UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do potencial antialérgico de flavonóides: estudo sinergístico e influência de sistemas lipossomais

Mariana Bellini Oliveira

Ribeirão Preto
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do potencial antialérgico de flavonóides: estudo sinergístico e influência de sistemas lipossomais

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientado(a): Mariana Bellini Oliveira

Orientador(a): Prof.ª Dr.ª Rose Mary Zumstein Georgetto Naal

Ribeirão Preto
2013

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.

Oliveira, Mariana Bellini
Avaliação do potencial antialérgico de flavonoides: estudo sinergístico e influência de sistemas lipossomais.Ribeirão Preto, 2013. 115p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.
Orientador: Zumstein Georgetto Naal, Rose Mary.

1. Flavonóides. 2. Lipossomos. 3. Alergia.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Mariana Bellini Oliveira
Título do trabalho: Avaliação do Potencial Antialérgico de Flavonóides: Estudo Sinergístico e Influência de Sistemas Lipossomais

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador(a): Prof.ª Dr.ª Rose Mary Zumstein Georgetto Naal

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr._____

Instituição:_____

Assinatura:_____

Prof.Dr._____

Instituição:_____

Assinatura:_____

Prof.Dr._____

Instituição:_____

Assinatura:_____

Dedicatória

Aos meus pais, Wla e Bilula,
Pelo Amor Incondicional

Ao meu avô, Malvino Bellini,
Pelo Exemplo de Vida

Agradecimento

A Deus... minha Força Maior.

À minha orientadora, Rose, minha infinita gratidão pela orientação sempre presente; pela paciência em cada etapa da minha vida e pela Amizade. Por acreditar em mim e permitir meu crescimento pessoal, profissional e acadêmico.

Aos meus pais, não bastaria um obrigada. Não tenho palavras para agradecer e dizer o que significam para mim. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, incansalvelmente, em todos os momentos. Vocês são o meu Sorriso.

Ao meu irmão, Thiago. Pelas conversas e conselhos que temos, pela União e por saber que posso contar com você. Você é um Ser Humano (com H maiúsculo!).

À minha avó, Angélica. Sou realmente privilegiada de ter você na minha vida. É um exemplo de Força e Paciência.

Ao meu avô, Malvino. Sei que estaria me dando um abraço bem forte, batendo em minhas costas e dizendo: Parabéns, minha Filha! Essa menina...! Lembro de você e das suas palavras todos os dias. Você é eterno para mim.

Ao meu namorado, Fernando. Por estar sempre estar disposto a ouvir minhas estórias intermináveis! Pelo companheirismo, acima de tudo e pela amizade.

Às companheiras de Laboratório, Perpétua e Laila, por todo o trabalho com as células e por sempre estarem dispostas a ajudar; ao Zeki, pelas discussões sobre a química e o trabalho realizado; à Sarah Angote dos Santospela ajuda nos experimentos do filme lipídico.

À Profa. Renata que disponibilizou o equipamenteo de Zeta Sizer e ao Zé Orestes pela paciência em ensinar e acompanhar os experimentos.

Aos funcionários da Pós Graduação por toda ajuda durante estes anos de Mestrado.

Senhor, fazei-me instrumento de vossa paz.

Onde houver ódio, que eu leve o amor;

Onde houver ofensa, que eu leve o perdão;

Onde houver discórdia, que eu leve a união;

Onde houver dúvida, que eu leve a fé;

Onde houver erro, que eu leve a verdade;

Onde houver desespero, que eu leve a esperança;

Onde houver tristeza, que eu leve a alegria;

Onde houver trevas, que eu leve a luz.

Ó Mestre, Fazei que eu procure mais

Consolar, que ser consolado;

compreender, que ser compreendido;

amar, que ser amado.

Pois, é dando que se recebe,

é perdoando que se é perdoado,

e é morrendo que se vive para a vida eterna.

São Francisco de Assis

RESUMO

Oliveira, M. B. **Avaliação do potencial antialérgico de flavonóides: estudo sinergístico e influência de sistemas lipossomais. Ribeirão Preto, 2013.** Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013. 115 p.

