de Ressonância Magnética Nuclear.

Ao laboratório do **Prof. Dr. Antônio José da Costa Filho** pela possibilidade de aprender um pouco sobre Ressonância Paramagnética Eletrônica, especialmente aos alunos **Rafael Pianca Barroso** e **Dennylson Willian Lemos Machado** pela dedicação, ajuda e ensinamentos, e à aluna **Priscilla Freddi** pelas análises de Calorimetria Exploratória Diferencial.

Aos laboratórios das **Profas. Dras. Priscyla Daniely Marcato Gaspari** e **Renata Fonseca Vianna Lopez** por permitirem a utilização dos equipamentos necessários a este trabalho. À técnica **Patrícia Sper Simão** pela ajuda no processo de liofilização e análises no equipamento Zetasizer.

Aos técnicos **José Carlos Tomaz** e **Vinicius Palaretti** pelas análises de Espectrometria de Massas e Ressonância Magnética Nuclear realizadas, e ao técnico **Adriano Batista da Costa** pela ajuda nos experimentos de Anisotropia de Fluorescência.

Aos membros da minha banca do exame de qualificação, **Profa. Dra. Juliana Maldonado Marchetti**, **Prof. Dr. Luis Alexandre Pedro de Freitas** e a jovem pesquisadora **Vanessa Leiria Campo**, pelas sugestões e correções realizadas.

A **todos os meus professores** que fizeram parte do meu desenvolvimento profissional, pessoal e acadêmico.

Aos colegas e amigos **Renata Bortoleto da Silveira**, **Giovanni Loureiro Raspantini** e **Raquel Petrilli** pelo apoio, amizade e ajuda nos momentos de dificuldades com o desenvolvimento do trabalho.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo** e ao **Programa de Pós Graduação em Ciências**

Farmacêuticas pela formação acadêmica e científica, e pela oportunidade da realização deste projeto de mestrado.

Aos **funcionários da secretaria de Pós-Graduação, Eleni Angeli Passos, Rafael Braga Poggi e Rosana dos Santos Florêncio**, pela disposição em ajudar e orientar durante todo o período.

Às agências de fomento **CNPq, CAPES e INCT-Bioanalítica** pelo respaldo financeiro e necessário ao desenvolvimento da presente pesquisa.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001".

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”.

Simone de Beauvoir

“É mais fácil obter o que se deseja com um sorriso do que à ponta da espada”.

William Shakespeare

“O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou, mas sim pelas dificuldades que superou no caminho”.

Abraham Lincoln

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.

ABSTRACT

BERTOZ, M. A. **Synthesis of mangiferin derivatives, evaluation of the antiallergic potential and effects on the biological membrane.** 2018. 182f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Allergic diseases represent a worldwide public health issue, being asthma and rhinitis the most common ones. These diseases demand the continuous use of medications whose side effects impinge on the affected people's quality of life, justifying the search for new drugs, or formulations, relevant to the treatment of allergies. In this context, we highlight the medicinal plant *Mangifera indica* L., whose aqueous extract, Vimang®, has been utilized for the treatment of several pathologies. The phytochemical study of this extract led to the isolation of various phenolic compounds, among which Mangiferin (Mgf) is predominant (~46 %) and responsible for important pharmacological properties, such as the antiallergic one. This molecule is metabolized in the intestine and transformed into its aglycone, norathyriol (Nrt), which is found in the plasma in a higher concentration than Mgf. Seeing as the structure-activity relationship of these substances is still little explored, this study proposed the synthesis of new molecules from the core structure of Mgf, with structural modifications in its substituent groups for *in vitro* evaluation of the antiallergic potential. Analogous molecules to Mgf were synthesized (compounds 4, 5 (Nrt) and 6), through specific modifications of hydroxyl groups of the xanthonic ring, by means of a synthesis strategy that allowed for a greater reactional yield. Nrt showed a higher antiallergic potential than Mgf, suggesting that sugar does in fact interfere in bioavailability. The presence of hydroxyl groups in the 6 and 7 positions of the xanthonic ring (catechol group) is crucial for bioavailability, because these substituents considerably influence the molecule's water solubility. The hydroxyl groups in the 1 and 3 positions of the xanthonic ring are also important, seeing as the substitution of the hydroxyl group only in position 3 completely inhibited bioactivity. Seeing as Nrt and Mgf (the most bioactive) are slightly soluble in water and susceptible to chemical oxidation or enzymatic degradation, the incorporation in liposomal nanocarriers was planned to improve bioavailability. The study for the best formulation was developed for Mgf due to the greater quantity available and its well-earned spotlight in various biological applications. The liposomes of PC:PE:COL (52:28:20), in the lipid concentrations of 2.9, 14.5 and 29 mmol/L, were prepared by the lipid film hydration method in different Mgf/lipid ratios (0.01, 0.02, 0.04 and 0.10), in pHs 6.5, 7.0 and 7.4. All the formulations were stable in the period of 29 days, with sizes around 100 nm and polydispersity indexes around 0.3, appropriate for intravenous application. The formulation with the highest loading capacity (3.4 %) was the one with 2.9 mmol/L of total lipids, and a Mgf/lipid ratio of 0.1, which was used in the biological essays. The liposomal formulation maintained the antiallergic potential profiles observed for free drugs. This result is relevant for biological application since the drugs are protected from chemical degradation and still exerts its pharmacological properties. Seeing as liposomes are systems that mimic the biological membrane, the location of Mgf and its effects on the membrane were studied by fluorescence anisotropy, DSC and EPR, in pH 7.4. The results showed that Mgf interacts with the lipid membrane, increasing its fluidity and reducing the lipid cooperation, reinforcing the bioactivity of Mgf linked to its action on membrane proteins, which is common for polyphenolic molecules.

Keywords: Allergies. Mangiferin. Norathyriol. Liposomes.

LISTA DE FIGURAS

<p>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.....</p>	6
<p>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 $Fc\epsilon RI$, 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.....</p>	8
<p>Figura 3 - Estrutura do receptor de alta afinidade para IgE ($FC\epsilon RI$). A molécula é composta por 3 subunidades, α, β e γ, sendo a cadeia α responsável pelo reconhecimento do antígeno e as demais cadeias responsáveis pela transdução do sinal. As tirosina quinases, Lyn e Syk, ligam-se às cadeias β e γ, participando dos eventos de sinalização</p>	10
<p>Figura 4 - Sinalização celular dos mastócitos. O intercruzamento de receptores $Fc\epsilon RI$ por um antígeno leva ao deslocamento dos receptores agregados para os <i>lipid rafts</i>, 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</p>	12
<p>Figura 5 - Reação de clivagem do substrato fluorogênico metilumbeliferil-N-acetil-β-D-glucosaminida (MUG) pela enzima β-hexosaminidase liberada no processo de desgranulação mastocitária, gerando o produto fluorescente metilumbeliferona.....</p>	15
<p>Figura 6 - Estrutura química básica da xantona.....</p>	17
<p>Figura 7 - Estrutura química da mangiferina</p>	18
<p>Figura 8 - Estrutura química do noratiriol</p>	19
<p>Figura 9 - Representação da organização estérica dos lipossomos compostos por uma única bicamada lipídica (unilamelar) ou várias bicamadas lipídicas concêntricas (multilamelar)</p>	21

Figura 10 - Diferentes fases de membranas lipídicas saturadas, hidratadas e contendo colesterol (<i>tilted</i> = inclinada; <i>rippled</i> = ondulada).....	22
Figura 11 - Obtenção de lipossomos uni ou multilamelares a partir da hidratação do filme lipídico seguida de processos mecânicos e eletrostáticos ..	23
Figura 12 - Representação do lipossomo como nanocarreador de substâncias hidrofílicas ou lipofílicas inseridas, respectivamente, em regiões polares e apolares	25
Figura 13 - Método de hidratação do filme lipídico para preparo dos lipossomos	37
Figura 14 - Esquema representativo do método indireto para determinação da eficiência de encapsulação e capacidade de carga de bioativos em sistemas nanocarreadores	38
Figura 15 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO) do 1,3,6,7-tetrahydroxi-9H-xanten-9-ona (noratiriol) (5).....	54
Figura 16 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, Acetona- d_6) do 1,3,6,7-tetrahydroxi-9H-xanten-9-ona (noratiriol) (5).....	54
Figura 17 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do 2,2,2-trifluoro-1-(2,4,6-trimetoxi-3-(2,4,5-trimetoxibenzoil)fenil)etan-1-ona (11)	57
Figura 18 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO) do 1,3-dihidroxi-6,7-dimetoxi-9H-xanten-9-ona (4).....	61
Figura 19 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO) do 1,3-dihidroxi-6,7-dimetoxi-9H-xanten-9-ona (4).....	62
Figura 20 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do 1-hidroxi-3,6,7-trimetoxi-9H-xanten-9-ona (6)	64
Figura 21 - Espectro de RMN de ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) do 1-hidroxi-3,6,7-trimetoxi-9H-xanten-9-ona (6)	64
Figura 22 - Curva analítica da mangiferina obtida em solução tampão de Tyrode (pH 7,4) e etanol, na proporção de 1:5, com leituras de absorbância em 368 nm. Cada valor representa a média \pm o desvio padrão de determinações em, no mínimo, triplicata	65
Figura 23 – Espectros de absorção no UV-VIS da mangiferina, na ausência e presença de contaminantes lipídicos (100 $\mu\text{mol/L}$ e 0,39 mmol/L), em tampão de Tyrode pH 7,4 e etanol (1:5), com $\lambda_{\text{máx}}$ de 368 nm	68
Figura 24 - Curva analítica do noratiriol obtida pela diluição em tampão de Tyrode pH 7,4 e etanol (1:5) determinada no comprimento de onda máximo de absorção igual a 364 nm. Cada valor representa a média \pm o desvio padrão de	

determinações em, no mínimo, triplicata	69
Figura 25 - Estruturas químicas da fosfatidilcolina (PC) (A), fosfatidiletanolamina (PE) (B) e colesterol (C).....	70
Figura 26 - Viabilidade celular dos mastócitos da linhagem RBL-2H3, na presença de lipossomos de PC:PE:COL (52:28:20) em diferentes concentrações. Cada valor representa a média \pm o desvio padrão de determinações em triplicata	71
Figura 27 - Estrutura química de 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano (DOTAP)	72
Figura 28 - Equilíbrio ácido-base para a mangiferina, evidenciando seus dois pkas de 6,52 e 7,97.....	74
Figura 29 - Representação esquemática de formação de agregados de mangiferina em solução aquosa.....	75
Figura 30 - Esquema representativo do princípio básico da medida de dispersão dinâmica de luz (DLS). A amostra é iluminada por um feixe de laser, e as flutuações da luz difusa são detectadas em um ângulo de dispersão conhecido, por um detector de fótons. O coeficiente de difusão e o tamanho de partícula são obtidos por meio do correlacionador.....	80
Figura 31 - Diagrama representativo do potencial Zeta. Representação de uma partícula com superfície negativa, com uma camada de íons positivos adsorvidos, caracterizando a camada de Stern. Com a distância da superfície, começa a ocorrer o equilíbrio entre a quantidade de íons positivos e negativos, até o ponto no qual as concentrações iônicas são iguais e o potencial elétrico torna-se zero. Conforme a partícula se movimenta, a superfície efetiva é definida como plano de cisalhamento, e é nesta região em que o potencial Zeta é determinado	81
Figura 32 - Parâmetros físico-químicos de tamanho de partícula e índice de polidispersividade (A), e potencial Zeta (B), em módulo, da formulação L4 (PC:PE:COL - 52:28:20) na concentração lipídica total de 2,9 mmol/L, concentração de bioativo de 0,3 mmol/L, relação bioativo/lipídeo (B/L) de 0,10, temperatura de hidratação do filme lipídico de 75°C e pH de 7,4. A formulação foi armazenada a 5°C e monitorada por 29 dias, na ausência (Branco) e presença de mangiferina. Cada valor representa a média \pm o desvio padrão de determinações em quadruplicata	84
Figura 33 - Comparação dos parâmetros físico-químicos de tamanho de partícula (A), índice de polidispersividade (B) e potencial Zeta (C) das formulações lipossomais antes e após processo de liofilização, utilizando os crioprotetores de sacarose e trealose, a 5 % e 10 %, monitorados no período de 22 dias. As formulações foram armazenadas a 5°C e cada valor representa a média \pm o desvio padrão de determinações em triplicata. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 e ****p < 0,0001 em comparação à formulação antes de	

- liofilizar; $\Delta p < 0,05$ em comparação à trealose 5 %; $\delta p < 0,05$ e $\delta\delta p < 0,01$ em comparação à sacarose 10 %, para cada semana de monitoramento..... 88
- Figura 34 - Porcentagem de β -hexosaminidase liberada para as células estimuladas pelo antígeno DNP-BSA (0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) na presença de diferentes concentrações de fumarato de cetotifeno. Cada valor representa a média \pm desvio padrão de determinações em quadruplicata 90
- Figura 35 - Porcentagem de β -hexosaminidase liberada para as células estimuladas pelo antígeno DNP-BSA (0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por meio do ensaio direto, na presença da mangiferina (A), noratiriol (composto 5) (B), composto 4 (C) e composto 6 (D). Cada valor representa a média \pm desvio padrão de determinações em triplicata 91
- Figura 36 - Efeito da presença de mangiferina (A) e noratiriol (composto 5) (B) na atividade da enzima β -hexosaminidase. Cada valor representa a média \pm desvio padrão de determinações em quadruplicata 94
- Figura 37 - Redução da resazurina em resorufina por meio das enzimas NADPH ou NADH desidrogenase, em células viáveis 94
- Figura 38 - Viabilidade celular dos mastócitos na presença de mangiferina (A) e noratiriol (B). Cada valor representa a média \pm o desvio padrão de determinações em triplicata 95
- Figura 39 - Porcentagem de β -hexosaminidase liberada para as células estimuladas pelo antígeno DNP-BSA (0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) na presença de mangiferina livre e incorporada em lipossomo, com 20 (A) e 60 min (B) de incubação, e noratiriol livre e incorporado, com 20 (C) e 60 min (D) de incubação. Os experimentos foram realizados por meio de ensaio padrão, e cada valor representa a média \pm desvio padrão de determinações em triplicata. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ em comparação ao bioativo livre, para cada uma das concentrações estudadas 96
- Figura 40 - Estrutura química do fosfolípídeo 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosforilcolina (DMPC), com identificação das regiões das cadeias de ácidos graxos (ou cadeias acila) (A), glicerol (B), grupo fosfato (C) e grupo colina (D). 97
- Figura 41 - Termograma de uma proteína hipotética. A linha tracejada indica a linha de base. A área sob a curva (região em cinza) é a entalpia calorimétrica (ΔH_{CAL}), que mostra a dependência da capacidade calorífica com a temperatura da amostra, à pressão constante. A diferença da capacidade calorífica (ΔC_p) do evento térmico é caracterizada pela temperatura de transição de fases (T_M , temperatura de melting), onde a capacidade calorífica atinge um máximo. O grau de cooperatividade das moléculas na amostra ($\Delta T_{1/2}$) é a largura em temperatura à meia altura na curva de transição 99
- Figura 42 - Curvas de DSC para os lipossomos de DMPC, na ausência e presença de mangiferina (Mgf:DMPC, 1:20), em solução tampão de HEPES 20 mmol/L, em pH 7,4 100

Figura 43 - Estrutura e localização das sondas fluorescentes DPH e TMA-DPH na bicamada lipídica.....	102
Figura 44 - Anisotropia de fluorescência no estado estacionário para as sondas DPH (A) e TMA-DPH (B), em função da temperatura, na ausência e presença de mangiferina, em lipossomas de DMPC e pH 7,4	104
Figura 45 - 5-PCSL como exemplo de marcador de spin, com o radical nítróxido ligado em C-5 (A) e estrutura química do radical nítróxido (B)	106
Figura 46 - Espectros representativos de RPE dos marcadores de spin 14-PCSL (A) e 5-PCSL (B) nos regimes de movimento rápido e lento, respectivamente. Estes parâmetros espectrais são utilizados na investigação da dinâmica lipídica em membranas	107
Figura 47 - Espectros representativos de RPE dos marcadores de spin 5-PCSL (A) e 14-PCSL (B) incorporados em membranas de DMPC em presença e ausência de mangiferina, em função da temperatura, na ausência de colesterol e pH 7,4. Varredura espectral: 10 mT	108
Figura 48 - Desdobramento hiperfino máximo ($2A_{MÁX}$) do marcador de spin 5-PCSL (A) e razão entre as alturas dos picos de campo baixo e médio (h_{+1}/h_0) do marcador de spin 14-PCSL (B), em função da temperatura, após incorporação em membranas de DMPC, na presença e ausência de mangiferina, na ausência de colesterol e pH 7,4	109
Figura 49 - Espectros representativos de RPE dos marcadores de spin 5-, 7-, 10-, 12- e 14-PCSL na fase gel (17°C) (A) e na fase fluida (41°C) (B) incorporados em membranas de DMPC, em presença e ausência de mangiferina, na ausência de colesterol e pH 7,4. Varredura espectral: 10 mT.....	110
Figura 50 - Desdobramento hiperfino máximo ($2A_{MÁX}$) (A) e razão entre as alturas dos picos de campo baixo e médio (h_{+1}/h_0) (B) em função dos marcadores de spin na fase gel (17°C) e na fase fluida (41°C) incorporados em membranas de DMPC, na presença e ausência de mangiferina, na ausência de colesterol e pH 7,4	110
Figura 51 - Espectros representativos de RPE dos marcadores de spin 5-, 7-, 10-, 12- e 14-PCSL na fase gel (17,9°C) (A) e na fase fluida (40,5°C) (B) incorporados em membranas de DMPC, em presença e ausência de mangiferina, na presença de colesterol e pH 7,4. Varredura espectral: 10 mT.....	112
Figura 52 - Desdobramento hiperfino máximo ($2A_{MÁX}$) (A) e razão entre as alturas dos picos de campo baixo e médio (h_{+1}/h_0) (B) em função dos marcadores de spin na fase gel (17,9°C) e na fase fluida (40,5°C) incorporados em membranas de DMPC, na presença e ausência de mangiferina, na presença de colesterol e pH 7,4.....	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Etapas para a quantificação da enzima β -hexosaminidase pelo ensaio padrão e direto (modelo biossensor)	16
Tabela 2 - Valores de precisão intra e interensaio para o método espectrofotométrico de quantificação da mangiferina	66
Tabela 3 - Valores de exatidão intra e interensaio para o método espectrofotométrico de quantificação da mangiferina	67
Tabela 4 - Eficiências de encapsulação (EE) e capacidades de carga (CC) da mangiferina nas formulações lipossomais contendo PC:PE:COL (52:28:20), na concentração lipídica total de 29 mmol/L, concentração de bioativo de 0,3 mmol/L, relação bioativo/lipídeo (B/L) de 0,01 e pH de 7,4, nas temperaturas de hidratação do filme lipídico de 25°C e 75°C	70
Tabela 5 - Eficiências de encapsulação (EE) e capacidades de carga (CC) da mangiferina para as formulações lipossomais preparadas em diferentes condições de concentração lipídica, concentração de bioativo, relação bioativo/lipídeo (B/L), temperatura de hidratação (T) e pH.....	72
Tabela 6 - Porcentagem das espécies neutras e ionizadas da mangiferina em diferentes pHs, tendo em vista seus dois pkas, de 6,52 e 7,97	75
Tabela 7 - Comparação das eficiências de encapsulação (EE) e capacidades de carga (CC) das formulações lipossomais preparadas com noratiriol (L15) e mangiferina (L4), ambas contendo PC:PE:COL (52:28:20), na concentração lipídica total de 2,9 mmol/L, concentração de bioativo de 0,3 mmol/L, relação bioativo/lipídeo (B/L) de 0,10, temperatura de hidratação do filme lipídico de 75°C e pH de 7,4.....	77
Tabela 8 - Eficiências de encapsulação (EE) e capacidades de carga (CC) da mangiferina para a formulação lipossomal L4, contendo PC:PE:COL (52:28:20), concentração lipídica de 2,9 mmol/L, concentração de mangiferina de 0,3 mmol/L, relação bioativo/lipídeo de 0,10, temperatura de hidratação de 75°C, pH 7,4, na ausência e presença dos crioprotetores de sacarose (L11 e L12) e trealose (L13 e L14), nas concentrações de 5 e 10 %. Cada valor representa a média \pm o desvio padrão de determinações em, no mínimo, triplicata.....	78
Tabela 9 - Parâmetros físico-químicos de tamanho de partícula, índice de polidispersividade (Pdl) e potencial Zeta (PZ) para as formulações L6 (PC:PE:COL, 52:28:20, pH 7,4), L8 (PC:PE:COL, 52:28:20, pH 6,5) e L9 (PC:PE:COL:DOTAP, 52:24:16:8, pH 7,4), preparadas na concentração lipídica total de 14,5 mmol/L, concentração de mangiferina de 0,3 mmol/L e temperatura de hidratação do filme lipídico de 75°C. As formulações foram armazenadas a 5°C e monitoradas por 29 dias, na ausência (Branco) e presença de mangiferina.....	83

Tabela 10 - Parâmetros físico-químicos de tamanho de partícula, índice de polidispersividade (Pdl) e potencial Zeta (PZ) da formulação L15 (PC:PE:COL, 52:28:20) na concentração lipídica total de 2,9 mmol/L, concentração de bioativo de 0,3 mmol/L, relação bioativo/lipídeo (B/L) de 0,10, temperatura de hidratação do filme lipídico de 75°C e pH de 7,4. A formulação foi armazenada a 5°C e monitorada por 29 dias, na ausência (Branco) e presença de noratiriol	85
Tabela 11 - Efeito inibidor dos derivados xantônicos na desgranulação dos mastócitos	93
Tabela 12 - Parâmetros termodinâmicos da pré-transição (T_P) e da transição principal (T_M) dos lipossomos constituídos por DMPC, na ausência e presença de mangiferina, em pH 7,4, obtidos da análise dos termogramas de DSC	100
Tabela 13 - Valores das temperaturas de transição de fases (T_M) para as sondas DPH e TMA-DPH, na ausência e presença de mangiferina, 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$	105

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Evolução de moléculas a serem investigadas quanto ao potencial antialérgico, baseada na estrutura química da mangiferina como modelo	20
Esquema 2 - Retrossíntese dos derivados da mangiferina (4 , 5 e 6).....	34
Esquema 3 - Rota sintética 01 inicialmente proposta para obtenção dos derivados da mangiferina	48
Esquema 4 - Síntese e mecanismo de formação do composto 7	49
Esquema 5 - Síntese do composto 8 (A), e mecanismo proposto para a reação (B)	50
Esquema 6 - Síntese e mecanismo de formação do composto 9	51
Esquema 7 - Síntese e mecanismo de formação do composto 10	52
Esquema 8 - Síntese do composto 5 (A), e mecanismo proposto para a reação (B)	53
Esquema 9 - Síntese do composto 8 esperado (A), síntese do composto 11 (B) e mecanismo proposto para a formação do composto 11 (C).....	56
Esquema 10 - Rota sintética 02 proposta para obtenção dos derivados da mangiferina	58
Esquema 11 - Síntese e mecanismo de formação do composto 2	59
Esquema 12 - Síntese e mecanismo de formação do composto 4	60
Esquema 13 - Síntese do composto 6	63
Esquema 14 - Equilíbrio ácido-base para a mangiferina.....	103

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Anti-DNP-IgE	Anticorpo monoclonal específico para reconhecimento de dinitrofenil
AP-1	Proteína de ativação 1
APC	Célula apresentadora de antígeno
CC	Capacidade de carga
CCD	Cromatografia em camada delgada
CI ₅₀	50 % da concentração inibitória máxima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COL	Colesterol
CV	Coeficiente de variação
DAG	Diacilglicerol
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DMEM	Meio mínimo essencial de cultura modificado
DMPC	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosforilcolina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNP-BSA	Soro albumina bovina conjugada com uma média de 15 grupos de dinitrofenil
DOTAP	1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano
DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EE	Eficiência de encapsulação
Fc ϵ RI	Receptor de alta afinidade para IgE
GUV	Vesículas unilamelares gigantes
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfônico
IES-EM	Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IP ₃	Inositol-1,4,5-trifosfato
ITAM	Segmento de ativação do receptor baseado na tirosina
<i>J</i>	Constante de acoplamento
K _d	Constante de dissociação
LAT	Ligante para a ativação de células T
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
LT	Leucotrieno
LUV	Vesículas unilamelares grandes

Lyn	Proteína tirosina quinase da família Src
MAP	Proteína ativada por mitógeno
MES	Ácido 2-(N-morfolino) etanossulfônico
Mgf	Mangiferina ou 2-C-β-D-glicopiranosil-1,3,6,7-tetrahidroxixantona
MIRR	Receptores de reconhecimento imune multicadeia
MLV	Vesículas multilamelares grandes
MUG	4-metilumbeliferil-N-acetil-β-D-glucosaminida
MVV	Vesículas multivesiculares
NAD	Dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NADP	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
n-PCSL	1-acil-2-[n-(4,4-dimetiloxazolidina-N-oxil)estearoil]-sn-glicero-3-fosfocolina. Fosfatidilcolina com spin marcado na posição C-n
Nrt	Noratiriol ou 1,3,6,7-tetrahidroxi-9H-xanten-9-ona
OLV	Vesículas oligolamelares
Orai1/CRACM1	Canal ativado por liberação de Ca ²⁺
PAF	Fator ativador de plaquetas
PBS	Tampão fosfato-salino
PC	Fosfatidilcolina
PdI	Índice de polidispersividade
PE	Fosfatidiletanolamina
PGD ₂	Prostaglandina D2
PIP ₂	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PKC	Proteína quinase C
PLA ₂	Enzima fosfolipase A ₂
PLC _γ	Enzima fosfolipase C _γ
PZ	Potencial Zeta
RBL-2H3	Células de leucemia basofílica de rato
RMN	Ressonância magnética nuclear
RPE	Ressonância paramagnética eletrônica
SOCE	Abastecimento operado pela entrada de Ca ²⁺
Src	Proteína tirosina quinase citoplasmática
STIM1	Molécula de interação estromal 1
SUV	Vesículas unilamelares pequenas
Syk	Proteína tirosina quinase do baço
T _M	Temperatura de transição de fase principal lipídica
T _{FH}	Células T foliculares auxiliares
Th2	Células T auxiliares 2
TMA-DPH	N,N,N-Trimetil-4-(6-fenil-1,3,5-hexatrieno-1-yl) fenilamonio p-toluenossulfonato
TNF	Fator de necrose tumoral

T_P	Temperatura de pré-transição de fase lipídica
UV-VIS	Ultravioleta-Visível
β -hex	Beta-hexosaminidase
δ	Deslocamento químico
ΔH	Varição de entalpia
ϵ	Coefficiente de absorvidade molar
λ_{em}	Comprimento de onda de emissão
λ_{exc}	Comprimento de onda de excitação
$\lambda_{m\acute{a}x}$	Comprimento de onda máximo de absorção

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	viii
Lista de esquemas	x
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	xi
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Alergias	2
1.1.1 Prevalência das doenças alérgicas	2
1.1.2 Tratamento das doenças alérgicas	3
1.1.3 Reações de hipersensibilidade	5
1.1.3.1 Reações de hipersensibilidade do tipo I	6
1.2 Mastócitos como alvo terapêutico	9
1.3 Modelo biossensor baseado em mastócitos	13
1.4 Substâncias naturais: as xantonas como alternativa terapêutica	16
1.5 Biodisponibilidade da mangiferina	20
1.6 Lipossomos	21
1.6.1 Características dos lipossomos	21
1.6.2 Métodos de preparo dos lipossomos	23
1.6.3 Lipossomos como nanocarreadores	24
1.6.4 Lipossomos como modelos de membranas biológicas	26
2. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo geral	28
2.2 Objetivos específicos	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Material	30
3.1.1 Solventes e reagentes	30
3.1.2 Material celular	30
3.1.3 Outros materiais	31
3.1.4 Equipamentos analíticos	31
3.1.5 Outros equipamentos	32
3.1.6 Softwares	33
3.2 Métodos	33
3.2.1 Planejamento sintético dos derivados da mangiferina	33
3.2.2 Sistemas lipossomais como nanocarreadores	34
3.2.2.1 Validação de método analítico para quantificação do bioativo	34
3.2.2.1.1 Limite de detecção	35
3.2.2.1.2 Limite de quantificação	35
3.2.2.1.3 Linearidade	35
3.2.2.1.4 Precisão intra e interensaio	35
3.2.2.1.5 Exatidão intra e interensaio	36
3.2.2.1.6 Seletividade	36
3.2.2.2 Preparação dos lipossomos	36
3.2.2.3 Caracterização físico-química dos lipossomos	37

3.2.2.3.1 Eficiência de encapsulação e capacidade de carga dos bioativos nos lipossomos.....	37
3.2.2.3.2 Determinação do tamanho de partícula e índice de polidispersividade.....	39
3.2.2.3.3 Determinação do potencial Zeta.....	39
3.2.2.3.4 Estabilidade preliminar das formulações lipossomais	39
3.2.2.4 Processo de liofilização dos lipossomos	40
3.2.3 Ensaio biológicos.....	40
3.2.3.1 Preparação das células.....	40
3.2.3.2 Modelo biossensor baseado em mastócitos (ensaio direto).....	40
3.2.3.3 Ensaio padrão	41
3.2.3.4 Quantificação da β -hexosaminidase	41
3.2.3.5 Inibição da atividade enzimática da β -hexosaminidase.....	42
3.2.3.6 Viabilidade celular	42
3.2.4 Sistemas lipossomais como modelos de membrana biológica.....	43
3.2.4.1 Calorimetria Exploratória Diferencial	43
3.2.4.2 Anisotropia de fluorescência	44
3.2.4.3 Ressonância Paramagnética Eletrônica.....	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 Obtenção dos derivados da mangiferina	48
4.1.1 Rota sintética 01.....	48
4.1.1.1 Síntese do 1,3,5-trimetoxibenzeno (7)	49
4.1.1.2 Síntese do (2,4,5-trimetoxifenil)-(2,4,6-trimetoxifenil) metanona (8)	50
4.1.1.3 Síntese do (2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)-(2,4,5-trimetoxifenil) metanona (9).....	51
4.1.1.4 Síntese do 1,3,6,7-tetrametoxi-9H-xanten-9-ona (10).....	52
4.1.1.5 Síntese do 1,3,6,7-tetrahidroxi-9H-xanten-9-ona (noratiriol) (5) pela rota 01	53
4.1.1.6 Formação do 2,2,2-trifluoro-1-(2,4,6-trimetoxi-3-(2,4,5-trimetoxibenzoil)fenil)etan-1-ona (11).....	55
4.1.2 Rota sintética 02.....	58
4.1.2.1 Síntese do ácido 2-hidroxi-4,5-dimetoxibenzoico (2)	58
4.1.2.2 Síntese do 1,3-dihidroxi-6,7-dimetoxi-9H-xanten-9-ona (4).....	59
4.1.2.3 Síntese do 1,3,6,7-tetrahidroxi-9H-xanten-9-ona (noratiriol) (5) pela rota 02	62
4.1.2.4 Síntese do 1-hidroxi-3,6,7-trimetoxi-9H-xanten-9-ona (6).....	62
4.2 Sistemas lipossomais como nanocarreadores	65
4.2.1 Metodologia analítica para quantificação da mangiferina.....	65
4.2.2 Validação do método.....	65
4.2.2.1 Limite de detecção	66
4.2.2.2 Limite de quantificação.....	66
4.2.2.3 Linearidade.....	66
4.2.2.4 Precisão intra e interensaio	66
4.2.2.5 Exatidão intra e interensaio	67
4.2.2.6 Seletividade	67
4.2.3 Metodologia analítica para quantificação do noratiriol.....	68
4.2.4 Estudos das formulações lipossomais	69
4.2.4.1 Mangiferina.....	69
4.2.4.2 Noratiriol	76

4.2.4.3 Formulações liofilizadas	77
4.2.5 Determinação de parâmetros físico-químicos dos lipossomos: tamanho de partícula, índice de polidispersividade e potencial Zeta	79
4.2.5.1 Mangiferina.....	79
4.2.5.2 Noratiriol	85
4.2.5.3 Formulações liofilizadas	86
4.3 Ensaios biológicos.....	89
4.3.1 Estudo do potencial antialérgico das espécies xantônicas.....	89
4.3.2 Avaliação da inibição da atividade da enzima β -hexosaminidase	93
4.3.3 Avaliação da citotoxicidade dos bioativos	94
4.3.4 Avaliação da desgranulação mastocitária dos bioativos livres e incorporados nos lipossomos	95
4.4 Sistemas lipossomais como modelos de membrana biológica.....	97
4.4.1 Calorimetria Exploratória Diferencial	98
4.4.2 Anisotropia de fluorescência	101
4.4.3 Ressonância Paramagnética Eletrônica.....	106
4.4.3.1 Marcadores de spin 5-PCSL e 14-PCSL.....	108
4.4.3.2 Análise dos marcadores de spin na ausência de colesterol.....	110
4.4.3.3 Análise dos marcadores de spin na presença de colesterol.....	111
5. CONCLUSÕES	114
6. SEÇÃO EXPERIMENTAL.....	117
6.1 Procedimentos gerais.....	117
6.1.1 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)	117
6.1.2 Cromatografia líquida “clássica”	117
6.1.3 Cromatografia líquida “flash”	117
6.2 Reações da rota sintética 01	117
6.2.1 Síntese de 1,3,5-trimetoxibenzeno (7)	117
6.2.2 Síntese do (2,4,5-trimetoxifenil)-(2,4,6-trimetoxifenil) metanona (8).....	118
6.2.3 Síntese do (2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)-(2,4,5-trimetoxifenil) metanona (9)	118
6.2.4 Síntese do 1,3,6,7-tetrametoxi-9H-xanten-9-ona (10).....	119
6.2.5 Síntese de cloridrato de piridina	120
6.2.6 Síntese do 1,3,6,7-tetrahidroxi-9H-xanten-9-ona (noratiriol) (5) pela rota 01	120
6.3 Reações da rota sintética 02.....	121
6.3.1 Síntese do ácido 2-hidroxi-4,5-dimetoxibenzoico (2).....	121
6.3.2 Síntese de 1,3-dihidroxi-6,7-dimetoxi-9H-xanten-9-ona (4).....	121
6.3.3 Síntese de 1,3,6,7-tetrahidroxi-9H-xanten-9-ona (noratiriol) (5) pela rota 02	122
6.3.4 Síntese de 1-hidroxi-3,6,7-trimetoxi-9H-xanten-9-ona (6)	123
REFERÊNCIAS.....	125
APÊNDICES	148

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).

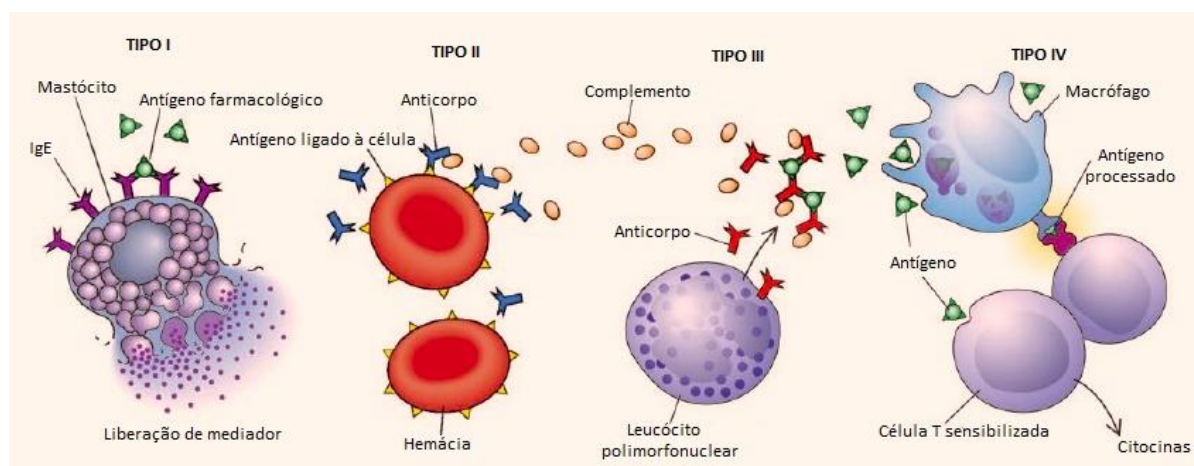
As reações de hipersensibilidade do tipo II são reações autoimunes, mediadas por anticorpos IgG e IgM, que podem causar lesão tecidual pela ativação do sistema complemento, recrutando células inflamatórias e alterando as funções celulares (RAJAN, 2003).

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⁺ ou CD8⁺. 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⁺ 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

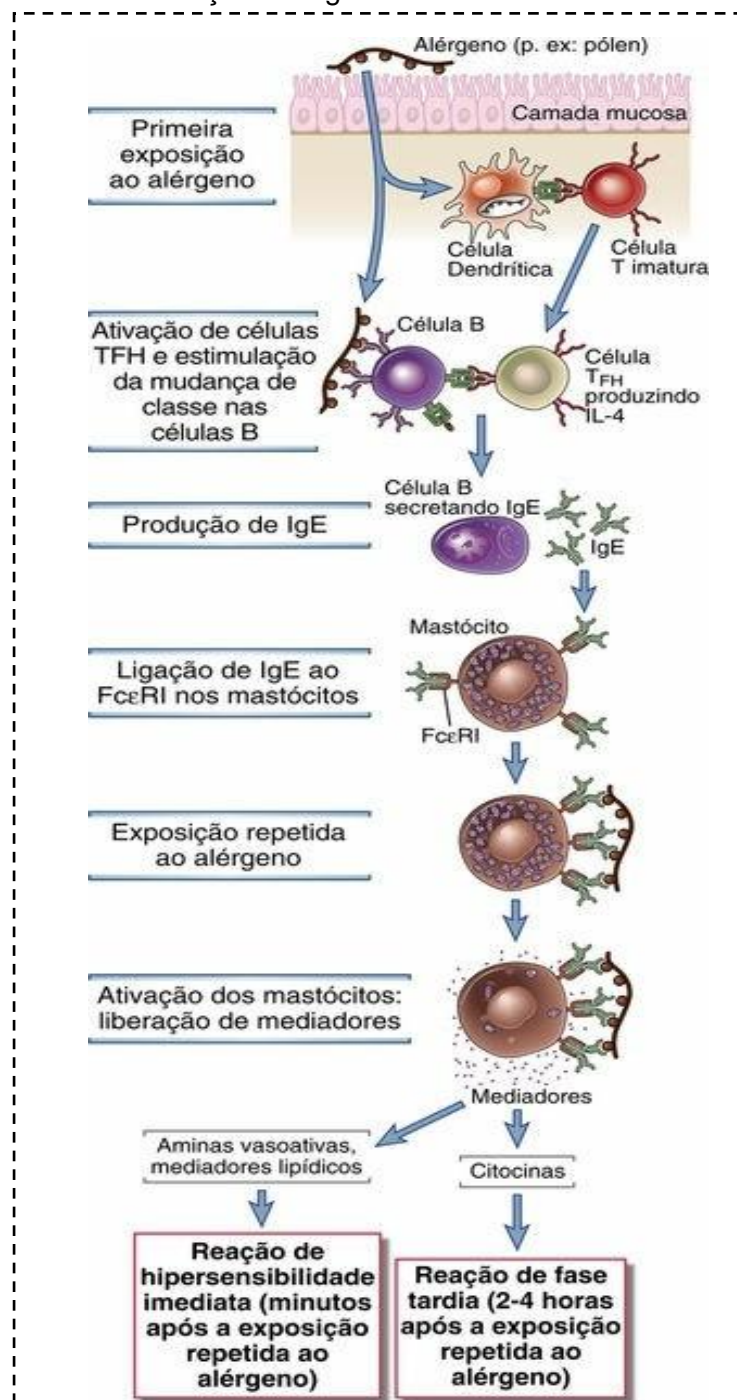
tipos de antígenos e manifestações clínicas, mas todas apresentam características comuns e são iniciadas por uma mesma sequência de eventos divididos em fase de sensibilização, fase de ativação e fase efetora, como mostra a Figura 2.

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⁺ imaturos, os quais vão se diferenciar em células Th2 ou em células T foliculares auxiliares (T_{FH}). As células Th2 diferenciadas migram para os tecidos nos locais de exposição aos alérgenos contribuindo para a fase inflamatória, enquanto que as células T_{FH} 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 (PGD₂, LTC₄, 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.

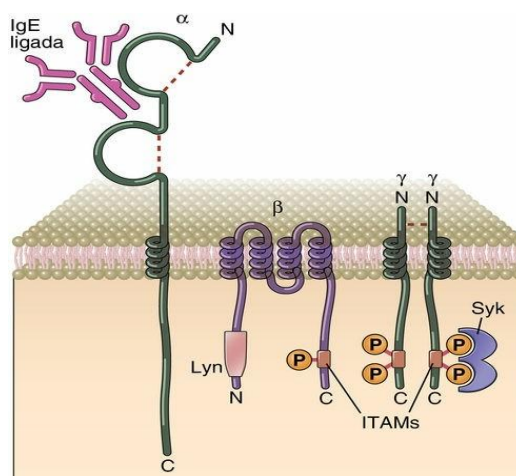
1.2 Mastócitos como alvo terapêutico

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_d, na ordem de 1×10^{-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 α que se liga à IgE, por uma cadeia β responsável por amplificar o sinal (LIN et al., 1996), e por duas cadeias γ 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, α , β e γ , sendo a cadeia α responsável pelo reconhecimento do antígeno e as demais cadeias responsáveis pela transdução do sinal. As tirosina quinases, Lyn e Syk, ligam-se às cadeias β e γ , 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 β e γ 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.

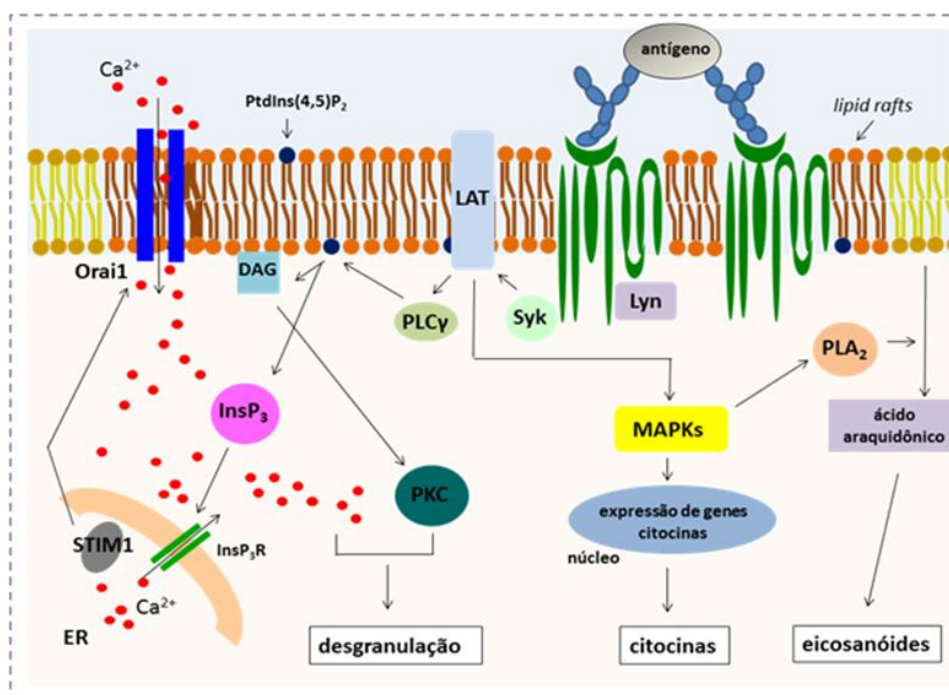
A fosforilação dos ITAMs, na subunidade γ do receptor, cria um novo sítio de ligação para outra proteína tirosina quinase chamada Syk, que se associa ao receptor através de seus dois domínios SH2. O recrutamento de Syk pelos ITAMs fosforilados resulta na fosforilação da LAT (Linker for Activation of 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- α) e conteúdo dos grânulos citoplasmáticos (histamina, serotonina, proteases, β -hexosaminidase) (GALLI et al., 2008).