Os problemas decorrentes de doenças alérgicas é tema em destaque atualmente devido ao aumento de pessoas que vêm apresentando sintomas e sofrendo as consequências de mudanças aceleradas nos costumes da nossa sociedade. Apesar das diversas terapias oferecidas, pacientes alérgicos ainda sofrem com efeitos colaterais decorrentes do uso de medicamentos anti-alérgicos. Assim, a busca por novas alternativas que possam amenizar os sintomas alérgicos torna-se relevante. As substâncias naturais tem sido alvo de intensa investigação devido às propriedades farmacológicas no tratamento de diversas doenças incluindo as alérgicas. Neste contexto, este trabalho foi focado no extrato Vimang e seu componente majoritário, a mangiferina (Mgf), que tem apresentado atividades biológicas diversas. Sabendo-se que a atividade biológica de um extrato pode ser potencializada pelo sinergismo entre seus componentes, foi avaliado o efeito sinérgico de substâncias isoladas do Vimang, tais como mangiferina, quercetina, catequina, ácido gálico e benzóico. Esses componentes foram combinados e as misturas avaliadas quanto à capacidade em inibir a desgranulação mastocitária. O Vimang, a quercetina e mangiferina inibem a desgranulação mastócitária enquanto catequina, ácido gálico e benzóico não são ativos; e porisso, não foram incluídos na determinação do isobolograma de aditividade, adotado no estudo de sinergismo. O isobolograma de aditividade mostra sinergismo para as concentrações de mangiferina iguais a 5, 10, 20 e 40 μM e quercetina iguais a 0,2, 1 e 1,6 μM; e mostra antagonismo para mangiferina 80 μM e quercetina 0,4 e 0,8 μM. Tais resultados sugerem que altas concentrações de mangiferina atrapalham a interação sinérgica entre estas substâncias e altas concentrações de quercetina exercem um efeito contrário, ou seja, favorecem o sinergismo entre quercetina e mangiferina. A baixa solubilidade de flavonóides em meio fisiológico levou ao estudo da interação da Mgf com lipossomos de Dimiristoil-L-α-Fosfatidilcolina (DMPC) para aplicação nos ensaios biológicos. A Interação da Mgf com lipossomos de DMPC, bem como a estabilidade lipossomal, foram avaliadas quanto aos efeitos de pH, força iônica e presença de colesterol. O pH influencia a eficiência de incorporação (EI) da Mgf que é maior em pHs ácidos. Em soluções de pH ácido ou fisiológico há aumento de tamanho do lipossomo na presença de Mgf, o que reforça a hipótese de interação desta com a bicamada lipídica. O aumento da força iônica, na ausência de Mgf, diminui a estabilidade do lipossomo. Na ausência de sal, a Mgf favorece a formação de agregados e diminui a estabilidade dos lipossomos e na presença de sal, a Mgf previne a agregação e estabiliza os agregados lipossomais. A EI da Mgf nos lipossomos de DMPC preparados pelo método da injeção etanólica, em pH fisiológico, foram ao redor de 13%. A tentativa de otimizar a EI foi realizada pela adição de colesterol em diferentes proporções lipídio:colesterol. Um aumento de 13% para 17% foi observado para a proporção DMPC:colesterol (9:1). A Mgf livre inibe a desgranulação dos mastócitos de forma concentração-dependente; mas a presença de lipossomos, preparados pelo método da injeção etanólica não altera significativamente esse perfil. A EI da mangiferina em lipossomos de DMPC:colesterol (9:1), preparados pelo método do filme lipídico, foi igual a 45%. Os resultados de potencial antialérgico, para este caso, mostraram que os lipossomos de DMPC favorecem o potencial antialérgico da Mgf em concentrações acima de 25 μM. Esses resultados abrem perspectivas na busca de sistemas lipossomais mais estáveis e que possam ser aplicados em ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: Vimang, mangiferina, lipossomos, degranulação mastocitária, alergia.