A ativação da LAT propicia o translocamento da enzima fosfolipase $C\gamma$ (PLC γ) do citosol para a membrana plasmática, onde a PLC γ catalisa a hidrólise de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PtdIns(4,5)P₂) para formar os mensageiros inositol-1,4,5-trifosfato (InsP₃) e diacilglicerol (DAG) (BERRIDGE, 1993). O InsP₃ liga-se a seu receptor no retículo endoplasmático e determina a liberação das reservas de Ca²⁺ para o citoplasma. A proteína STIM1 (Stromal Interaction Molecule 1), localizada no retículo endoplasmático, funciona como um sensor para Ca²⁺ e, devido à depleção das reservas deste íon, mediada por InsP₃, 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 Ca²⁺ Orai1/CRACM1 (Ca²⁺ Release Activated Channel) para induzir o influxo de Ca²⁺ por meio de um processo denominado SOCE (Store Operated Ca²⁺ Entry) (LEWIS, 2007). O aumento da concentração intracelular de Ca²⁺ 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- α , 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 (PLA₂), 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 ϵ 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 γ , 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).

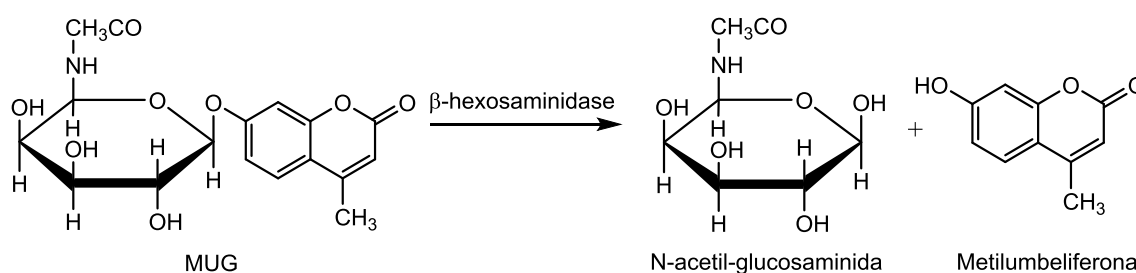
A linhagem de células RBL-2H3 (Rat Basophilic Leukemia), derivada de mastócitos de ratos, é bem apropriada para o emprego em biossensores celulares (NAAL et al., 2004; CURTIS et al., 2008). Estas células crescem em cultura,

associadas a substratos sólidos e podem expressar mais que 1×10^5 receptores Fc ϵ 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 ϵ RI é forte, o receptor pode ser totalmente ocupado em concentrações de IgE menores que 5×10^{-10} M (aproximadamente 1 μ g/mL) (HOLLOWKA; BAIRD, 1996). Além disso, somente poucas centenas de moléculas de Fc ϵ 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 β -hexosaminidase (β -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 β -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 β -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- β -D-glucosaminida (MUG), o qual reage com a enzima β -hexosaminidase para formar o produto fluorescente metilumbeliferona, como ilustra a Figura 5.

Figura 5 - Reação de clivagem do substrato fluorogênico metilumbeliferil-N-acetil- β -D-glucosaminida (MUG) pela enzima β -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 (β -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 β -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 β -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 β -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).

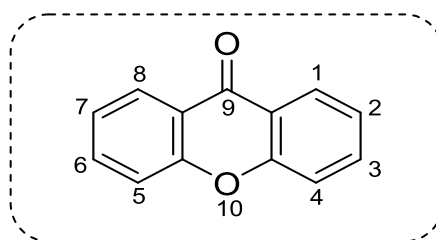
1.4 Substâncias naturais: as xantonas como alternativa terapêutica

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- γ -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.



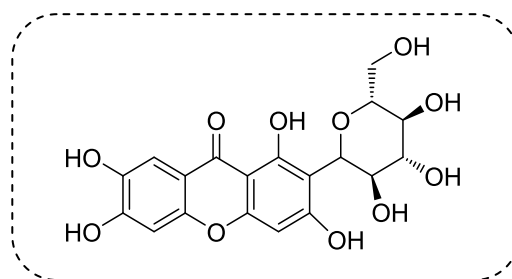
Fonte: Ahmad e colaboradores (2016).

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- β -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).

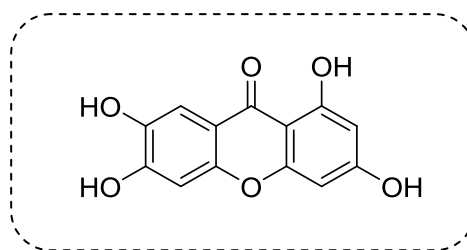
Em Cuba, a mangiferina é encontrada como composto majoritário do Vimang® (NÚÑEZ-SÉLLES et al., 2002), um extrato padronizado e registrado pelas Autoridades Cubanas Reguladoras de Saúde como um fitomedicamento anti-inflamatório (PARDO-ABREU et al., 2006; GARCIA-RIVERA et al., 2011). Ela é também recomendada 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 conseqüente 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).

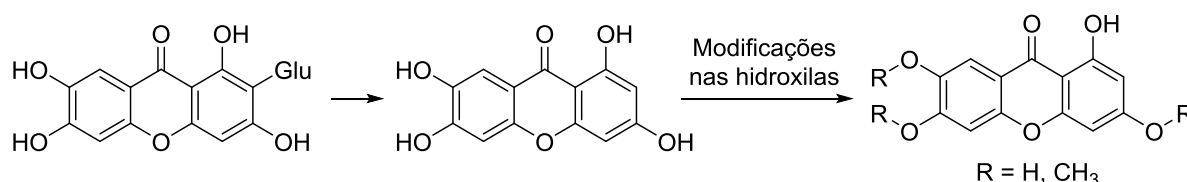
Apesar do conhecido potencial antialérgico da mangiferina (RODEIRO; DELGADO; GARRIDO, 2014; NÚÑEZ-SÉLLES; VILLA; RASTRELLI, 2015) assim como de seu derivado, o noratiriol, nada se sabe sobre a importância dos grupos substituintes no potencial farmacológico destas moléculas, o que justifica a síntese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

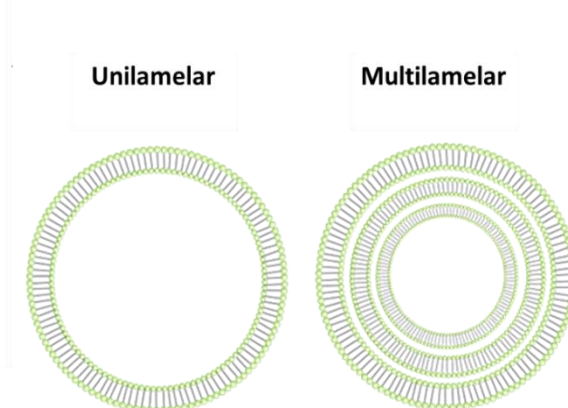
Como consequência, o uso clínico da mangiferina é, atualmente, limitado e evidencia a importância da incorporação em sistemas nanocarreadores, a fim de aumentar sua biodisponibilidade, estabilidade e, conseqüentemente, sua eficácia terapêutica (GORDON; ROEDIG-PENMAN, 1998; TARDI et al., 2000; NOBLE et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

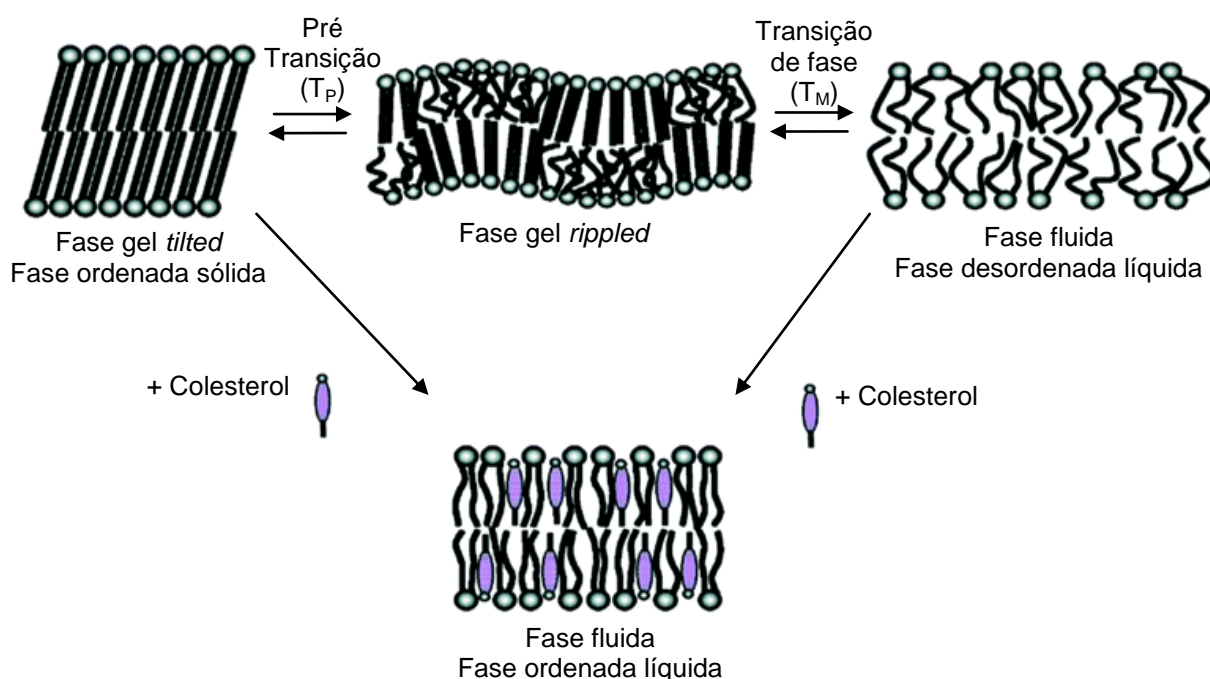
A composição básica dos lipossomos é de fosfolipídeos, com maior proporção de fosfatidilcolinas as quais são exemplos de lipídeos que se estabilizam em solução

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

Um dos critérios utilizados na caracterização dos fosfolipídeos 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 lipídeos 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).

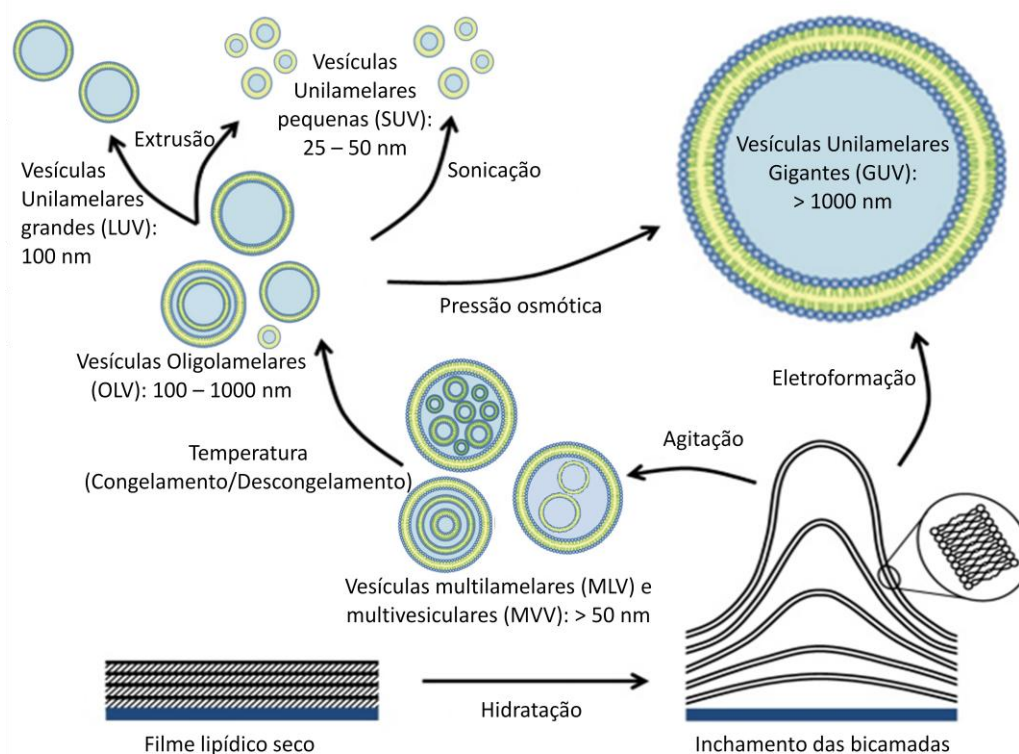


Fonte: Adaptado de Hasan (2017).

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).

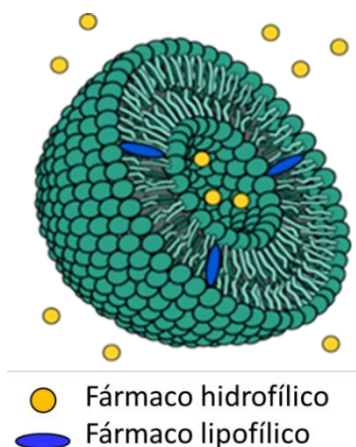
O tamanho das vesículas e o método escolhido deve ser adaptado para o tipo de fármaco a ser incorporado e os objetivos do estudo (TANDRUP SCHMIDT et al., 2016).

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).

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi realizar a síntese de derivados da mangiferina, avaliar o potencial antialérgico *in vitro*, e correlacionar a estrutura com a bioatividade. Além disso, as moléculas bioativas foram incorporadas em lipossomos com o intuito de melhorar a biodisponibilidade e explorar a influência na membrana biológica.

2.2. Objetivos específicos

- Síntese e caracterização de derivados do esqueleto xantônico da mangiferina;
- Avaliação, *in vitro*, do potencial antialérgico, da citotoxicidade e da inibição da atividade enzimática da β -hexosaminidase na presença da mangiferina e dos derivados sintéticos;
- Correlação de estrutura com a bioatividade dos compostos;
- Preparo de lipossomos para o estudo como nanocarreadores e como modelo de membrana biológica;
- Investigação das melhores condições de liofilização das formulações lipossomais, com relação à porcentagem e tipo de crioprotetor;
- Avaliação das propriedades físico-químicas dos lipossomos antes e após liofilização;
- Investigação da localização e influência da mangiferina na membrana lipossomal por meio das técnicas de calorimetria exploratória diferencial, anisotropia de fluorescência e ressonância paramagnética eletrônica.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1 Solventes e reagentes

Os solventes e reagentes comerciais utilizados na extração e síntese foram obtidos através da Sigma-Aldrich Brasil, Alfa Aesar, Merck e Synth, e foram purificados conforme descrito na literatura (PERRIN; ARMAREGO, 1988).

Os solventes (acetato de etila, acetona, clorofórmio, diclorometano, DMSO, etanol, éter dietílico, éter de petróleo, heptano, hexano, metanol e pentano) e os reagentes (ácido sulfúrico, ácido 2,4,5-trimetoxibenzoico, anidrido de trifluoracético, carbonato de potássio, cloridrato de piridina, dimetilacetamida, dimetilformamida, floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenzeno), hidróxido de tetrametilamônio, iodometano, pentóxido de fósforo, piperazina, piridina, sulfato de dimetila, sulfato de sódio e tribrometo de boro) foram adequadamente separados e enviados para o centro de tratamento de resíduos.

3.1.2 Material celular

- DNP-BSA (soro albumina bovina conjugada com uma média de 15 grupos de dinitrofenil) e anti-DNP-IgE (anticorpo monoclonal específico para reconhecimento de dinitrofenil): Cedidos pelo grupo Baird-Holowka, Cornell University, EUA;
- MUG (4-metilumbeliferil-N-acetil- β -D-glucosaminida): Sigma-Aldrich. A solução estoque foi preparada em DMSO (0,12 mol/L), e armazenada a -20°C . Para o ensaio direto, foi usada uma solução recém-preparada na concentração de 3,6 mmol/L em tampão de Tyrode (135 mmol/L de NaCl; 1,8 mmol/L de CaCl_2 ; 5 mmol/L de KCl; 1 mmol/L de MgCl_2 ; 5,6 mmol/L de glicose e 20 mmol/L de HEPES), pH 7,4. Para o ensaio padrão, a solução foi preparada na concentração de 1,2 mmol/L em tampão acetato pH 4,4;
- Mastócitos de ratos da linhagem RBL-2H3: Fornecidos pelo grupo das Profas. Dras. Maria Célia Jamur e Connie Oliver, FMRP-USP, e cultivadas em nosso laboratório;
- DMEM (meio mínimo essencial de cultura modificado): Gibco. Foi preparado pela mistura de 13,4 g de DMEM suplementado com sal de Eagles, 3,7 g de NaHCO_3 (Sigma-Aldrich), 10 mL de solução de antibiótico-antimicótico (Gibco) e 150 mL de soro bovino fetal inativado (LGC) em 1 L de água destilada, pH 7,4.

3.1.3 Outros materiais

- Lipídeos de fosfatidilcolina derivada de ovo (PC S), fosfatidiletanolamina derivada de ovo (1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, PE), colesterol (COL), 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano (DOTAP) e 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosforilcolina (DMPC): Lipoid;
- Triton X-100, mangiferina, HEPES, DMSO, NaCl, sacarose, trealose: Sigma-Aldrich;
- $MgCl_2$, $CaCl_2$ e KCl: J.T.Baker;
- Glicose: Gibco;
- Sondas 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) e N,N,N-Trimetil-4-(6-fenil-1,3,5-hexatrieno-1-yl)fenilamonio p-toluenossulfonato (TMA-DPH): Sigma-Aldrich;
- Marcadores de spin n-PCSL (1-acil-2-[n-(4,4-dimetiloxazolidina-N-oxil)estearoil]-sn-glicero-3-fosfocolina) com $n = 5, 7, 10, 12$ e 14 : Avanti Polar Lipids e Sigma-Aldrich.

3.1.4 Equipamentos analíticos

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de 1H) foram registrados a 300 e 500 MHz, e os espectros de Ressonância Magnética de Carbono-13 (RMN de ^{13}C) a 75 e 126 MHz, em espectrômetro BRUKER® - Modelo DRX300 ou DRX500 Ultra Shield, no Departamento de Química, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo. Os valores de deslocamentos químicos (δ) estão relatados em partes por milhão (ppm), utilizando-se como referência o tetrametilsilano (TMS). As multiplicidades dos sinais estão apresentadas entre parênteses (s = simpleto, d = duplete), os valores de constante de acoplamento (J) são dados em Hertz (Hz) e os números de hidrogênios são deduzidos a partir da integral relativa.

As análises de espectrometria de massas foram feitas por IES-EM (espectrometria de massas com ionização por “electrospray”) e foram realizadas em aparelho modelo ultrOTOFQ - ESI-TOF Mass Spectrometer, da Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA.

As análises cromatográficas em camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando-se cromatofolhas de alumínio de sílica gel 60 F254-MERCK. Para a visualização dos componentes nas análises em CCD, foi utilizada uma lâmpada ultravioleta (254 nm).

Os espectros de absorção foram registrados em espectrofotômetro Shimadzu UV-2550. A mangiferina teve sua absorbância registrada em $\lambda_{\text{máx}}$ de 368 nm e o noratiriol em $\lambda_{\text{máx}}$ de 364 nm. As análises foram medidas em cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico.

A fluorescência da metilumbeliferona foi registrada através do leitor para microplacas SynergyTM HT – Biotek, em λ_{exc} de 360 nm e λ_{em} de 450 nm. Nos estudos de viabilidade celular, o monitoramento da resorufina foi realizado em λ_{exc} de 530 nm e λ_{em} de 590 nm.

O monitoramento dos parâmetros físico-químicos dos sistemas lipossomais foi realizado por meio do equipamento Zetasizer Nano - ZS90 da Malvern Instruments em meio dispersante de água, com diluição de 1:100, temperatura de 25°C, laser de 10 mW HeNe, λ de 633 nm e ângulo de incidência de 90°.

Os dados de anisotropia de fluorescência foram obtidos pelo espectrofotômetro F-7000 FL, em λ_{exc} de 350 e 355 nm para as sondas DPH e TMA-DPH, respectivamente, com λ_{em} de 430 nm, velocidade de varredura de 240 nm/min, fendas de excitação e de emissão iguais a 5,0 nm e voltagem de 700 V.

Os efeitos da mangiferina nas transições de fase das vesículas de DMPC foram observados usando o microcalorímetro VP-DSC da empresa MicroCal (Microcal, Northampton, MA, EUA). A taxa de calor fornecida foi de 20°C/h em um intervalo de temperatura de 25 a 50°C.

Os espectros de RPE foram registrados em espectrômetro de Ressonância Paramagnética Eletrônica FA-200 da Jeol. A amostra teve sua temperatura controlada por banho circulador de água ligado a um radiador de alumínio acoplado à cavidade ressonante. A verificação da temperatura foi feita por meio de termopar (Fluke 51 KJ). A potência de micro-ondas utilizada foi de 10 mW, a frequência na ordem de 9,4 GHz, e amplitude da modulação do sinal entre 0,4 e 1,6 G.

3.1.5 Outros equipamentos

- Sistema purificador de água em osmose reversa OS10 LX da Gehaka;
- Agitador magnético: Corning PC-320 e IKA C-MAG H57;
- Balanças analíticas: AY 220 da Shimadzu; APX-200 da Denver Instrument; CP 225 D da Sartorius;
- Bombas de alto vácuo: Precision Model D 150; E2M5 (Edwards); V-700 Büchi;

- Evaporador rotatório com controlador de vácuo: Büchi R-215; IKA RV 10 Control;
- Colunador automático: CombiFlash® Rf+ UV-Vis da Teledyne Isco;
- Incubadora refrigerada shaker de bancada: CT 712 RN da Cientec;
- Centrífuga: Legend™ MACH 1.6 / R da Sorvall;
- Sonicador de ponta de titânio: Vibra-CellVCX 750;
- Agitador de tubos tipo vórtex: AP-56 da Phoenix;
- Savant Speedvac plus-Thermo Quest;
- Liofilizador: Líotop K 105;
- pHmetro digital PG 2000 da Gehaka.
- Termopar Fluke 51 KJ

3.1.6 Softwares

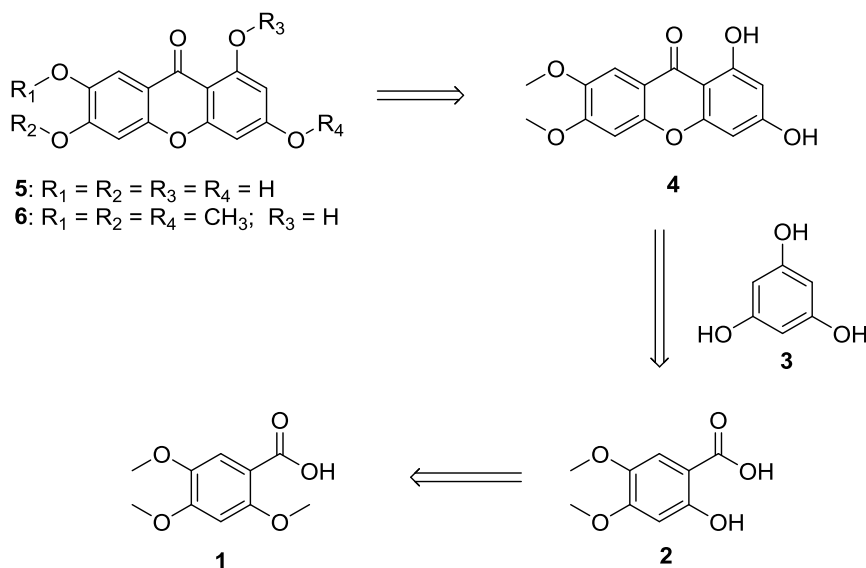
As estruturas químicas dos compostos descritos foram editadas usando o ChemBioDraw 13.0[®] da PerkinElmer Informatics, e os espectros de RMN de ¹H e ¹³C foram processados com o MestreNova[®] V6.0.2.-5475. Os gráficos foram confeccionados utilizando o OriginPro 8 SR0[®] V8.0724 (B724) ou Origin 7.0, e o tratamento estatístico foi realizado através do GraphPad Prism 6.01[®].

3.2 Métodos

3.2.1 Planejamento sintético dos derivados da mangiferina

A síntese dos derivados da mangiferina (**4**, **5** e **6**) foi planejada com base no esquema retrossintético apresentado abaixo (Esquema 2). Os compostos **5** (noratiriol) e **6** foram obtidos, respectivamente, a partir de reações de desmetilação e metilação do composto **4**.

Este composto **4**, por sua vez, foi obtido a partir da reação de condensação do floroglucinol (**3**) com o ácido salicílico dimetoxilado (**2**), o qual foi obtido da desmetilação seletiva do ácido 2,4,5-trimetoxibenzoico (**1**).

Esquema 2 - Retrossíntese dos derivados da mangiferina (**4**, **5** e **6**).

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.2.2 Sistemas lipossomais como nanocarreadores

3.2.2.1 Validação de método analítico para quantificação do bioativo

A validação do método analítico foi baseada na quantificação da mangiferina, em lipossomos, por espectrofotometria UV-VIS e foi realizada de acordo com as diretrizes da ANVISA (RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 – “Guia para validação de métodos analíticos”) (ANVISA, 2017), utilizando-se os seguintes parâmetros analíticos: limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão, exatidão e seletividade.

Para a determinação do limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão e exatidão intra e interensaios, uma solução estoque de mangiferina 0,5 mmol/L, em metanol, foi preparada em 3 dias consecutivos. Em cada dia, a solução estoque foi diluída para obter as concentrações de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 $\mu\text{mol/L}$ no diluente tampão de Tyrode (pH 7,4) e etanol, na proporção de 1:5. Nos 3 dias, todas as diluições foram feitas em triplicatas, exceto as concentrações de 30, 40 e 50 $\mu\text{mol/L}$ que foram feitas em quintuplicatas no primeiro dia. As medidas de absorbância das amostras foram registradas em $\lambda_{\text{máx}}$ de 368 nm.

A partir da utilização da lei de Beer-Lambert (Equação 1), foi possível relacionar a absorbância da solução e sua concentração, quando atravessada por uma radiação luminosa monocromática (SWINEHART, 1962).

Equação 1

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

Na Equação 1, **A** é a absorvância, ε é o coeficiente de absorvidade molar da espécie em estudo, **b** é o caminho óptico ou a distância percorrida pela radiação através da solução, e **c** é a concentração molar da espécie em solução.

3.2.2.1.1 Limite de detecção

O limite de detecção (LD) foi calculado pela Equação 2, baseando-se na curva analítica interensaio, onde DP é o desvio padrão médio do intercepto com o eixo y de, no mínimo, 3 curvas padrão, e IC é a inclinação da curva.

Equação 2

$$LD = \frac{DP \times 3}{IC}$$

3.2.2.1.2 Limite de quantificação

Para o cálculo do limite de quantificação (LQ), a solução de menor concentração (10 $\mu\text{mol/L}$) foi diluída em tampão de Tyrode pH 7,4, e etanol, na proporção de 1:5, a fim de obter soluções nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 0,8; 1; 2; 3; 5 e 8 $\mu\text{mol/L}$. Tais soluções tiveram suas absorvâncias registradas em $\lambda_{\text{máx}}$ de 368 nm, com o intuito de identificar a concentração mínima que poderia ser quantificada pelo equipamento, com precisão e exatidão convenientes.

3.2.2.1.3 Linearidade

Para a determinação da linearidade foram analisados os coeficientes de correlação linear (r) das curvas analíticas obtidas sendo que, para a validação ser aceita, os valores devem ser considerados, no mínimo, iguais a 0,99.

3.2.2.1.4 Precisão intra e interensaio

As precisões intra e interensaio foram calculadas através do coeficiente de variação (CV) (Equação 3), que é dado pelo desvio padrão (DP) das curvas intra ou interensaio dividido pela média dos valores obtidos. Para o método ser aceito, as precisões não devem ser superiores a 5 %.

Equação 3

$$CV = \frac{DP}{Média} \times 100$$

3.2.2.1.5 Exatidão intra e interensaio

As exatidões intra e interensaio foram determinadas pela Equação 4, a qual relaciona a concentração média experimental com a concentração teórica. Para o método ser considerado aceito, os valores obtidos devem estar próximos a 100 %.

Equação 4

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

3.2.2.1.6 Seletividade

Com relação aos critérios de seletividade, uma solução de mangiferina 0,5 mmol/L foi preparada em metanol. A seguir, a mesma foi diluída para 40 µmol/L em tampão de Tyrode pH 7,4 e etanol, na proporção de 1:5, em triplicata, e a absorbância foi registrada em 368 nm. Após este procedimento, novas triplicatas de soluções de mangiferina 40 µmol/L foram preparadas, porém, sendo contaminadas com concentrações de 100 µmol/L e 0,39 mmol/L de lipossomo branco, a fim de verificar se a quantificação do bioativo era mantida na presença de outros componentes.

3.2.2.2 Preparação dos lipossomos

Os lipossomos foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico (Figura 13) (LONDOÑO-LONDOÑO et al., 2010), utilizando os lipídeos PC, PE, COL e DOTAP, nas formulações PC:PE:COL (52:28:20) e PC:PE:COL:DOTAP (52:24:16:8). Foram avaliadas as concentrações lipídicas totais iguais a 2,9; 14,5 e 29 mmol/L, e razões bioativo/lipídeo iguais a 0,01; 0,02; 0,04 e 0,10. Inicialmente, foram preparadas soluções estoque para cada lipídeo em um volume de 10 mL, sendo que PC, COL e DOTAP foram solubilizados em etanol, e PE em clorofórmio. Em seguida, 4,5 mL de cada um dos lipídeos foram pipetados em dois balões de fundo redondo, sendo um para o branco e outro para a amostra, a fim de obter as concentrações lipídicas desejadas para cada formulação. No balão contendo a

amostra, foram adicionados 6 ou 12 mL de solução de mangiferina, ou noratiríol, para obter concentrações finais iguais a 300 ou 600 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente, a partir de soluções estoque de 0,5 mmol/L do bioativo, preparada em metanol. Posteriormente, os solventes foram removidos por rotaevaporação e os filmes lipídicos formados foram hidratados com 10 mL de tampão de Tyrode, nos pHs 7,4; 7,0 ou 6,5, nas temperaturas de 25°C ou 75°C. As suspensões lipossomais foram agitadas em vórtex por 10 minutos, homogeneizadas em sonicador de ponta de titânio (Vibra-CellVCX 750) por 10 minutos, na temperatura de 48°C, amplitude de 40% e diâmetro de 13 mm, e filtradas em Millipore de 0,45 μm .

Figura 13 - Método de hidratação do filme lipídico para preparo dos lipossomos.



Fonte: Elaborada pelo autor.

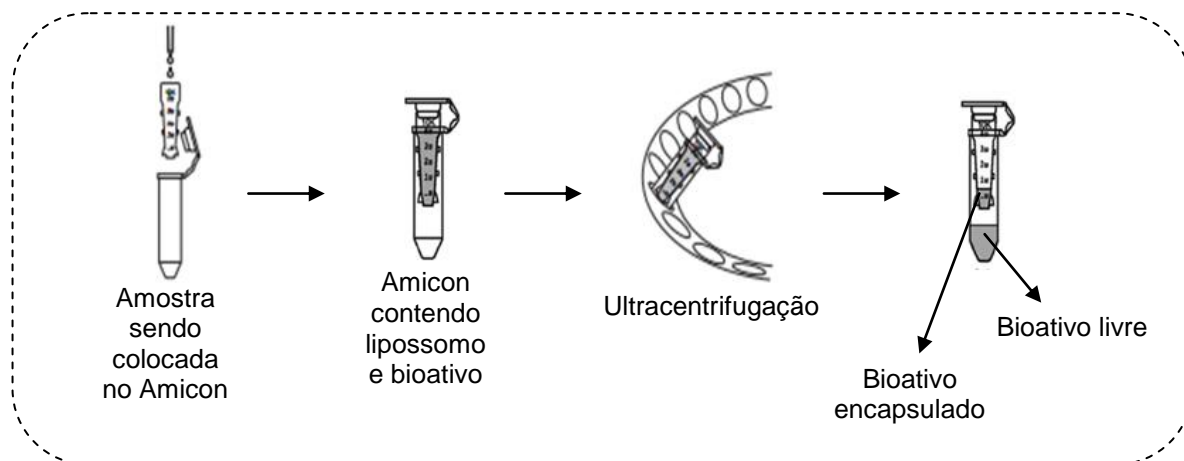
3.2.2.3 Caracterização físico-química dos lipossomos

3.2.2.3.1 Eficiência de encapsulação e capacidade de carga dos bioativos nos lipossomos

A eficiência de encapsulação (EE) e a capacidade de carga (CC) foram determinadas através do método indireto, como representado na Figura 14. Neste método, a suspensão lipossomal contendo o bioativo foi colocada em filtros Amicon

de ultracentrifugação, capazes de separar as partículas de acordo com o tamanho dos poros e, conseqüentemente, realizar a separação do bioativo livre e encapsulado.

Figura 14 - Esquema representativo do método indireto para determinação da eficiência de encapsulação e capacidade de carga de bioativos em sistemas nanocarreadores.



Fonte: Adaptado de Techniques To Go (2014) e Merck (2018).

Nesta etapa, foi retirada uma alíquota da suspensão lipossomal, antes de ultracentrifugar, com posterior diluição em etanol na proporção 1:5, e determinação da absorbância da mangiferina total em 368 nm, ou do noratiriol total em 364 nm. Em seguida, 1 mL da suspensão lipossomal foi colocado em filtro Amicon Ultra 50K para centrifugação a 4000 x g, por 40 minutos, a 25°C. A solução do filtrado foi diluída em etanol na proporção 1:5 e o bioativo livre foi determinado, também, por absorbância nos mesmos comprimentos de onda mencionados para a mangiferina e noratiriol total.

A EE e a CC foram determinadas utilizando-se as Equações 5 e 6, respectivamente, a partir da relação entre a concentração total do bioativo na suspensão lipossomal ($[B]_{total}$), e a concentração do bioativo livre contida na alíquota centrifugada ($[B]_{livre}$), ambas obtidas por meio de curvas analíticas. No entanto, para a determinação da EE, a concentração do bioativo encapsulado ($[B]_{total} - [B]_{livre}$) foi relacionada com a concentração total do bioativo ($[B]_{total}$), enquanto para a determinação da CC, a concentração do bioativo encapsulado foi relacionada com a concentração total de lipídeos ($[Lipídeos]_{totais}$) (XU; DU, 2003).

Equação 5

$$\% EE = \left(\frac{[B]_{\text{total}} - [B]_{\text{livre}}}{[B]_{\text{total}}} \right) \times 100$$

Equação 6

$$\% CC = \left(\frac{[B]_{\text{total}} - [B]_{\text{livre}}}{[\text{Lipídeos}]_{\text{totais}}} \right) \times 100$$

3.2.2.3.2 Determinação do tamanho de partícula e índice de polidispersividade

O diâmetro hidrodinâmico dos lipossomos e o índice de polidispersividade (Pdl) das dispersões lipossomais foram determinados por meio de medidas de espalhamento dinâmico de luz (DLS), em equipamento Zetasizer Nano - ZS90 da Malvern Instruments, usando laser de HeNe operando a 10 mW, λ de 633 nm, ângulo de detecção de 90° e temperatura de 25°C. Para as leituras, as dispersões foram diluídas em água destilada na proporção de 1:100, e colocadas em celas de 1 cm de caminho óptico.

3.2.2.3.3 Determinação do potencial Zeta

O potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento da partícula, o chamado potencial Zeta (PZ), foi determinado pela mobilidade eletroforética das partículas submetidas a um campo elétrico, por meio do equipamento Zetasizer Nano - ZS90 da Malvern Instruments, utilizando cela eletroforética. As leituras foram realizadas pela diluição das suspensões em água destilada na proporção de 1:100, uma vez que a presença de íons livres no meio já estava garantida em virtude do processo de hidratação ter sido realizado em tampão. A condutividade foi mantida em torno de 0,2 mS/cm.

3.2.2.3.4 Estabilidade preliminar das formulações lipossomais

As formulações lipossomais, na ausência e presença do bioativo, foram armazenadas na temperatura de 5°C, e tiveram suas estabilidades monitoradas pelo período de 22 ou de 29 dias, através do acompanhamento do tamanho de partícula, índice de polidispersividade e potencial Zeta.

3.2.2.4 Processo de liofilização dos lipossomos

Após o preparo dos lipossomos conforme descrito no item 3.2.2.2, um volume dos lipossomos branco e contendo a amostra foram separados para procedimento de liofilização. Para tanto, foram adicionados os crioprotetores de trealose e sacarose nas concentrações de 5 e 10 % (p/v). Os lipossomos foram homogeneizados em agitador de tubos vórtex, congelados a -80°C , por 24 horas, e em seguida, colocados em liofilizador (Líotop K 105) por 2 dias, a -90°C e condição de vácuo abaixo de $500\ \mu\text{Hg}$. Após o procedimento, foram ressuspensos em água destilada, novamente homogeneizados até completa dispersão, e filtrados em filtro Millipore de $0,45\ \mu\text{m}$.

3.2.3 Ensaios biológicos

3.2.3.1 Preparação das células

As células RBL-2H3 (BARSUMIAN et al., 1981) foram crescidas em frascos de cultura de células de 25 ou $75\ \text{cm}^2$ em DMEM. As células aderidas em monocamadas foram lavadas com PBS (0,2 g KCl, 8 g de NaCl, 1,15 g de Na_2HPO_4 e 0,2 g de KH_2PO_4 para 1 L) 3 dias após a repicagem, e tratadas com tripsina-EDTA 0,05 %, sendo incubadas durante 5 minutos, a 37°C e 5 % de CO_2 . Em seguida, foram centrifugadas e ressuspensas em 1 mL de DMEM para render a suspensão celular igual a 5×10^5 cél/mL, e as células foram, então, sensibilizadas pela adição de anti-DNP-IgE na concentração de $0,5\ \mu\text{g/mL}$. Finalmente, $100\ \mu\text{L}$ da suspensão celular foram colocados em uma placa de cultura com 96 compartimentos e incubados durante a noite a 37°C e 5 % de CO_2 .

3.2.3.2 Modelo biossensor baseado em mastócitos (ensaio direto)

As células RBL sensibilizadas pela IgE e aderidas em microplacas de 96 compartimentos, com 70 % de confluência, foram lavadas em tampão de Tyrode pH 7,4, a temperatura ambiente, e incubadas após a adição de $100\ \mu\text{L}$ do bioativo, nas concentrações de 0,05 a $300\ \mu\text{mol/L}$, por 20 minutos, a 37°C e 5 % de CO_2 . Em seguida, foram estimuladas por $100\ \mu\text{L}$ do antígeno DNP-BSA (concentração final de $0,1\ \mu\text{g/mL}$ em tampão de Tyrode pH 7,4) e incubadas por 1 hora, a 37°C e 5 % de CO_2 . Posteriormente, a placa de cultura foi deixada em banho de gelo por 10 minutos a fim de parar a reação de desgranulação, sendo, então, tratadas com 100

μL do substrato MUG (concentração final de 1,2 mmol/L) para β -hexosaminidase, seguida de incubação por 30 minutos, a 37°C e 5 % de CO_2 . Os experimentos foram realizados em, no mínimo, triplicata.

3.2.3.3 Ensaio padrão

O preparo inicial das células RBL foi conduzido como descrito no item 3.2.3.1. No entanto, neste caso, as células foram tratadas com 150 μL do bioativo livre, nas mesmas concentrações e condições de incubação já descritas (item 3.2.3.2). O estímulo antigênico foi feito pela adição de 150 μL da solução de antígeno, também nas mesmas condições descritas no item 3.2.3.2. A reação de desgranulação foi parada em banho de gelo por 10 minutos e, em seguida, foram retirados 25 μL do sobrenadante celular e transferidos para uma nova placa de cultura, contendo 100 μL de MUG preparado em tampão acetato pH 4,4. Por fim, foram adicionados 175 μL de tampão carbonato pH 10 para cessar a reação. Os experimentos foram realizados em, no mínimo, triplicata.

3.2.3.4 Quantificação da β -hexosaminidase

O perfil de inibição da desgranulação foi feito pela quantificação da enzima β -hexosaminidase liberada pelas células. A liberação espontânea das células foi medida para eliminar componentes não específicos da desgranulação, sendo determinada em tampão de Tyrode pH 7,4. A liberação total da β -hexosaminidase (100 %) foi determinada para as células contendo 0,1 % de Triton X-100. Para eliminar as interferências causadas pela fluorescência do tampão de Tyrode, a reação enzimática foi realizada na presença deste tampão. A atividade da β -hexosaminidase no sobrenadante foi quantificada por fluorescência em um leitor para microplacas (SynergyTM HT - Biotek) com λ_{exc} e λ_{em} iguais a 360 e 450 nm, respectivamente. A β -hexosaminidase liberada foi expressa como uma porcentagem da β -hexosaminidase total determinada pelas células destruídas com Triton X-100 (Equação 7). Os valores de CI_{50} foram determinados, graficamente, a partir de curvas de % de β -hexosaminidase *versus* concentração de bioativo.

S (Amostra): células (+), DNP-BSA (+), substância teste (+) ou (-);

N (Normal): células (-), DNP-BSA (-), substância teste (-);

T (Total): células (+), DNP-BSA (-), substância teste (-), Triton X-100 (+).

Equação 7

$$\% \beta - \text{Hex} = \left(\frac{S - N}{T - N} \right) \times 100$$

3.2.3.5 Inibição da atividade enzimática da β -hexosaminidase

A suspensão celular na concentração de 1×10^6 cél/mL foi centrifugada, ressuspendida em 3 mL de Tyrode, e adicionada a 30 μ L de Triton X-100 (0,1 %) para lise celular e consequente liberação da enzima. A solução foi homogeneizada, centrifugada e o sobrenadante foi diluído para 5×10^5 cél/mL em um volume final de 3 mL de Tyrode. A solução enzimática (45 μ L) e as soluções diluídas das amostras teste (5 μ L) foram transferidas para uma placa de 96 compartimentos e incubadas a 37°C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 50 μ L da solução de substrato fluorogênico MUG (concentração final de 1,2 mmol/L em tampão acetato pH 4,4), sendo incubadas, novamente, a 37°C, por mais 30 minutos. A reação foi finalizada pela adição de 200 μ L de uma solução tampão $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 0,1 mol/L, pH 10. A fluorescência foi medida usando um leitor para microplacas com λ_{exc} igual a 360 nm e λ_{em} igual a 450 nm.

3.2.3.6 Viabilidade celular

Um volume de 200 μ L de células RBL-2H3, na suspensão de $1,5 \times 10^5$ cél/mL, foi cultivado em placa de cultura de células com 96 compartimentos e incubado por toda a noite a 37°C e 5 % CO_2 . Após este período, o meio de cultura foi removido e as células lavadas com 200 μ L de tampão PBS. Nos poços destinados ao branco (meio de cultura sem células) e ao controle (meio de cultura com células) foram adicionados 200 μ L de DMEM. Nos demais poços, foram acrescentados 200 μ L de soluções dos bioativos (mangiferina ou noratiriol) preparadas em DMEM nas concentrações de 0 a 300 μ mol/L, ou 200 μ L das suspensões lipossomais, também preparadas em DMEM, nas concentrações de 1,5 a 28 mmol/L. Nova incubação foi realizada por 2 horas, ou 24 horas, a 37°C e 5 % de CO_2 . Posteriormente, o meio de cultura foi descartado e 200 μ L de DMEM foram adicionados juntamente com 5 μ L do corante resazurina, diluído 10 vezes a partir de uma solução estoque de 10 mg/mL em PBS. A placa foi incubada por mais 3 horas, a 37°C e 5 % de CO_2 , e a fluorescência foi monitorada usando um leitor para

microplacas (λ_{exc} igual a 530 nm e λ_{em} igual a 590 nm). A porcentagem de células viáveis em cada suspensão foi determinada pela Equação 8.

Equação 8

$$\% \text{ Viabilidade celular} = \left(\frac{S - B}{C - B} \right) \times 100$$

S (Amostra): célula (+), resazurina (+), substância teste (+);

B (Branco): célula (-), resazurina (+), substância teste (-);

C (Controle): célula (+), resazurina (+), substância teste (-).

3.2.4 Sistemas lipossomais como modelos de membrana biológica

3.2.4.1 Calorimetria Exploratória Diferencial

Inicialmente, foram preparadas soluções estoque do lipídeo DMPC em clorofórmio, e mangiferina em metanol. Em seguida, as soluções foram misturadas em tubos cônicos de vidro e a solução final foi evaporada em fluxo de gás nitrogênio para a formação de um filme lipídico nas paredes do tubo. Para garantir a completa eliminação de resíduos de clorofórmio, as amostras foram submetidas à ultracentrifugação sob vácuo (Speed Vac Concentrator – Thermo Cientific) por, no mínimo, 2 horas. Em seguida, as amostras foram hidratadas com um volume adequado de tampão HEPES (20 mmol/L) em pH 7,4. Para a realização das medidas, foi utilizada uma proporção de bioativo:lipídeo de 1:20 [mangiferina (0,15 mmol/L):DMPC (3 mmol/L)].