ABSTRACT

Oliveira, M. B. Evaluation of the potential antiallergic flavonoids**:** synergistic influence and liposomal systems**.** Ribeirão Preto, 2013. 115p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

The problems due to allergic diseases are currently a highlighted topic due to the increase of people who are showing symptoms and suffering the consequences of rapid changes in the habits of our society. Despite various therapies offered, allergic patients still suffer side effects from the use of anti-allergic drugs. Thus, the search for new alternatives that can alleviate the allergic symptoms becomes relevant. Natural substances have been the subject of intense research due to the pharmacological properties in the treatment of several diseases, including allergic ones. In this context, this work was focused on Vimang extract and its major component, the mangiferin (Mgf), which has shown several biological activities. Given that the biological activity of an extract can be enhanced by the synergism between its components, the synergistic effect of compounds isolated from Vimang such as mangiferin, quercetin, catechin, gallic acid and benzoic acid was evaluated. These components were combined and the mixtures tested for their ability to inhibit mast cell degranulation. The Vimang, quercetin and mangiferin inhibit mast cell degranulation while catechin, gallic acid and benzoic acid are not active and for that reason they were not included in the determination of the isobologram adopted in the synergism study. The isobologram of additivity shows synergism for the concentration of mangiferin equal to 5, 10, 20 and 40 μM and quercetin equal 0.2, 1 and 1.6 μM, and shows antagonism for mangiferin 80 μM and quercetin 0.4 and 0.8 μM. The low solubility of flavonoids in physiological medium led to the study of the interaction of Mgf with liposomes of L-α-dimyristoyl-phosphatidylcholine (DMPC) for application in biological assays. The interaction of Mgf with DMPC liposomes as well as the liposomal stability was evaluated considering the effects of pH, ionic strength and cholesterol presence. The pH influences the incorporation efficiency (IE) of mangiferin, which is higher in acidic pHs. In solutions of acidic or physiological pH, the liposome size increases in the presence of Mgf, which reinforces the hypothesis of interaction of Mgf with the lipid bilayer. The increased ionic strength in the absence of Mgf decreases the stability of the liposome. In the absence of salt, Mgf favors the formation of aggregates and decreases the stability of the liposomes. When in presence of salt, Mgf prevents the aggregation and stabilizes the liposomal aggregates. The IE of mangiferin in DMPC prepared by the ethanol injection method, at physiological pH, were around 13%. The attempt to optimize the IE was performed by the addition of cholesterol in different proportions lipid:cholesterol. An increase from 13% to 17% was observed for the proportion of DMPC:cholesterol (9:1). Free mangiferin inhibits mast cells degranulation in a dose-dependent manner, but the presence of liposomes prepared by the ethanol injection method does not significantly change this profile. The IE of mangiferin in liposomes of DMPC:cholesterol (9:1), prepared by the method of lipidic film was equal to 45%.The results of antiallergic potential in this case show that DMPC liposomes favor the mangiferin antiallergic potential at concentrations above 25 mM. These results open perspectives in the search for more stable liposomal systems and can be applied to biological assays *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: Vimang, mangiferin, liposomes, mast cell degranulation, allergy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Sequência de eventos em reações de hipersensibilidade imediata: Adaptado de ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. Imunologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 03

Figura 02. Estrutura polipeptídica do receptor FcεRI. A molécula de FcεRI é composta por 3 subunidades: uma cadeia α, que intermedia a ligação com IgE, e três cadeias que contribuem para a sinalização intracelular, através de seus domínios ITAMs, sendo uma cadeia β e um dímero de cadeias γ. Adaptado de ABBAS *et al*., 2000. 04

Figura 03. Eventos na transdução de sinais em mastócitos: Adaptado de ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. Imunologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 06

Figura 04. Reação da clivagem de metilumbeliferil-N-acetil-β-D-glucosaminida (MUG) para a formação do produto fluorescente, metilumbeliferona. A quantificação de metilumbeliferona é frequentemente empregada como uma medida da degranulação mastocitária. 10

Figura 05. Protocolo para os ensaios padrão e direto de quantificação da enzima β-hexosaminidase. O número menor de etapas requerido para o ensaio direto, associado ao fato de que este ensaio é realizado na presença de células, possibilita sua aplicação como um biossensor celular na triagem de moléculas com potencial anti-alérgico. 11

Figura 06. Estrutura da mangiferina 13

Figura 07. Estrutura química do lipídio Dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) 15

Figura 08. Ilustração mostrando a transição de fases em lipossomos 15

Figura 09. Corte transversal de um lipossomo mostrando a encapsulação de substâncias hidrofílicas e lipofílicas. 16
(Adaptado de: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322007000400003).

Figura 10. Representação das condições de uma superfície negativa, com uma camada de íons positivos adsorvidos, configurando o plano de Stern. O número de íons negativos aumenta e o número de íons positivos diminui com o aumento da distância da superfície, até o ponto no qual as concentrações iônicas são iguais e o potencial elétrico torna-se zero. Conforme a partícula se move, a superfície efetiva é definida como superfície de cisalhamento, a qual está situada um pouco mais para frente do plano de Stern, dependendo da rugosidade da superfície de macromoléculas adsorvidas, etc. É no plano de cisalhamento que está localizado o potencial Zeta (ζ). 20

Figura 11. Figura ilustrativa do dispositivo Amicon usado na centrifugação das soluções lipossomais;adaptado de http://www.millipore.com/catalogue/module/c82301. 28

Figura 12. Espectro de absorção **(A)** e curva de calibração **(B)** da mangiferina em tampão acetato, pH 2,0, obtidos de resultados em duplicata. Comprimento de onda de absorção da mangiferina obtido em 365 nm 36

Figura 13. Espectro de absorção **(A)** e curva de calibração **(B)** da mangiferina em tampão fosfato, pH 4,0, obtidos de resultados em duplicata. Comprimento de onda de absorção da mangiferina obtido em 365 nm 37

Figura 14. Espectro de absorção **(A)** e curva de calibração **(B)** da mangiferina em tampão de Tyrode, pH 7,4, obtidos de resultados em duplicata. Comprimento de onda de absorção da mangiferina obtido em 365 nm. 38

Figura 15. Espectro de absorção **(A)** e curva de calibração **(B)** da mangiferina em tampão borato, pH 10,0, obtidos de resultados em duplicata. Comprimento de onda de absorção da mangiferina obtido em 365 nm. 39

Figura 16. Espectro de absorção **(A)** e curva de calibração **(B)** da mangiferina em tampão borato, pH 12,0, obtidos de resultados em duplicata. Comprimento de onda de absorção da mangiferina obtido em 365 nm. 40

Figura 17. Espectros de absorção da mangiferina em tampão acetato, pH 2,0 **(A),** tampão fosfato, pH 4,0 **(B),** tampão de Tyrode, pH 7,4 **(C)** e tampão borato, pH 10 **(D)** obtidos de resultados em duplicata; pkas da mangiferina: pka_1=6,52; pka_2=7,97; pka_3=9,44; pka_4=12,10. 43

Figura 18. Estrutura do lipídio Dimiristoil-l-α-Fosfatidilcolina (DMPC). 45

Figura 19. Exemplos de flavonóides das sub-classes flavonas e flavanonas. 46

Figura 20. Estrutura química do colesterol 50

Figura 21. Espectros de absorção da mangiferina em lipossomos preparados por diferentes proporções de DMPC:colesterol, em tampão de Tyrode, pH 7,4. Soluções lipossomais sem ultracentrifugar (sem UC) e ultracentrifugadas (UC) são representadas pelas linhas vermelhas e pretas, respectivamente. 51

Figura 22. Espectro de fluorescência da mangiferina em diferentes concentrações (0 a 0,33 mol/L) de lipossomos de DMPC:colesterol (9:1), preparados em tampão de Tyrode; **(B)** Gráfico de $1/\Delta F$ versus 1/[DMPC] para a mangiferina em soluções de DMPC:colesterol (9:1). A regressão linear em altas concentrações de lipossomos permite a determinação da constante de ligação (Kb) e de partição (Kp). 53

Figura 23. Evolução dos valores de Potencial Zeta, em função do pH, para lipossomos unilamelares de DMPC na ausência ou presença de mangiferina (DMPC+Mgf) medidos no dia da preparação. 64