Os efeitos da mangiferina na transição de fases do DMPC foram monitorados por um microcalorímetro VP-DSC - MicroCal, situado no Laboratório de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas”, IFSC - USP. Foi escolhida a taxa de fornecimento de calor de 20°C/h, em um intervalo de 25 a 50°C, e os termogramas foram registrados apenas durante o aquecimento das amostras. Para garantir a reprodutibilidade dos termogramas, as amostras foram mantidas em equilíbrio térmico a 50°C, durante 15 minutos, e os termogramas foram registrados até que houvesse reprodutibilidade. O tratamento e a análise dos dados foram realizados por meio do software desenvolvido para o Origin 7.0 e fornecido pela MicroCal.

3.2.4.2 Anisotropia de fluorescência

Inicialmente, o lipídeo de DMPC foi solubilizado em etanol a fim de se obter uma concentração lipídica total de 0,5 mmol/L, em ausência do bioativo. Em seguida, foram adicionadas alíquotas de soluções estoque 3 mmol/L das sondas, DPH ou TMA-DPH, preparadas em clorofórmio e metanol, respectivamente, para obter a concentração final de 2 μ mol/L. O solvente foi removido por rotaevaporação, e o filme lipídico formado foi hidratado em tampão de Tyrode, pH 7,4, agitado em vórtex por 10 minutos, sonificado em sonicador de ponta de titânio e filtrado em filtro Millipore de 0,45 μ m, conforme descrito no item 3.2.2.2. Em seguida, foram adicionadas à suspensão lipossomal alíquotas da solução estoque de mangiferina (3,0 mmol/L em metanol) de forma a obter concentrações finais de 0, 50 e 100 μ mol/L do bioativo. As suspensões lipossomais foram incubadas a 37°C, por 30 minutos. Os dados de anisotropia de fluorescência foram obtidos pelo espectrofotômetro F-7000 FL, em λ_{exc} de 350 e 355 nm para as sondas DPH e TMA-DPH, respectivamente, com λ_{em} de 430 nm, velocidade de varredura de 240 nm/min, fendas de excitação e de emissão iguais a 5,0 nm e voltagem de 700 V.

3.2.4.3 Ressonância Paramagnética Eletrônica

Para os experimentos de RPE, foram preparados, em tubos de vidro, lipossomos constituídos por DMPC ou DMPC:COL (8:2) na concentração de 10 mmol/L, contendo os marcadores de spin 5-PCSL, 7-PCSL, 10-PCSL, 12-PCSL ou 14-PCSL (0,5 % da concentração de lipídeo) todos solubilizados em clorofórmio, na ausência e presença de mangiferina (1 mmol/L) preparada em metanol.

A suspensão final foi evaporada em fluxo de gás nitrogênio, formando um filme fino nas paredes do tubo. Para garantir a completa eliminação de resíduos de clorofórmio, as amostras foram submetidas à ultracentrifugação sob vácuo (Savant Speedvac plus Thermo Quest) por 2 horas, e armazenadas em freezer a -20°C. Na sequência, as amostras foram hidratadas em volume adequado de tampão HEPES (10 mmol/L) em pH 7,4, e as soluções foram agitadas em vórtex, sendo, em seguida, transferidas para tubos capilares, e centrifugadas por 10 minutos, a 15000 x g. O procedimento garantiu a formação de dispersões lipídicas na extremidade dos capilares, com o intuito de aumentar a relação sinal-ruído das amostras nas medidas de RPE. As quantidades de lipídeo e fármaco utilizadas forneceram uma mistura de bioativo:lipídeo na razão molar de 1:10 [mangiferina (1 mmol/L):DMPC (10 mmol/L)].

As leituras foram realizadas em espectrômetro de Ressonância Paramagnética Eletrônica FA-200 da Jeol. A temperatura da amostra foi controlada por um banho circulador de água ligado a um radiador de alumínio acoplado à cavidade ressonante, e monitorada por um termopar Fluke 51 KJ. Foi utilizada uma potência de micro-ondas de 10 mW, frequência da ordem de 9,4 GHz, e amplitude da modulação do sinal em uma faixa de 0,4 a 1,6 G.

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As xantonas, importante classe de heterocíclicos oxigenados, são amplamente distribuídas na natureza e exibem atividades biológicas diversas dependendo de sua estrutura química e posição de substituintes no anel aromático (NEGI et al., 2013). Seu esqueleto estrutural e suas propriedades farmacológicas importantes têm encorajado o isolamento ou a síntese de novas moléculas como candidatos a novos fármacos (AHMAD et al, 2016; WANG et al., 2017).

O primeiro estudo sobre a síntese de derivados xantônicos visando novos fármacos antialérgicos data de 1972, quando Pfister e colaboradores sintetizaram uma série de derivados do ácido 2-carboxílico-xantona e observaram que a posição de grupos metóxi no anel aromático influencia a bioatividade (PFISTER; FERRARESI; ROOKS, 1972). Em seguida, Jones e colaboradores (1977) sintetizaram novos compostos derivados do ácido 2,7-dicarboxílico-xantona e observaram que a atividade antialérgica é aumentada quando o grupo ácido é substituído por amida (JONES et al., 1977). Nas últimas duas décadas, um número expressivo de xantonas tem sido sintetizado, ou isolado de fontes naturais, com foco principalmente na atividade anticâncer (HAN et al., 2016; LIU et al., 2016). No entanto, em todos esses anos nenhuma informação relevante foi acrescentada ao potencial antialérgico de xantonas.

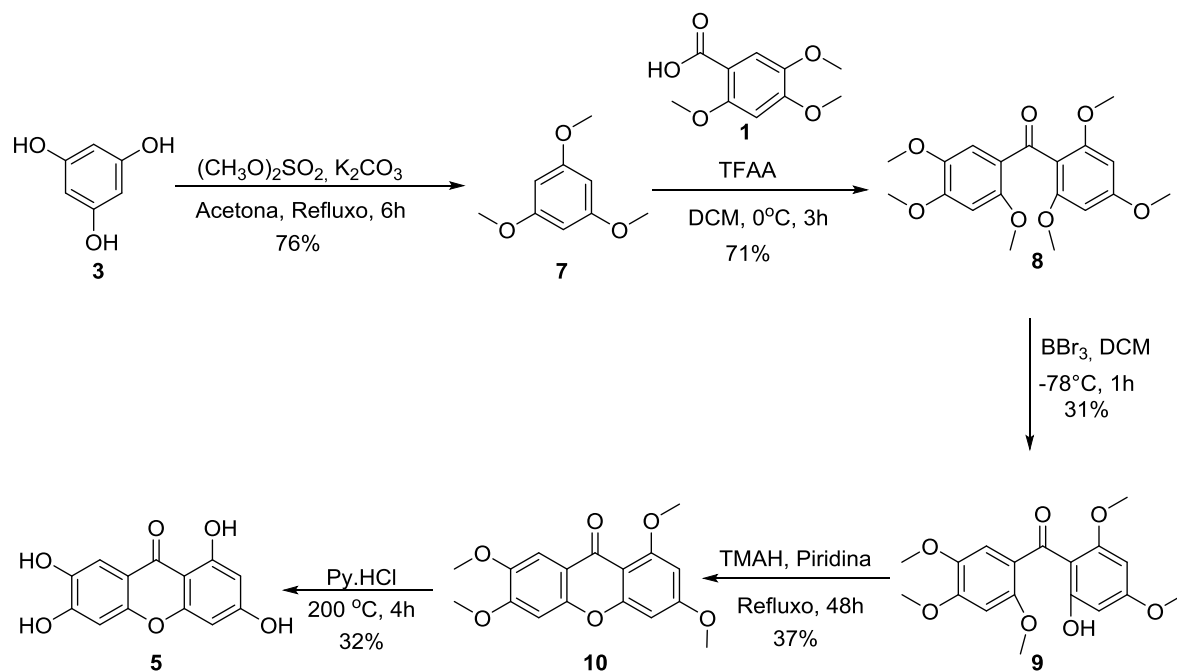
Como já mencionado, a mangiferina (Figura 7) é uma C-glicosídeo xantona, cuja estrutura apresenta potencial antialérgico, e em virtude da carência de conhecimentos sobre a importância dos grupos substituintes nessa propriedade, foi realizado neste estudo a síntese de análogos da mangiferina, com modificações pontuais das hidroxilas fenólicas, além da exclusão do grupo glicosídeo da molécula. A compreensão da relação estrutura-atividade foi avaliada através da inibição da desgranulação mastocitária determinada pelo modelo biossensor baseado em mastócitos (NAAL et al., 2004).

4.1 Obtenção dos derivados da mangiferina

4.1.1 Rota sintética 01

Inicialmente, foi delineada a rota sintética 01 apresentada no Esquema 3. Com essa rota foi sintetizado o noratiriol (composto **5**) cuja estrutura é similar à mangiferina, porém, sem o anel glicosídico. Ressalta-se que a síntese desta estrutura é importante pelo fato de que a quebra da ligação carbono-glicosídeo no anel xantônico ocorre com a ação de enzimas, normalmente presentes na flora intestinal. Portanto, é uma das estruturas considerada como metabólito da mangiferina no organismo (WANG et al., 2007). Os produtos obtidos das reações da rota sintética 01 foram confirmados por espectros de RMN de ^1H , sendo comparados com a literatura, e podem ser vistos nos Apêndices.

Esquema 3 - Rota sintética 01 inicialmente proposta para obtenção dos derivados da mangiferina.

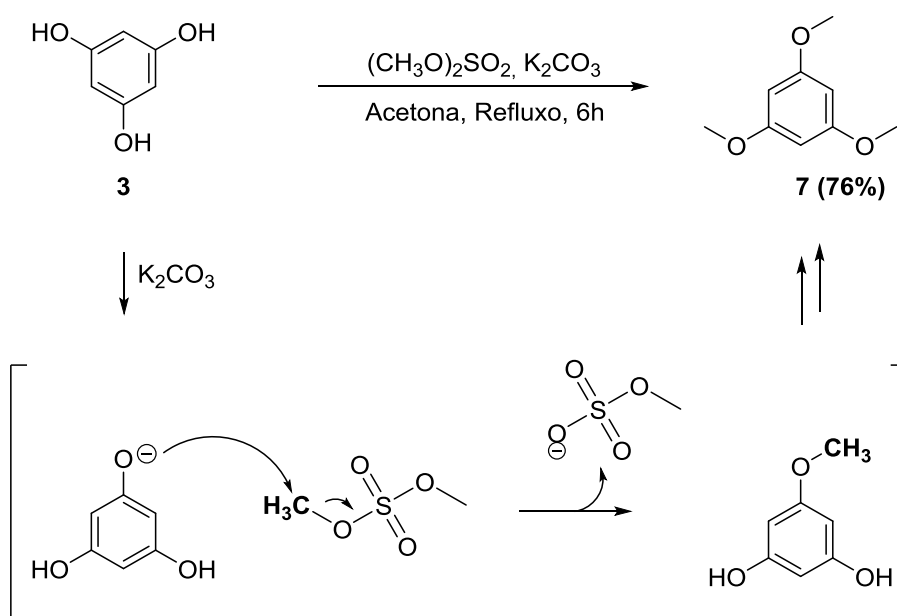


Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.1.1 Síntese do 1,3,5-trimetoxibenzeno (7)

A primeira etapa para a obtenção do noratiriol envolveu a permetilação do floroglucinol (**3**) ao 1,3,5-trimetoxibenzeno (**7**). Tal reação ocorreu pela formação do fenolato em meio básico, que ao reagir com o sulfato de dimetila, utilizado em excesso, fornece o produto alquilado (Esquema 4). Esta reação foi obtida com 76 % de rendimento, um valor abaixo do obtido (94 %) por Babu e colaboradores (2012) (BABU et al., 2012). O RMN de ^1H obtido para a molécula (Apêndice A) foi comparado com a literatura (YANG et al., 2011).

Esquema 4 - Síntese e mecanismo de formação do composto **7**.

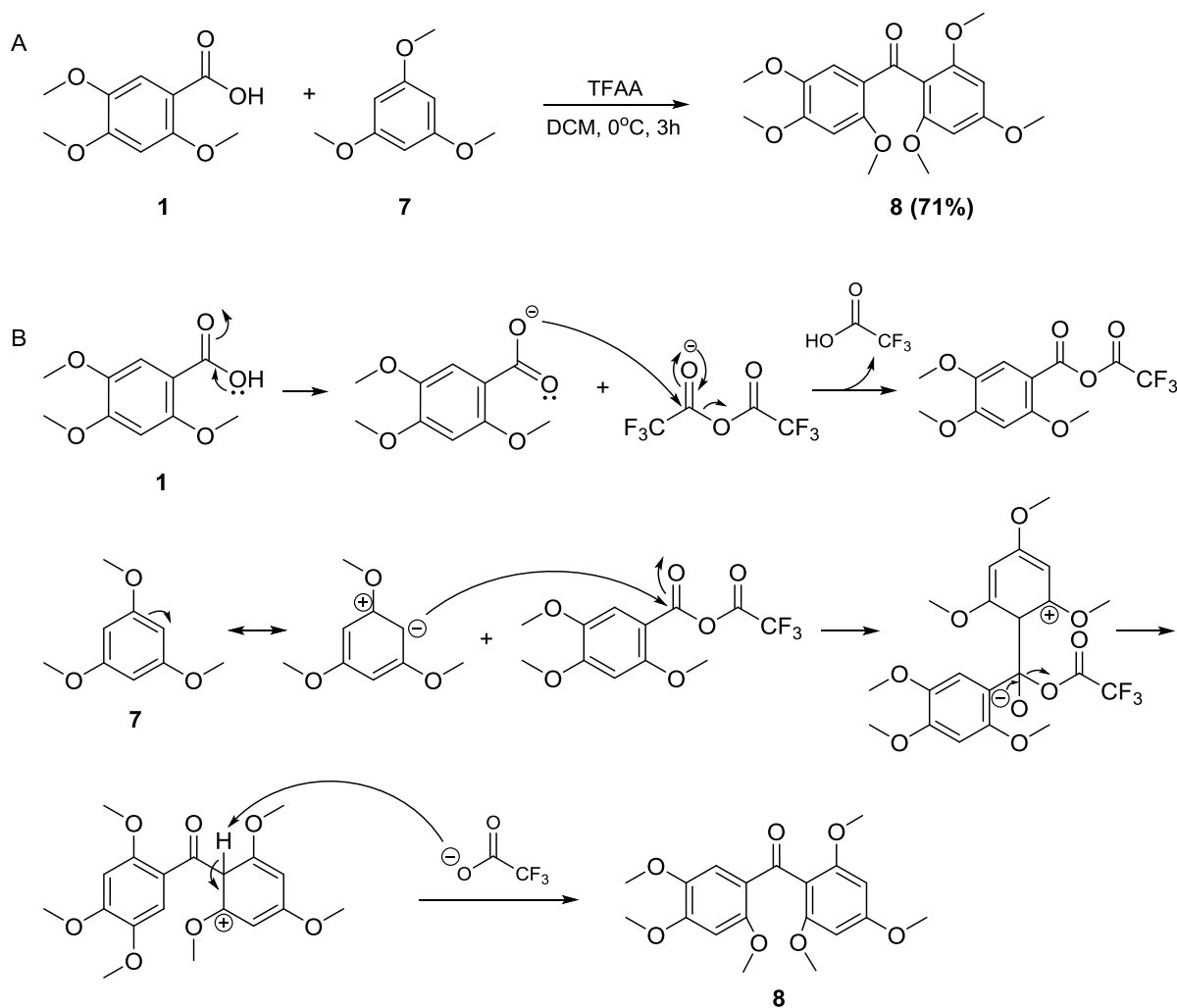


Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.1.2 Síntese do (2,4,5-trimetoxifenil)-(2,4,6-trimetoxifenil) metanona (8)

Na segunda etapa, foi realizada a condensação de **7** com o ácido 2,4,5-trimetoxibenzoico (**1**), levando à formação do (2,4,5-trimetoxifenil) (2,4,6-trimetoxifenil) metanona (**8**). Esta reação ocorreu pela utilização de anidrido de trifluoracético (TFAA) como catalisador, cuja função é formar um intermediário mais reativo, a fim de favorecer a substituição em posição específica (Esquema 5). O procedimento adotado foi baseado no trabalho de Aurell e colaboradores (1989), o qual levou à produção de um composto semelhante (AURELL et al., 1989). O rendimento foi de 71 %, estando próximo ao obtido no trabalho citado (67 %), e os dados de RMN de ^1H (Apêndice B) também estão condizentes com a literatura.

Esquema 5 - Síntese do composto **8** (A), e mecanismo proposto para a reação (B).

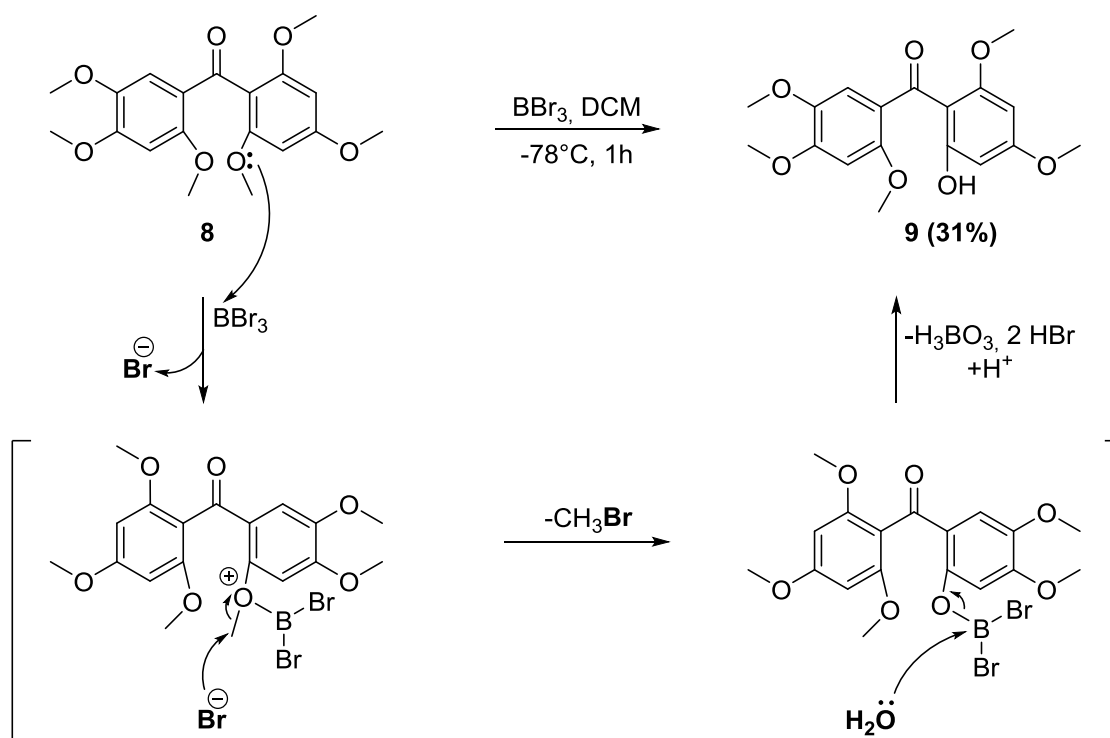


Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.1.3 Síntese do (2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)-(2,4,5-trimetoxifenil) metanona (9)

Na terceira etapa da reação, o composto **8**, na presença do ácido de Lewis tribrometo de boro (BBr_3), levou à formação do (2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil) (2,4,5-trimetoxifenil) metanona (**9**), em um processo de monodesmetilação do anel em posição orto à função carbonila (orto-desmetilação seletiva) (Esquema 6). O BBr_3 permite a formação de um intermediário catiônico, o qual direciona a hidrólise para posição específica. O rendimento desta reação foi de 31 %, muito inferior ao obtido pela metodologia apresentada por Kuhakarn e colaboradores (2011), os quais obtiveram um composto semelhante com 82 % de rendimento (KUHAKARN et al., 2011). Os dados de RMN de ^1H do composto **9** (Apêndice C) foram comparados aos descritos no trabalho citado e ambos apresentaram características semelhantes.

Esquema 6 - Síntese e mecanismo de formação do composto **9**.

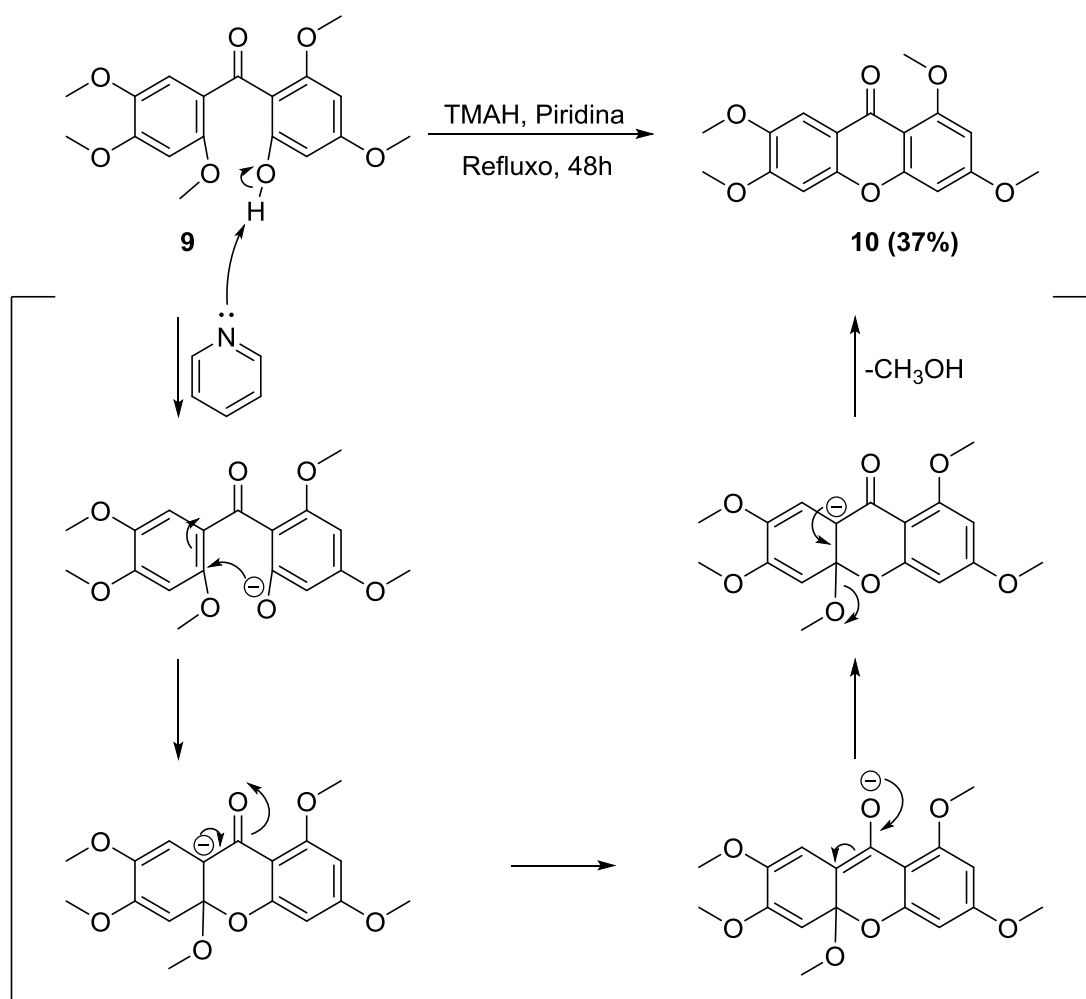


Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.1.4 Síntese do 1,3,6,7-tetrametoxi-9H-xanten-9-ona (10)

Para a formação do 1,3,6,7-tetrametoxi-9H-xanten-9-ona (**10**) foi utilizado o composto **9**, em presença de piridina e hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) (Esquema 7), o qual é uma base forte e tem a função de regenerar a piridina no sistema. A reação, portanto, envolveu uma ciclização catalisada por base, com eliminação de metanol, seguindo metodologia apresentada por Dai e colaboradores (2013), os quais produziram um composto semelhante, diferenciado apenas na posição de uma metoxila (DAI et al., 2013). O composto **10** foi obtido com 37 % de rendimento, sendo este um valor inferior ao esperado (83 %). Os dados de RMN de ^1H (Apêndice D) foram confirmados com a literatura (QIN; YANG; YANG, 2014).

Esquema 7 - Síntese e mecanismo de formação do composto **10**.

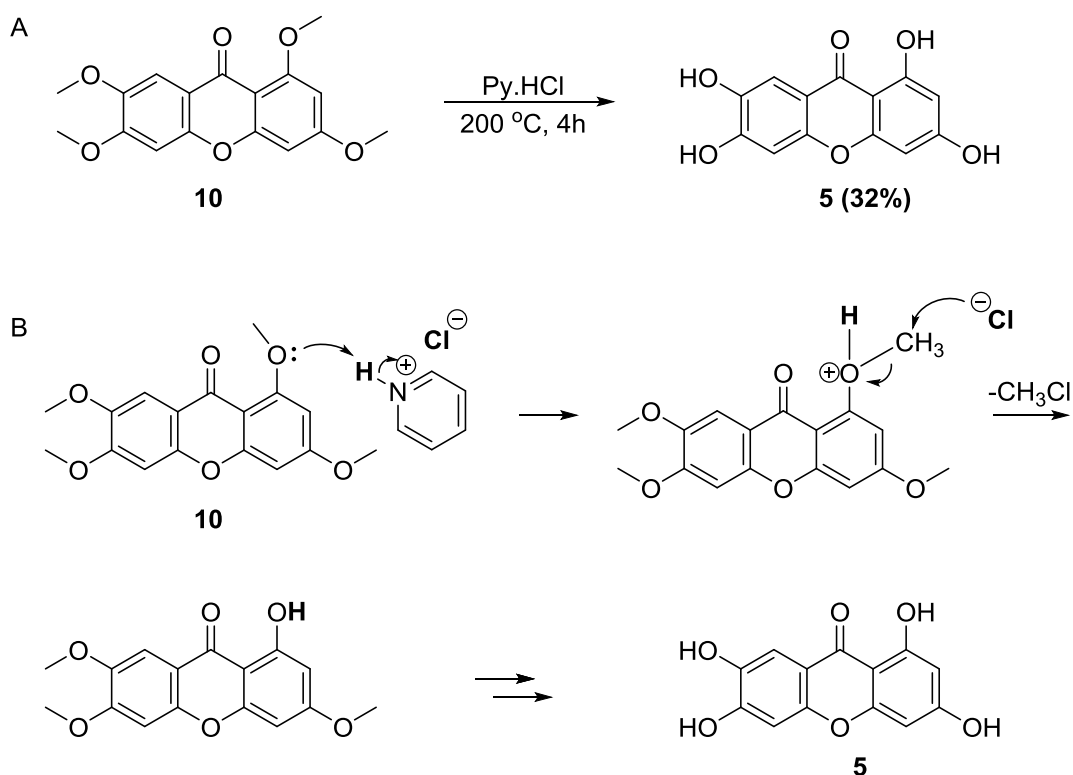


Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.1.5 Síntese do 1,3,6,7-tetrahidroxi-9H-xanten-9-ona (noratiriol) (5) pela rota 01

Para dar prosseguimento, foi utilizado cloridrato de piridina em excesso, o qual reagiu com o composto **10**, levando à síntese do 1,3,6,7-tetrahidroxi-9H-xanten-9-ona (noratiriol) (**5**) por processo de desmetilação, na ausência de solvente, seguindo metodologia de Yang e colaboradores (2014) (YANG et al., 2014) (Esquema 8).

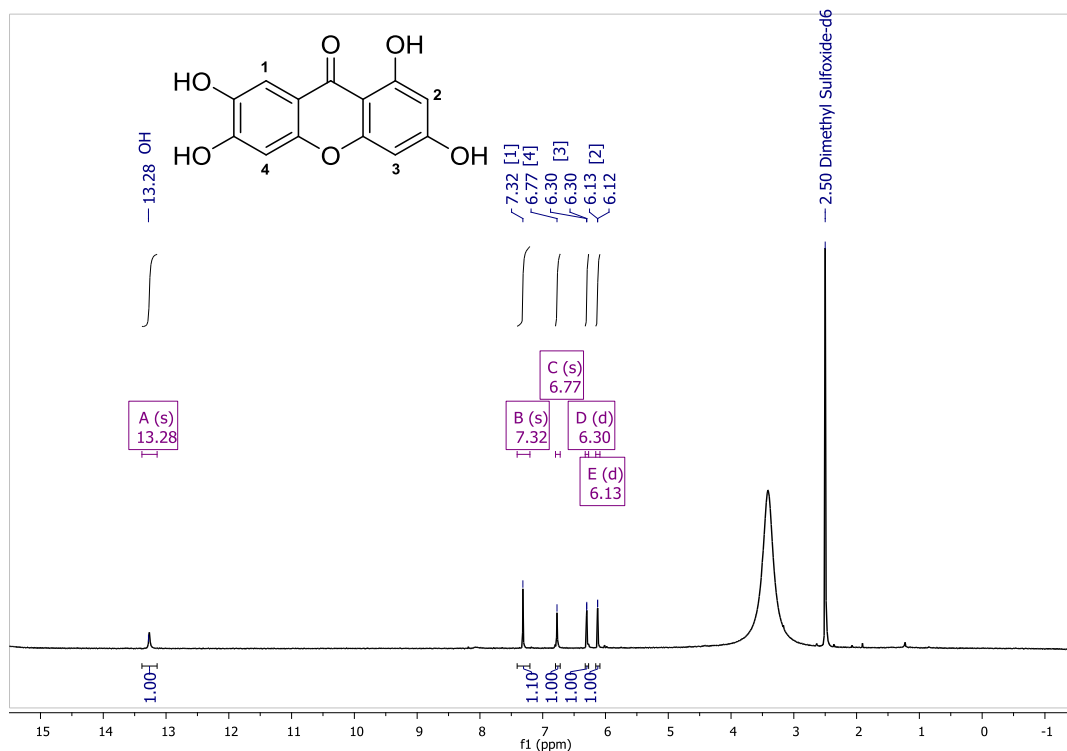
Esquema 8 - Síntese do composto **5** (A), e mecanismo proposto para a reação (B).



Fonte: Elaborada pelo autor.

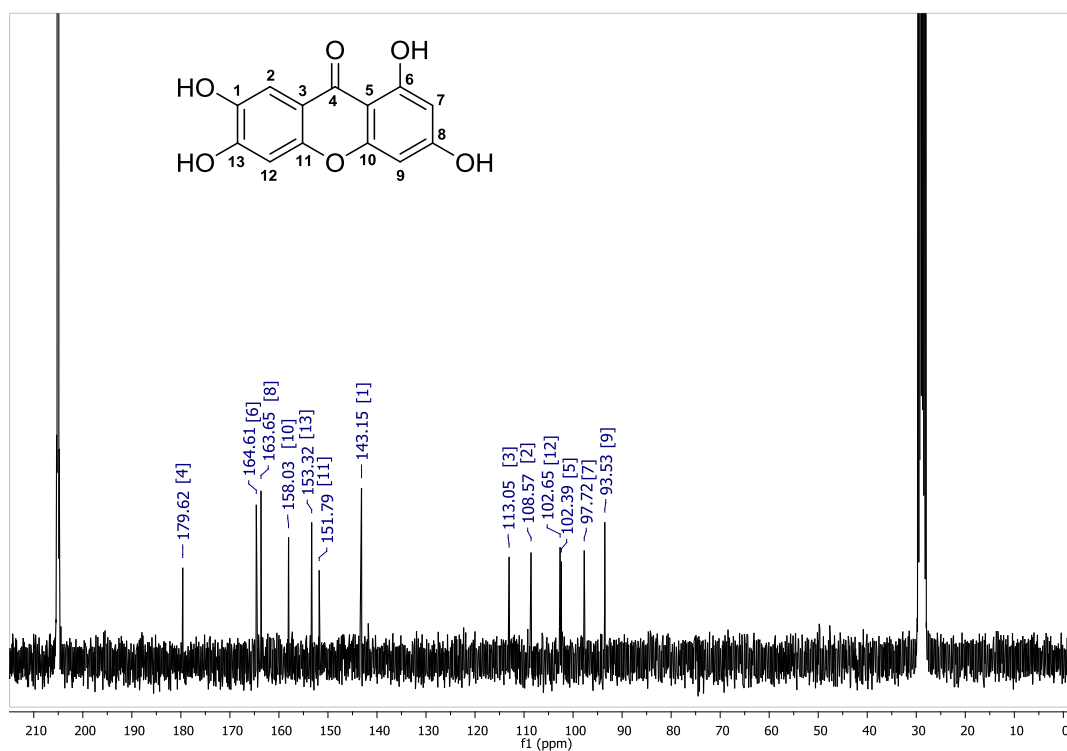
Esta etapa levou à formação do noratiriol (**5**) com um rendimento de 32 %, o qual foi bem inferior ao esperado (91 %) (YANG et al., 2014). O composto foi confirmado por meio das análises espectroscópicas de RMN de ^1H e ^{13}C , tal como indicado nas Figuras 16 e 17, respectivamente, e foi comparado com a literatura (QIN; YANG; YANG, 2014; AHN; YUN; HAN, 2018). Além disso, o espectro de massas (Apêndice F) confirma a formação do produto esperado.

Figura 15 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO) do 1,3,6,7-tetrahydroxi-9H-xanten-9-ona (noratriol) (**5**).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 16 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, Acetona- d_6) do 1,3,6,7-tetrahydroxi-9H-xanten-9-ona (noratriol) (**5**).



Fonte: Elaborada pelo autor.

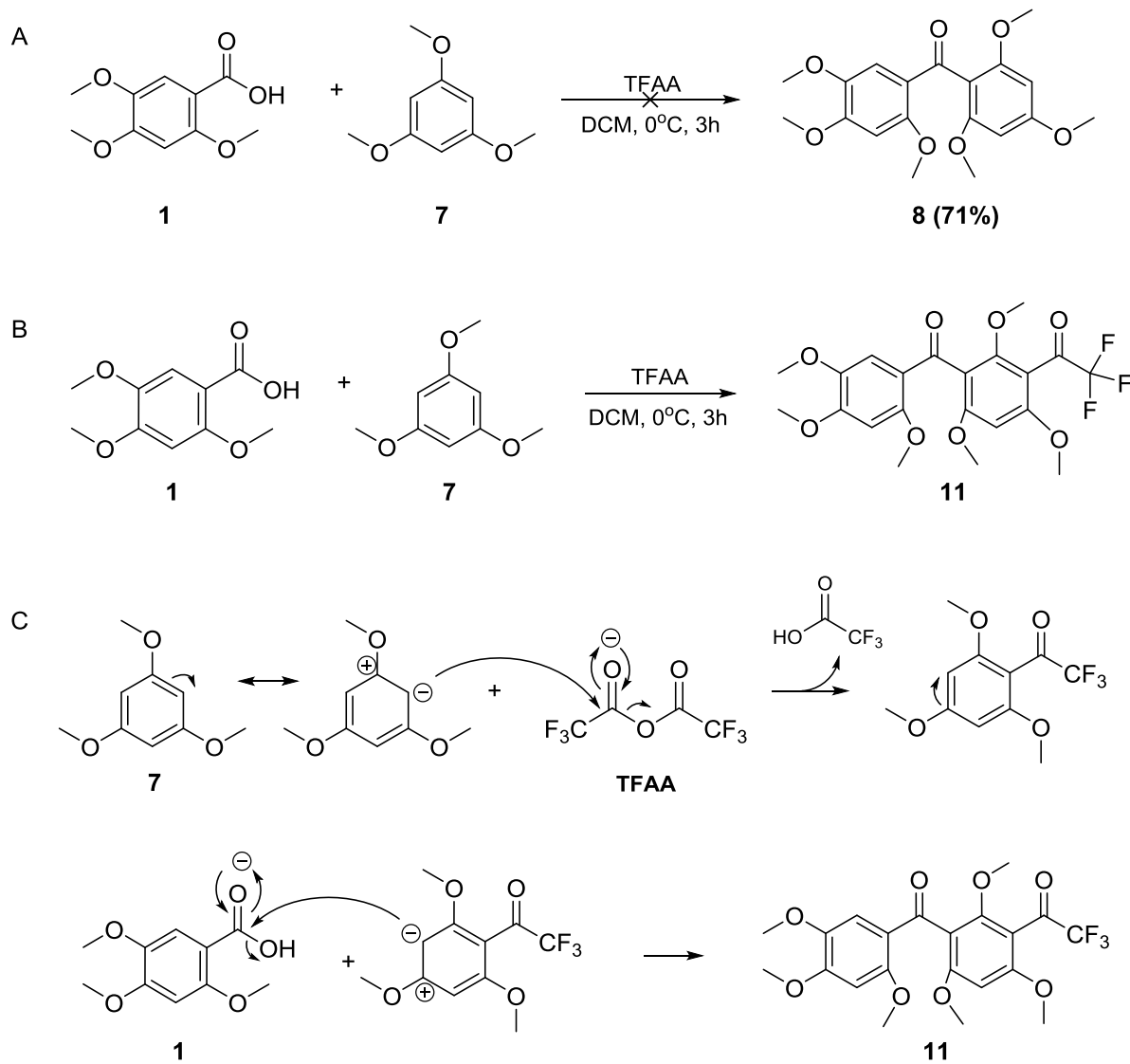
É possível visualizar no espectro de RMN de ^1H (Figura 15) a presença dos hidrogênios na região dos aromáticos (δ 6,5 - 8,5), conforme esperado. Os hidrogênios 1 (δ 7,32) e 4 (δ 6,77) apresentam-se como simpletos com integrais de 1, sendo o hidrogênio 1 mais desblindado por estar mais próximo à carbonila, a qual diminui a densidade eletrônica dos átomos vizinhos devido a um efeito da anisotropia magnética. Já os hidrogênios 2 (δ 6,13) e 3 (δ 6,30) apresentam integrais de 1 e dupletos com J_4 de 1,3 Hz, referentes a um padrão de substituição *meta*. Neste caso, estes últimos hidrogênios se encontram mais blindados em virtude de serem menos influenciados pela carbonila (QIN; YANG; YANG, 2014; AHN; YUN; HAN, 2018).

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 16), o carbono mais desblindado (δ 179,6; C-4) se refere à carbonila, e em seguida, podem ser vistos os carbonos ligados a heteroátomos (δ 164,6 para C-6; 163,7 para C-8; 158,0 para C-10; 153,3 para C-13; 151,8 para C-11 e 143,2 para C-1). Os carbonos mais blindados são aqueles ligados a hidrogênio (δ 93,5 para C-9; 97,8 para C-7; 102,7 para C-12 e 108,6 para C-2) ou quaternários (δ 102,4 para C-5 e 113,1 para C-3) (AHN; YUN; HAN, 2018).

4.1.1.6 Formação do 2,2,2-trifluoro-1-(2,4,6-trimetoxi-3-(2,4,5-trimetoxibenzoil)fenil)etan-1-ona (11)

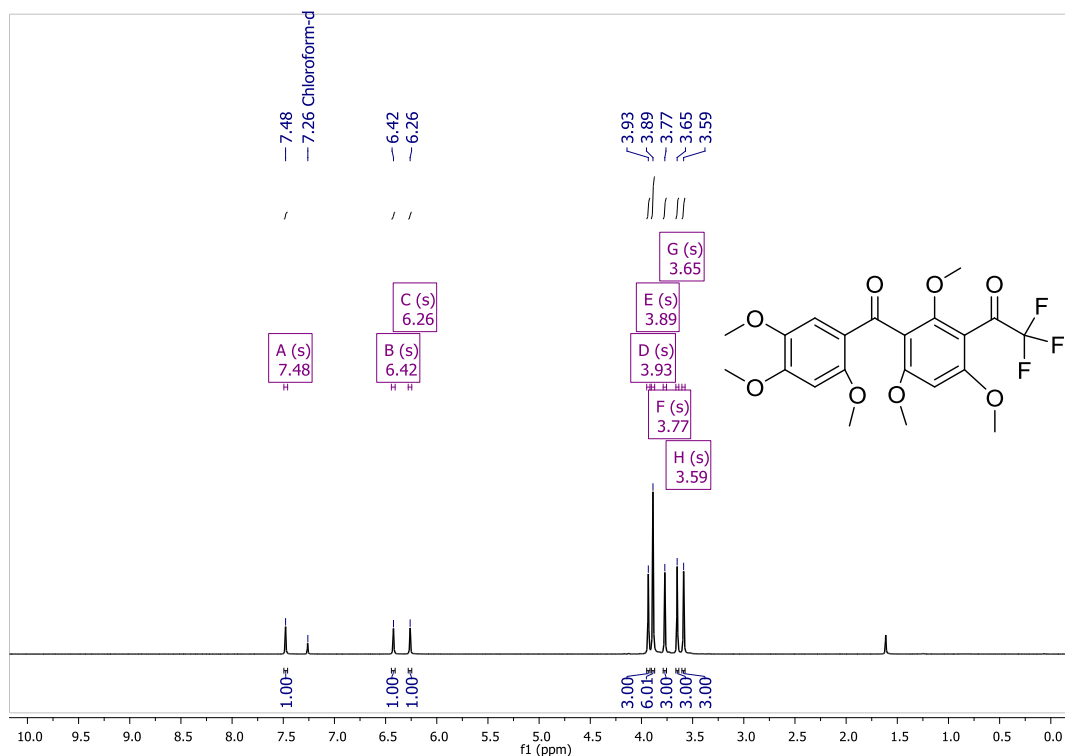
Visto que a obtenção dos compostos da rota 01 foi alcançada em pequena escala, foram utilizadas quantidades maiores dos reagentes, a fim de obter maior formação do produto final. No entanto, ao ampliar a escala, tal objetivo não foi atingido, pois não houve a formação do composto **8** na segunda etapa (Esquema 9 - A), quando foram utilizadas quantidades maiores dos reagentes 1,3,5-trimetoxibenzeno (**7**) e ácido 2,4,5-trimetoxibenzoico (**1**). Nessa reação, pela análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 17), foi possível visualizar a presença de apenas três hidrogênios aromáticos (δ 7,48; 6,42 e 6,26) ao invés dos quatro hidrogênios esperados, além da presença das seis metoxilas (δ 3,93; 3,89; 3,77; 3,65 e 3,59), levando a indícios da formação do produto 2,2,2-trifluoro-1-(2,4,6-trimetoxi-3-(2,4,5-trimetoxibenzoil)fenil)etan-1-ona (**11**) (Esquema 9 - B). Tal produto pode ter sido obtido por meio da reação de ataque do composto **7** ao TFAA, como indicado no Esquema 9 - C, inviabilizando as etapas seguintes necessárias à obtenção do noratiriol.

Esquema 9 - Síntese do composto **8** esperado (A), síntese do composto **11** (B) e mecanismo proposto para a formação do composto **11** (C).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 17 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do 2,2,2-trifluoro-1-(2,4,6-trimetoxi-3-(2,4,5-trimetoxibenzoil)fenil)etan-1-ona (**11**).



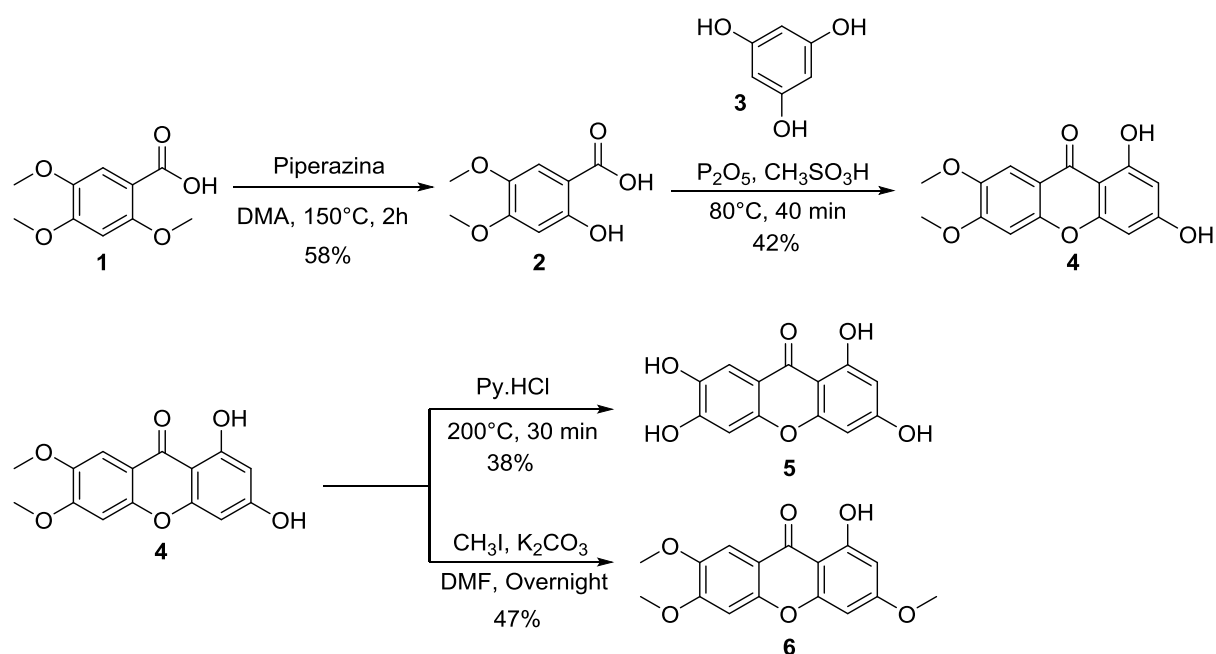
Fonte: Elaborada pelo autor.

A rota sintética 01 descrita foi planejada com o intuito de levar à obtenção do noratiriol e de seus derivados em um processo de otimização, visto que ao serem utilizados reagentes com grupos substituintes em diferentes posições na etapa 2, muitas possibilidades de produtos poderiam ser produzidas. No entanto, analisando o rendimento global, esta rota apresentou um valor de 2 % na síntese do noratiriol em pequena escala, e não foi capaz de gerar moléculas derivadas em quantidades suficientes para estudos posteriores. Assim, visando contornar o baixo rendimento global e baseando-se na literatura (CANUTO; 2009), foi decidido adotar uma segunda rota sintética, chamada de número 02, partindo da ideia de Bhatia e Seshadri (1968), os quais realizaram a condensação do ácido 2,5-dihidroxi-4-metoxibenzoico com floroglucinol anidro, e posterior desmetilação, para a produção do noratiriol.

4.1.2 Rota sintética 02

A rota sintética 02 proposta (Esquema 10) teve como objetivo a obtenção do noratiriol por meio de um número menor de etapas e um rendimento global maior. Enquanto a rota sintética 01 foi constituída por cinco etapas, apresentando um rendimento global de 2 %, e entrave no aumento de escala, a rota sintética 02 propõe que o noratiriol seja produzido em três etapas, o que otimiza o rendimento e as derivatizações desejadas. As etapas de síntese decorrentes dessa nova rota são detalhadas a seguir.

Esquema 10 - Rota sintética 02 proposta para obtenção dos derivados da mangiferina.



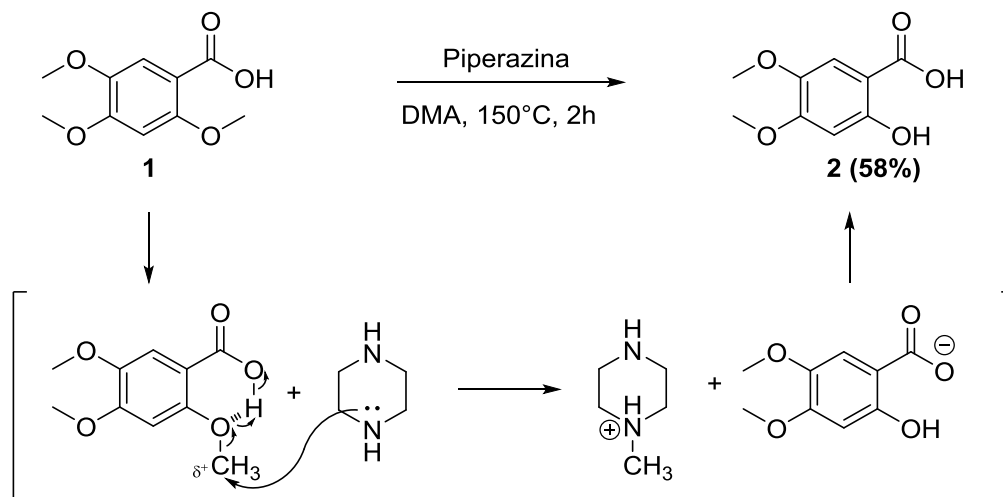
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.2.1 Síntese do ácido 2-hidroxi-4,5-dimetoxibenzoico (2)

A primeira reação é a formação do ácido 2-hidroxi-4,5-dimetoxibenzoico (**2**) a partir do composto **1** por meio de desmetilação utilizando piperazina (NISHIOKA; NAGASAWA; YOSHIDA, 2000). A presença do próton ácido, no heteroátomo adjacente ao grupo orto-carbonilo no composto **1**, é importante para a ativação do oxigênio da função éter por uma ligação de hidrogênio intramolecular, o que favorece o ataque nucleofílico por meio de uma amina, em solvente aprótico, conforme demonstrado no Esquema 11. O rendimento desta etapa (58 %) foi abaixo do esperado (84 %). Os dados de RMN de ¹H e ¹³C do composto **2** estão disponíveis

nos Apêndices G e H, respectivamente, e foram correlacionados com os encontrados na literatura (NAKAGAWA et al., 1987).

Esquema 11 - Síntese e mecanismo de formação do composto **2**.

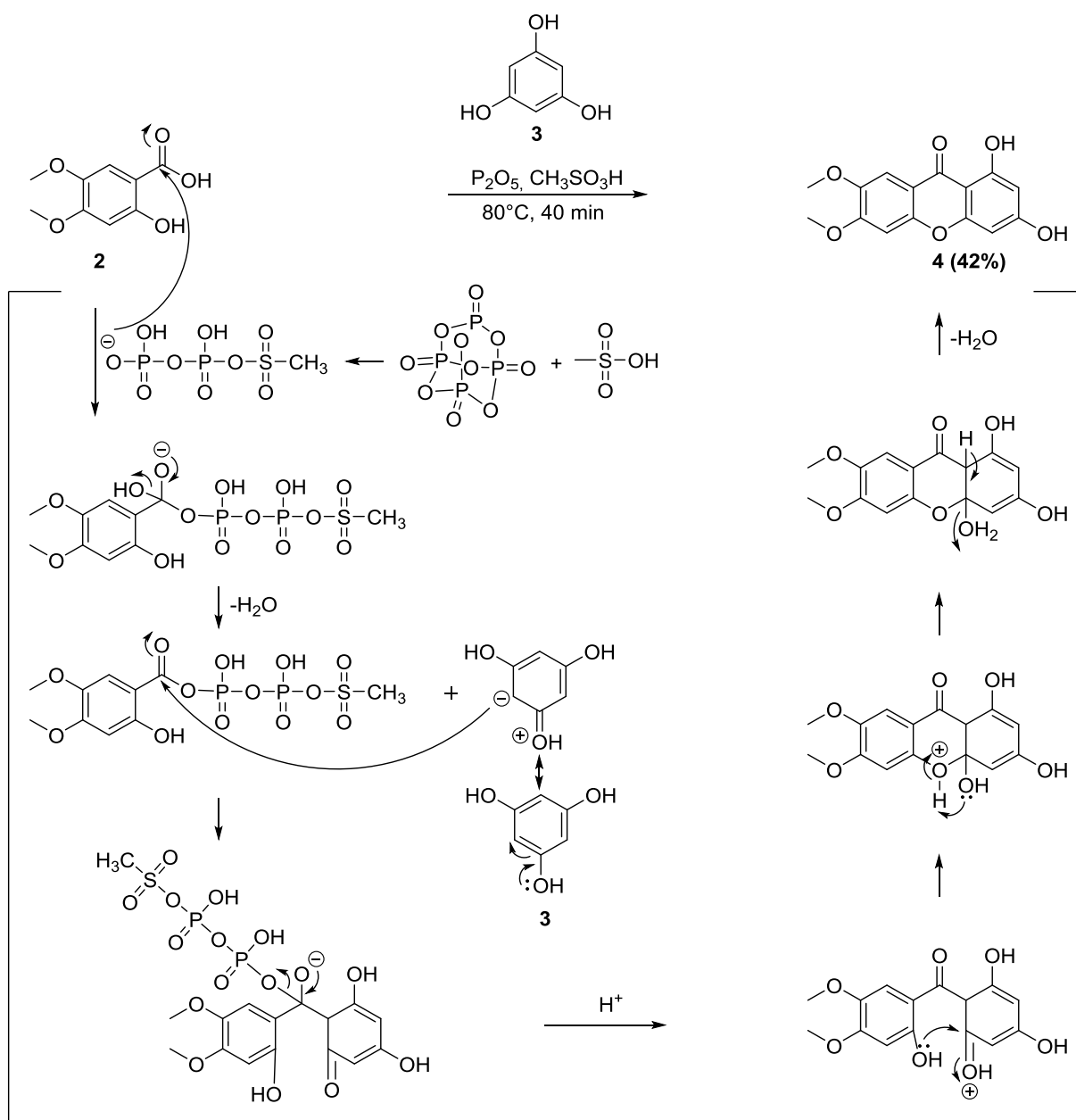


Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.2.2 Síntese do 1,3-dihidroxi-6,7-dimetoxi-9H-xanten-9-ona (**4**)

Na segunda reação, a ciclização entre o ácido 2-hidroxi-4,5-dimetoxibenzoico (**2**) e o floroglucinol (**3**) foi realizada com sucesso devido à presença de pentóxido de fósforo e ácido metanossulfônico (reagente de Eaton) (WU et al., 2010). Tal reagente, ao interagir com o composto **2**, levou à formação de um intermediário reacional com grupo abandonador mais eficiente, e de menor energia, favorecendo a reação com o composto **3** e garantindo a formação do composto 1,3-dihidroxi-6,7-dimetoxi-9H-xanten-9-ona (**4**) desejado (Esquema 12). O reagente de Eaton é empregado como agente de condensação, e conforme relatado na literatura (PILLAI et al., 1986; PUTAROV; DE CARVALHO; DE AGUIAR, 2014), o uso deste reagente leva a rendimentos de reação maiores, com formação de um número menor de subprodutos. O melhor desempenho do reagente de Eaton parece estar vinculado às reações com floroglucinol.

Esquema 12 - Síntese e mecanismo de formação do composto 4.

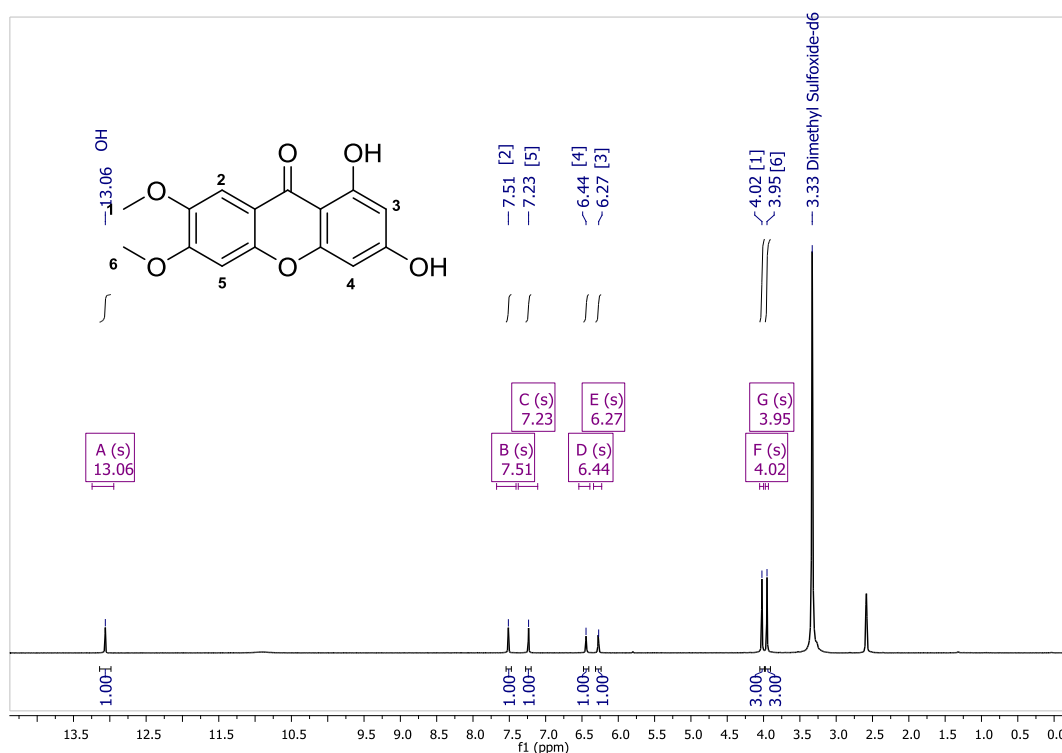


Fonte: Elaborada pelo autor.

O composto 4 foi obtido com um rendimento de 42 %, e este valor está próximo ao obtido no trabalho citado (40 %) (WU et al., 2010), no qual houve a produção de um derivado 7-O-mesilo. A confirmação do composto 4 pode ser vista pelo espectro de massas no Apêndice J, e pelas análises espectroscópicas de RMN de 1H (Figura 18) e ^{13}C (Figura 19), as quais são mostradas a seguir, e se aproximam da literatura (LIU et al., 2018).

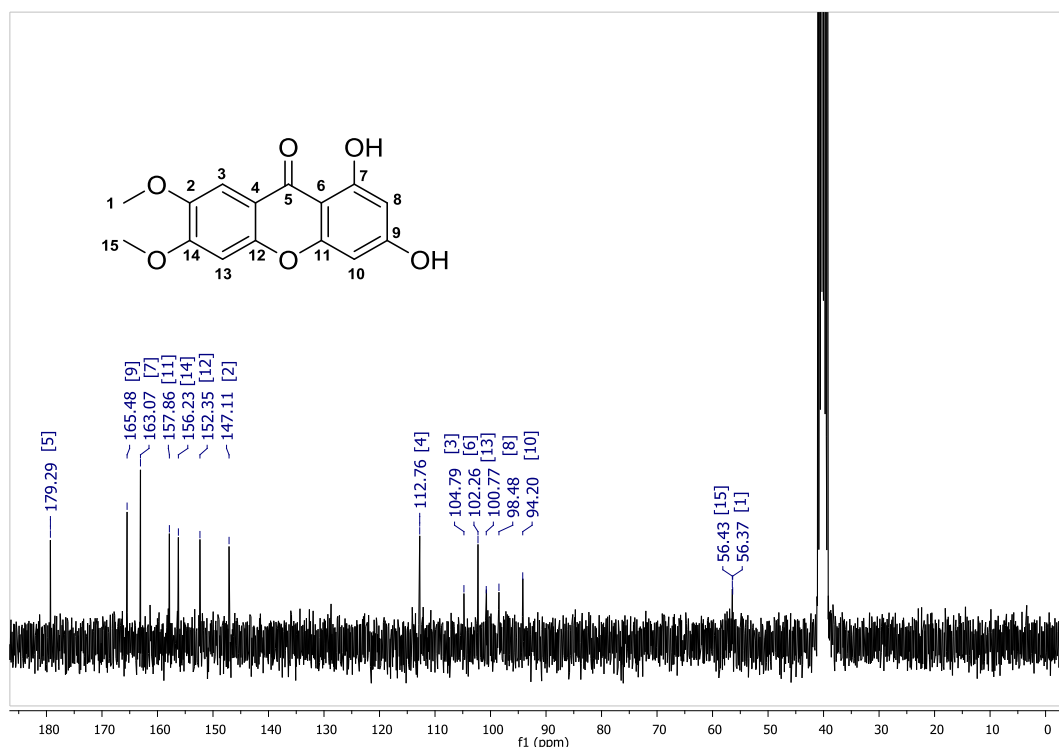
De forma análoga ao noratiriol, os sinais dos quatro hidrogênios na região dos aromáticos (RMN de ^1H - Figura 18) podem ser observados nos deslocamentos correspondentes a δ 7,51 (C-2), 7,23 (C-5), 6,44 (C-4) e 6,27 (C-3), e nos sinais das duas metoxilas em δ 4,02 (C-1) e 3,95 (C-6) (LIU et al., 2018). No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 19), o padrão dos deslocamentos se manteve, sendo o carbono da carbonila o mais desblindado (δ 179,3; C-5), seguido pelos carbonos ligados a heteroátomos (δ 165,5 para C-5; 163,1 para C-7; 157,9 para C-11; 156,2 para C-14; 152,4 para C-12 e 147,1 para C-2), carbonos ligados a hidrogênios e carbonos quaternários (δ 112,8 para C-4; 104,8 para C-3; 102,3 para C-6; 100,8 para C-13; 98,5 para C-8 e 94,2 para C-10) e, por fim, carbonos das metoxilas (δ 56,4 para C-15 e C-1) (LIU et al., 2018).

Figura 18 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO) do 1,3-dihidroxi-6,7-dimetoxi-9H-xanten-9-ona (4).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 19 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO) do 1,3-dihidroxi-6,7-dimetoxi-9H-xanten-9-ona (**4**).



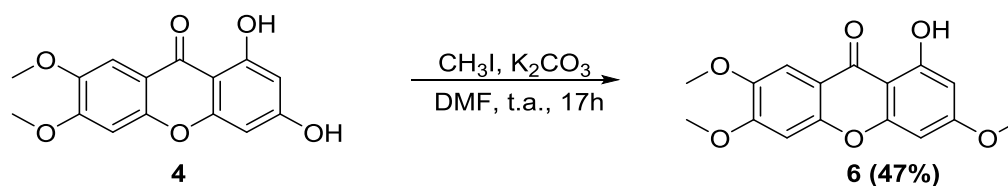
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.2.3 Síntese do 1,3,6,7-tetrahidroxi-9H-xanten-9-ona (noratiriol) (**5**) pela rota 02

Nesta etapa, o composto **5** foi formado por processo de desmetilação de **4**, sob condições livres de solvente (YANG et al., 2014; QIN; YANG; YANG, 2014), em presença de cloridrato de piridina recém-preparado. O par de elétrons da metoxila abstrai o próton do cloridrato de piridina, gerando uma espécie deficiente de elétrons, a qual serve de substrato para que ocorra a reação desejada, conforme apresentado anteriormente no Esquema 8. Visto que, por meio desta reação, não foi possível obter as derivatizações do noratiriol por monodesmetilação do composto **4** em virtude da dificuldade deste processo, a próxima etapa foi realizada objetivando alquilação seletiva.

4.1.2.4 Síntese do 1-hidroxi-3,6,7-trimetoxi-9H-xanten-9-ona (**6**)

O 1-hidroxi-3,6,7-trimetoxi-9H-xanten-9-ona (**6**) foi sintetizado na quarta etapa, a partir da metilação do composto **4** (SATO et al., 2012), pela utilização de uma base e iodeto de metila (Esquema 13).

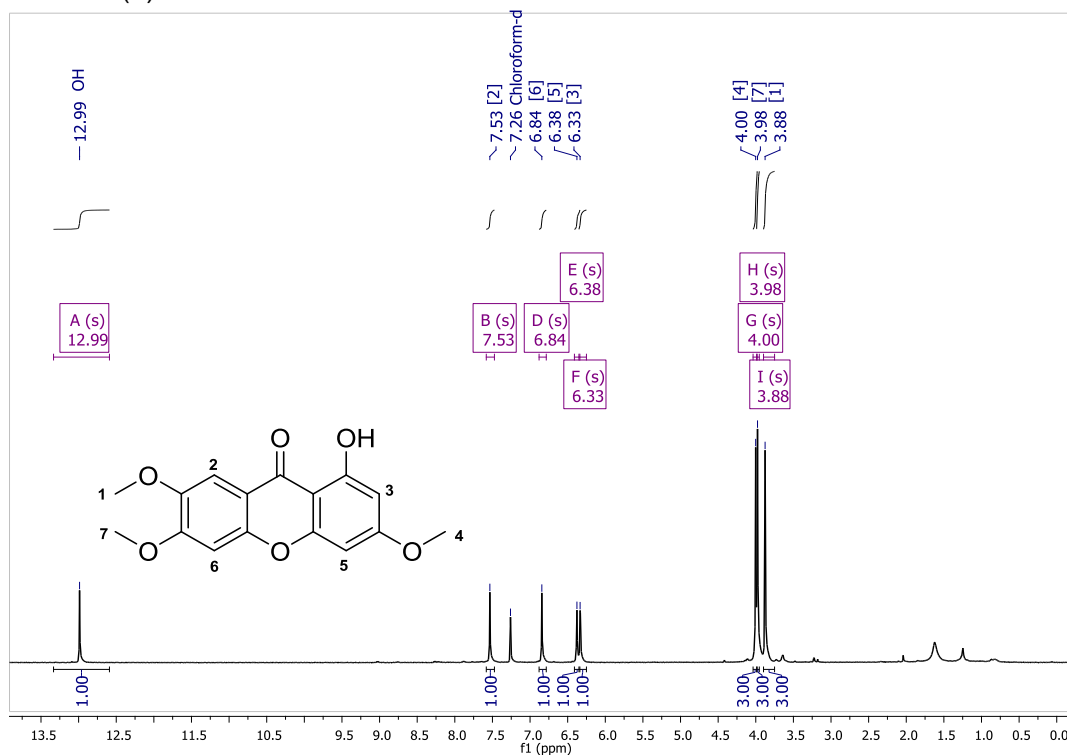
Esquema 13 - Síntese do composto **6**.

Fonte: Elaborada pelo autor.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 20), a obtenção do composto **6** (rendimento 47 %) foi comprovada pela presença dos quatro hidrogênios aromáticos (δ 7,53; 6,84; 6,38 e 6,33) e das três metoxilas (δ 4,00; 3,98 e 3,88), indicando que a reação planejada foi realizada com sucesso. Pela análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 21), os deslocamentos dos carbonos seguiram a ordem já descrita para os compostos **5** e **4**, de modo que o carbono da carbonila (C-5) encontra-se na região mais desblindada do espectro (δ 179,9), com os sinais posteriores correspondendo aos carbonos ligados a heteroátomos (δ 166,1 para C-9; 163,3 para C-7; 157,7 para C-12; 155,7 para C-15; 152,5 para C-13 e 146,8 para C-2), aos carbonos ligados a hidrogênios e quaternários (δ 113,4 para C-4; 104,6 para C-3; 103,6 para C-6; 99,5 para C-14; 96,9 para C-8 e 92,6 para C-11) e, finalmente, aos carbonos das metoxilas na região mais blindada (δ 56,6 para C-1; 56,4 para C-16 e 55,8 para C-10). Os dados de RMN obtidos para o composto **6** foram analisados em conjunto com os dados obtidos para os compostos tetrametoxilado (**10**) (QIN; YANG; YANG, 2014) e dimetoxilado (**4**) (LIU et al., 2018), além de simulações espectrais nos programas MestreNova e ChemBioDraw, uma vez que não estavam disponíveis na literatura, por se tratar de um composto inédito. Também, por meio de análise de espectrometria de massas, tal composto foi confirmado (Apêndice L).

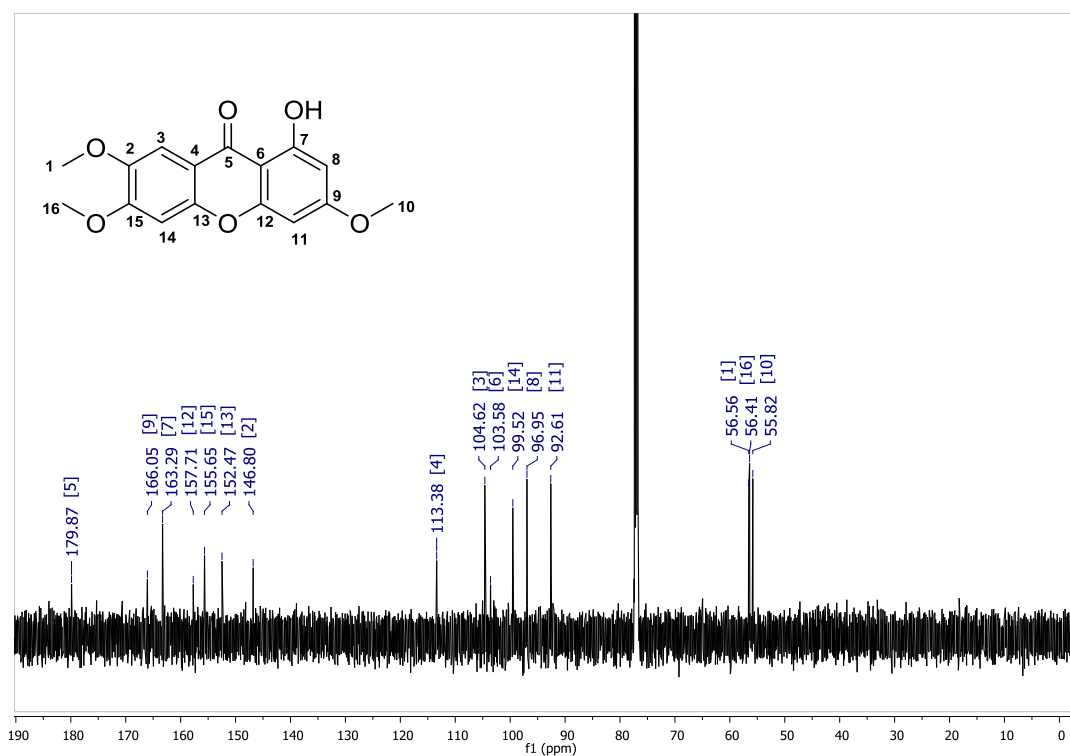
Analisando a rota sintética 02, pode-se dizer que foi vantajosa se comparada à rota 01. Nesta segunda estratégia, foi possível produzir o noratiriol em um número menor de etapas e com um rendimento global de 9 %, superior ao obtido pela primeira rota (2 %). Além disso, espécies derivadas deste bioativo também foram produzidas, obtendo um rendimento global de 24 % e 11 % para os compostos **4** e **6**, respectivamente.

Figura 20 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do 1-hidroxi-3,6,7-trimetoxi-9H-xanten-9-ona (**6**).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 21 - Espectro de RMN de ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) do 1-hidroxi-3,6,7-trimetoxi-9H-xanten-9-ona (**6**).



Fonte: Elaborada pelo autor.

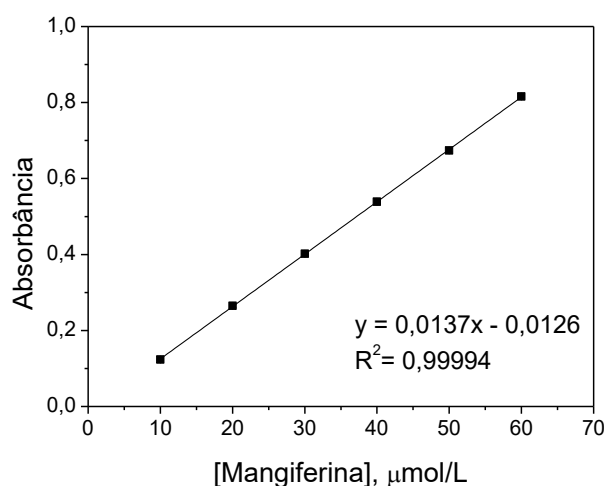
4.2 Sistemas lipossomais como nanocarreadores

4.2.1 Metodologia analítica para quantificação da mangiferina

Para a quantificação da mangiferina nos sistemas lipossomais foi utilizado o método espectrofotométrico na região do ultravioleta-visível, sendo empregado o comprimento de onda máximo de absorção de 368 nm. A opção por esta técnica foi feita em função de sua praticidade, uma vez que estudos prévios no grupo mostraram que não houve diferença no resultado de eficiência de encapsulação determinados por absorciometria ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Além disso, os fosfolípidos e a mangiferina absorvem em diferentes comprimentos de onda do espectro de absorção.

A curva analítica da mangiferina, nas concentrações de 10 a 60 $\mu\text{mol/L}$, em solução 1:5 de tampão de Tyrode pH 7,4 e etanol, está representada na Figura 22.

Figura 22 - Curva analítica da mangiferina obtida em solução tampão de Tyrode (pH 7,4) e etanol, na proporção de 1:5, com leituras de absorbância em 368 nm. Cada valor representa a média \pm o desvio padrão de determinações em, no mínimo, triplicata.



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.2 Validação do método

A validação do método adotado foi realizada para garantir confiabilidade na quantificação do bioativo nas formulações lipossomais. Os parâmetros clássicos de validação de metodologias analíticas tais como limite de quantificação, limite de detecção, seletividade, linearidade, precisão e exatidão foram determinados de acordo com diretrizes preconizadas pela ANVISA (RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 – “Guia para validação de métodos analíticos”) (ANVISA, 2017).

4.2.2.1 Limite de detecção

O limite de detecção obtido para a mangiferina por meio da espectrofotometria foi de 0,4 $\mu\text{mol/L}$.

4.2.2.2 Limite de quantificação

O limite de quantificação corresponde ao menor nível determinado com precisão e exatidão aceitáveis. Assim, para este método, a menor concentração quantificável foi considerada igual a 3 $\mu\text{mol/L}$, pois concentrações abaixo desta foram analisadas e excluídas por não apresentarem exatidão adequada.

4.2.2.3 Linearidade

A linearidade do método analítico se refere à proporcionalidade entre a concentração do analito e a resposta observada. Os resultados na Figura 22 mostraram que o método analítico desenvolvido para a quantificação da mangiferina apresentou linearidade na faixa de concentração de 10 a 60 $\mu\text{mol/L}$. O ajuste dos resultados por regressão linear, usando o método dos mínimos quadrados, apresentou um coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,99 e, conseqüentemente, um coeficiente de correlação linear (r) de 0,99. Tais valores confirmaram a linearidade do método, conforme preconizado pela ANVISA, que indica o valor de 0,99 para r mínimo de aceitação.

4.2.2.4 Precisão intra e interensaio

Para que o bioativo possa ser analisado de maneira segura, o método deve apresentar precisão, ou seja, deve exibir pequena dispersão entre os valores de absorbância obtidos para uma mesma concentração analisada. Os resultados de precisão encontrados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores de precisão intra e interensaio para o método espectrofotométrico de quantificação da mangiferina.

Concentração $\mu\text{mol/L}$	30	40	50
Intraensaio			
Número de replicatas	5	5	5
CV (%)	1,38	1,07	1,03
Interensaio			
Número de replicatas	11	11	11
CV (%)	2,08	2,39	1,60

Fonte: Elaborada pelo autor.

Analisando a Tabela 2, os coeficientes de variação (CV) intra e interensaio foram inferiores a 5 %, mostrando-se dentro do limite estabelecido pela ANVISA (RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 - “Guia para validação de métodos analíticos”) (ANVISA, 2017), e caracterizando, portanto, o método como preciso.

4.2.2.5 Exatidão intra e interensaio

Para que o método possa ser considerado exato, é necessário um grau de concordância entre resultados individuais em um mesmo ensaio (intraensaio), e em ensaios independentes (interensaio), em relação a um valor de referência. De acordo com resultados na Tabela 3, pode-se dizer que o método de quantificação da mangiferina foi exato para um mesmo dia de análise e para ensaios em dias diferentes, pois os valores foram próximos a 100 %.

Tabela 3 - Valores de exatidão intra e interensaio para o método espectrofotométrico de quantificação da mangiferina.

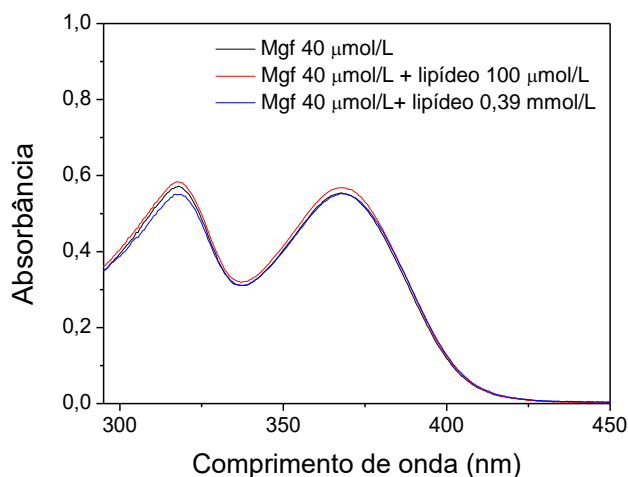
Concentração $\mu\text{mol/L}$	30	40	50
Intraensaio			
Número de replicatas	5	5	5
Exatidão (%)	98,4	100,8	99,7
Interensaio			
Número de replicatas	11	11	11
Exatidão (%)	100,6	100,8	100,2

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.2.6 Seletividade

A seletividade diz respeito à capacidade do método em identificar o analito na presença de outros componentes da formulação. Assim, a avaliação da seletividade foi realizada a fim de garantir a não interferência dos componentes lipídicos da formulação na quantificação da mangiferina. Na análise das soluções de mangiferina (40 $\mu\text{mol/L}$) contaminadas com duas concentrações diferentes da composição lipídica (100 $\mu\text{mol/L}$ e 0,39 mmol/L) (Figura 23), foi possível calcular um coeficiente de variação de 3,8 % e uma exatidão de 102,9 %, indicando que o método foi seletivo.

Figura 23 - Espectros de absorção no UV-VIS da mangiferina, na ausência e presença de contaminantes lipídicos (100 $\mu\text{mol/L}$ e 0,39 mmol/L), em tampão de Tyrode pH 7,4 e etanol (1:5), com $\lambda_{\text{máx}}$ de 368 nm.



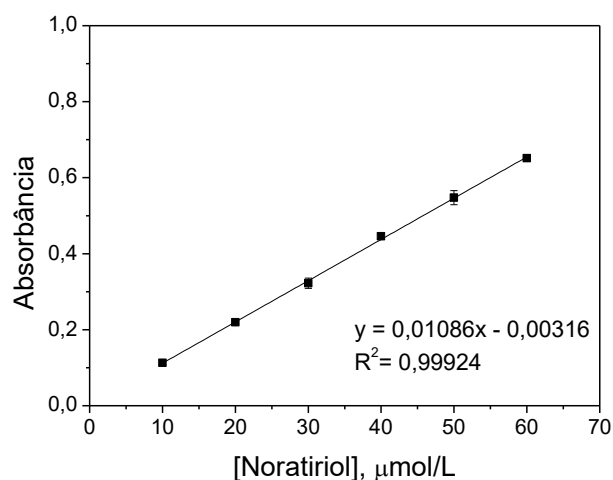
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.3 Metodologia analítica para quantificação do noratiriol

Os espectros de absorção da mangiferina e de sua aglicona, o noratiriol, são muito semelhantes (ϵ_{Mgf} : $13.700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; ϵ_{Nrt} : $10.860 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), com comprimentos de onda máximos de absorção nas mesmas regiões do espectro UV-VIS ($\lambda_{\text{máx}}$ Mgf: 368 nm; $\lambda_{\text{máx}}$ Nrt: 364 nm) (Apêndices M e N). Assim, foi assumido que o mesmo método usado para a quantificação da mangiferina poderia ser usado para a quantificação do noratiriol.

A Figura 24 mostra a curva analítica para o noratiriol determinada em tampão de Tyrode pH 7,4 e etanol (1:5). Pode ser observado que o método também apresentou linearidade na faixa de concentração de 10 a 60 $\mu\text{mol/L}$. O ajuste dos resultados por regressão linear, usando o método dos mínimos quadrados, apresentou um coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,99, e um coeficiente de correlação linear (r) de 0,99, confirmando a linearidade do método.

Figura 24 - Curva analítica do noratiríol obtida pela diluição em tampão de Tyrode pH 7,4 e etanol (1:5) determinada no comprimento de onda máximo de absorção igual a 364 nm. Cada valor representa a média \pm o desvio padrão de determinações em, no mínimo, triplicata.



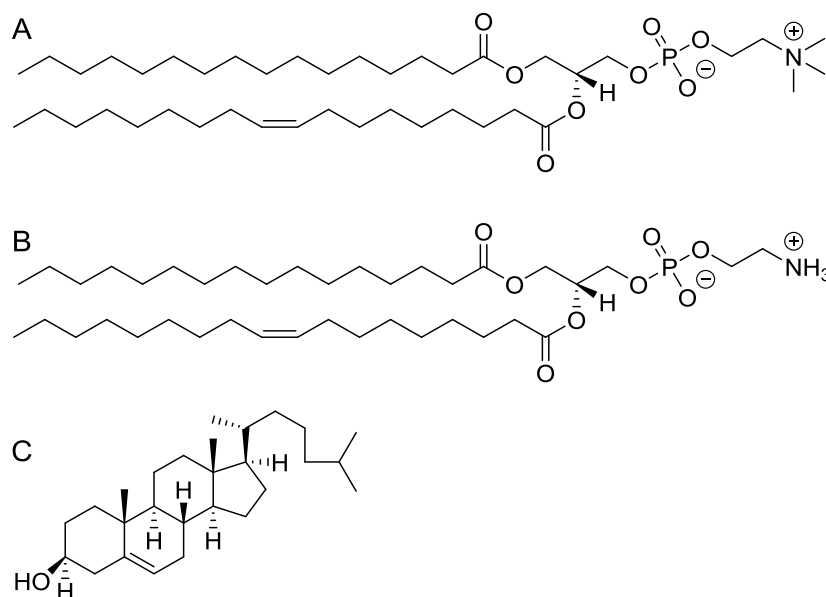
Fonte: Elaborada pelo autor

4.2.4 Estudos das formulações lipossomais

4.2.4.1 Mangiferina

Inicialmente, lipossomos formados por fosfatidilcolina (PC) (Figura 25 A), fosfatidiletanolamina (PE) (Figura 25 B) e colesterol (COL) (Figura 25 C) na proporção PC:PE:COL (52:28:20) foram preparados a fim de mimetizar a membrana biológica dos mastócitos cuja composição lipídica é majoritariamente formada por estes lipídeos. Estudos prévios realizados no grupo (dados não publicados) mostraram uma alta eficiência de encapsulação da mangiferina (EE = 60 %) para a formulação contendo DMPC, DOTAP e COL, com concentração lipídica total de 29 mmol/L, e hidratação do filme lipídico na temperatura ambiente. Assim, a priori, a formulação PC:PE:COL (52:28:20) foi investigada na mesma concentração lipídica variando-se a temperatura de hidratação (25 e 75°C). Essas temperaturas foram escolhidas em função da temperatura de transição de fases da PC anidra que é 65°C (KOYNOVA; CAFFREY, 1998).

Figura 25 - Estruturas químicas da fosfatidilcolina (PC) (A), fosfatidiletanolamina (PE) (B) e colesterol (COL) (C).



Fonte: Adaptado de Lipoid GmbH (2018) e Avanti Polar Lipids, Inc. (2018).

A Tabela 4 mostra os resultados de eficiências de encapsulação e capacidades de carga para duas formulações estudadas (**L1** e **L2**), com concentrações lipídicas totais iguais a 29 mmol/L, razão bioativo/lipídeo de 0,01, pH 7,4 e temperaturas de hidratação do filme lipídico iguais a 25 e 75°C (**L1** e **L2**, respectivamente).

Tabela 4 - Eficiências de encapsulação (EE) e capacidades de carga (CC) da mangiferina nas formulações lipossomais contendo PC:PE:COL (52:28:20), na concentração lipídica total de 29 mmol/L, concentração de bioativo de 0,3 mmol/L, relação bioativo/lipídeo (B/L) de 0,01 e pH de 7,4, nas temperaturas de hidratação do filme lipídico de 25°C e 75°C.

Formulação	Composição	Lipídeo Total (mmol/L)	Mgf Total (mmol/L)	B/L	T (°C)	pH	EE (%)	CC (%)
L1	PC:PE:COL	29	0,3	0,01	25	7,4	29	0,3
L2	PC:PE:COL	29	0,3	0,01	75	7,4	40	0,4

Nota: PC:PE:COL = 52:28:20.

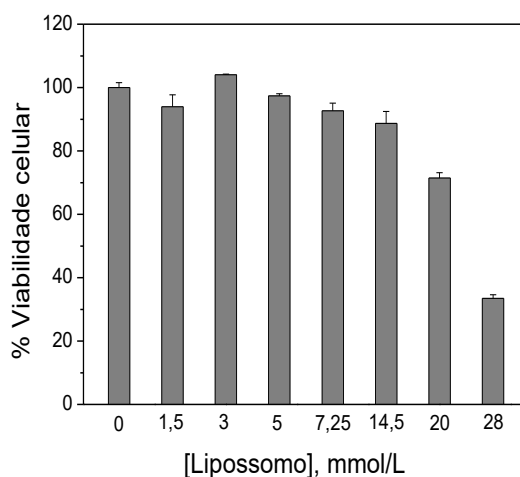
Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados mostraram que houve aumento da EE de 29 % (**L1**) para 40 % (**L2**) quando a hidratação foi feita na temperatura de 75°C. Esse resultado pode ser explicado pelo aumento da fluidez da membrana, a qual se torna mais desordenada com o aumento da temperatura e com maior hidratação dos

grupamentos hidrofílicos (FRÉZARD et al., 2005). A maior mobilidade da camada lipídica leva à maior fluidez da membrana e propicia maior incorporação do bioativo, como observado. Curiosamente, ao contrário do esperado, as EEs para **L1** (29 %) e **L2** (40 %) não foram tão altas quanto aquelas observadas para a formulação contendo DMPC:DOTAP:COL (EE = 60 %). É provável que a presença do lipídeo DOTAP, com carga positiva, tenha exercido atração eletrostática sobre a molécula da mangiferina a qual, em pH fisiológico 7,4, encontra-se predominantemente na forma aniônica (pK_{a1} Mg_f = 6,52) (GÓMEZ-ZALETA et al., 2006).

No entanto, a concentração lipídica de 29 mmol/L apresentou citotoxicidade para os mastócitos da linhagem RBL-2H3 usados nos ensaios *in vitro* de potencial antialérgico. Assim, para determinar a concentração máxima de lipídeos totais, sem prejuízo para a viabilidade celular, foi realizado o estudo de citotoxicidade pelo método da resazurina, variando-se a concentração lipídica total da formulação PC:PE:COL (52:28:20), como mostra a Figura 26.

Figura 26 - Viabilidade celular dos mastócitos da linhagem RBL-2H3, na presença de lipossomos de PC:PE:COL (52:28:20) em diferentes concentrações. Cada valor representa a média \pm o desvio padrão de determinações em triplicata.

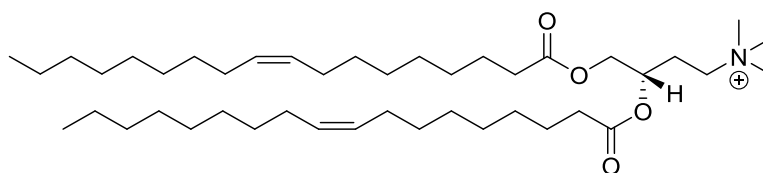


Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados na Figura 26 indicaram que, até a concentração de 14,5 mmol/L de lipídeos totais, não há comprometimento da viabilidade celular, sendo esta acima de 90 %. Com isso, a otimização de incorporação da mangiferina na formulação lipossomal PC:PE:COL (52:28:20) foi explorada variando-se a concentração lipídica total até 14,5 mmol/L. As formulações **L1** e **L2** mencionadas acima foram eliminadas deste estudo em virtude da citotoxicidade.

Para as novas formulações estudadas (**L3** a **L10**) foram variadas a concentração lipídica, a razão bioativo/lipídeo, a temperatura de hidratação do filme lipídico e o pH do meio. Além disso, em uma das formulações (**L9**), foi adicionado o lipídeo DOTAP (Figura 27), a fim de investigar o efeito do lipídeo catiônico na encapsulação. Os resultados das eficiências de encapsulação e capacidades de carga determinados nesta etapa estão relacionados na Tabela 5.

Figura 27 - Estrutura química de 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano (DOTAP).



Fonte: Adaptado de Batista e colaboradores (2007).

Tabela 5 - Eficiências de encapsulação (EE) e capacidades de carga (CC) da mangiferina para as formulações lipossomais preparadas em diferentes condições de concentração lipídica, concentração de bioativo, relação bioativo/lipídeo (B/L), temperatura de hidratação (T) e pH.

Formulação	Composição	Lipídeo	Mgf	B/L	T (°C)	pH	EE (%)	CC (%)
		Total (mmol/L)	Total (mmol/L)					
L3	PC:PE:COL	2,9	0,3	0,10	25	7,4	28	2,7
L4	PC:PE:COL	2,9	0,3	0,10	75	7,4	29	3,4
L5	PC:PE:COL	14,5	0,3	0,02	25	7,4	22	0,4
L6	PC:PE:COL	14,5	0,3	0,02	75	7,4	31	0,8
L7	PC:PE:COL	14,5	0,6	0,04	75	7,4	28	1,1
L8	PC:PE:COL	14,5	0,3	0,02	75	6,5	44	0,8
L9	PC:PE:COL:DOTAP	14,5	0,3	0,02	75	7,4	28	0,5
L10	PC:PE:COL	14,5	0,3	0,02	75	7,0	29	0,7

Nota: PC:PE:COL = 52:28:20; PC:PE:COL:DOTAP = 52:24:16:8.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Ao reduzir a concentração lipídica para 2,9 mmol/L (**L3** e **L4**), mantendo a concentração total de mangiferina em 0,3 mmol/L (razão bioativo/lipídeo de 0,10), a eficiência de encapsulação não foi muito alterada, comparando-se as duas temperaturas de hidratação do filme lipídico (25 e 75°C) (Tabela 5). Este resultado foi surpreendente, uma vez que era esperado aumento da eficiência de

encapsulação da mangiferina em função do aumento da temperatura de hidratação do filme lipídico.

Sabe-se que abaixo da temperatura de transição de fases (T_M) a permeabilidade do bioativo é menor, mas pode ser aumentada pela adição de colesterol, o qual leva à maior fluidez da bicamada lipídica. No entanto, acima da T_M , a presença do colesterol pode ter um papel inverso, ou seja, ele pode levar à maior organização da bicamada, diminuindo a interação do bioativo (FRÉZARD et al., 2005; MAXFIELD; TABAS, 2005). Acredita-se, portanto, que, na concentração lipídica total de 2,9 mmol/L, o colesterol tenha exercido o papel de desorganizar a membrana, na temperatura abaixo da T_M , e de organizar na temperatura acima da T_M , levando a um equilíbrio na fluidez da bicamada lipossomal sem alteração na incorporação do bioativo.

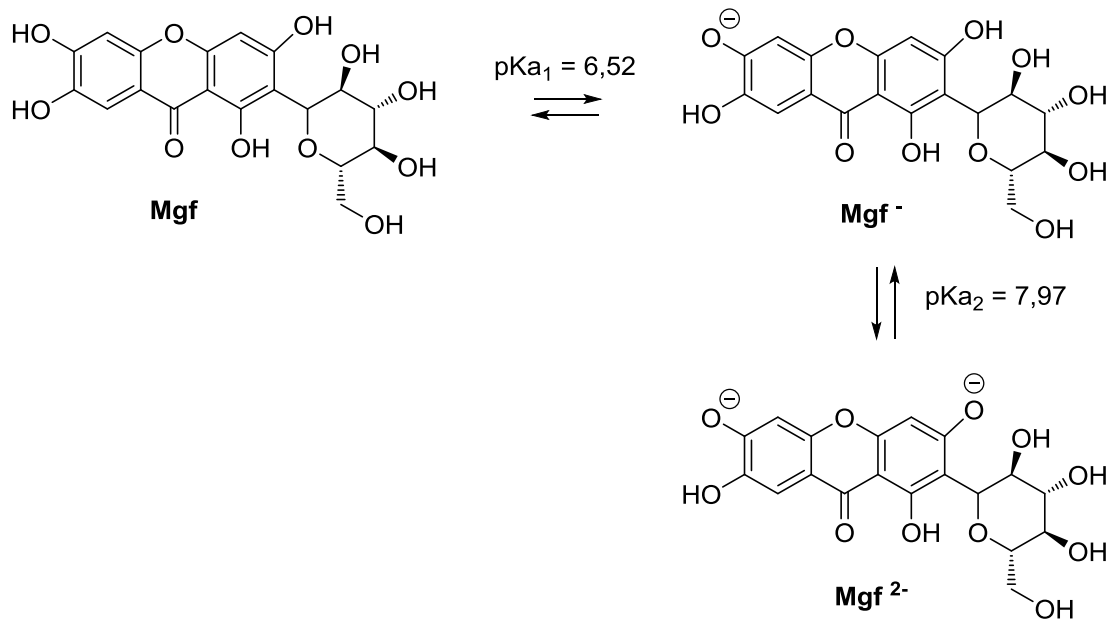
O aumento da concentração total de lipídeos de 2,9 (**L4**; EE = 29 %) para 14,5 mmol/L (**L6**; EE = 31 %) não aumentou muito a EE. No entanto, foi observado um maior aumento na EE de 22 % para 31 % quando a temperatura de hidratação mudou de 25°C (**L5**) para 75°C (**L6**) em uma mesma concentração lipídica (14,5 mmol/L). Este resultado sugere que a temperatura de hidratação é particularmente importante para as concentrações maiores de lipídeo.

Como a EE foi um pouco maior na concentração lipídica de 14,5 mmol/L (**L6**; EE = 31 %) comparada a de 2,9 mmol/L (**L4**; EE = 29 %), a primeira foi escolhida para explorar outras variações na formulação como razão bioativo/lipídeo e pH. Assim, primeiro, o pH 7,4 e a temperatura de hidratação de 75°C foram mantidos e a razão bioativo/lipídeo foi variada de 0,02 (**L6**) para 0,04 (**L7**). Os resultados na Tabela 5 mostraram que a EE varia muito pouco em função da variação da razão bioativo/lipídeo, mantendo-se ao redor de 30 %.

Tendo em vista a incorporação de 30 %, o estudo continuou sendo direcionado no sentido de aumentar a EE da mangiferina na formulação lipossomal. Como esse bioativo assume diferentes formas iônicas com a variação do pH do meio (Figura 28), decidiu-se avaliar a EE da mangiferina em uma formulação preparada em pH 6,5 (**L8**). Os resultados na Tabela 5 mostraram que houve um aumento da EE de 31 % (**L6**) para 44 % (**L8**) quando o pH do meio foi reduzido de 7,4 para 6,5. Já a redução do pH de 7,4 (**L6**) para 7,0 (**L10**) não alterou o resultado, e a EE foi de 29 %.

Os resultados obtidos pela variação de pH foram explicados pelas espécies neutra e ionizada da mangiferina assumidas nos diferentes pHs do meio, como mostra o equilíbrio de dissociação na Figura 28.

Figura 28 - Equilíbrio ácido-base para a mangiferina, evidenciando seus dois pKas de 6,52 e 7,97.



Fonte: Elaborada pelo autor.

As porcentagens de cada uma das espécies (Tabela 6) foram obtidas por meio da equação de Henderson-Hasselbalch (Equação 9) (PO; SENOZAN, 2001), com base nos valores de pka da mangiferina (pka₁ = 6,52 e pka₂ = 7,97) (GÓMEZ-ZALETA et al., 2006).

Equação 9

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log\left(\frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}\right)$$

Na Equação 9, **pH** é o potencial hidrogeniônico, **pK_a** é a constante de dissociação do ácido, **[HA]** é a concentração do ácido e **[A⁻]** é a concentração da base conjugada.

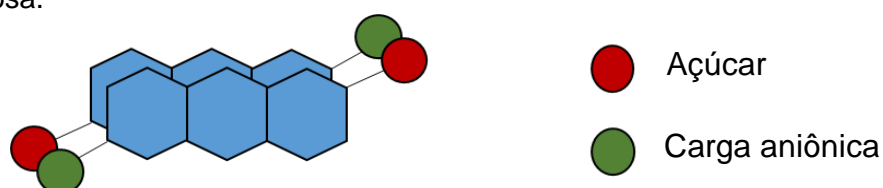
Tabela 6 - Porcentagem das espécies neutras e ionizadas da mangiferina em diferentes pHs, tendo em vista seus dois pKas, de 6,52 e 7,97.

pH	% Mgf	% Mgf ⁻	% Mgf ²⁻
5,0	97	3	0
6,5	51	47	2
7,0	25	68	7
7,4	12	69	19

Fonte: Elaborada pelo autor.

No pH 6,5, grande parte da mangiferina (51 %) está na forma neutra, o que confere a esse pH, e à formulação **L8**, um número maior de espécies neutras, com maior afinidade pela membrana lipídica e, portanto, maior eficiência de encapsulação (EE = 44 %). No pH fisiológico 7,4 (**L6**), essa situação se inverte, ou seja, 88 % da mangiferina está na forma iônica (69 % monoaniônica e 19 % dianiônica), o que confere maior solubilidade da mangiferina e menor eficiência de encapsulação (EE ao redor de 30 %). Apesar da aparente solubilidade da mangiferina no pH fisiológico, estudos de potencial antialérgico realizados em concentrações de mangiferina acima de 100 $\mu\text{mol/L}$, para soluções preparadas em tampão de Tyrode, têm sido comprometidos pela solubilidade da amostra. É provável que no pH 7,4 ocorra a formação de agregados da mangiferina, possivelmente dímeros, os quais se formam pela aproximação dos núcleos xantônicos (hidrofóbicos), e exposição dos grupos glicosídeos e das cargas aniônicas da mangiferina para regiões opostas, como mostra a Figura 29. De acordo com estudos realizados por Corrêa e colaboradores (2012), o núcleo aromático xantônico tem uma conformação quase planar que propicia o empilhamento π - π , além de interações de hidrogênio intermoleculares entre os dímeros da mangiferina e entre moléculas de água presentes na estrutura cristalina, que podem explicar a baixa solubilidade para concentrações mais altas da mangiferina, apesar da existência dos grupos substituintes hidrofílicos (CORRÊA et al., 2012).

Figura 29 - Representação esquemática de formação de agregados de mangiferina em solução aquosa.



Fonte: Elaborada pelo autor

Como no pH fisiológico a mangiferina é predominantemente aniônica, decidiu-se incluir o lipídeo DOTAP na formulação que, por ser catiônico, poderia se associar à estrutura aniônica da mangiferina, aumentando a incorporação, ou a interação com a interface da bicamada lipídica. Porém, analisando os resultados para **L9**, na Tabela 5, percebeu-se que tal evento não ocorreu e a EE para essa formulação permaneceu ao redor de 30 %.

De modo geral, os resultados na Tabela 5 mostraram que todas as tentativas para aumentar a eficiência de encapsulação da mangiferina nos lipossomos, em pH fisiológico, levaram à um resultado próximo a 30 %. Essa eficiência de encapsulação é considerada moderada, mas importante do ponto de vista biológico, uma vez que, dependendo da concentração total do bioativo, a quantidade incorporada faz diferença na bioatividade.

A determinação da capacidade de carga (Equação 5) para as diferentes formulações estudadas mostrou valores que variam de 0,4 a 3,4 % (Tabela 5). A maior capacidade de carga foi obtida para a formulação **L4** (CC = 3,4 %) que está próxima daquela observada para a α -mangostina (uma xantona) (aproximadamente 4 %), conforme relatado no trabalho de Benjakul e colaboradores (2015) (BENJAKUL et al., 2015).

Pela Tabela 5, foi visto que a capacidade de carga aumenta com a razão bioativo/lipídeo, o que é consistente com o trabalho de Ulrich e colaboradores (2010), que relata o aumento da incorporação de polifenóis em lipossomos de fosfatidilcolina até um ponto de saturação (razão bioativo/lipídeo) que varia em função da estrutura do polifenol (ULRIH et al., 2010).

4.2.4.2 Noratiriol

A incorporação do noratiriol em lipossomos foi feita com base na formulação **L4**, contendo mangiferina, que apresentou a maior capacidade de carga, como mostra a Tabela 5. A formulação para o noratiriol foi denominada **L15**, cujos resultados para eficiência de encapsulação e capacidade de carga em lipossomos estão relacionados na Tabela 7.

Tabela 7 - Comparação das eficiências de encapsulação (EE) e capacidades de carga (CC) das formulações lipossomais preparadas com noratiríol (L15) e mangiferina (L4), ambas contendo PC:PE:COL (52:28:20), na concentração lipídica total de 2,9 mmol/L, concentração de bioativo de 0,3 mmol/L, relação bioativo/lipídeo (B/L) de 0,10, temperatura de hidratação do filme lipídico de 75°C e pH de 7,4.

Formulação	Composição	Lipídeo	Bioativo	B/L	T (°C)	pH	EE (%)	CC (%)
		Total (mmol/L)	Total (mmol/L)					
L15	PC:PE:COL	2,9	0,3	0,10	75	7,4	74	8,4
L4	PC:PE:COL	2,9	0,3	0,10	75	7,4	29	3,4

Fonte: Elaborada pelo autor.

A eficiência de encapsulação e a capacidade de carga do noratiríol (**L15**) nos lipossomos foram, aproximadamente, 2,5 vezes maiores que da mangiferina (**L4**). Este resultado era esperado em virtude da ausência do anel glicosídico na estrutura química do noratiríol, o que confere maior hidrofobicidade a esta molécula e maior afinidade pela bicamada lipídica.

4.2.4.3 Formulações liofilizadas

A utilização dos lipossomos na forma de dispersão lipídica apresenta algumas desvantagens relacionadas à presença de água no sistema, como por exemplo, a facilidade de contaminação microbológica e as dificuldades no transporte e armazenamento. Assim, o emprego do processo de liofilização, também conhecido como *freeze drying*, é capaz de aumentar o tempo de vida de prateleira dos nanocarreadores, garantindo maior proteção do bioativo.

A técnica da liofilização gera a secagem da amostra por meio de sublimação, removendo as moléculas de água que passam diretamente do estado sólido para o gasoso, sob pressão reduzida. Assim, é necessário que a amostra seja primeiramente congelada antes de passar pelo liofilizador. No entanto, durante este processo de congelamento e secagem à pressão negativa, a amostra pode sofrer prejuízos como insolubilidade, instabilidade e diminuição dos efeitos biológicos (FANG et al., 2018). A fim de contornar tais problemas, alguns açúcares como a sacarose e a trealose são utilizados como crioprotetores, com o intuito de minimizar as deformações estruturais decorrentes das variações bruscas de temperatura (HUA et al., 2003, VARSHOSAZ et al., 2012), evitando-se a perda do bioativo encapsulado (VAN WINDEN; CROMMELIN, 1999; WOLFE; BRYANT, 1999).

O efeito dos crioprotetores está baseado nas teorias de substituição de água e da vitrificação (CHEN et al., 2010). Na primeira, o carboidrato, ao interagir com a cabeça polar do fosfolípido, preserva um espaço entre as regiões polares na ausência de água, evitando a aproximação dessas regiões e, conseqüentemente, a ruptura do lipossomo (CROWE et al., 1997). Na teoria da vitrificação, a estabilização dos lipossomos desidratados se dá pela transformação da solução concentrada do crioprotetor para o estado vítreo, o qual é capaz de aprisionar os lipossomos em uma matriz amorfa (OHTAKE et al., 2004). Portanto, neste trabalho foram estudadas a sacarose e a trealose, nas concentrações de 5 e 10 %, a fim de avaliar o crioprotetor mais adequado para a formulação lipossomal de interesse. Para isso, foi selecionada a formulação **L4**, com maior capacidade de carga, cujo processo de liofilização resultou nas formulações **L11** a **L14**. As eficiências de encapsulação e capacidades de carga determinadas para essas formulações, na ausência e presença dos diferentes crioprotetores, estão comparadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Eficiências de encapsulação (EE) e capacidades de carga (CC) da mangiferina para a formulação lipossomal L4, contendo PC:PE:COL (52:28:20), concentração lipídica de 2,9 mmol/L, concentração de mangiferina de 0,3 mmol/L, relação bioativo/lípido de 0,10, temperatura de hidratação de 75°C, pH 7,4, na ausência e presença dos crioprotetores de sacarose (L11 e L12) e trealose (L13 e L14), nas concentrações de 5 e 10 %. Cada valor representa a média \pm o desvio padrão de determinações em, no mínimo, triplicata.

Formulação	Crioprotetor	Concentração (%)	EE (%)	CC (%)
L4	Não liofilizada	-	29 \pm 2,50	3,4 \pm 0,30
L11	Sacarose	5	22 \pm 0,01	2,6 \pm 0,01
L12	Sacarose	10	18 \pm 0,70	1,9 \pm 0,10
L13	Trealose	5	25 \pm 1,40	2,7 \pm 0,07
L14	Trealose	10	22 \pm 1,00	2,5 \pm 0,20

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados na tabela acima mostraram que os maiores valores para eficiência de encapsulação e capacidade de carga ocorreram para a formulação sem liofilizar e na ausência de crioprotetor (**L4**). Embora o processo de liofilização possa acarretar a saída do bioativo dos lipossomos, a utilização deste processo com o uso de crioprotetores acaba por ser preconizada, visto que leva à maior preservação das amostras, além de facilitar o seu manuseio, como já mencionado (FATTAL et al., 1991). Assim, por meio dos resultados da Tabela 8, foi visto que o uso da sacarose 10 % (**L12**) gerou menor capacidade de carga comparado às demais formulações,

sendo descartado como melhor crioprotetor. Analisando as outras três formulações (sacarose 5 % - **L11**, trealose 5 % - **L13** e trealose 10 % - **L14**), foram observadas capacidades de carga semelhantes, e o melhor crioprotetor foi escolhido baseado nos resultados dos parâmetros físico-químicos.

4.2.5 Determinação de parâmetros físico-químicos dos lipossomos: tamanho de partícula, índice de polidispersividade e potencial Zeta

4.2.5.1 Mangiferina

A perspectiva de aplicação das formulações lipossomais requer a caracterização físico-química dos lipossomos com a determinação de parâmetros que influenciam consideravelmente a estabilidade e o comportamento dos lipossomos em meio biológico (LASIC, 1998). Assim, as medidas de diâmetro hidrodinâmico e a distribuição homogênea (índice de polidispersividade ou *Polydispersity Index*, PDI) dos lipossomos em meio líquido foram monitoradas utilizando o espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering*, DLS), que é uma técnica que mede partículas menores que 1000 nm. Esta técnica se baseia no movimento browniano das partículas em suspensão, as quais se movem em virtude de sua energia térmica.

O movimento browniano é diretamente proporcional à temperatura, inversamente proporcional à viscosidade do meio e ao diâmetro da partícula, cuja velocidade é definida pelo coeficiente de difusão translacional (D). Quando as partículas são iluminadas com luz laser, ocorre o espalhamento desta luz com flutuações de intensidade que dependem do tamanho das partículas. A correlação entre espalhamento e tamanho pode ser feita por meio da equação de Stokes-Einstein (Equação 10).

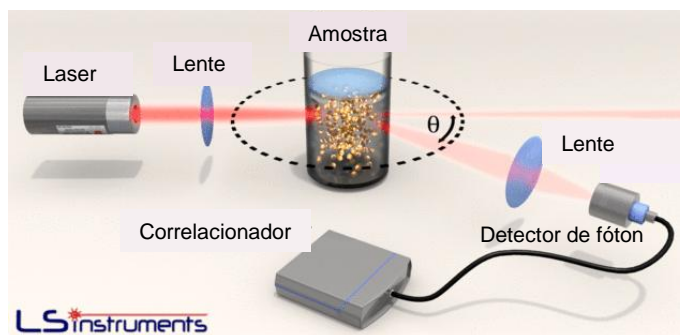
Equação 10

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

Na Equação 10, $d(H)$ é o diâmetro hidrodinâmico, k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, η é a viscosidade do solvente e D é o coeficiente de difusão translacional (TEJERA-GARCIA et al., 2011).

Um esquema representativo da técnica de DLS pode ser visto na Figura 30, que permite a obtenção do coeficiente de difusão e informações sobre o tamanho de partícula.

Figura 30 - Esquema representativo do princípio básico da medida de dispersão dinâmica de luz (DLS). A amostra é iluminada por um feixe de laser, e as flutuações da luz difusa são detectadas em um ângulo de dispersão conhecido, por um detector de fótons. O coeficiente de difusão e o tamanho de partícula são obtidos por meio do correlacionador.



Fonte: Adaptado de LS Instruments (2018).

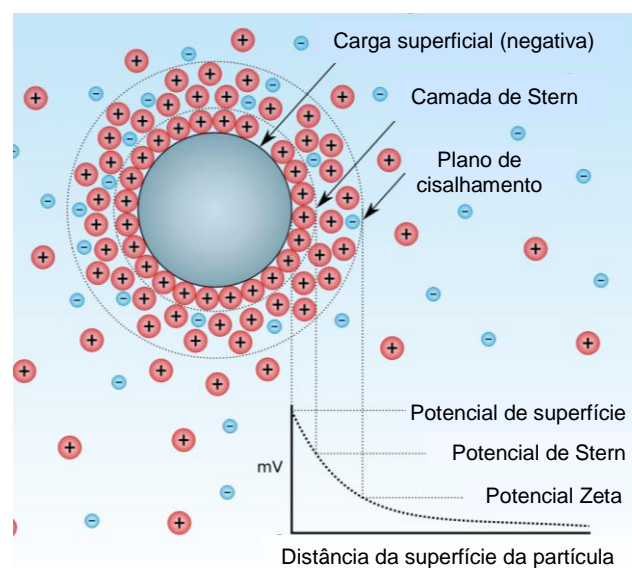
O potencial Zeta é um parâmetro que afeta a estabilidade das formulações e sua determinação permite o reconhecimento das causas de dispersão, agregação ou floculação, à medida que evidencia a magnitude das interações de atração e repulsão entre as partículas (CASALS et al., 2003). A medida do potencial Zeta favorece a redução do tempo e dos custos com testes de estabilidade. Quanto maior seu valor absoluto (positivo ou negativo), maiores são as forças de repulsão entre as nanopartículas, que evitam a agregação e promovem estabilidade.

Quando os materiais entram em contato com um meio líquido, na maioria das vezes adquirem uma carga elétrica superficial, seja pela dissociação ou ionização de grupos funcionais, ou pela adsorção de íons presentes na solução. A carga presente na superfície da partícula altera a distribuição de íons ao seu redor, atraindo contraíons, e levando à formação de uma dupla camada elétrica na interface da partícula com o líquido, como mostra a Figura 31.

Nesta figura, a partícula representada possui carga superficial negativa e, com isso, atrai uma camada de contraíons positivos, configurando a camada de Stern, na qual os íons estão fortemente ligados à partícula, determinando o potencial de Stern. Conforme a distância da superfície da partícula aumenta, uma camada difusa começa a ser formada, na qual os íons estão menos associados,

configurando o plano de cisalhamento. O potencial elétrico medido no plano de cisalhamento corresponde ao potencial Zeta, o qual indica alta estabilidade das partículas quando seu valor for maior que 30 mV, em módulo, para os casos em que a estabilidade ocorrer somente por carga.

Figura 31 - Diagrama representativo do potencial Zeta. Representação de uma partícula com superfície negativa, com uma camada de íons positivos adsorvidos, caracterizando a camada de Stern. Com a distância da superfície, começa a ocorrer o equilíbrio entre a quantidade de íons positivos e negativos, até o ponto no qual as concentrações iônicas são iguais e o potencial elétrico torna-se zero. Conforme a partícula se movimenta, a superfície efetiva é definida como plano de cisalhamento, e é nesta região em que o potencial Zeta é determinado.



Fonte: Adaptado de Wikipedia (2018).

O potencial Zeta é determinado pelo método de eletroforese de laser Doppler. Neste método, é aplicado um campo elétrico na dispersão, fazendo com que as partículas carregadas migrem para o eletrodo de carga oposta, a uma velocidade proporcional à magnitude de sua carga ou potencial Zeta. Concomitantemente, um feixe de laser passa através da amostra na célula capilar, gerando espalhamento de luz em decorrência do movimento da partícula, alterando a frequência. Esta alteração é diretamente proporcional à mobilidade eletroforética das partículas (ATTWOOD; FLORENCE, 2003).

O potencial Zeta pode ser calculado por meio da equação de Henry (Equação 11). Nesta equação, a função de Henry, $f(k, a)$, pode ser considerada igual a 1, pela aproximação de Huckel, quando partículas menores estão dispersas em um meio de baixa constante dielétrica, geralmente meios não aquosos, situação na qual o

diâmetro da partícula é muito menor que a dupla camada de cargas. No entanto, se a dupla camada de cargas for muito menor em relação ao diâmetro da partícula, utiliza-se a aproximação de Smoluchowsky, sendo $f(k.a)$ igual a 1,5. Nesta condição, as partículas apresentam 200 nm, ou mais, e estão dispersas em meio aquoso de moderada concentração de eletrólito (maior que 10 mmol/L) (SILVER COLLOIDS, 2001-2012; CLOGSTON; PATRI, 2009).

Equação 11

$$U_E = \frac{2 \cdot \epsilon \cdot z \cdot f(k.a)}{3\eta}$$

Na Equação 11, U_E é a mobilidade eletroforética, ϵ é a constante dielétrica, z é o potencial Zeta, $f(k.a)$ é a função de Henry e η é a viscosidade do solvente.

O monitoramento da estabilidade das formulações foi feito semanalmente, por um período de 29 dias. Para tanto, foram escolhidas as formulações **L6** (PC:PE:COL, 52:28:20, 14,5 mmol/L de lipídeo total, 0,3 mmol/L de mangiferina, 75°C, pH 7,4), **L8** (PC:PE:COL, 52:28:20, 14,5 mmol/L de lipídeo total, 0,3 mmol/L de mangiferina, 75°C, pH 6,5), **L9** (PC:PE:COL:DOTAP, 52:24:16:8, 14,5 mmol/L de lipídeo total, 0,3 mmol/L de mangiferina, 75°C, pH 7,4) e **L4** (PC:PE:COL, 52:28:20, 2,9 mmol/L de lipídeo total, 0,3 mmol/L de mangiferina, 75°C, pH 7,4) sendo que a última, **L4**, com maior capacidade de carga, foi escolhida para explorar outros parâmetros como liofilização e estabilidade após tal procedimento. As demais formulações foram selecionadas por apresentarem variáveis importantes, como pH e introdução do lipídeo catiônico DOTAP.

Os valores dos parâmetros analisados para **L6**, **L8** e **L9** estão relacionados na Tabela 9, e mostraram que as nanopartículas lipossomais foram estáveis ao longo de 29 dias, com tamanhos e índices de polidispersividade relativamente constantes. Notou-se, no entanto, que os lipossomos (branco e com mangiferina) contendo o lipídeo DOTAP (formulação **L9**) foram menores que os das formulações **L6** e **L8**. Tal fato é explicado pela atração eletrostática entre as cargas negativas dos grupos fosfato, nas cabeças polares dos fosfolipídeos PC e PE, e a carga positiva do DOTAP, resultando na aproximação e menor repulsão entre os fosfolipídeos, favorecendo o menor tamanho (CAMPBELL et al., 2001).

Tabela 9 - Parâmetros físico-químicos de tamanho de partícula, índice de polidispersividade (Pdl) e potencial Zeta (PZ) para as formulações L6 (PC:PE:COL, 52:28:20, pH 7,4), L8 (PC:PE:COL, 52:28:20, pH 6,5) e L9 (PC:PE:COL:DOTAP, 52:24:16:8, pH 7,4), preparadas na concentração lipídica total de 14,5 mmol/L, concentração de mangiferina de 0,3 mmol/L e temperatura de hidratação do filme lipídico de 75°C. As formulações foram armazenadas a 5°C e monitoradas por 29 dias, na ausência (Branco) e presença de mangiferina.

Tempo (dias)	Branco			Mgf		
	Tamanho (nm)	Pdl	PZ (mV)	Tamanho (nm)	Pdl	PZ (mV)
L6 - PC:PE:COL (52:28:20), pH 7,4						
1	108,6	0,283	-24,7	98,77	0,279	-27,2
8	106,9	0,271	-23,3	97,21	0,300	-23,5
15	108,1	0,277	-25,0	102,3	0,326	-18,2
22	105,9	0,330	-24,8	101,5	0,303	-26,7
29	103,9	0,275	-27,4	99,95	0,395	-32,8
L8 - PC:PE:COL (52:28:20), pH 6,5						
1	101,5	0,298	-21,4	90,28	0,287	-20,3
8	104,0	0,267	-30,6	93,65	0,359	-20,3
15	98,41	0,361	-26,3	91,70	0,365	-17,8
22	104,1	0,288	-29,5	93,16	0,357	-21,5
29	103,2	0,279	-37,6	92,99	0,287	-24,4
L9 - PC:PE:COL:DOTAP (52:24:16:8), pH 7,4						
1	76,34	0,124	32,6	71,83	0,163	32,5
8	74,75	0,128	8,31	75,19	0,188	7,81
15	75,80	0,084	8,52	77,97	0,205	6,64
22	76,89	0,120	37,9	80,01	0,171	34,7
29	85,69	0,144	29,0	83,80	0,201	37,2

Fonte: Elaborada pelo autor.

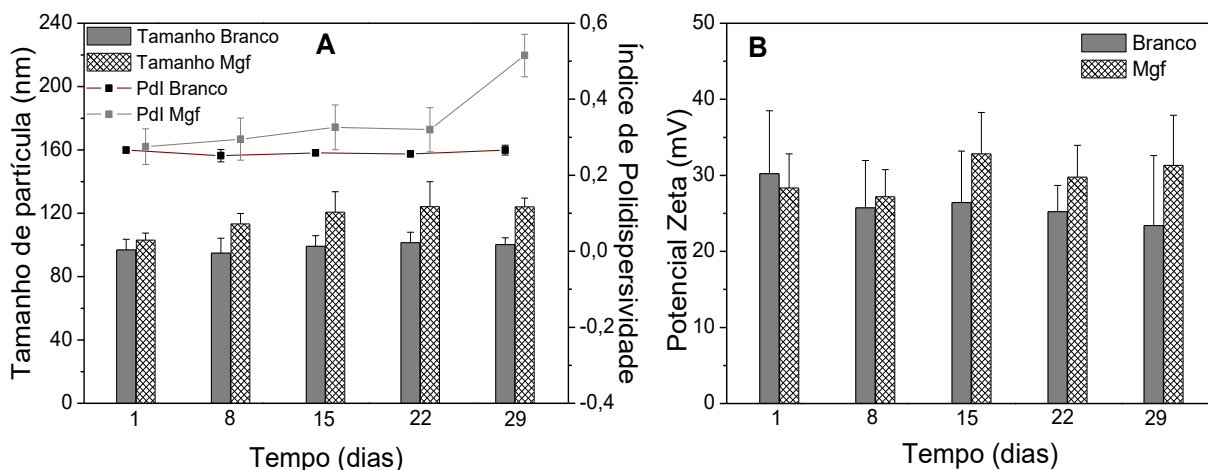
O índice de polidispersividade se manteve ao redor de 0,3, para as formulações **L6** e **L8**, e ao redor de 0,2 para a formulação **L9**. Esses resultados demonstram uma distribuição de tamanho homogênea, caracterizada por um perfil de distribuição monomodal que é importante na formulação e na aplicação terapêutica (SCHAFFAZICK et al., 2003). O menor índice de polidispersividade para **L9**, comparado à **L6** e **L8**, justifica-se pela presença do DOTAP, cujas cargas positivas levam à repulsão eletrônica entre as nanopartículas, diminuindo a agregação (HASANOVIC et al., 2010).

Os resultados de potencial Zeta para as formulações lipossomais **L6** e **L8** mostraram potencial de carga negativa. No caso do lipossomo branco, o

potencial negativo é explicado pela presença de maior quantidade de espécies aniônicas (íons Cl^-), provenientes do tampão de Tyrode, que neutralizam parte das cargas positivas do grupo colina nos fosfolipídeos, aumentando a carga superficial negativa do lipossomo. Na presença da mangiferina, em pH 7,4 (**L6**), notou-se um discreto aumento no valor absoluto do potencial Zeta, o qual se tornou mais negativo, em função da presença da mangiferina aniônica, que exerce, também, o papel de neutralizar as cargas positivas do grupo colina. Para a **L8** (pH 6,5), o potencial Zeta continuou negativo em virtude dos íons Cl^- e da mangiferina aniônica, porém, foi menos negativo que a **L6**, devido à maior quantidade de espécies neutras da mangiferina. Para a formulação **L9**, o potencial Zeta foi positivo pela presença do lipídeo catiônico DOTAP. Apesar dos valores de potencial Zeta terem oscilado consideravelmente durante o 8° e 15° dia da análise da **L9** (Tabela 9), tal variação não significou uma perda de estabilidade físico-química da formulação, uma vez que seus valores se restabeleceram nas próximas leituras, e os valores de tamanho e índice de polidispersividade se mantiveram praticamente constantes.

Com relação à formulação **L4**, os parâmetros determinados estão representados na Figura 32.

Figura 32 - Parâmetros físico-químicos de tamanho de partícula e índice de polidispersividade (A), e potencial Zeta (B), em módulo, da formulação L4 (PC:PE:COL - 52:28:20) na concentração lipídica total de 2,9 mmol/L, concentração de bioativo de 0,3 mmol/L, relação bioativo/lipídeo (B/L) de 0,10, temperatura de hidratação do filme lipídico de 75°C e pH de 7,4. A formulação foi armazenada a 5°C e monitorada por 29 dias, na ausência (Branco) e presença de mangiferina. Cada valor representa a média \pm o desvio padrão de determinações em quadruplicata.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os parâmetros físico-químicos determinados para **L4** (Figura 32 A e B) mostraram um perfil estável no período de 29 dias. O tamanho médio das nanopartículas foi constante, ao longo do tempo avaliado, com tamanho médio de 100 nm para os lipossomos sem mangiferina, e 120 nm para os lipossomos contendo o bioativo (Figura 32 A). O aumento do tamanho do lipossomo na presença de mangiferina é um indício da incorporação da mesma, compatível com a maior capacidade de carga observada para essa formulação.

O índice de polidispersividade foi em torno de 0,3 para os lipossomos, em ausência e presença de mangiferina, o que indica homogeneidade na formulação e boa estabilidade no tempo avaliado (Figura 32 A). No entanto, foi observado, no último dia de análise para essa formulação (**L4**), um aumento da polidispersividade na presença de mangiferina (Pdl = 0,5). Este resultado pode ser um indicativo de um início da perda de estabilidade da formulação.

4.2.5.2 Noratiriol

A estabilidade da formulação **L15**, contendo noratiriol, foi monitorada por 29 dias e os parâmetros físico-químicos, determinados para esta formulação, estão apresentados na Tabela 10, abaixo.

Tabela 10 - Parâmetros físico-químicos de tamanho de partícula, índice de polidispersividade (Pdl) e potencial Zeta (PZ) da formulação L15 (PC:PE:COL, 52:28:20) na concentração lipídica total de 2,9 mmol/L, concentração de bioativo de 0,3 mmol/L, relação bioativo/lipídeo (B/L) de 0,10, temperatura de hidratação do filme lipídico de 75°C e pH de 7,4. A formulação foi armazenada a 5°C e monitorada por 29 dias, na ausência (Branco) e presença de noratiriol.

Tempo (dias)	Branco			Nrt		
	Tamanho (nm)	Pdl	PZ (mV)	Tamanho (nm)	Pdl	PZ (mV)
1	96,31	0,273	-27,1	117,7	0,272	-27,7
8	96,28	0,302	-23,9	133,7	0,380	-29,6
15	102,4	0,264	-23,8	133,9	0,372	-30,1
22	98,13	0,282	-23,0	160,1	0,450	-33,4
29	102,7	0,273	-35,1	170,4	0,430	-40,2

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados na Tabela 10 mostraram que o tamanho de partícula e o índice de polidispersividade foram maiores para os lipossomos contendo noratiriol, indicando a incorporação efetiva do bioativo nos nanocarreadores. Notou-se, ainda,

que o tamanho e o índice de polidispersividade dos lipossomos contendo noratiriol aumentaram durante o tempo de monitoramento, com a formação de agregados após o 15º dia da preparação. Acredita-se que a ausência do glicosídeo na estrutura do noratiriol favoreça a incorporação em regiões mais profundas da bicamada, o que pode ter contribuído para a agregação dos lipossomos, que foi um comportamento contrário ao observado para a mangiferina, a qual deve estar mais associada na cabeça lipídica, prevenindo a agregação.

Embora os valores apresentados ainda indiquem sistemas com tamanhos de partícula adequados para uma administração endovenosa (< 200 nm) e média polidispersividade (0,3 - 0,6), pode-se dizer que os lipossomos contendo noratiriol foram menos estáveis em comparação aos lipossomos contendo mangiferina.

O potencial Zeta foi negativo tanto na ausência quanto na presença do bioativo e mesmo assim houve agregação dos lipossomos, o que é um indicativo de que na interação do noratiriol com a bicamada lipídica ocorra o predomínio de forças hidrofóbicas e não eletrostáticas como no caso da mangiferina.

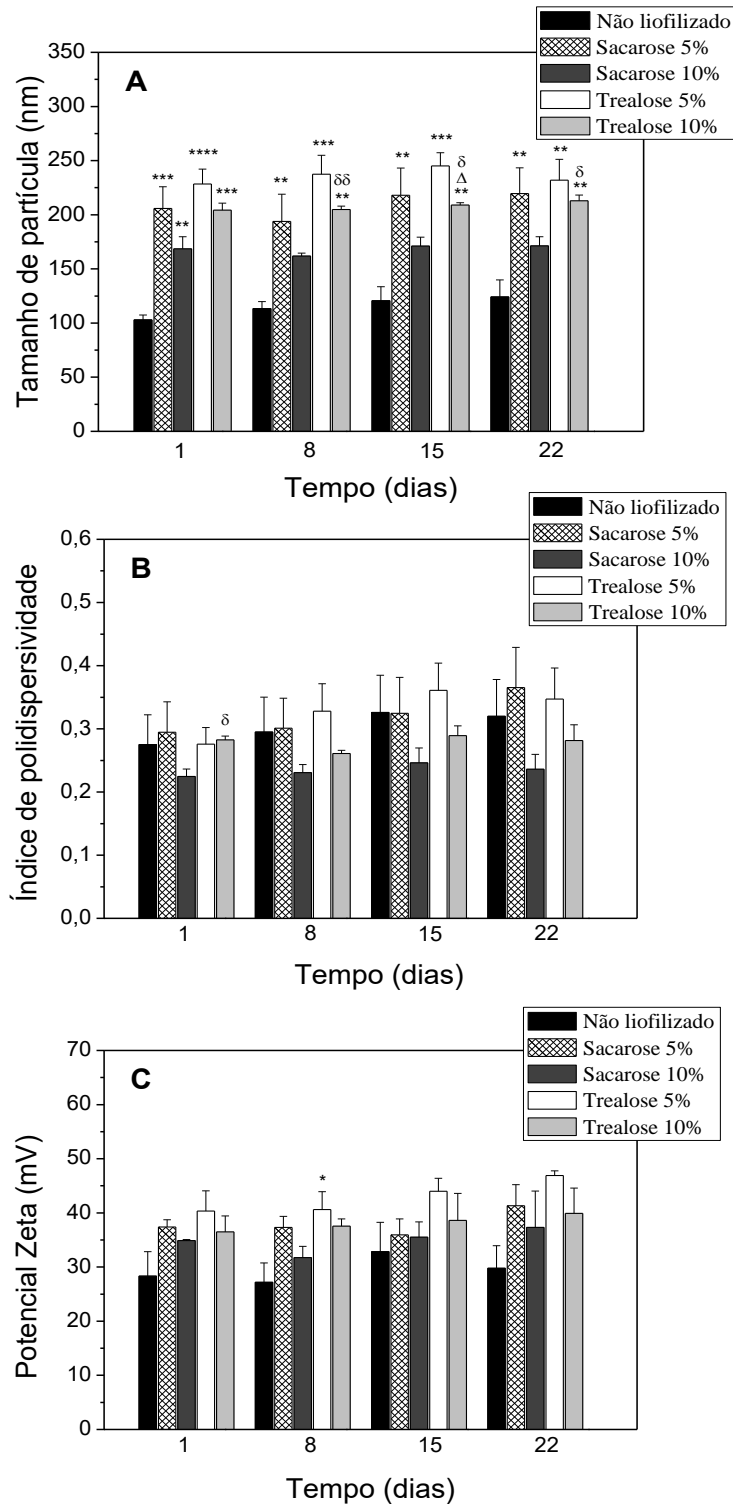
4.2.5.3 Formulações liofilizadas

A estabilidade das formulações foi monitorada, semanalmente, por 22 dias através das medidas de tamanho, índice de polidispersividade e potencial Zeta, e os resultados foram comparados na Figura 33. As estatísticas foram realizadas por meio da análise de *One-Way* ANOVA seguido pelo teste de Dunnett, e por meio da análise do Teste T de *Student*.

Os resultados na Figura 33 A mostraram que o tamanho das nanopartículas após a liofilização foi significativamente maior para todas as formulações estudadas com exceção daquela liofilizada na presença de sacarose 10 % (**L12**). Tal formulação apresentou um tamanho de partícula inferior a 200 nm, porém, teve menor capacidade de carga (1,9 %), como apresentado na Tabela 8. Embora a formulação de trealose 5 % (**L13**) tenha apresentado uma maior capacidade de carga (2,7 %), seu tamanho de partícula foi superior a 200 nm, o que inviabiliza uma administração por via intravenosa. Comparando as formulações de sacarose 5 % (**L11**) e trealose 10 % (**L14**), ambas apresentaram capacidades de carga semelhantes e tamanhos de partícula ao redor de 200 nm. No entanto, em virtude da **L14** ter apresentado uma menor barra de incerteza, tal formulação foi considerada melhor para administração pela via desejada.

Com relação ao índice de polidispersividade (Figura 33 B), todas as formulações apresentaram valores entre 0,2 e 0,3, indicando sistemas pouco polidispersos. E na análise do potencial Zeta (Figura 33 C), todas as formulações apresentaram valores iguais ou superiores a 30 mV, em módulo, o que indica maior probabilidade de estabilidade. Assim, a formulação **L14**, liofilizada com o uso do açúcar trealose a 10 % como crioprotetor, foi a melhor representada.

Figura 33 - Comparação dos parâmetros físico-químicos de tamanho de partícula (A), índice de polidispersividade (B) e potencial Zeta (C) das formulações lipossomais antes e após processo de liofilização, utilizando os crioprotetores de sacarose e trealose, a 5 % e 10 %, monitorados no período de 22 dias. As formulações foram armazenadas a 5°C e cada valor representa a média ± o desvio padrão de determinações em triplicata. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 e ****p < 0,0001 em comparação à formulação antes de liofilizar; Δ p < 0,05 em comparação à trealose 5 %; δ p < 0,05 e $\delta\delta$ p < 0,01 em comparação à sacarose 10 %, para cada semana de monitoramento.



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3 Ensaios biológicos

4.3.1 Estudo do potencial antialérgico das espécies xantônicas

Como já mencionado, a mangiferina e sua aglicona, o noratiriol (**5**), inibem a desgranulação, *in vitro*, de mastócitos estimulados por antígeno, e a modificação química de substituintes nas diferentes posições do anel pode levar à compreensão dos grupos responsáveis pela bioatividade dessas moléculas. O estudo do potencial antialérgico da mangiferina e de seus derivados (compostos **4**, **5** (noratiriol) e **6**) foi realizado pelo modelo biossensor baseado em mastócitos (NAAL et al., 2004), cujo sinal biológico é representado pela desgranulação das células estimuladas por antígeno. A desgranulação libera a enzima β -hexosaminidase a qual é quantificada pela reação com o substrato MUG, gerando o produto fluorescente metilumbeliferona, como já mostrado na Figura 5.

Quando as células são estimuladas por alérgenos, ou morrem (por necrose), o conteúdo granular dos mastócitos é liberado para o meio extracelular e, com isso, observa-se um aumento da porcentagem da enzima β -hexosaminidase liberada. O mesmo comportamento pode ser observado quando as células são tratadas por moléculas exógenas durante o *screening* farmacêutico, ou seja, pode ser observado um aumento de liberação da β -hexosaminidase em relação ao controle (ausência de bioativo). Se esse comportamento é observado, diz-se que tais moléculas apresentam potencial alergênico, ou seja, estimulam a liberação de mediadores químicos dos grânulos secretórios levando às reações alérgicas.

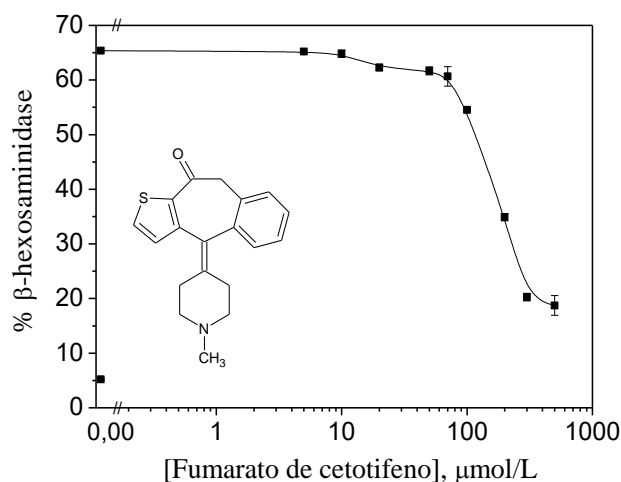
Se as moléculas investigadas com potencial biológico inibem a desgranulação mastocitária e reduzem a porcentagem de β -hexosaminidase liberada, pode-se dizer, a priori, que as mesmas apresentam potencial antialérgico e, assim, podem ser consideradas moléculas promissoras no estudo de novos fármacos antialérgicos. No entanto, o perfil de inibição da desgranulação pode, também, ser decorrente de morte celular (por apoptose). Assim, o ensaio para quantificação da enzima β -hexosaminidase (NAAL et al., 2004) sinaliza tanto a inibição da desgranulação (potencial antialérgico) quanto o estímulo celular (potencial alergênico), sendo que ambos podem ser indicativos de morte celular, o que justifica o estudo cuidadoso sobre a citotoxicidade dos mastócitos tratados por bioativos.

Quando um perfil de inibição da porcentagem de β -hexosaminidase é observado, outro fator importante a ser considerado é a possibilidade de estar

ocorrendo a inibição da atividade da enzima após a desgranulação, o que resulta em menor reação com o substrato (MUG), menor quantidade do produto metilumbeliferona produzido e, conseqüentemente, menor fluorescência (vide reação na Figura 5). Se isso ocorrer, pode ser observado um falso positivo e, por essa razão, sempre que houver inibição da desgranulação, além da citotoxicidade, deve-se avaliar se a atividade da enzima não está sendo comprometida na presença das moléculas investigadas como potenciais antialérgicos.

O efeito inibidor das substâncias investigadas no presente estudo foi comparado àquele apresentado pelo fármaco antialérgico fumarato de cetotifeno (17 % de inibição na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$) (Figura 34), o qual, além de atuar como antagonista de receptores histamínicos H1, também age como estabilizador de mastócitos (SERNA; PORRAS; VERGARA, 2006), e, portanto, é amplamente empregado como controle positivo para este tipo de estudo.

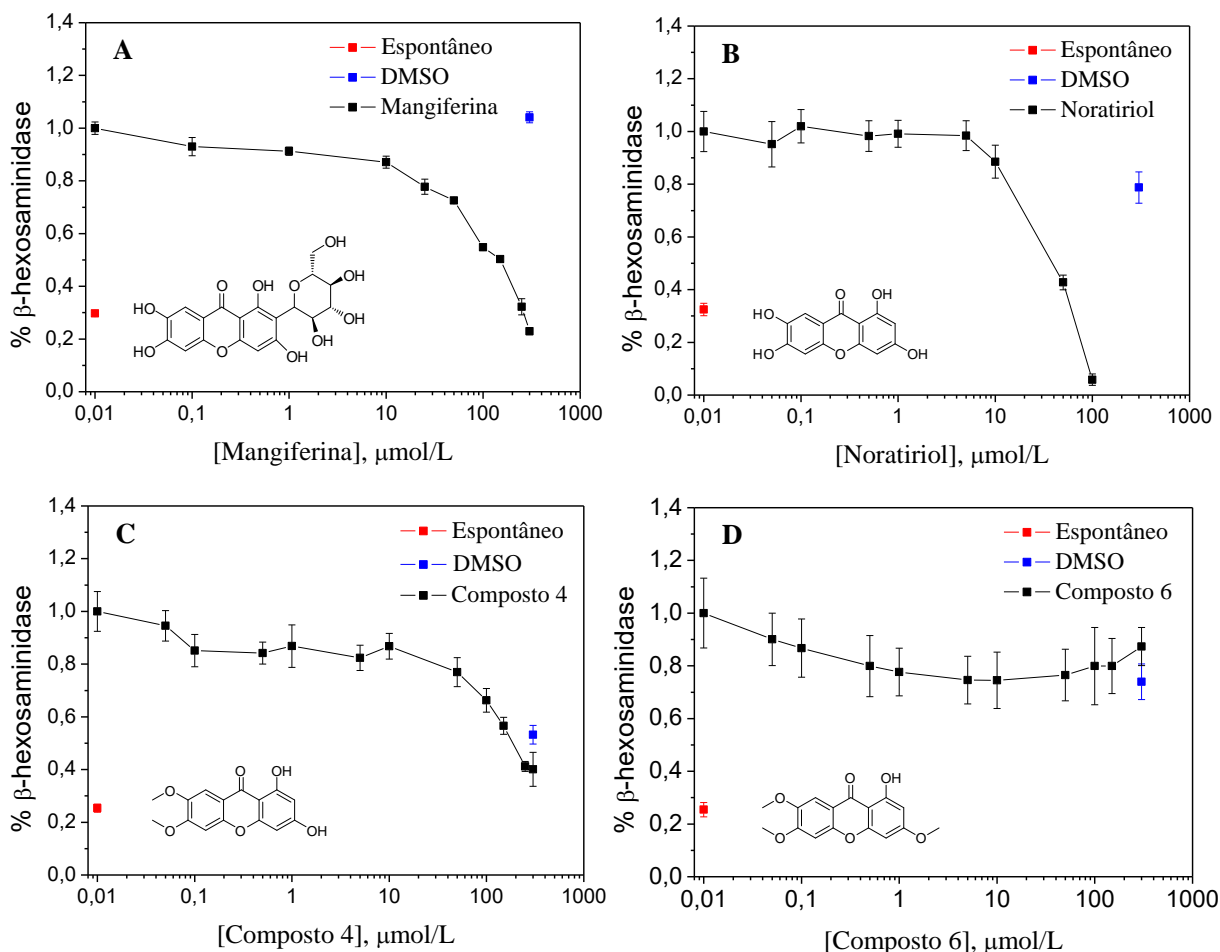
Figura 34 - Porcentagem de β -hexosaminidase liberada para as células estimuladas pelo antígeno DNP-BSA (0,1 $\mu\text{g/mL}$) na presença de diferentes concentrações de fumarato de cetotifeno. Cada valor representa a média \pm desvio padrão de determinações em quadruplicata.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Nas Figuras 35 A-D a seguir, podem ser observadas as porcentagens de liberação da enzima β -hexosaminidase em função da concentração das moléculas teste (mangiferina, composto 5 (noratiriol), composto 4 e composto 6).

Figura 35 - Porcentagem de β -hexosaminidase liberada para as células estimuladas pelo antígeno DNP-BSA ($0,1 \mu\text{g/mL}$) por meio do ensaio direto, na presença da mangiferina (A), noratiriol (composto 5) (B), composto 4 (C) e composto 6 (D). Cada valor representa a média \pm desvio padrão de determinações em triplicata.



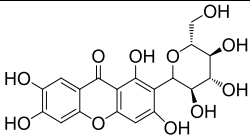
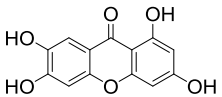
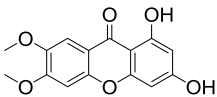
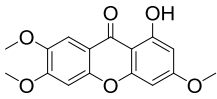
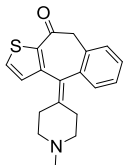
Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados mostraram que a mangiferina inibe a desgranulação em 45 % na concentração de $100 \mu\text{mol/L}$ do bioativo (Figura 35 A, Tabela 11). A eliminação do grupo glicosídeo na posição 2 do núcleo xantônico resultou no composto **5** (noratiriol), que é uma estrutura mais ativa que a mangiferina, com porcentagem de inibição igual a 94 % na concentração de $100 \mu\text{mol/L}$ do bioativo (Figura 35 B). Esse resultado foi coerente com outros estudos de atividade biológica (WANG et al., 2014; SHI et al., 2017) que comparam a mangiferina e noratiriol, e mostram que a eliminação do açúcar aumenta o potencial farmacológico, provavelmente em função da maior biodisponibilidade e facilidade de interação da molécula com a membrana biológica.

Quando as hidroxilas do grupo catecol, no composto **5** (noratiriol), foram substituídas por grupos metóxi (posições 6 e 7 do anel xantônico), o composto **4** formado apresentou um perfil de inibição de 34 % na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$ do bioativo. A substituição das duas hidroxilas, por duas metoxilas, que são grupos mais apolares, resultou em considerável redução da solubilidade do composto **4**, com consequente prejuízo para a bioatividade, comparado ao composto **5** (noratiriol). Devido à baixa solubilidade do composto **4**, foi necessário o uso de maior porcentagem de DMSO na solubilização, o que levou à inibição da desgranulação pelo solvente, na concentração de 300 $\mu\text{mol/L}$ do bioativo (Figura 35 C). No entanto, essa inibição não foi observada na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$ usada para a comparação da atividade entre as diferentes estruturas. A substituição da hidroxila, por metoxila, na posição 3 do anel xantônico, resultou no composto **6**, totalmente inativo (Figura 35 D).

Tais resultados sugerem que a presença do açúcar na molécula, de fato, contribui para a menor atividade antialérgica da mangiferina comparada ao noratiriol. Além disso, a presença das hidroxilas nas posições 6 e 7 do anel da xantona (grupo catecol) parece ser crucial para a bioatividade, pois estes substituintes influenciam na solubilidade da molécula. Finalmente, pode-se dizer, a priori, que a presença de hidroxilas nas posições 1 e 3 do anel favorecem a atividade, uma vez que a substituição da hidroxila na posição 3 gerou um composto incapaz de inibir a desgranulação dos mastócitos (Figura 35 D, Tabela 11). De acordo com estes resultados, os compostos **4** e **6** foram eliminados dos estudos posteriores, permanecendo a mangiferina e o noratiriol como moléculas de destaque e investigação neste trabalho.

Tabela 11 – Efeito inibidor dos derivados xantônicos na desgranulação dos mastócitos.

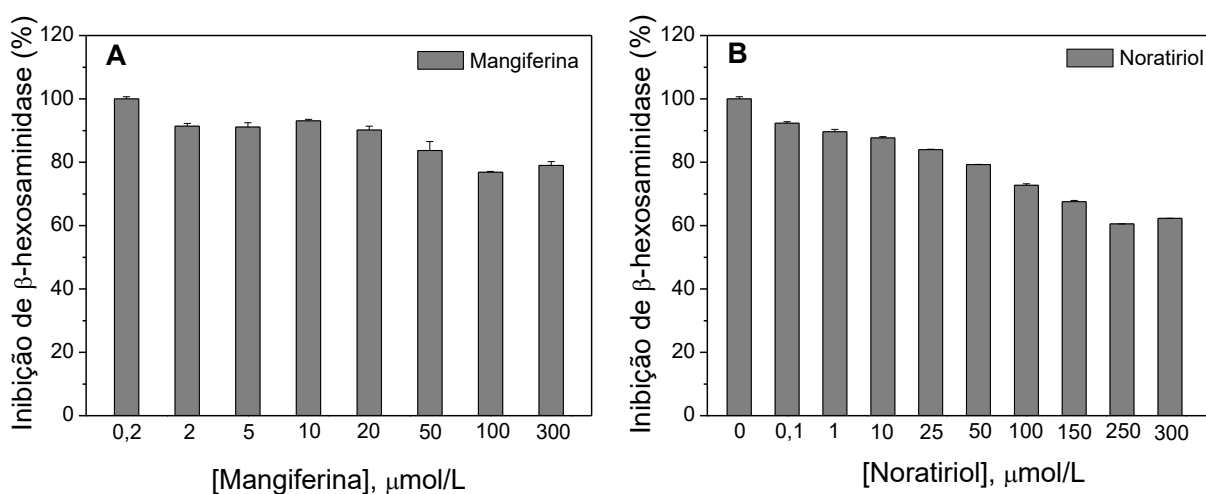
Composto	Estrutura	% Inibição em 100 $\mu\text{mol/L}$
Mangiferina		45
Noratiriol (5)		94
Composto 4		34
Composto 6		-
Fumarato de cetotifeno		17

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3.2 Avaliação da inibição da atividade da enzima β -hexosaminidase

Com objetivo de investigar se os bioativos estavam interferindo na desgranulação mastocitária, e não promovendo a inibição direta da atividade da enzima β -hexosaminidase, foram realizados os ensaios de inibição da enzima na presença de mangiferina e noratiriol (5). Através da Figura 36 A, constatou-se que a mangiferina inibe, aproximadamente, 23 % da atividade da enzima β -hexosaminidase, sugerindo que a inibição da desgranulação na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$ ocorre com 22 %. No caso do noratiriol (5) (Figura 36 B), também ocorreu influência sobre a atividade da enzima β -hexosaminidase a partir da concentração de 10 $\mu\text{mol/L}$, sendo que em 100 $\mu\text{mol/L}$ ele inibe 24 %, restando 70 % de inibição para a desgranulação. Assim, apesar de ambos os bioativos interferirem na atividade da β -hexosaminidase, a comparação entre os bioativos mostrou que o noratiriol foi mais eficiente em interferir no processo de desgranulação mastocitária comparado à mangiferina.

Figura 36 - Efeito da presença de mangiferina (A) e noratiriol (composto 5) (B) na atividade da enzima β -hexosaminidase. Cada valor representa a média \pm desvio padrão de determinações em quadruplicata.

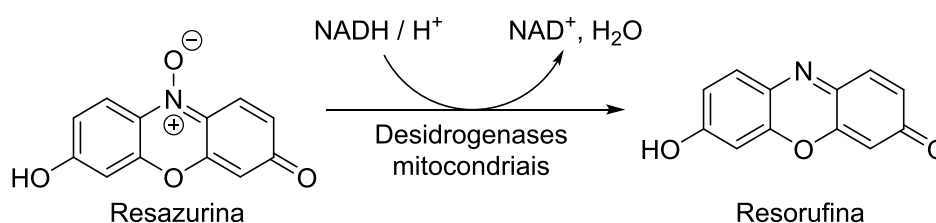


Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3.3 Avaliação da citotoxicidade dos bioativos

A citotoxicidade da mangiferina e do noratiriol para os mastócitos da linhagem RBL-2H3 foi investigada pelo método da resazurina, que consiste na medida da atividade de redutases mitocondriais para reduzir a molécula de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido), um corante azul, em resorufina, um corante rosa fluorescente (Figura 37). A redução da molécula de resazurina só acontece quando as enzimas mitocondriais estão ativas, ou seja, somente para células vivas, o que permite utilizar o ensaio como um índice de viabilidade celular (CANDEIAS et al., 1998).

Figura 37 - Redução da resazurina em resorufina por meio das enzimas NADPH ou NADH desidrogenase, em células viáveis.

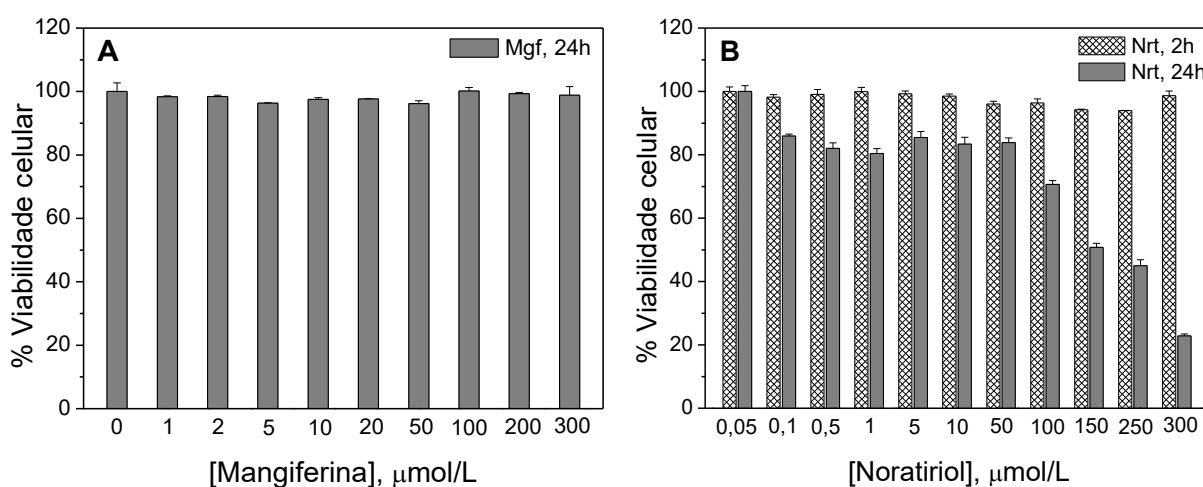


Fonte: Adaptado de Candeias e colaboradores (1998).

A Figura 38 mostra o efeito dos bioativos sobre a viabilidade dos mastócitos. Para cada substância foi determinada a porcentagem de células viáveis até a concentração máxima de 300 $\mu\text{mol/L}$. Os resultados mostraram que as células são

100 % viáveis na presença de mangiferina com tempo de incubação de 24 horas (Figura 38 A), e noratiriol com tempo de incubação de 2 horas (Figura 38 B). Notou-se que o noratiriol é citotóxico quando as células são expostas a ele por um período de 24 horas. Porém, considerando que o ensaio de inibição da desgranulação mastocitária é realizado em um tempo máximo de 2 horas, pode-se dizer que a inibição da desgranulação observada não foi decorrente de citotoxicidade, mas, sim, do efeito inibidor desses compostos na desgranulação dos mastócitos.

Figura 38 - Viabilidade celular dos mastócitos na presença de mangiferina (A) e noratiriol (B). Cada valor representa a média \pm o desvio padrão de determinações em triplicata.

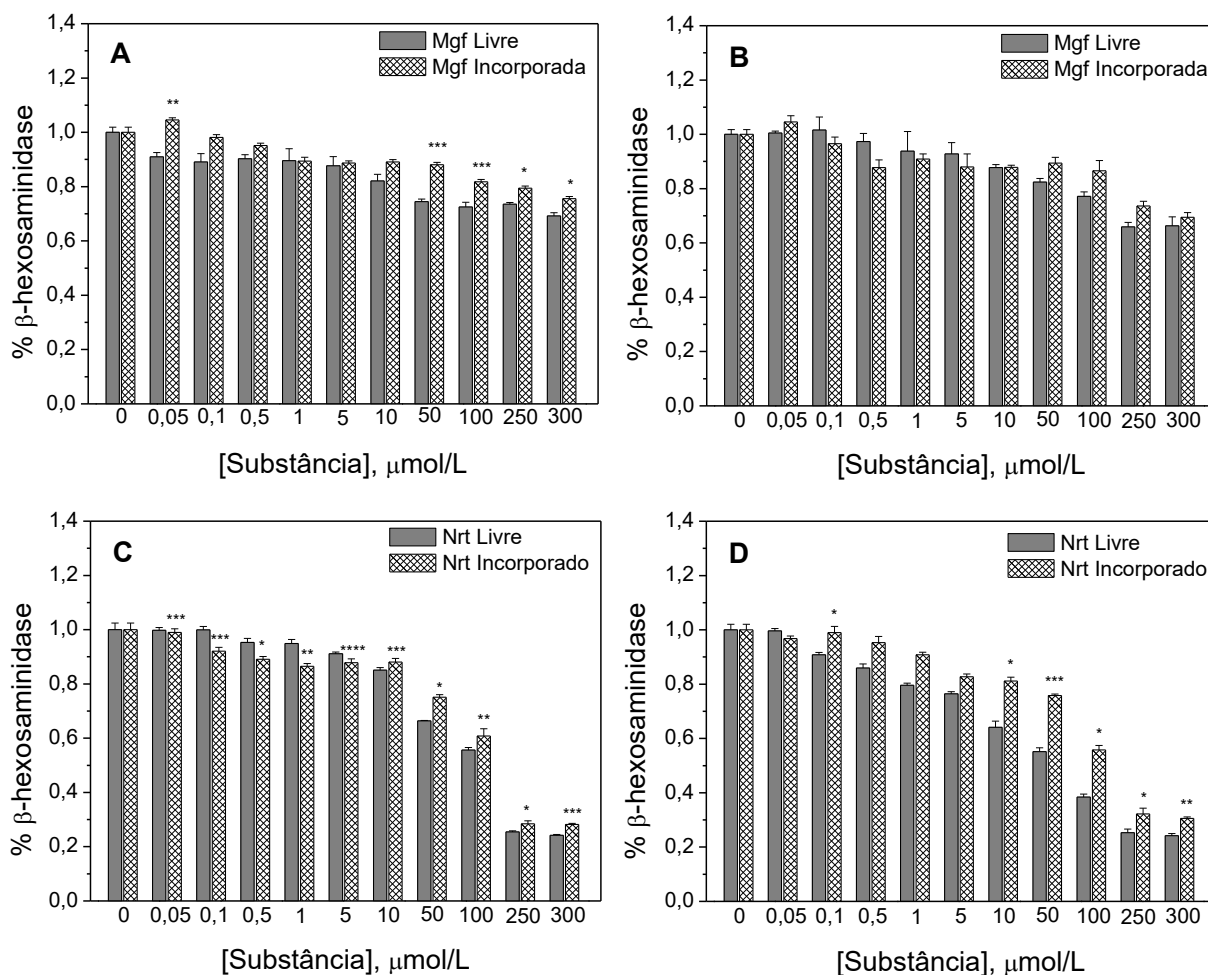


Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3.4 Avaliação da desgranulação mastocitária dos bioativos livres e incorporados nos lipossomos

As porcentagens de liberação da enzima β -hexosaminidase em função das concentrações dos bioativos, mangiferina e noratiriol, livres ou incorporados em lipossomos, estão representadas nas Figuras 39 A-D. Os resultados mostraram que a formulação lipossomal contendo noratiriol foi mais efetiva na inibição da desgranulação que a formulação contendo mangiferina, o que é consistente com o maior potencial antialérgico do noratiriol na forma livre. Em ambos os casos, a formulação lipossomal diminuiu aproximadamente 10 % do potencial antialérgico dos bioativos nas maiores concentrações (100 a 300 $\mu\text{mol/L}$), e não houve diferença significativa neste perfil quando o tempo de incubação das células aumentou de 20 para 60 minutos (Figuras 39 A-D).

Figura 39 - Porcentagem de β -hexosaminidase liberada para as células estimuladas pelo antígeno DNP-BSA ($0,1 \mu\text{g/mL}$) na presença de mangiferina livre e incorporada em lipossomo, com 20 (A) e 60 min (B) de incubação, e noratiriol livre e incorporado, com 20 (C) e 60 min (D) de incubação. Os experimentos foram realizados por meio de ensaio padrão, e cada valor representa a média \pm desvio padrão de determinações em triplicata. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ em comparação ao bioativo livre, para cada uma das concentrações estudadas.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Estudos prévios realizados no grupo sobre a liberação, *in vitro*, da mangiferina incorporada em lipossomos de DMPC:DOTAP:COL mostraram que somente 20 % do bioativo é liberado no tempo de 2 horas, o que explica o menor desempenho dos bioativos incorporados na formulação lipossomal comparado aos bioativos na forma livre. Estes resultados são consistentes com estudos de liberação do polifenol silimarina em lipossomos de lecitina e colesterol, os quais mostraram que a quantidade máxima do bioativo na formulação é liberada após 5 horas (EL-SAMALIGY; AFIFI; MAHMOUD, 2006).

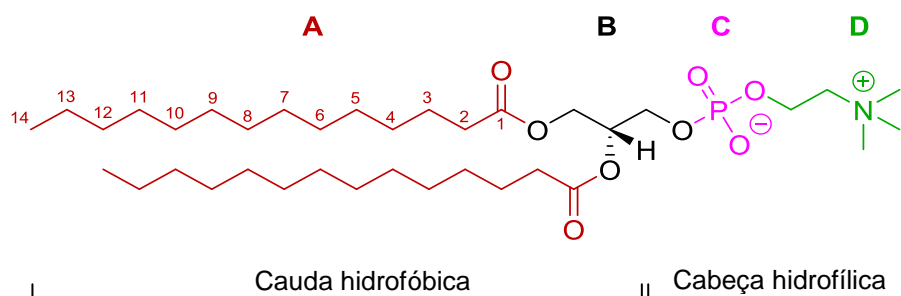
É importante destacar que nem a formulação lipossomal e nem os bioativos livres estimularam a liberação da enzima β -hexosaminidase, sugerindo que os mesmos não apresentam propriedades alergênicas *in vitro*, ou seja, não estimulam alergias. Este resultado é bastante satisfatório do ponto de vista de aplicações biológicas pretendidas, principalmente no caso da formulação lipossomal, cujo papel, além de melhorar a solubilidade, é garantir a integridade do bioativo até atingir o alvo.

4.4 Sistemas lipossomais como modelos de membrana biológica

As membranas biológicas desempenham um papel importante no transporte, distribuição, ação, seletividade e toxicidade de fármacos. A presença de moléculas de fármacos na estrutura organizada da bicamada lipídica pode interferir no empacotamento das cadeias lipídicas e na fluidez da membrana (KOYNOVA; CAFFREY, 1998). Este efeito depende da estrutura do fármaco, cuja natureza, hidrofílica ou hidrofóbica, resulta em interações diferentes com a membrana biológica.

Neste estudo, os lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) (Figura 40) foram usados como modelos de membrana biológica, uma vez que os lipídeos sintéticos apresentam uniformidade na cadeia carbônica, com temperaturas de transição de fases definidas, que são importantes para o estudo sobre a localização e influência do fármaco na bicamada. Os efeitos da mangiferina sobre a fluidez da bicamada lipídica, assim como suas localizações, foram estudados pela combinação das técnicas de calorimetria exploratória diferencial, anisotropia de fluorescência e ressonância paramagnética eletrônica.

Figura 40 - Estrutura química do fosfolípídeo 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosforilcolina (DMPC), com identificação das regiões das cadeias de ácidos graxos (ou cadeias acila) (A), glicerol (B), grupo fosfato (C) e grupo colina (D).



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4.1 Calorimetria Exploratória Diferencial

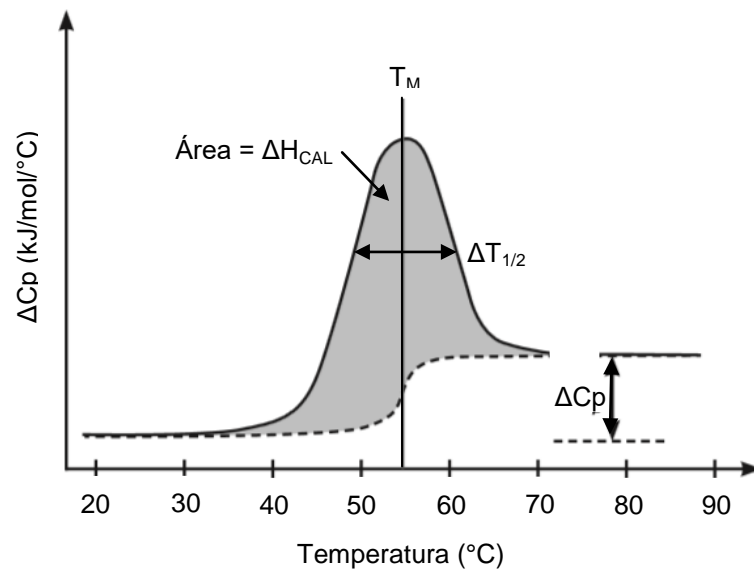
A calorimetria exploratória diferencial é uma técnica termodinâmica apropriada para estudar os efeitos térmicos de aditivos na bicamada lipídica, e tem sido usada para entender o efeito de polifenóis na membrana lipídica (SAIJA et al., 1995). Parâmetros como temperatura de transição de fases, entalpia e grau de cooperatividade podem ser obtidos em um termograma de DSC (MARSH; WATTS; KNOWLES, 1977; KANEHISA; TSONG, 1978).

Essa técnica se baseia no uso de um microcalorímetro contendo dois compartimentos (celas), sendo uma cela de referência onde é colocado um tampão específico, e outra de amostra onde são inseridas as suspensões lipídicas na ausência ou presença do bioativo. Ambas as celas são aquecidas, ou resfriadas, e a diferença de temperatura entre elas é medida em unidades de potência (dQ/dt), ou seja, quantidade de calor por unidade de tempo, relativos à diferença de fluxo de calor entre as celas da amostra e referência. Quando não há diferença entre as temperaturas das duas celas, uma linha de base horizontal é obtida, indicando que amostra e referência se alteram igualmente com a variação de temperatura. No entanto, quando a amostra está próxima da temperatura de transição de fases, o calorímetro altera a entrada do fluxo de calor para esta cela, a fim de reduzir a diferença de temperatura entre ambas, gerando um desvio da linha de base, em função da variação positiva ($\Delta H > 0$) ou negativa ($\Delta H < 0$) de entalpia para mudanças endo ou exotérmica, respectivamente (LEWIS; MCELHANEY, 1992). No final, é obtido um gráfico da diferença do fluxo de calor (dQ/dt) entre as celas, em função da temperatura, gerando um termograma como mostra o exemplo hipotético na Figura 41.

O termograma permite o cálculo de parâmetros termodinâmicos importantes que caracterizam o comportamento da molécula em estudo. Estes parâmetros são entalpia calorimétrica total (ΔH_{CAL}), temperatura de transição de fases (T_M), capacidade calorífica (ΔC_p) e grau de cooperatividade ($\Delta T_{1/2}$). A entalpia calorimétrica (ΔH_{CAL}) é obtida a partir da área sob a curva no termograma. A temperatura de transição de fases (T_M) é a temperatura na qual a capacidade calorífica (ΔC_p) atinge um máximo e, no caso das bicamadas lipídicas, é a temperatura na qual metade dos lipídeos encontra-se na fase gel e metade na fase fluida. A capacidade calorífica (ΔC_p) é determinada à pressão constante e é medida subtraindo-se uma linha de base do termograma, que é escolhida de forma a anular

o valor absoluto do calor específico da amostra (antes e após a transição), de forma que somente o calor específico proveniente da transição de fases seja registrado. E, finalmente, o grau de cooperatividade ($\Delta T_{1/2}$), que é determinado pelo valor da largura do pico (dado em temperatura), à meia altura, de modo que, quanto menor a largura maior é a cooperatividade no processo termotrópico (Figura 41).

Figura 41 - Termograma de uma proteína hipotética. A linha tracejada indica a linha de base. A área sob a curva (região em cinza) é a entalpia calorimétrica (ΔH_{CAL}), que mostra a dependência da capacidade calorífica com a temperatura da amostra, à pressão constante. A diferença da capacidade calorífica (ΔC_p) do evento térmico é caracterizada pela temperatura de transição de fases (T_M , temperatura de melting), onde a capacidade calorífica atinge um máximo. O grau de cooperatividade das moléculas na amostra ($\Delta T_{1/2}$) é a largura em temperatura à meia altura na curva de transição.

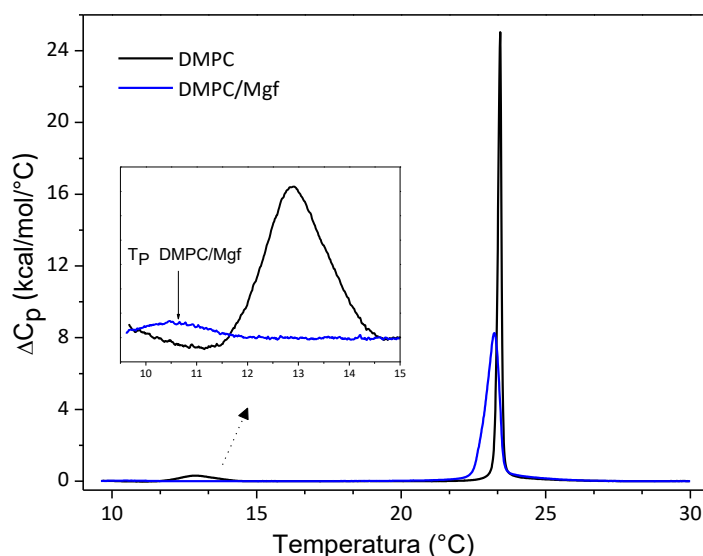


Fonte: Adaptado de Riske; Perez; Amaral (2014).

Para interpretar os resultados sobre a influência do bioativo nas propriedades termotrópicas dos lipossomos, é importante conhecer as diferentes mudanças estruturais dos lipídeos de DMPC submetidos a aquecimento (KOYNOVA; CAFFREY, 1998).

A Figura 42 mostra os termogramas obtidos para os lipossomos de DMPC na ausência e presença de mangiferina (razão bioativo:lipídeo de 1:20), no pH de 7,4. Os dados termodinâmicos das análises térmicas estão indicados na Tabela 12.

Figura 42 - Curvas de DSC para os lipossomos de DMPC, na ausência e presença de mangiferina (Mgf:DMPC, 1:20), em solução tampão de HEPES 20 mmol/L, em pH 7,4.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 12 - Parâmetros termodinâmicos da pré-transição (T_P) e da transição principal (T_M) dos lipossomos constituídos por DMPC, na ausência e presença de mangiferina, em pH 7,4, obtidos da análise dos termogramas de DSC.

Amostra	T_P (°C)	ΔH_P (Kcal/mol)	T_M (°C)	ΔH_{CAL} (Kcal/mol)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)
DMPC	13,0	0,43	23,4	4,49	0,14
DMPC/Mgf	10,6	0,05	23,2	5,49	0,53

Fonte: Elaborada pelo autor.

As bicamadas lipídicas de DMPC, na fase cristalina, encontram-se organizadas, com as cadeias carbônicas estendidas, e menor hidratação da região polar dos lipídeos, sem movimentação dos grupos fosfato na região interfacial. Com o aumento da temperatura, a fase cristalina passa para a fase gel *tilted* com maior hidratação da região interfacial e maior mobilidade para as cabeças de grupos polares dos lipídeos. O contínuo aumento de temperatura leva à mudança da fase gel *tilted* para a fase gel *rippled*, cuja temperatura de pré-transição de fases (T_P), ao redor de 13°C (Figura 42, Tabela 12), propicia maior movimentação na região polar dos lipídeos, favorecendo a formação de ondulações na membrana. Esta transição é menos energética e menos cooperativa (KOYNOVA; CAFFREY, 1998). Após novo aquecimento, ocorre finalmente a transição da fase gel *rippled* para a fase líquido-cristalina, em uma temperatura conhecida como temperatura de transição de fases principal (T_M), ao redor de 23°C (Figura 42, Tabela 12). Nesta temperatura, ocorre

uma fusão cooperativa das cadeias acila dos fosfolipídeos, os quais se encontram na forma mais fluida e desordenada. Todas as transições de fases mencionadas são acompanhadas por várias mudanças estruturais dos lipídeos com alterações na conformação das bicamadas. Estas mudanças conformacionais influenciam a fluidez da membrana e dependem, não somente, da temperatura, mas, também, de perturbações decorrentes da interação dos bioativos com a bicamada (GONIOTAKI et al., 2004). Em suma, a presença de bioativos pode influenciar as transições de fases e alterar as temperaturas T_P e T_M do lipídeo puro, indicando perturbação na organização lipídica.

Como observado na Tabela 12, a mangiferina praticamente não afetou a temperatura de transição de fases principal (T_M), mas modificou a entalpia calorimétrica (ΔH_{CAL}) (de 4,49 para 5,49 Kcal/mol) que é indício da ruptura de interações de Van der Waals entre as cadeias acila, sugerindo que a mangiferina pode estar intercalada entre as cadeias de ácidos graxos (JOBIN et al., 2013).

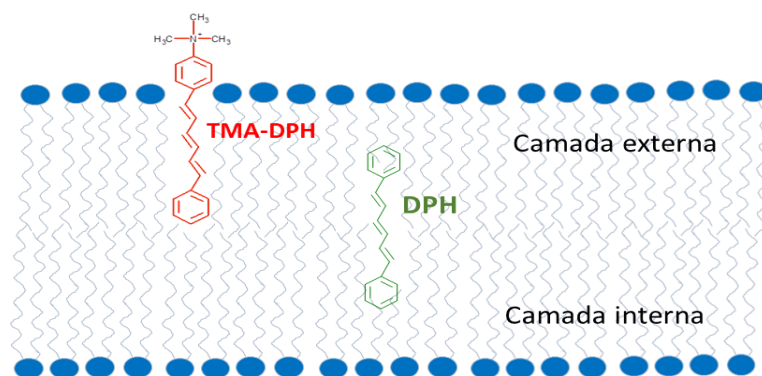
Pela Figura 42, notou-se que a adição da mangiferina afetou consideravelmente a temperatura de pré-transição de fases do lipídeo (T_P), deslocando-a para valores menores (de 13 para 10,6°C) com picos mais largos. A mudança na largura do pico de pré-transição ou na sua temperatura sugerem que a fase gel *rippled* mudou em função da interação da mangiferina com a região da cabeça polar do lipídeo. A diminuição na entalpia de pré-transição (ΔH_P) (de 0,43 para 0,05 Kcal/mol) pela presença da mangiferina reforça a interação com a cabeça polar e sugere modificação na inclinação da cabeça polar do lipídeo. Por meio do valor de $\Delta T_{1/2}$, observou-se que a cooperatividade do sistema foi menor na presença do bioativo, o que justifica uma transição de fases mais lenta e corrobora com a hipótese de que a mangiferina esteja interagindo em uma região próxima da cabeça polar do lipídeo (PINHEIRO et al., 2014).

4.4.2 Anisotropia de fluorescência

A anisotropia de fluorescência é uma técnica sensível e reprodutível que fornece parâmetros espectroscópicos interpretados em termos da fluidez da membrana lipossomal (MARCZAK, 2009). Para esse tipo de estudo, são usadas sondas fluorescentes completamente, ou parcialmente, lipofílicas cujas incorporações ocorrem em domínios da membrana, de forma independente, sem causar perturbações na mesma.

As sondas fluorescentes utilizadas foram DPH e TMA-DPH (WANG et al., 1991; KAISER; LONDON, 1998; TREVORS, 2003; MARCZAK, 2009). A sonda DPH é hidrofóbica e penetra no núcleo hidrofóbico da membrana, orientando-se de forma paralela à cadeia de ácidos graxos, como ilustra a Figura 43. A TMA-DPH, um análogo da DPH, é ancorada na interface aquosa da membrana em função da cadeia lateral positivamente carregada, que lhe confere caráter anfipático (Figura 43) (ILLINGER et al., 1995; NELSON et al., 2012). Assim, como essas sondas se posicionam em regiões estratégicas da bicamada, elas podem revelar o efeito de diferentes bioativos em modelos de membrana biológica (BORENSTAIN; BARENHOLZ, 1993).

Figura 43 - Estrutura e localização das sondas fluorescentes DPH e TMA-DPH na bicamada lipídica.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O monitoramento da anisotropia de fluorescência é realizado por espectrofluorímetro equipado com polarizadores, termostato para controle de temperatura e agitador de amostras. O feixe de luz UV que excita a amostra é polarizado verticalmente antes de atingi-la. A emissão de luz pela amostra (luz despolarizada) é coletada por um ou dois polarizadores de emissão orientados nas posições horizontal ou vertical, e depende de momentos dipolares de excitação e emissão direcionados ao longo da estrutura da sonda excitada (MYKYTCZUK et al., 2007). Quando a amostra é exposta à luz polarizada, só serão excitadas aquelas moléculas cujos momentos dipolares estão orientados na mesma direção da luz de excitação, criando-se, assim, um estado excitado orientado cuja despolarização resulta na medida de anisotropia. Quanto maior é a liberdade rotacional da sonda, menor é a despolarização e menor é a anisotropia (LENTZ, 1989; LAKOWICZ, 2006). A anisotropia de fluorescência (r) é determinada de acordo com a Equação 12 (LENTZ, 1989; MYKYTCZUK et al., 2007), onde I_{VV} é a emissão medida por um

polarizador paralelo à direção de polarização da luz de excitação, e I_{VH} é a emissão medida por um polarizador perpendicular à direção de polarização da luz de excitação.

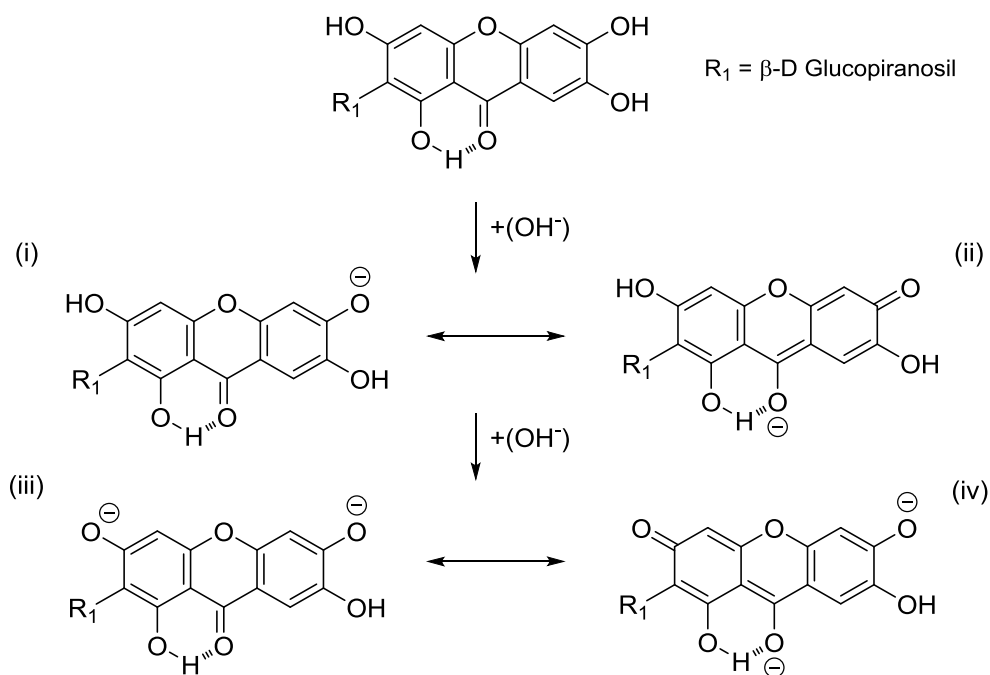
Equação 12

$$r = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} - 2I_{VH}}$$

A localização de bioativos e a influência destes na fluidez da membrana dependem da estrutura, da lipofilicidade e do grau de ionização (para moléculas com propriedades ácido-base).

A mangiferina é o exemplo de uma molécula cujas características mudam em função do pH do meio e podem influenciar a membrana de forma diferente. Em pH fisiológico, somente 12 % da mangiferina está na forma neutra e as demais estruturas estão representadas pelas formas monoaniônica (69 %) e dianiônica (19 %), com estruturas de ressonância que formam o íon enolato (Esquema 14). (GÓMEZ-ZALETA et al., 2006). Esses comentários nos permitem interpretar o comportamento de incorporação da mangiferina nas membranas lipídicas, com base nos resultados experimentais que monitoram as propriedades da membrana.

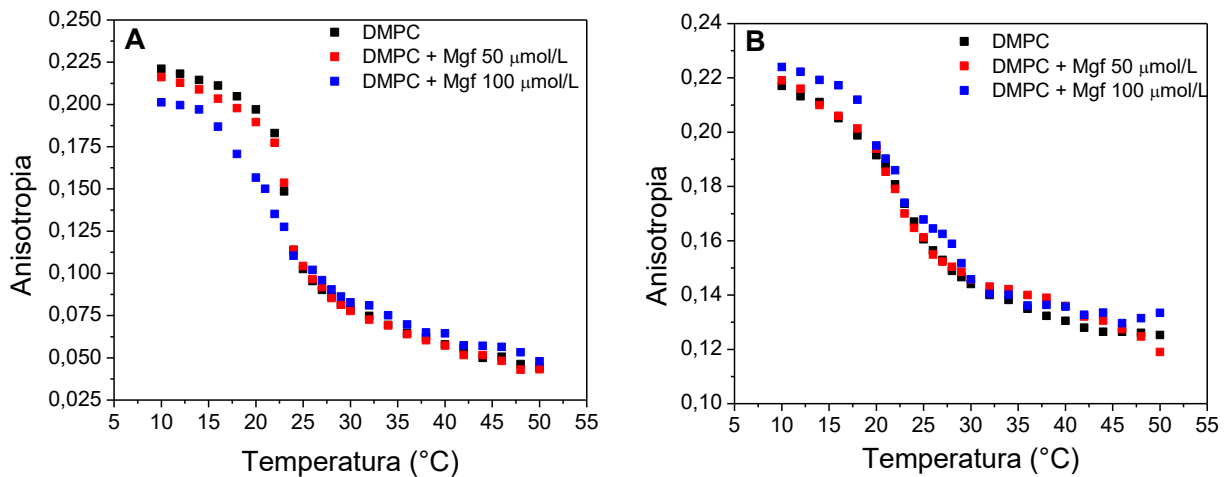
Esquema 14 - Equilíbrio ácido-base para a mangiferina.



Fonte: Adaptado de Gómez-Zaleta e colaboradores (2006).

As Figuras 44 A e B mostram a influência da mangiferina sobre a anisotropia de fluorescência das sondas DPH e TMA-DPH, em função da temperatura, no pH 7,4.

Figura 44 - Anisotropia de fluorescência no estado estacionário para as sondas DPH (A) e TMA-DPH (B), em função da temperatura, na ausência e presença de mangiferina, em lipossomas de DMPC e pH 7,4.



Fonte: Elaborada pelo autor.

De acordo com o modelo de membrana formado por lipossomos de DMPC, dois comportamentos distintos podem ser observados nas diferentes regiões da membrana, ou seja, a mangiferina aumentou a fluidez das cadeias acila da fosfatidilcolina, na fase mais organizada da bicamada, e diminuiu um pouco a microviscosidade na fase mais fluida (Figura 44 A). Isto representa um comportamento similar ao colesterol, o qual é responsável por promover maior fluidez na fase gel da membrana, sem comprometer o alto grau de organização da mesma. Ao mesmo tempo, a mangiferina diminuiu a fluidez na cabeça de grupo polar dos lipídeos (Figura 44 B). Estes resultados sugerem interações eletrostáticas com a cabeça polar dos lipídeos e interações hidrofóbicas com as cadeias carbônicas dos fosfolipídeos, que são consistentes com estudos de partição e localização de fármaco anticâncer em lipossomos de DMPC (ALVES et al., 2017).

A partir dos dados experimentais de anisotropia de fluorescência, é possível determinar a temperatura de transição de fases principal (T_M) do DMPC (Tabela 13), pelo ponto de inflexão das curvas, e interpretar a cooperatividade que pode ser observada pela inclinação das retas.

Tabela 13 - Valores das temperaturas de transição de fases (T_M) para as sondas DPH e TMA-DPH, na ausência e presença de mangiferina, 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$.

Sonda	Sistema	T_M ($^{\circ}\text{C}$)
DPH	DMPC	23,00
DPH	DMPC + Mgf 50 $\mu\text{mol/L}$	23,90
DPH	DMPC + Mgf 100 $\mu\text{mol/L}$	22,95
TMA-DPH	DMPC	22,05
TMA-DPH	DMPC + Mgf 50 $\mu\text{mol/L}$	22,05
TMA-DPH	DMPC + Mgf 100 $\mu\text{mol/L}$	22,00

Fonte: Elaborada pelo autor.

A análise da Tabela 13 mostrou que a temperatura de transição de fases (T_M) na ausência de mangiferina é ao redor de 23°C , o que foi consistente com nossos estudos de DSC e com a literatura (KOYNOVA; CAFFREY, 1998; ENDERS et al., 2004; KOZAK et al., 2010; NEVES et al., 2016). A presença de mangiferina não alterou a T_M , mas a mudança na inclinação das curvas de anisotropia (Figura 43) sugere redução na cooperatividade, indicando, novamente, a interação do bioativo com a bicamada lipídica como foi observado para o resveratrol em lipossomos de DMPC (NEVES et al., 2016). Estes efeitos foram observados principalmente com a adição de 100 $\mu\text{mol/L}$ de mangiferina, o que mostrou que o efeito deste bioativo sobre a bicamada lipídica foi dependente da concentração.

Estudos de dinâmica molecular, realizados por Koukoulitsa e colaboradores (2011), mostraram que moléculas que possuem grupos fenólicos orientam-se na bicamada lipídica de forma desajeitada, apresentando a maioria dos grupos hidroxila ancorados nos domínios da cabeça polar do lipídeo (KOUKOULITSA et al., 2011). Esta orientação maximiza as interações polares, mas deixam os grupos hidroxila remanescentes se intercalarem na região hidrofóbica.

Diante disso, nossa hipótese foi de que a mangiferina, na forma neutra, incorporou em regiões mais profundas da bicamada, formando interações de hidrogênio entre as hidroxilas do anel glicosídico e os grupos acila da cadeia lipídica, expondo o restante da molécula para o interior da bicamada. Já a forma monoaniônica (maior porcentagem no pH 7,4) deve ter interagido mais na região polar do lipídeo, estabelecendo interações eletrostáticas com o grupo colina, e interações de hidrogênio com os grupos acila.

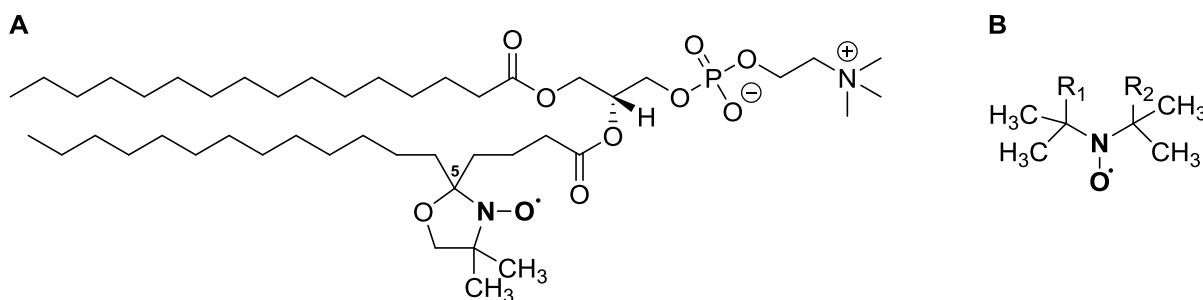
4.4.3 Ressonância Paramagnética Eletrônica

A Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) é uma técnica espectroscópica que detecta espécies que apresentam elétrons desemparelhados ou, em outras palavras, espécies paramagnéticas. Esse requisito é visto em espécies radiculares livres, moléculas orgânicas, complexos inorgânicos ou metaloproteínas.

Tendo em vista que a maioria dos sistemas biológicos apresenta uma configuração eletrônica de valência completa, sem elétrons desemparelhados, sendo, portanto, diamagnéticos, os sinais de RPE não são produzidos. Uma maneira para resolver este problema, é a utilização de marcadores ou sondas de spin, que são moléculas orgânicas que apresentam um radical livre paramagnético.

No estudo de interações de pequenas moléculas com membranas biológicas, pode-se utilizar como marcador de spin fosfolipídeos, ácidos graxos ou derivados (Figura 45 A, com representação do marcador 5-PCSL) ligados a um radical nitróxido (N-O•) (Figura 45 B), por meio de ligação covalente através da reação dos grupos R1 e R2.

Figura 45 - 5-PCSL como exemplo de marcador de spin, com o radical nitróxido ligado em C-5 (A) e estrutura química do radical nitróxido (B).



Fonte: Adaptado de Axel (1976); Vitiello e colaboradores (2013).

O sinal de RPE é produzido pelo elétron desemparelhado localizado na ligação N-O, e este sinal é sensível a alguns parâmetros, como por exemplo, polaridade, viscosidade e pH. Os marcadores são intercalados nas bicamadas lipídicas, e em virtude de seus ordenamentos, fornecem informações estruturais sobre a dinâmica lipídica, indicando a fluidez do ambiente, necessária para o funcionamento das membranas.

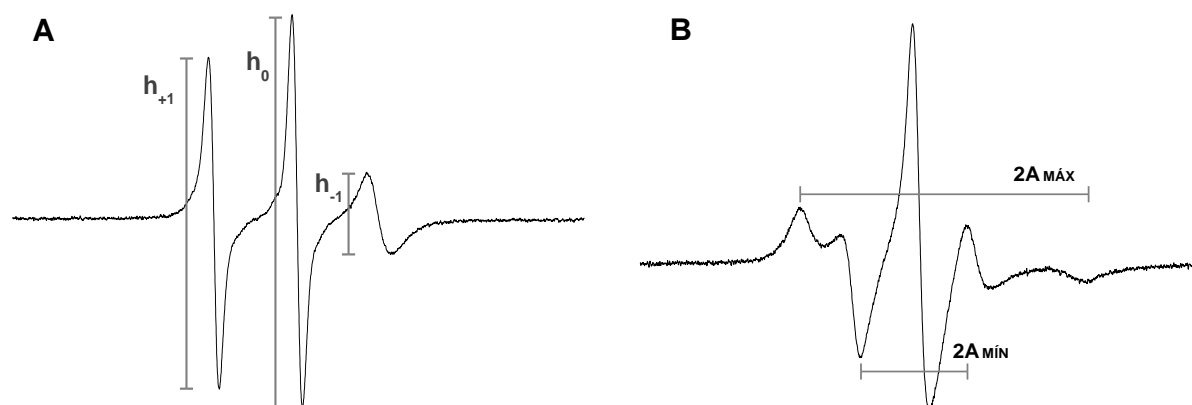
Esses radicais nitróxido são estáveis em virtude da presença dos quatro grupos metila, os quais criam uma proteção estérica da ligação N-O (FORRESTER;

THOMSON, 1964; AXEL, 1976). Essa proteção permite que os substituintes R1 e R2 sejam modificados sem a participação do elétron desemparelhado, favorecendo a formação dos variados marcadores de spin de radicais nitróxidos.

Dependendo do tipo de marcador de spin utilizado e de sua sensibilidade à temperatura, são escolhidos diferentes parâmetros a serem analisados no espectro de RPE. Para os marcadores de spin que apresentam alta mobilidade, como o 14-PCSL, um marcador da cadeia acila de lipídeos, as razões das amplitudes h_{+1}/h_0 e h_{-1}/h_0 são os melhores parâmetros a serem considerados (Figura 46 A). Para este tipo de marcador, a temperatura de transição principal do lipídeo é mais repentina, quando comparada a marcadores mais próximos à superfície (TURCHIELLO et al., 2000), uma vez que estes são menos sensíveis à variação da fluidez da membrana nessa temperatura. Um espectro mais isotrópico, isto é, de maior fluidez e menor empacotamento da membrana, pode ser observado se ambas as razões se aproximarem da unidade.

Além deste parâmetro, pode também ser determinado pelo espectro de RPE o desdobramento hiperfino máximo ($2A_{\text{máx}}$) (Figura 46 B), que é mais aplicado para marcadores de spin com menor capacidade de movimento como o 5-PCSL. Este parâmetro aumenta com a viscosidade ou empacotamento do ambiente (MARSH, 1981) e diminui conforme a energia térmica é fornecida, sendo que na temperatura de transição de fases do lipídeo uma redução acentuada é observada, indicando passagem da fase gel para a fase fluida da cadeia lipídica, e diminuição do empacotamento.

Figura 46 - Espectros representativos de RPE dos marcadores de spin 14-PCSL (A) e 5-PCSL (B) nos regimes de movimento rápido e lento, respectivamente. Estes parâmetros espectrais são utilizados na investigação da dinâmica lipídica em membranas.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Assim, para o estudo da interação da mangiferina com as vesículas de DMPC foram utilizados os marcadores de spin 5-, 7-, 10-, 12- e 14-PCSL para monitorar diferentes regiões da bicamada lipídica. O marcador de spin DOPTC, localizado na região das cabeças polares dos fosfolipídeos, importante para evidenciar alterações na superfície da membrana, não pôde ser estudado em virtude de problemas relacionados à sua disponibilidade. No entanto, apesar da sua importância, a falta do DOPTC não comprometeu as interpretações realizadas para os demais marcadores, permitindo uma hipótese sobre a organização das cadeias lipídicas.

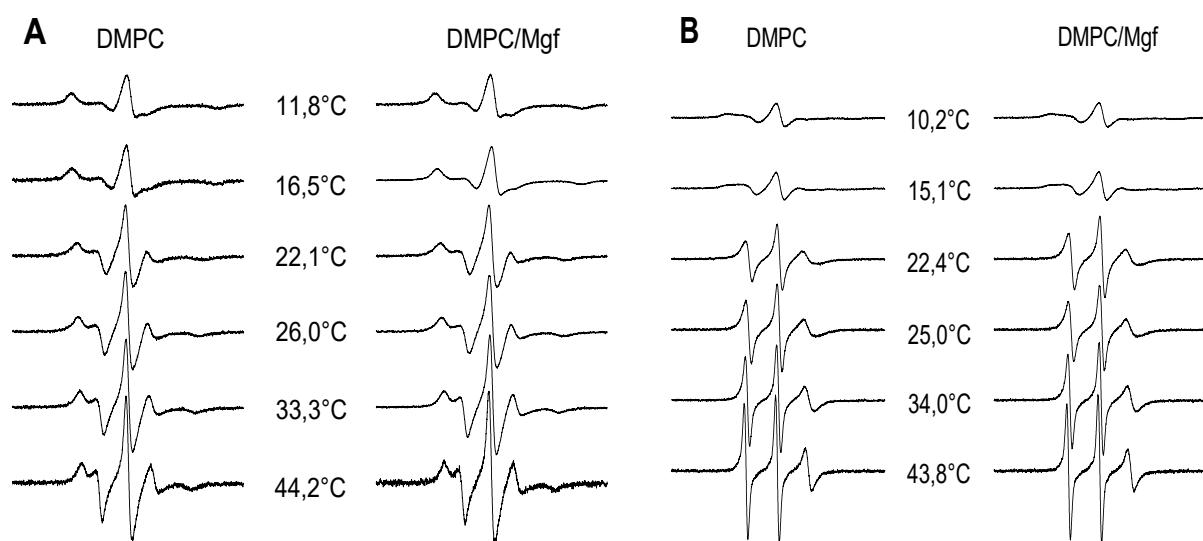
Sabe-se que a região mais interna da bicamada apresenta maior fluidez, e este comportamento pôde ser comprovado pelos dados experimentais que seguem, visto que, em todos os casos analisados foi registrado um gradiente de fluidez crescente do marcador 5-PCSL para o 14-PCSL.

Para iniciar os estudos, primeiramente, foram analisados, de modo mais detalhado, os marcadores 5- e 14-PCSL, uma vez que se localizam em regiões opostas da bicamada, podendo sugerir diferentes efeitos após a adição do bioativo.

4.4.3.1 Marcadores de spin 5-PCSL e 14-PCSL

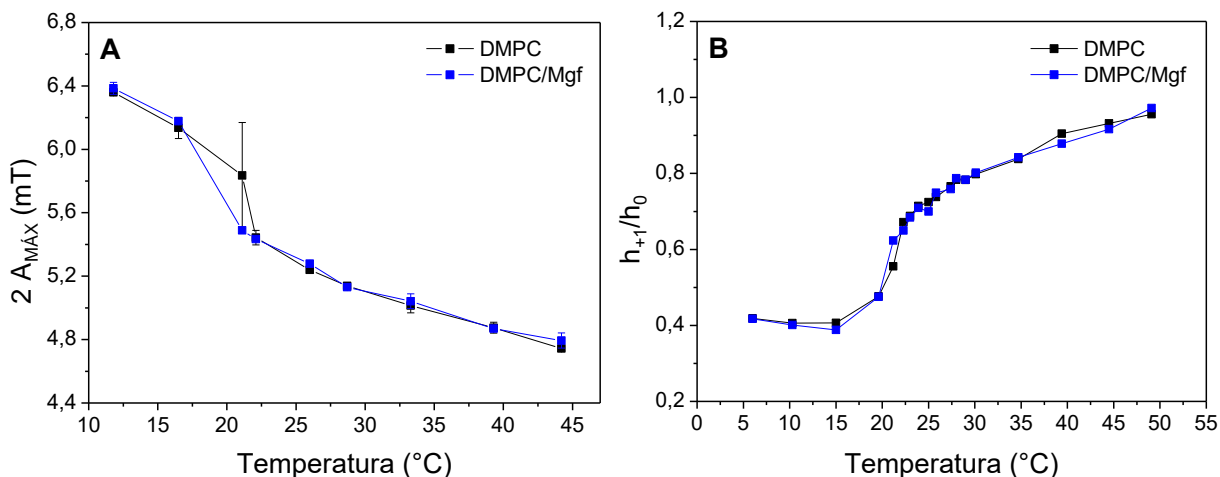
Nas Figuras 47 A e B são apresentados os espectros de RPE, e nas Figuras 48 A e B as variações dos parâmetros $2A_{MÁX}$ e h_{+1}/h_0 , em função da temperatura, para os marcadores 5- e 14-PCSL, respectivamente.

Figura 47 - Espectros representativos de RPE dos marcadores de spin 5-PCSL (A) e 14-PCSL (B) incorporados em membranas de DMPC em presença e ausência de mangiferina, em função da temperatura, na ausência de colesterol e pH 7,4. Varredura espectral: 10 mT.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 48 - Desdobramento hiperfino máximo ($2A_{\text{MÁX}}$) do marcador de spin 5-PCSL (A) e razão entre as alturas dos picos de campo baixo e médio (h_{+1}/h_0) do marcador de spin 14-PCSL (B), em função da temperatura, após incorporação em membranas de DMPC, na presença e ausência de mangiferina, na ausência de colesterol e pH 7,4.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os marcadores de spin 5- e 14-PCSL foram investigados, a fim de verificar as variações dos parâmetros empíricos de seus espectros em função da temperatura, após serem incorporados em membranas de DMPC, na ausência e presença de mangiferina, e pH 7,4.

A partir das Figuras 48 A e B, foi observado que os dados experimentais obtidos dos parâmetros analisados apresentam perfis característicos de variação conforme a temperatura é aumentada. A variação mais evidente no estudo com os lipossomos de DMPC ocorre em torno de 23°C , indicando a temperatura de transição de fases principal do lipídeo (T_M).

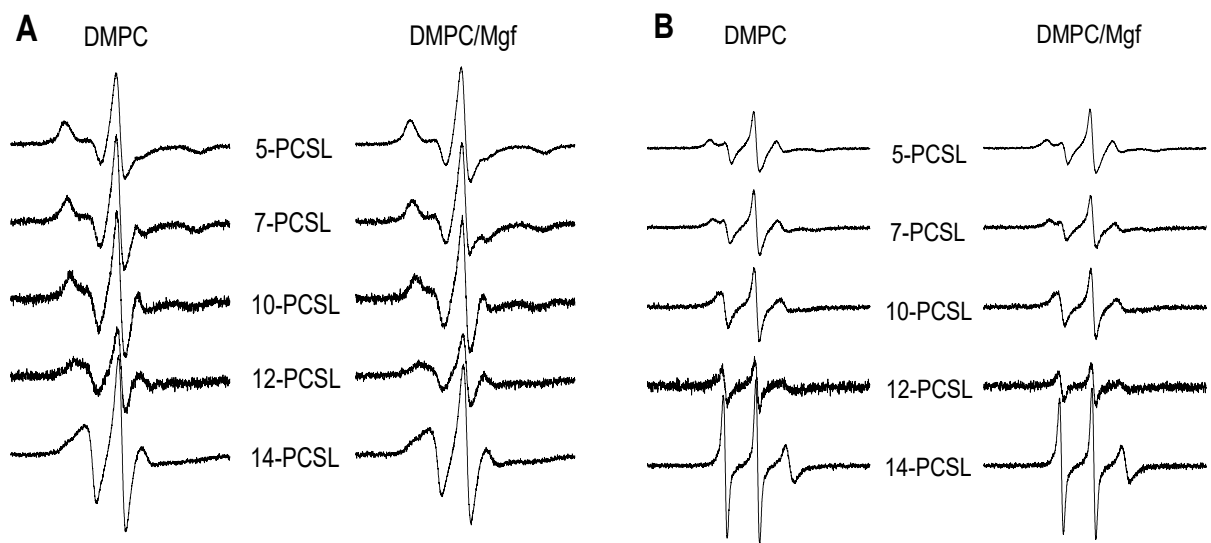
As Figuras 47 A e B mostraram que não houve mudanças na mobilidade da membrana, em função da presença da mangiferina, em nenhuma das regiões monitoradas (carbonos 5 e 14), considerando tanto a fase gel quanto a fluida. No caso do marcador 5-PCSL (Figura 48 A), apenas uma mudança em 21°C ocorreu, porém, devido ao tamanho da barra de incerteza, provavelmente essa mudança foi em virtude de problemas de estabilização da temperatura do equipamento no momento da análise.

Para o estudo dos demais marcadores de spin, foram escolhidas duas temperaturas, uma abaixo (em torno de 17°C) e outra acima (em torno de 40°C) da temperatura de transição de fases lipídica (23°C), e foi estudado o comportamento dos mesmos na presença e ausência de colesterol, no pH 7,4.

4.4.3.2 Análise dos marcadores de spin na ausência de colesterol

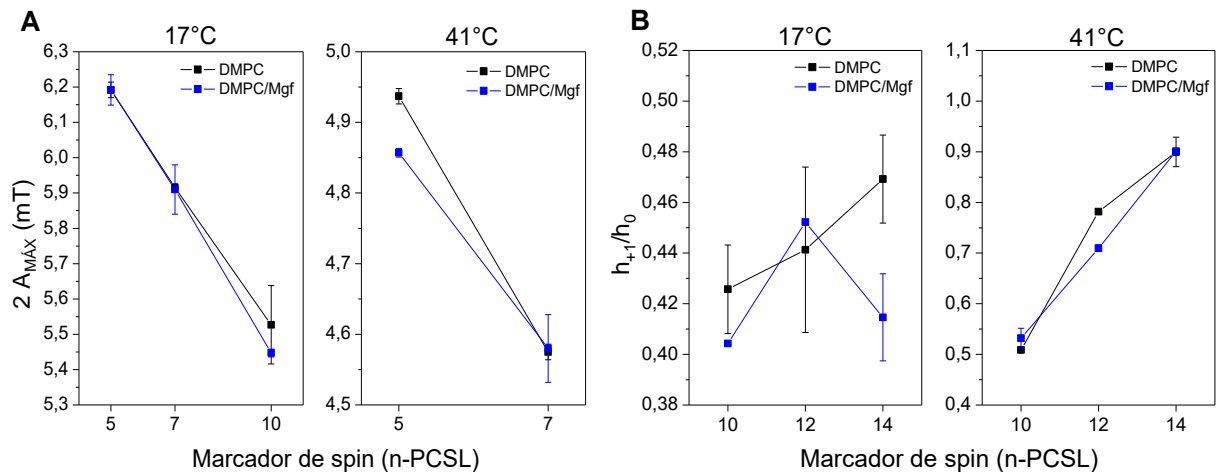
Nas Figuras 49 A e B são apresentados os espectros de RPE, e nas Figuras 50 A e B as variações dos parâmetros $2A_{MÁX}$ e h_{+1}/h_0 , em função dos diversos marcadores de spin, nas fases gel (17°C) e fluida (41°C), na ausência de colesterol e pH 7,4.

Figura 49 - Espectros representativos de RPE dos marcadores de spin 5-, 7-, 10-, 12- e 14-PCSL na fase gel (17°C) (A) e na fase fluida (41°C) (B) incorporados em membranas de DMPC, em presença e ausência de mangiferina, na ausência de colesterol e pH 7,4. Varredura espectral: 10 mT.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 50 - Desdobramento hiperfino máximo ($2A_{MÁX}$) (A) e razão entre as alturas dos picos de campo baixo e médio (h_{+1}/h_0) (B) em função dos marcadores de spin na fase gel (17°C) e na fase fluida (41°C) incorporados em membranas de DMPC, na presença e ausência de mangiferina, na ausência de colesterol e pH 7,4.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Pelas Figuras 50 A e B, notou-se que a mangiferina provoca mudanças na bicamada lipídica, no entanto estas não foram conclusivas, uma vez que em vários aspectos os resultados encontrados foram divergentes dos apresentados pela técnica de anisotropia de fluorescência, monitorada pelas sondas DPH e TMA-DPH, e já discutidos no tópico anterior.

Na Figura 50 A, e temperatura de 17°C, observou-se que a mangiferina aumenta um pouco a fluidez da membrana na região da sonda 10-PCSL, o que é compatível com os resultados de anisotropia de fluorescência para a sonda DPH, localizada, também, na região mais hidrofóbica da bicamada. Na temperatura de 41°C, notou-se um aumento de fluidez para a sonda 5-PCSL, localizada próximo à região polar, o que foi contraditório com o pequeno aumento de rigidez observado para a sonda TMA-DPH nos resultados de anisotropia de fluorescência.

Com relação à Figura 50 B, observou-se na temperatura de 17°C que houve diminuição da fluidez nas regiões das sondas 10-PCSL e 14-PCSL, contradizendo novamente os resultados de anisotropia de fluorescência para a sonda DPH, a qual mostrou que a presença de mangiferina contribuiu para o aumento da fluidez da membrana na fase gel. E finalmente, acima da T_M , na temperatura de 41°C, a sonda 12-PCSL indicou redução da fluidez da membrana, que foi coerente com os resultados de anisotropia para a sonda DPH.

Diante o exposto, estes resultados, de fato, indicaram uma alteração na membrana lipídica pela presença da mangiferina, porém, não foi possível tirar conclusões acerca de sua localização com base nesta técnica.

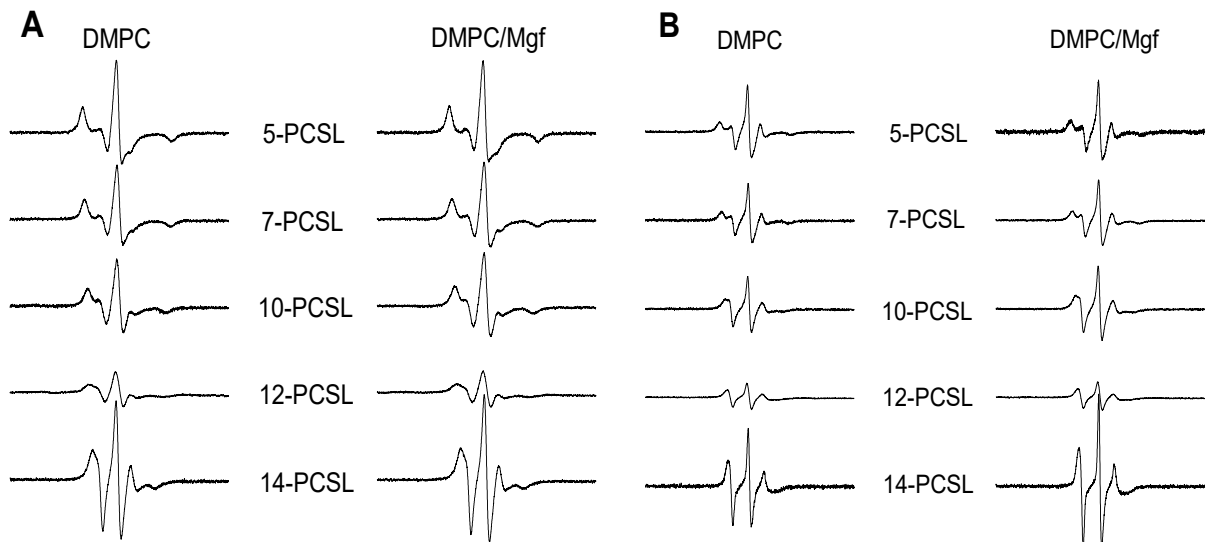
4.4.3.3 Análise dos marcadores de spin na presença de colesterol

Os espectros de RPE e as variações dos parâmetros $2A_{MÁX}$ e h_{+1}/h_0 , em função dos diversos marcadores de spin, nas fases gel (17,9°C) e fluida (40,5°C), na presença de colesterol e pH 7,4 estão indicados nas Figuras 51 A e B e Figuras 52 A e B, respectivamente.

Na análise das Figuras 52 A e B, de forma geral, os resultados na presença de colesterol mostraram que a mangiferina não induz mudanças na mobilidade das sondas em nenhuma das fases. Tal comportamento era esperado, uma vez que, como já dito anteriormente, a presença do colesterol na membrana lipídica proporciona a desorganização da bicamada na fase gel e a sua organização na fase fluida, eliminando, assim, a transição de fases principal (T_M) do fosfolipídeo. Com isso,

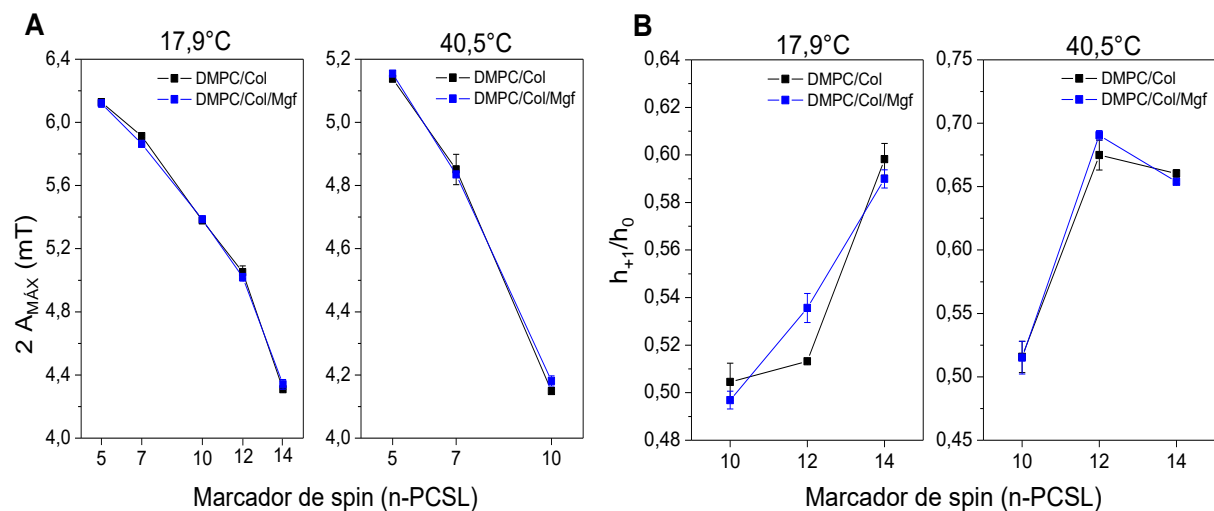
a membrana assumiu um estado conformacional que amenizou a diferença entre ambas as fases, gel e fluida, de forma que a mangiferina não conseguiu interferir.

Figura 51 - Espectros representativos de RPE dos marcadores de spin 5-, 7-, 10-, 12- e 14-PCSL na fase gel (17,9°C) (A) e na fase fluida (40,5°C) (B) incorporados em membranas de DMPC, em presença e ausência de mangiferina, na presença de colesterol e pH 7,4. Varredura espectral: 10 mT.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 52 - Desdobramento hiperfino máximo ($2A_{MAX}$) (A) e razão entre as alturas dos picos de campo baixo e médio (h_{+1}/h_0) (B) em função dos marcadores de spin na fase gel (17,9°C) e na fase fluida (40,5°C) incorporados em membranas de DMPC, na presença e ausência de mangiferina, na presença de colesterol e pH 7,4.



Fonte: Elaborada pelo autor.

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*.

Seção Experimental

6. SEÇÃO EXPERIMENTAL

6.1 Procedimentos gerais

6.1.1 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)

As análises de CCDC foram realizadas em cromatofolhas de alumínio de sílica gel 60 F254-MERCK® cortadas em tamanhos de 2 cm X 5 cm. As amostras foram solubilizadas em solventes apropriados e aplicadas nas cromatofolhas por meio de capilares de vidro.

6.1.2 Cromatografia líquida “clássica”

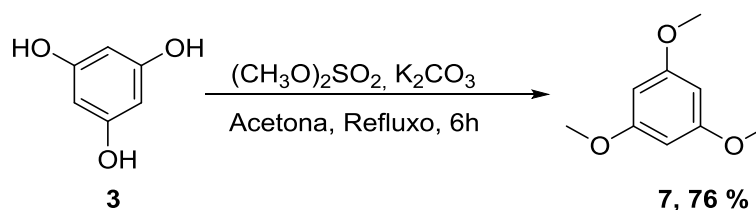
Realizada em coluna de vidro, empacotada com sílica gel 60 Å (70 – 230 Mesh/Sigma-Aldrich Brasil Ltda) e diferentes sistemas eluentes, conforme análise de CCDC.

6.1.3 Cromatografia líquida “flash”

Realizada em coluna de vidro com adaptação para entrada de ar comprimido, ou em colunador automático CombiFlash® Rf+ da Teledyne Isco. A fase estacionária utilizada foi sílica gel 60 Å (230-400 Mesh/ Sigma-Aldrich Brasil Ltda) para coluna de vidro, e colunas pré-empacotadas com sílica flash de fase normal. Diferentes sistemas eluentes foram empregados.

6.2 Reações da rota sintética 01

6.2.1 Síntese de 1,3,5-trimetoxibenzeno (7)

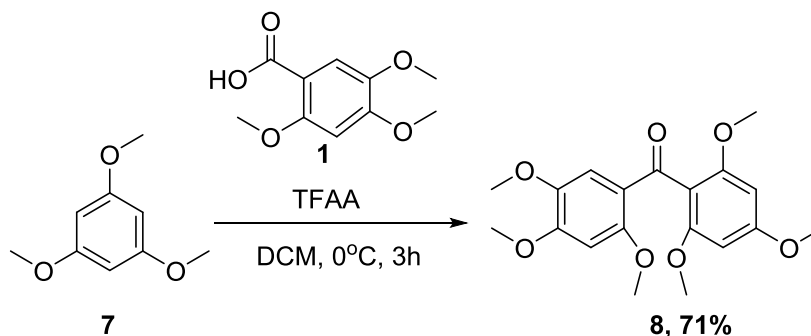


Em um balão reacional, foram adicionados o floroglucinol anidro (**3**) (5,0243 g, 39,8 mmol) seco a 110°C, o carbonato de potássio (K_2CO_3) (29 g, 209,8 mmol), a acetona anidra (70 mL) e o sulfato de dimetila [$(\text{CH}_3\text{O})_2\text{SO}_4$] (12 mL, 127,5 mmol). A mistura foi mantida em refluxo por 6 horas, a 60°C. Em seguida, foi realizada uma filtração, e o filtrado obtido foi purificado por meio de coluna cromatográfica tipo flash, utilizando fase móvel de hexano:acetato de etila (95:5

v/v). O composto **7** obtido foi confirmado por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e por análise do espectro de RMN ^1H (Apêndice A).

Composto 7: sólido branco, 76 % de rendimento. RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 6,09 (s, 3H), 3,77 (s, 9H).

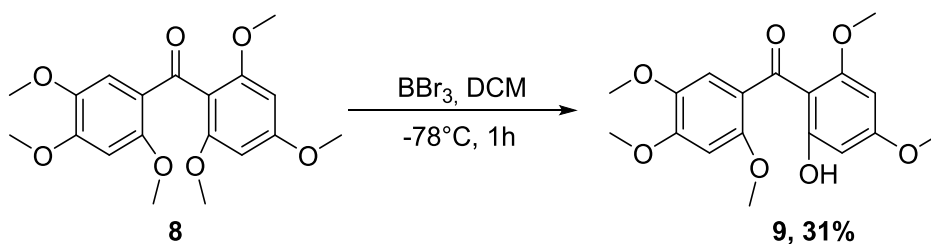
6.2.2 Síntese do (2,4,5-trimetoxifenil)-(2,4,6-trimetoxifenil) metanona (**8**)



Foram adicionados o ácido 2,4,5-trimetoxibenzoico (**1**) (126,4 mg, 0,6 mmol), o 1,3,5-trimetoxibenzeno (**7**) (282 mg, 1,68 mmol) e diclorometano (DCM) (5 mL) em um balão reacional, e a mistura foi mantida sob atmosfera inerte. Em seguida, foi adicionado o anidrido de trifluoracético (TFAA) (0,8 mL, 6 mmol) e a reação foi mantida sob agitação por 3 horas, a 0°C . O produto foi vertido em gelo, extraído com DCM, seco em sulfato de sódio (Na_2SO_4), filtrado e o solvente foi removido. A purificação foi realizada em coluna cromatográfica tipo flash, utilizando como fase móvel hexano:acetato de etila (50:50 v/v). O composto **8** foi confirmado por CCD e pela análise do espectro de RMN ^1H (Apêndice B).

Composto 8: sólido amarelo, 71 % de rendimento. RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 7,60 (s, 2H), 6,55 (s, 2H), 4,06 (s, 6H), 3,96 (s, 6H), 3,89 (s, 6H).

6.2.3 Síntese do (2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)-(2,4,5-trimetoxifenil) metanona (**9**)

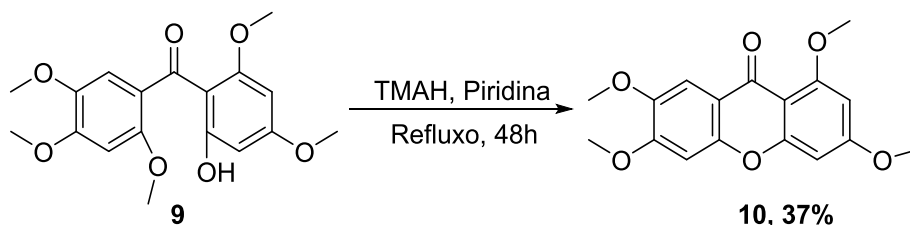


O (2,4,5-trimetoxifenil) (2,4,6-trimetoxifenil) metanona (**8**) (191, 8 mg, 0,53 mmol) foi colocado em um balão reacional juntamente com diclorometano (DCM) (10

mL) e tribrometo de boro (BBr_3) (100 μL , 1,06 mmol), e foi mantido sob atmosfera inerte, em agitação por 1 hora, a -78°C . Após o procedimento, foi adicionada água destilada (25 mL) e realizada extração em DCM. O produto foi seco em Na_2SO_4 , filtrado e o solvente foi removido. A purificação foi realizada em coluna cromatográfica tipo flash, utilizando como fase móvel hexano:acetato de etila (70:30 e 50:50 v/v). O composto **9** foi confirmado por CCD e pela análise do espectro de RMN ^1H (Apêndice C).

Composto 9: sólido amarelo, 31 % de rendimento. **RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3):** δ 13,06 (s, 1H), 6,89 (s, 1H), 6,47 (s, 1H), 6,11 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H), 5,84 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H), 3,93 (s, 3H), 3,84 (s, 3H), 3,83 (s, 3H), 3,69 (s, 3H), 3,45 (s, 3H).

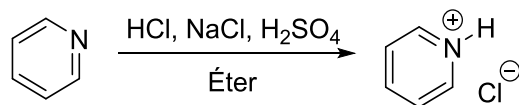
6.2.4 Síntese do 1,3,6,7-tetrametoxi-9H-xanten-9-ona (**10**)



Foi colocado em uma proveta o hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) (225 mg, 2,5 mmol) juntamente com água destilada (5 mL) e piridina (5 mL, 62 mmol), e a mistura foi vertida em um balão, o qual já continha o (2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)-(2,4,5-trimetoxifenil) metanona (**9**) (58,1 mg, 0,167 mmol). A reação foi mantida em refluxo por 48 horas, e após o período foi adicionado gelo e o pH foi ajustado para 6,0. O produto foi extraído com DCM, seco em Na_2SO_4 , filtrado e o solvente foi removido. A purificação foi realizada por meio de coluna cromatográfica tipo flash, utilizando fase móvel isocrática de clorofórmio. O composto **10** obtido foi confirmado por CCD e por análise do espectro de RMN ^1H (Apêndice D).

Composto 10: sólido amarelo, 37 % de rendimento. **RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3):** δ 7,65 (s, 1H), 6,81 (s, 1H), 6,46 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H), 6,34 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H), 3,98 (s, 3H), 3,97 (s, 6H), 3,90 (s, 3H).

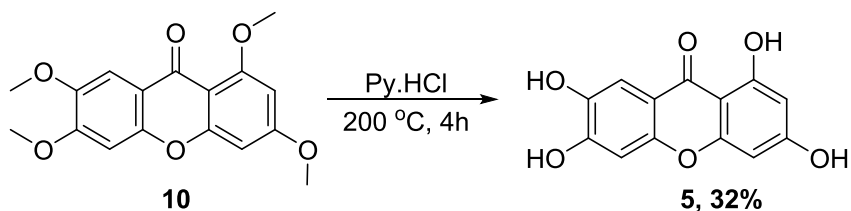
6.2.5 Síntese de cloridrato de piridina



Em um balão de fundo redondo de 100 mL, foram adicionados piridina (14 mL, 174 mmol) e 40 mL de éter, sob agitação. Em um segundo balão, foram colocados sulfato de sódio (NaCl) (10 g, 170 mmol) e ácido clorídrico (HCl) (15 mL, 485 mmol). Os balões foram fechados, e conectados entre si. No segundo balão foi adicionado ácido sulfúrico (H₂SO₄) (4,8 mL, 90 mmol) lentamente. O sólido formado no primeiro balão foi filtrado e rotaevaporado (TAYLOR et al., 1995).

Cloridrato de piridina: sólido branco, 60 % de rendimento.

6.2.6 Síntese do 1,3,6,7-tetrahidroxi-9H-xanten-9-ona (noratiriol) (5) pela rota 01

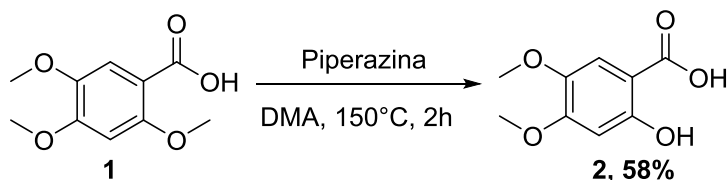


Em um vial, foram adicionados o 1,3,6,7-tetrametoxi-9H-xanten-9-ona (**10**) (18,4 mg, 0,058 mmol) e cloridrato de piridina (Py.HCl) (135 mg, 1,17 mmol), e o sistema foi deixado sob agitação por 30 minutos, a 200°C. Na sequência, foi adicionada água destilada e feita uma centrifugação a 2500 rpm, por 20 minutos. Foi realizada a separação do sobrenadante, e o sólido foi dissolvido em metanol, seguido de purificação por coluna cromatográfica tipo flash com fase móvel de hexano:acetato de etila (70:30 v/v). O composto **5** obtido foi confirmado por CCD, espectros de RMN ¹H (Figura 15), ¹³C (Figura 16), DEPT 135 (Apêndice E) e espectro de massas de alta resolução por IES (Apêndice F).

Composto 5: sólido amarelo, 32 % de rendimento. **RMN de ¹H (500 MHz, DMSO):** δ 13,28 (s, 1H), 7,32 (s, 1H), 6,77 (s, 1H), 6,30 (d, *J* = 1,3 Hz, 1H), 6,13 (d, *J* = 1,3 Hz, 1H). **RMN de ¹³C (75 MHz, Acetona-d₆):** δ 179,6; 164,6; 163,7; 158,0; 153,3; 151,8; 143,2; 113,1; 108,6; 102,7; 102,4; 97,8; 93,5. **Sinal m/z [M+H]⁺** calculado para C₁₃H₉O₆⁺: 261,0394, obtido: 261,0393.

6.3 Reações da rota sintética 02

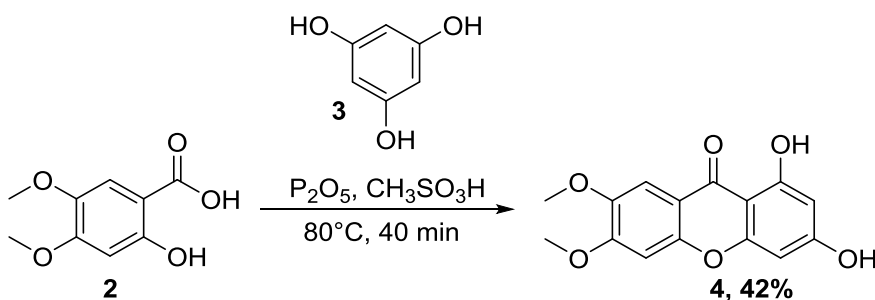
6.3.1 Síntese do ácido 2-hidroxi-4,5-dimetoxibenzoico (2)



Em um balão reacional, foram adicionados o ácido 2,4,5-trimetoxibenzoico (1) (0,212 g, 1 mmol) e a piperazina (0,602 g, 7 mmol), e a mistura foi mantida sob atmosfera inerte. Foi adicionado dimetilacetamida (DMA) (2 mL) e a reação foi mantida sob agitação por 2 horas, a 150°C. Em seguida, o DMA foi removido com posterior adição de 20 mL de água destilada e ajuste de pH para 3,0. O produto foi filtrado e o precipitado resultante foi purificado por meio de coluna cromatográfica tipo flash, utilizando fase móvel isocrática de clorofórmio. O composto 2 obtido foi confirmado por CCD, e por análise dos espectros de RMN ^1H (Apêndice G) e ^{13}C (Apêndice H).

Composto 2: sólido branco, 58 % de rendimento. **RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3):** δ 10,40 (s, 1H), 7,28 (s, 1H), 6,50 (s, 1H), 3,92 (s, 3H), 3,86 (s, 3H). **RMN de ^{13}C (75 MHz, MeOD):** δ 171,8; 158,7; 156,2; 142,1; 112,3; 103,31; 99,9; 55,9; 55,1.

6.3.2 Síntese de 1,3-dihidroxi-6,7-dimetoxi-9H-xanten-9-ona (4)

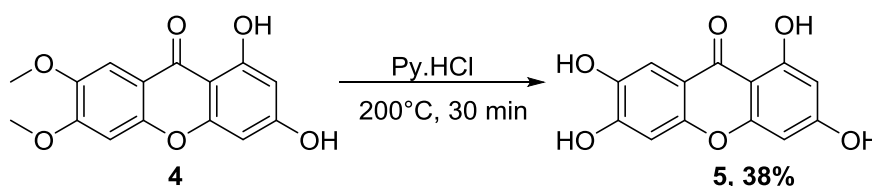


Na segunda reação, houve a condensação do composto 2 (0,250 g, 1,26 mmol) com o floroglucinol (3) (0,317 g, 2,52 mmol) anidro, na presença de pentóxido de fósforo {1,07 g, 7,56 mmol - 9,2 mL de reagente de Eaton [pentóxido de fósforo (P_2O_5) + ácido metanossulfônico ($\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$)]} para formar o composto 4. O sistema foi mantido sob agitação por 40 minutos, a 80°C. Na finalização da reação, o produto foi vertido em gelo, filtrado e solubilizado em

acetona. Esta solução foi seca em Na_2SO_4 , filtrada e seu solvente foi removido. A purificação foi realizada em coluna cromatográfica tipo flash, utilizando como fase móvel clorofórmio:metanol (98:2 v/v). O composto **4** foi confirmado por CCD, pela análise dos espectros de RMN ^1H (Figura 18), ^{13}C (Figura 19), DEPT 135 (Apêndice I) e por IES-EM (Apêndice J).

Composto 4: sólido amarelo, 42 % de rendimento. **RMN de ^1H (300 MHz, DMSO):** δ 13,06 (s, 1H), 7,51 (s, 1H), 7,23 (s, 1H), 6,44 (s, 1H), 6,27 (s, 1H), 4,02 (s, 3H), 3,95 (s, 3H). **RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO):** δ 179,3; 165,5; 163,1; 157,9; 156,2; 152,4; 147,1; 112,8; 104,8; 102,3; 100,8; 98,5; 94,2; 56,4; 56,4. **Sinal m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$** calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{O}_6^+$: 289,0707, obtido: 289,0707.

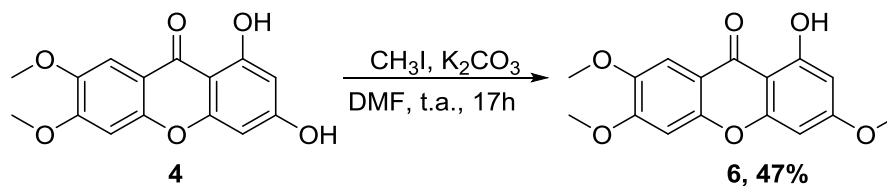
6.3.3 Síntese de 1,3,6,7-tetrahydroxi-9H-xanten-9-ona (noratiriol) (**5**) pela rota 02



Para tal, ao composto **4** (0,180 g, 0,624 mmol), em um vial, foi adicionado cloridrato de piridina (Py.HCl) (1,442 g, 12,48 mmol). O sistema foi deixado sob agitação por 30 minutos, a 200°C . Em seguida, foi adicionada água destilada e feita uma centrifugação a 2500 rpm, por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sólido foi dissolvido em metanol, seguido de purificação por coluna cromatográfica tipo flash com fase móvel de hexano:acetato de etila (70:30 v/v). O composto **5** foi confirmado por CCD, espectros de RMN ^1H (Figura 15), ^{13}C (Figura 16), DEPT 135 (Apêndice E) e por IES-EM (Apêndice F).

Composto 5: sólido amarelo, 38 % de rendimento. **RMN de ^1H (500 MHz, DMSO):** δ 13,28 (s, 1H), 7,32 (s, 1H), 6,77 (s, 1H), 6,30 (d, $J = 1,3$ Hz, 1H), 6,13 (d, $J = 1,3$ Hz, 1H). **RMN de ^{13}C (75 MHz, Acetona- d_6):** δ 179,6; 164,6; 163,7; 158,0; 153,3; 151,8; 143,2; 113,1; 108,6; 102,7; 102,4; 97,8; 93,5. **Sinal m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$** calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{O}_6^+$: 261,0394, obtido: 261,0393.

6.3.4 Síntese de 1-hidroxi-3,6,7-trimetoxi-9H-xanten-9-ona (6)



Para tanto, em um balão reacional contendo **4** (0,160 g, 0,55 mmol) foi adicionado K_2CO_3 (0,076 g, 0,55 mmol), iodometano (CH_3I) (35 μL , 0,55 mmol) e dimetilformamida (DMF) anidro (2 mL), e o sistema ficou sob agitação overnight. O solvente foi removido e o sólido foi purificado por coluna cromatográfica tipo flash com fase móvel de hexano:acetato de etila (70:30 v/v). O composto **6** foi confirmado por CCD, por espectros de RMN ^1H (Figura 20), ^{13}C (Figura 21), DEPT 135 (Apêndice K) e por IES-EM (Apêndice L).

Composto 6: sólido amarelo, 47 % de rendimento. **RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3):** δ 12,99 (s, 1H), 7,53 (s, 1H), 6,84 (s, 1H), 6,38 (s, 1H), 6,33 (s, 1H), 4,00 (s, 3H), 3,98 (s, 3H), 3,88 (s, 3H). **RMN de ^{13}C (126 MHz, CDCl_3):** δ 179,9; 166,1; 163,3; 157,7; 155,7; 152,5; 146,8; 113,4; 104,6; 103,6; 99,5; 96,9; 92,6; 56,6; 56,4; 55,8. **Sinal m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$** calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{O}_6^+$: 303,0863, obtido: 303,0864.

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 α -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>. 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 π ... π 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 β -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, ¹H, and ¹³C 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 β -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 α -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^a 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/>. 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>. 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>. 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-FLEMINGER, 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**. 3rd 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 β -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 μ -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 α -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>. 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.

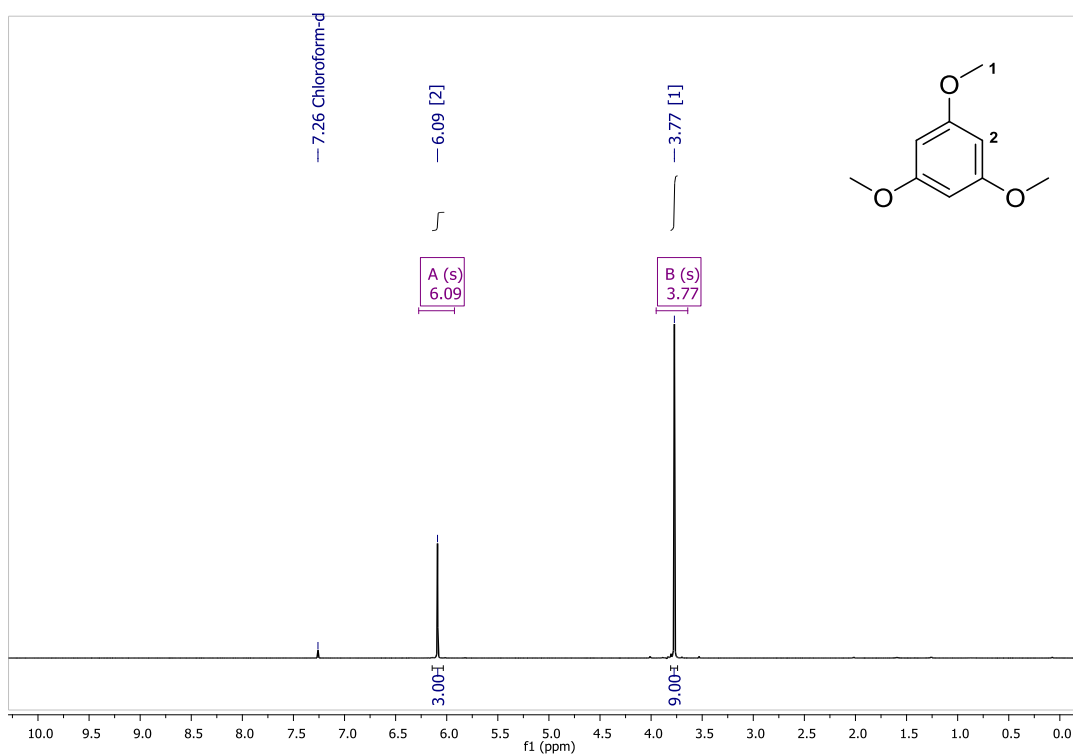
YANG, Z. et al. Protective effects of mangiferin on cerebral ischemia–reperfusion injury and its mechanisms. **European Journal of Pharmacology**, v. 771, p. 145-151, 2016.

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.

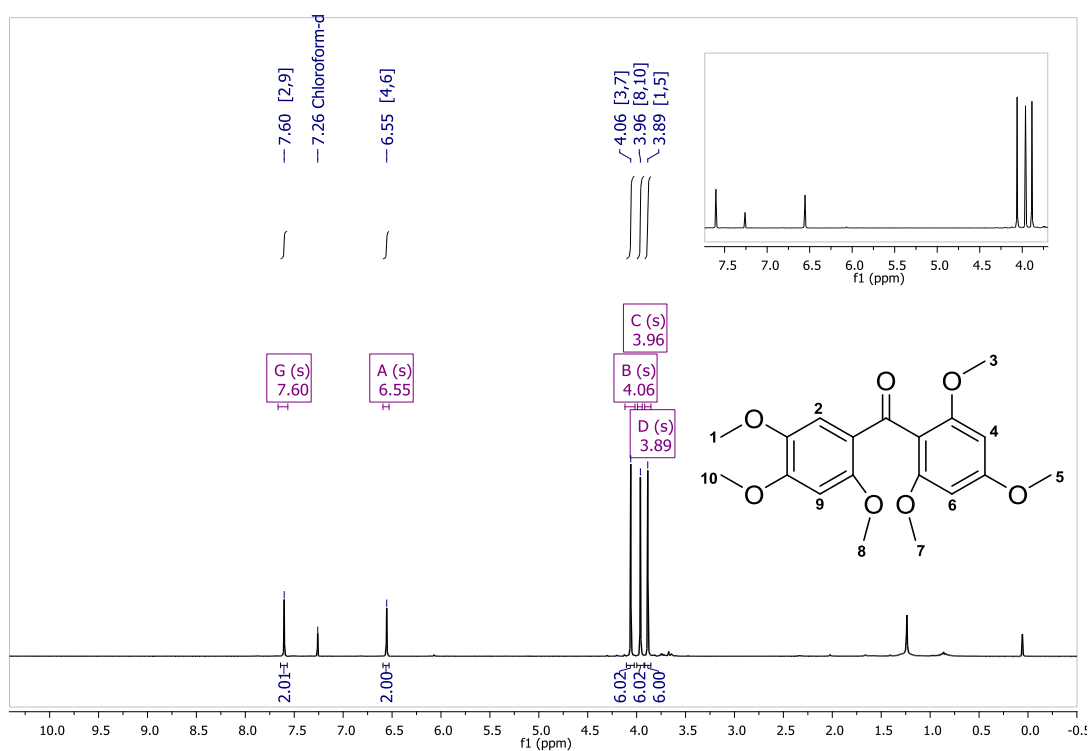
APÊNDICES

Apêndice A - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do 1,3,5-trimetoxibenzeno (**7**)



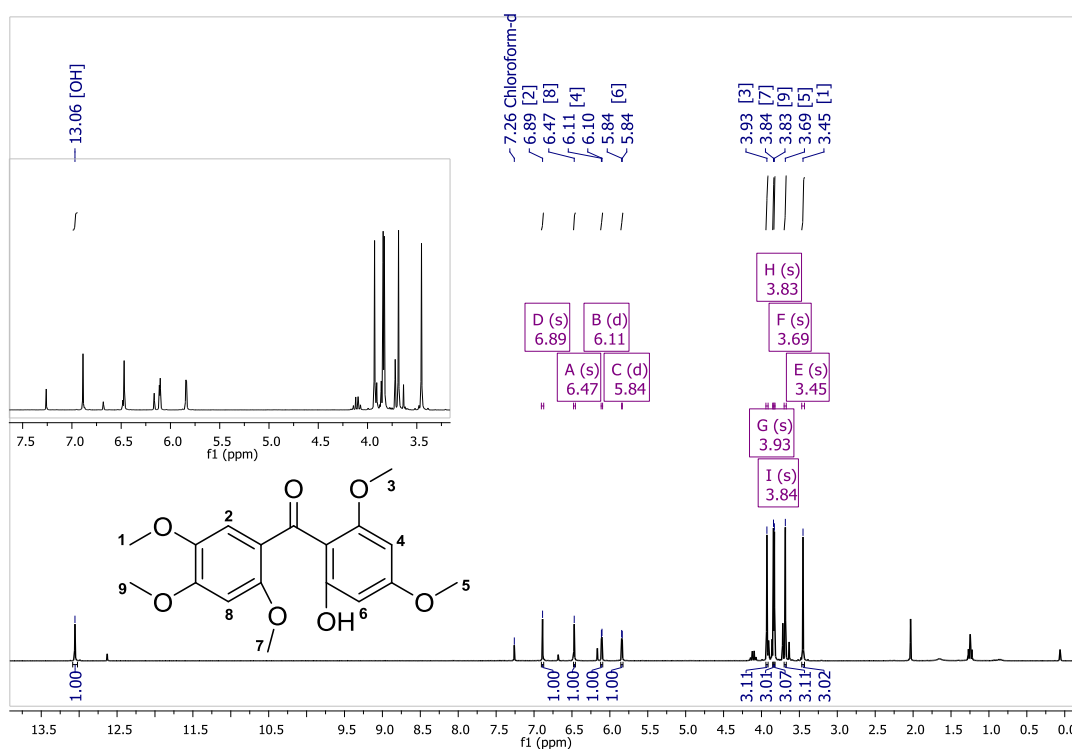
Fonte: Elaborada pelo autor.

Apêndice B - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do (2,4,5-trimetoxifenil)-(2,4,6-trimetoxifenil) metanona (**8**)



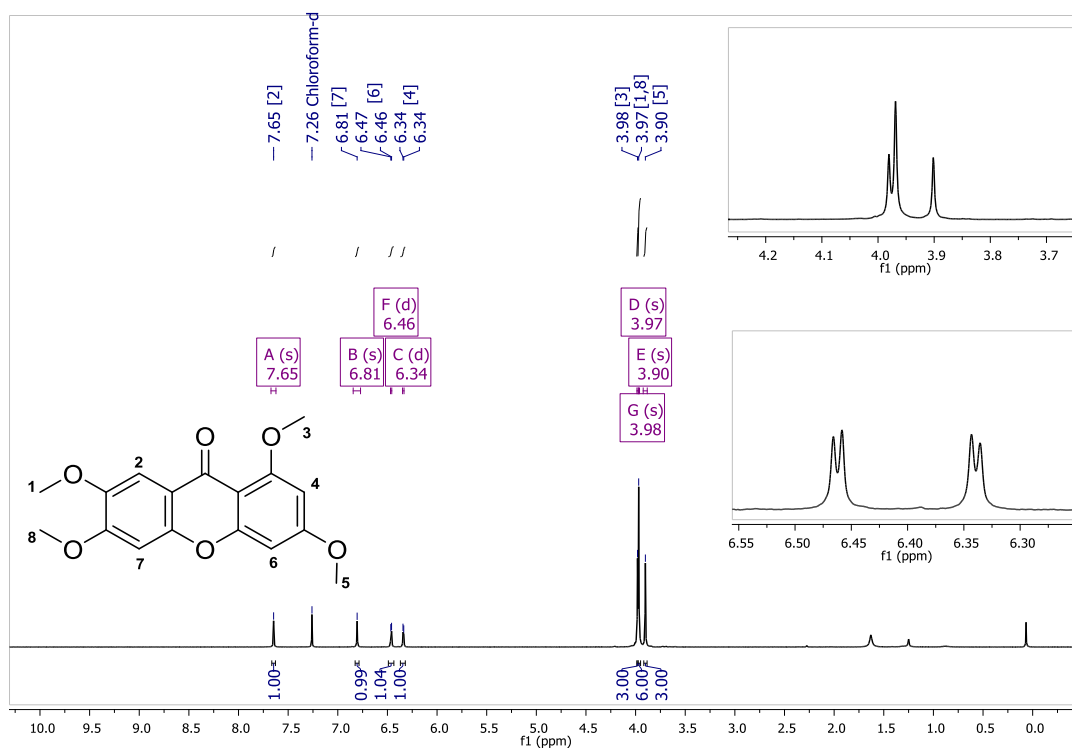
Fonte: Elaborada pelo autor.

Apêndice C - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do (2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)-(2,4,5-trimetoxifenil) metanona (**9**)



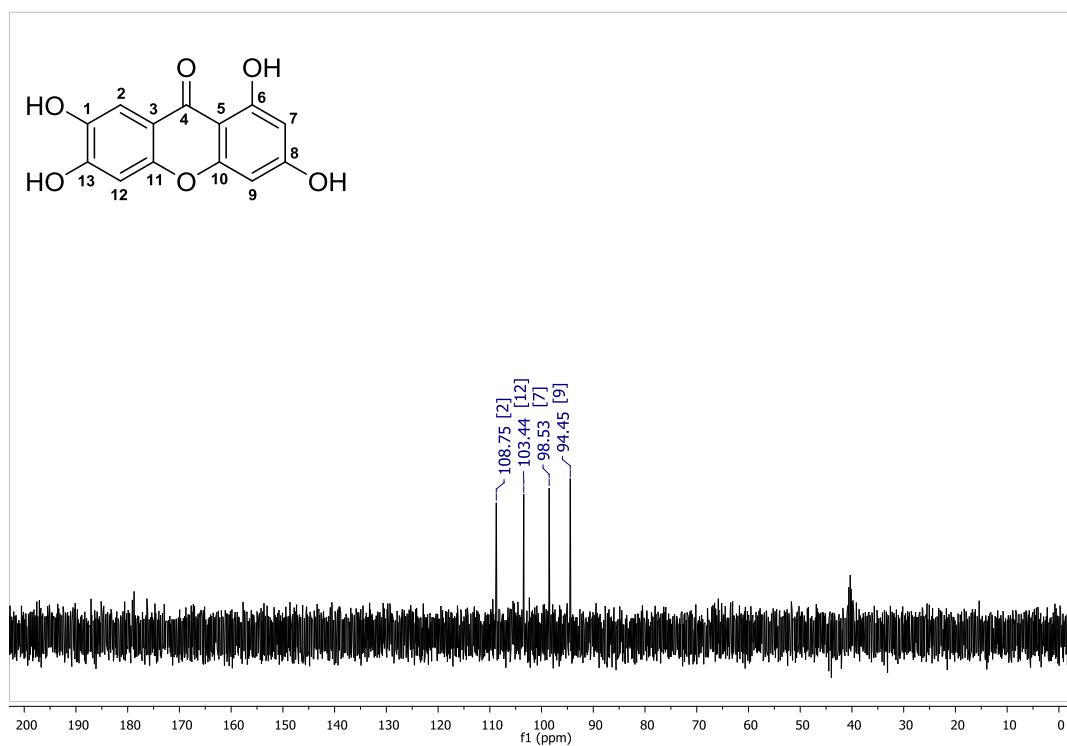
Fonte: Elaborada pelo autor.

Apêndice D - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do 1,3,6,7-tetrametoxi-9H-xanten-9-ona (**10**)



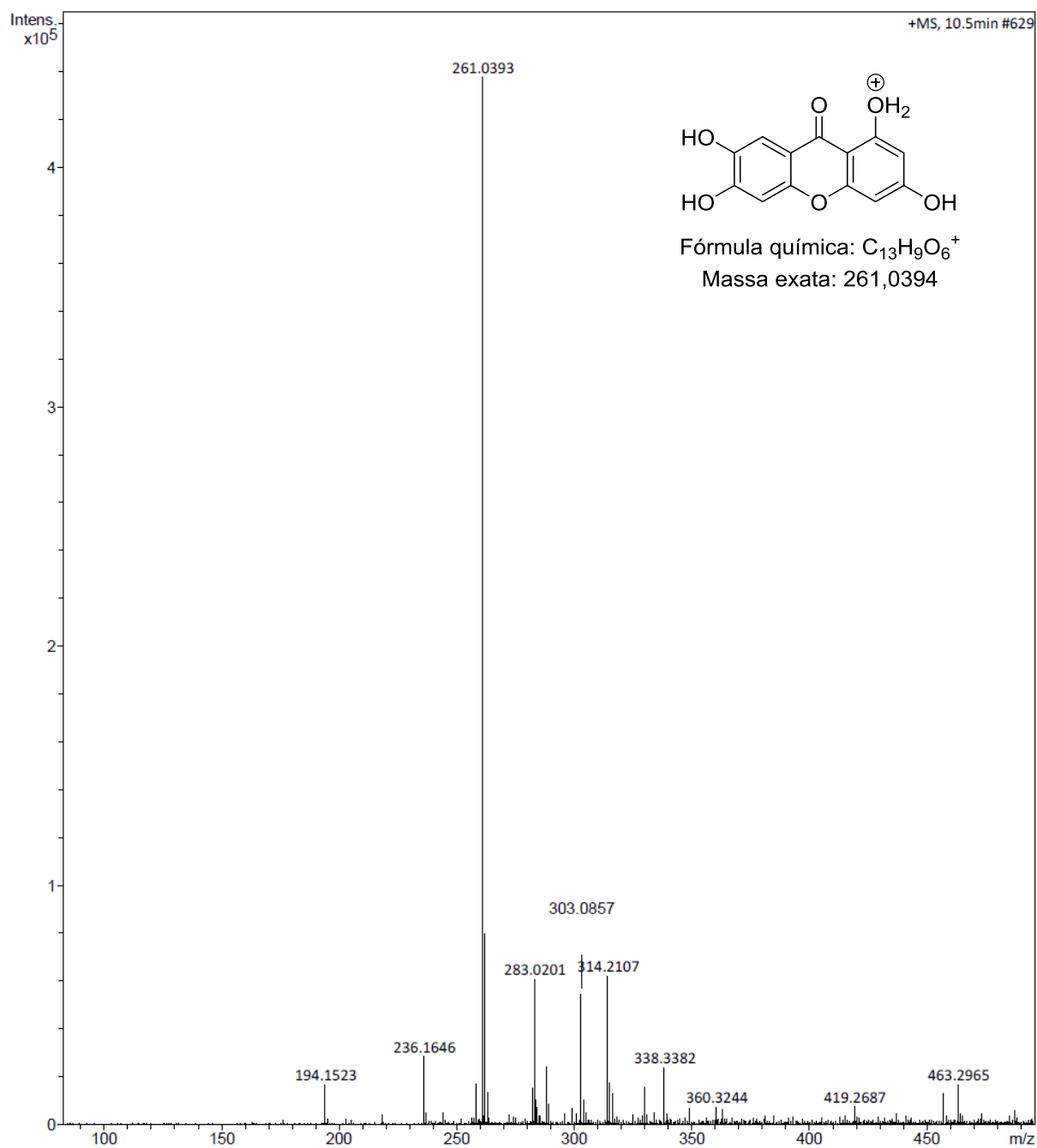
Fonte: Elaborada pelo autor.

Apêndice E - Espectro de RMN de DEPT 135 (126 MHz, DMSO) do 1,3,6,7-tetrahidroxi-9H-xanten-9-ona (noratiriol) (5)



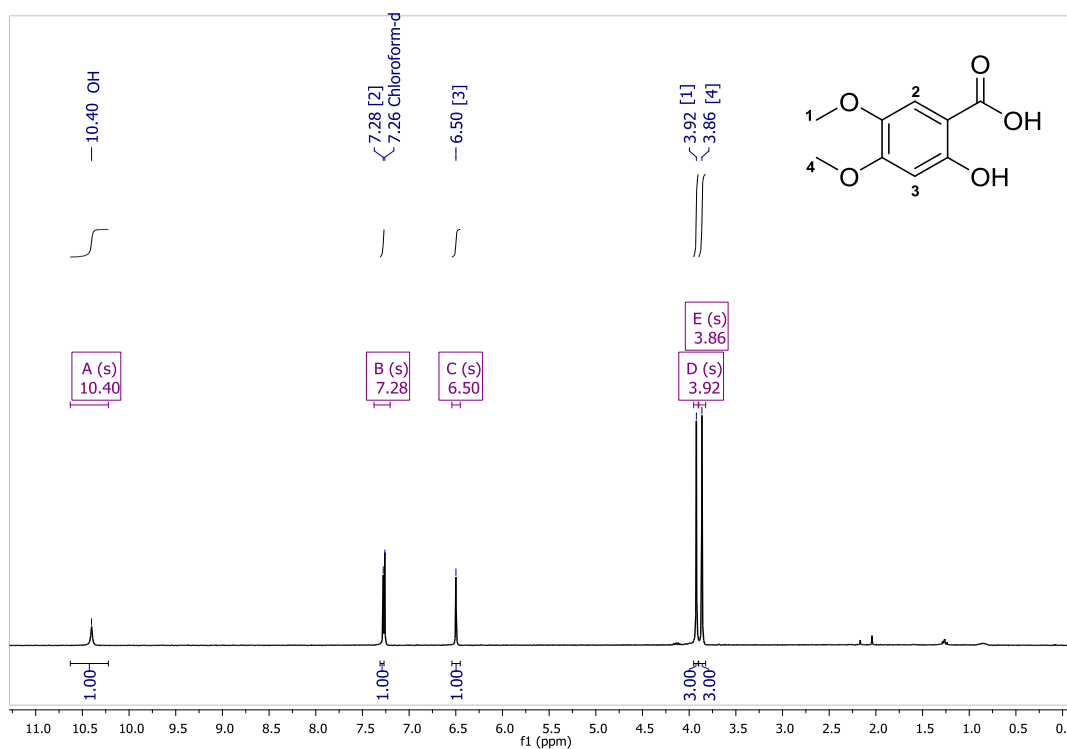
Fonte: Elaborada pelo autor.

Apêndice F - Espectro de massas do 1,3,6,7-tetrahidroxi-9H-xanten-9-ona (noratiriol) (5)



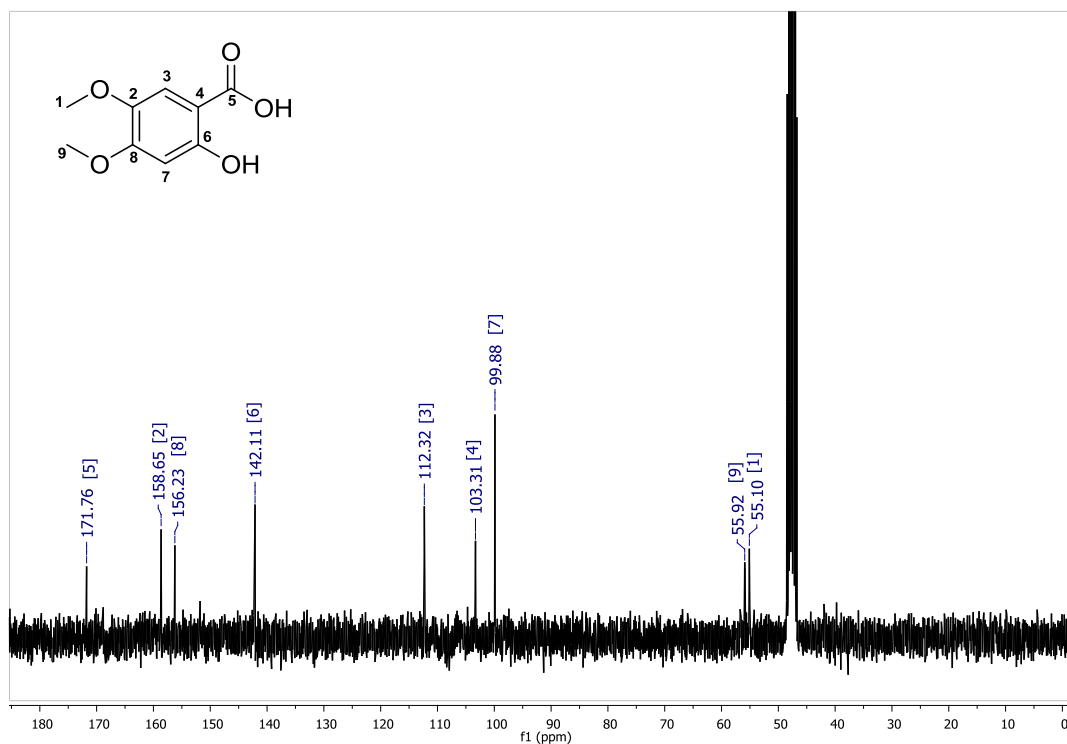
Fonte: Elaborada pelo autor.

Apêndice G - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do ácido 2-hidroxi-4,5-dimetoxibenzoico (**2**)



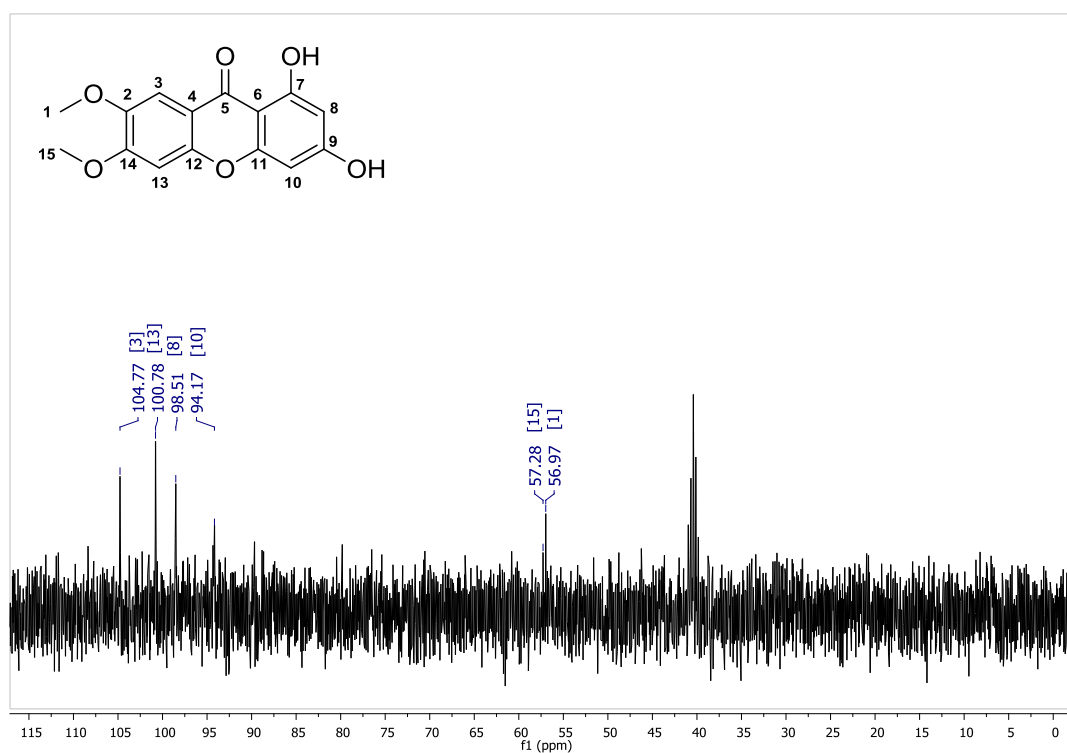
Fonte: Elaborada pelo autor.

Apêndice H - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, MeOD) do ácido 2-hidroxi-4,5-dimetoxibenzoico (**2**)



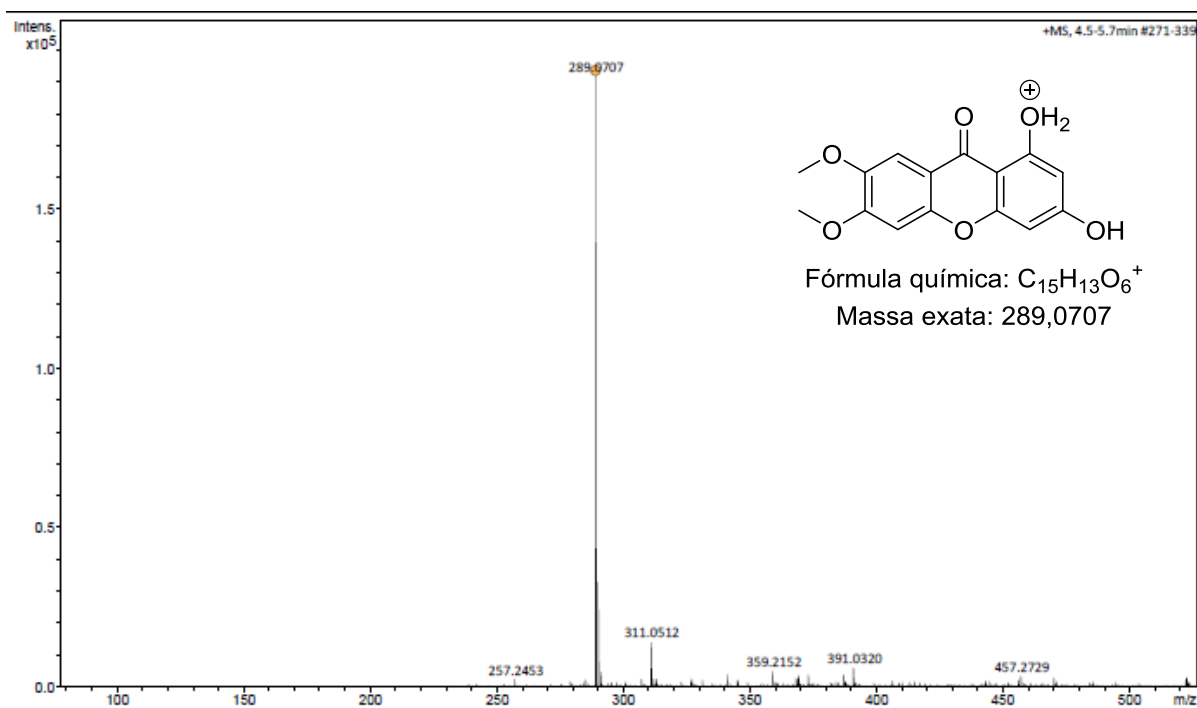
Fonte: Elaborada pelo autor.

Apêndice I - Espectro de RMN de DEPT 135 (75 MHz, DMSO) do 1,3-dihidroxi-6,7-dimetoxi-9H-xanten-9-ona (**4**)

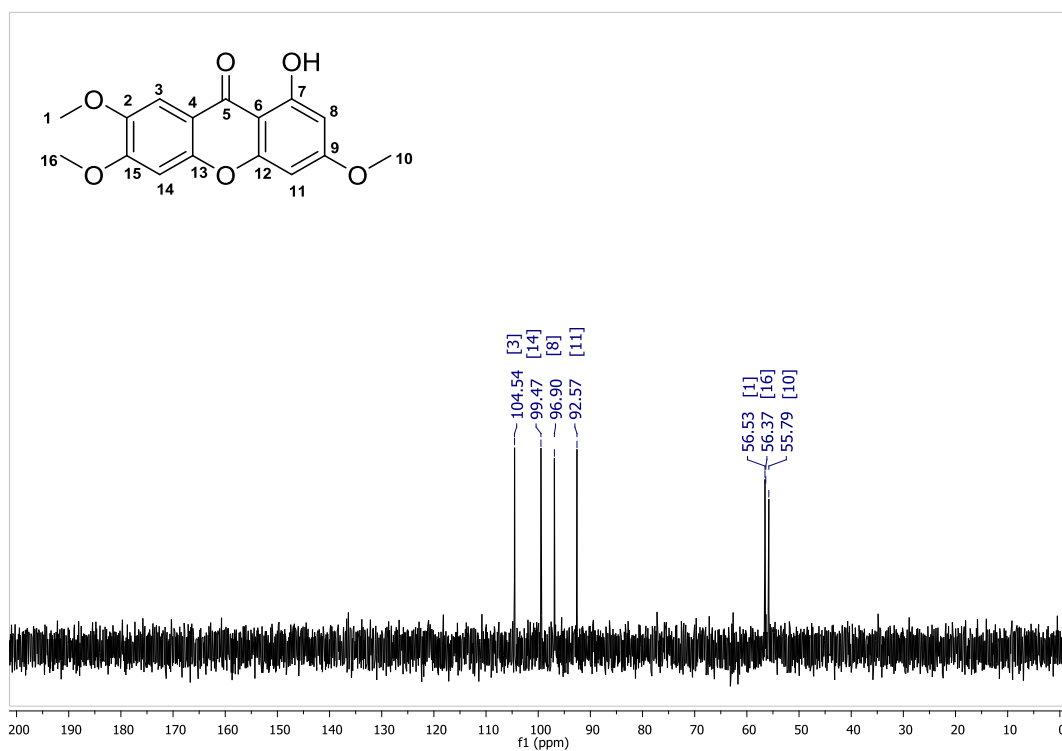


Fonte: Elaborada pelo autor.

Apêndice J - Espectro de massas do 1,3-dihidroxi-6,7-dimetoxi-9H-xanten-9-ona (**4**)

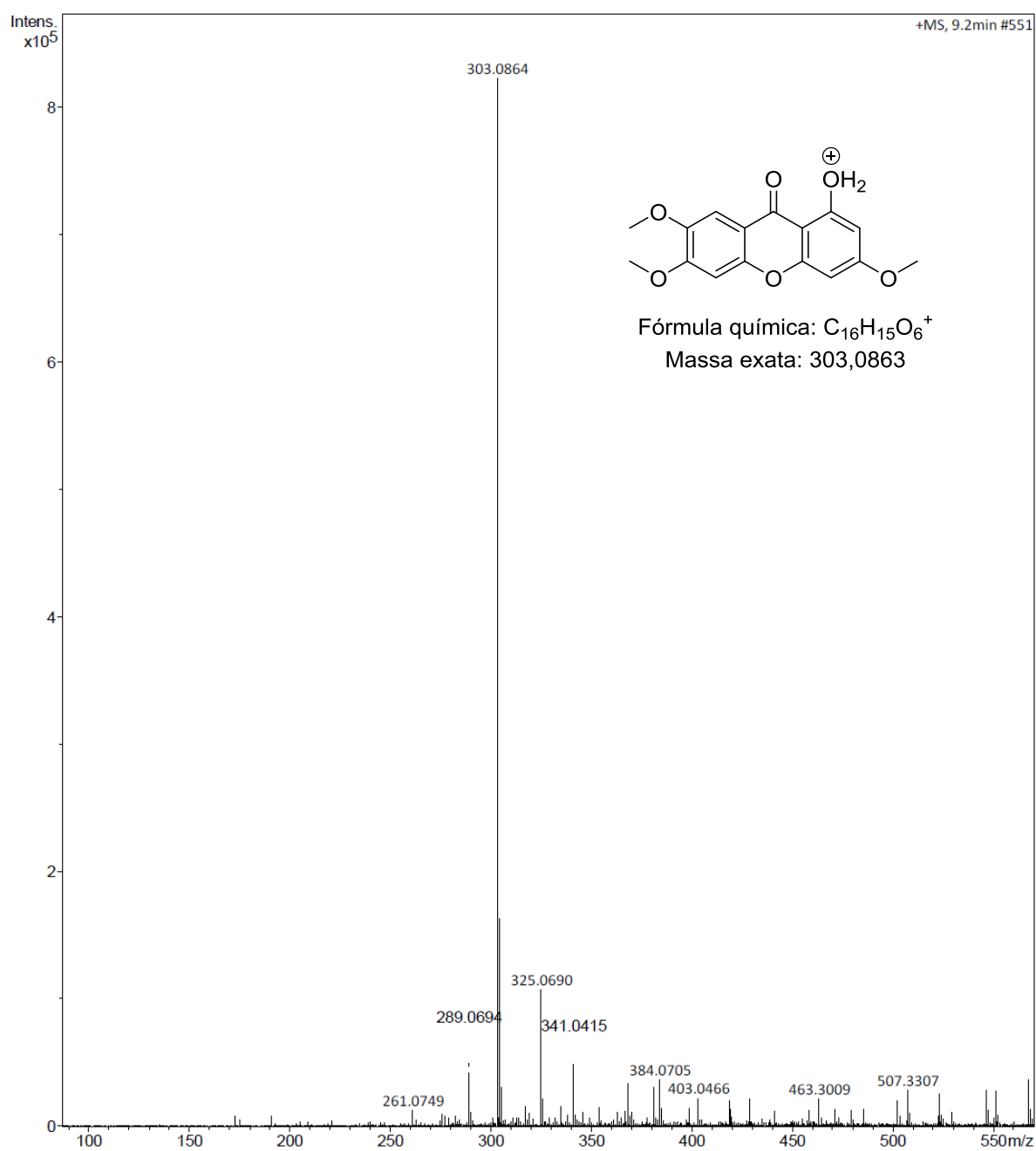


Fonte: Elaborada pelo autor.

Apêndice K - Espectro de RMN de DEPT 135 (75 MHz, DMSO) do 1-hidroxi-3,6,7-trimetoxi-9H-xanten-9-ona (**6**)

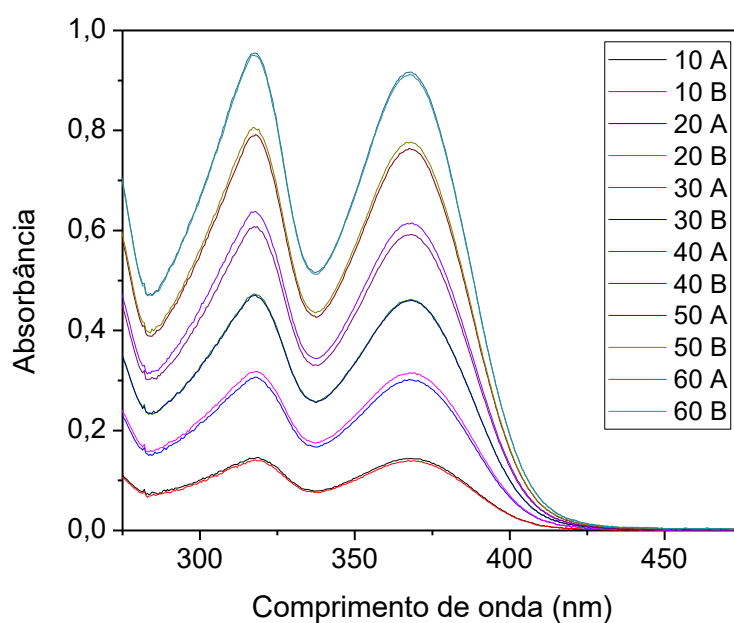
Fonte: Elaborada pelo autor.

Apêndice L - Espectro de massas do 1-hidroxi-3,6,7-trimetoxi-9H-xanten-9-ona (6)



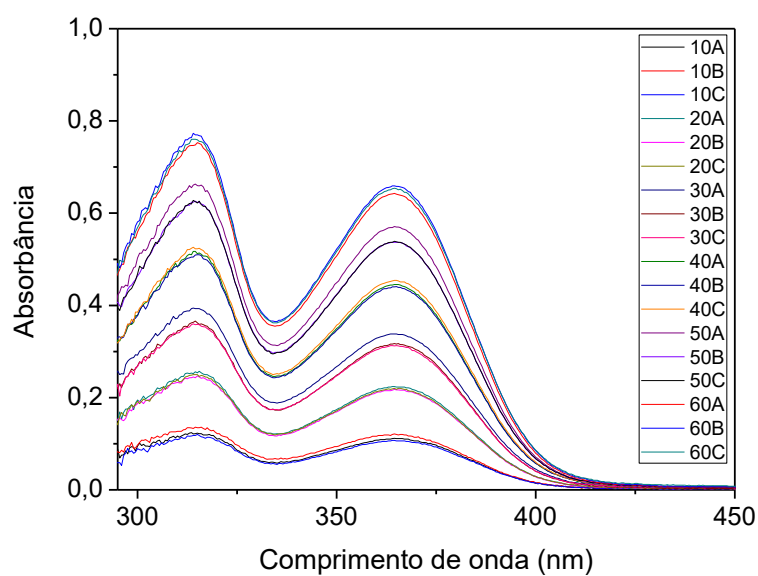
Fonte: Elaborada pelo autor.

Apêndice M - Espectro de absorção no UV-VIS da mangiferina, em tampão de Tyrode pH 7,4 e etanol (1:5), com $\lambda_{\text{máx}}$ de 368 nm



Fonte: Elaborada pelo autor.

Apêndice N - Espectro de absorção no UV-VIS do noratiríol, em tampão de Tyrode pH 7,4 e etanol (1:5), com $\lambda_{\text{máx}}$ de 364 nm



Fonte: Elaborada pelo autor.