Figura 24. Tamanho e PdI de lipossomos de DMPC preparados pelo método do filme lipídico na proporção DMPC:colesterol (9:1), determinados pelo equipamento DLS Zetasizer Nano, no dia da preparação (0h). 72

Figura 25. Porcentagem de β-hexosaminidase liberada, para as células estimuladas na presença de diferentes concentrações do antígeno DNP-BSA, usando o modelo biossensor (NAAL et al., 2004). Cada valor representa a média ± desvio padrão de determinações em quadruplicata; **p<0,01 em comparação ao controle. 75

Figura 26. Porcentagem de β-hexosaminidase liberada, para as células estimuladas na presença de diferentes concentrações do antígeno DNP-BSA, usando o modelo biossensor (NAAL et al., 2004). Cada valor representa a média ± desvio padrão de determinações em quadruplicata; **p<0,01 em comparação ao controle. 75

Figura 27. Liberação de β-hexosaminidase em células RBL-2H3 estimuladas pelo antígeno DNP-BSA (0,1 µg/mL) na presença de diferentes concentrações do extrato Vimang e de compostos isolados do mesmo tais como ácido gálico, quercetina, ácido benzóico, mangiferina e catequina. Cada valor representa a média ± desvio padrão de determinações em triplicata. Análise de One-way ANOVA, seguido pelo teste de Dunett indicaram significância estatística de *P<0,05 e ** P<0,01 em relação ao controle. 77

Figura 28. Isoboles de Aditividade (I), Sinergismo (II) e Antagonismo (III); (I) Efeito da adição de Substâncias individuais. (II) Interação positiva. (III) Interação negativa. 78

Figura 29. Liberação de β-hexosaminidase em mastócitos estimuladas pelo antígeno DNP-BSA (0,1 µg/mL) na presença de diferentes concentrações de quercetina e concentrações fixas de catequina: **(A)** Cateq 20 µM, **(B)** Cateq 40 µM, **(C)** cateq 80µM e **(D)** representação de todas as curvas**.** Cada valor de % de β-Hex representa a média ± desvio padrão de determinações em triplicata. A liberação espontân iv β-Hex está representada em preto. Análise de One-way ANOVA, seguido pelo teste de Dunett indicaram significância estatística de *P<0,05 e ** P<0,01 em relação ao controle. 78

Figura 30. Liberação de β-hexosaminidase em mastócitos estimuladas pelo antígeno DNP-BSA (0,1 µg/mL) na presença de diferentes concentrações de quercetina e concentrações fixas de ácido gálico: **(A)** Gal 5 µM, **(B)** Gal 10 µM, **(C)** Gal 20µM e **(D)** representação de todas as curvas**.** Cada valor de % de β-Hex representa a média ± desvio padrão de determinações em triplicata. A liberação espontânea de β-Hex está representada em preto. Análise de One-way ANOVA, seguido pelo teste de Dunett indicaram significância estatística de *P<0,05 e ** P<0,01 em relação ao controle. 81

Figura 31. Liberação de β-hexosaminidase em mastócitos estimuladas pelo antígeno DNP-BSA (0,1 µg/mL) na presença de diferentes concentrações de quercetina e concentrações fixas de ácido benzóico: **(A)** Benz 10 µM, **(B)** Benz 20 µM, **(C)** Benz 40µM e **(D)** representação de todas as curvas**.** Cada valor de % de β-Hex representa a média ± desvio padrão de determinações em triplicata. A liberação espontânea de β-Hex está representada em preto. Análise de One-way ANOVA, seguido pelo teste de Dunett indicaram significância estatística de *P<0,05 e ** P<0,01 em relação ao controle. 80

Figura 32. Liberação de β-hexosaminidase em mastócitos estimuladas pelo antígeno DNP-BSA (0,1 µg/mL) na presença de diferentes concentrações de mangiferina e concentrações fixas quercetina: **(A)** Mgf 2,5 µM, **(B)** Mgf 5 µM, **(C)** Mgf 10 µM e **(D)** representação de todas as curvas**.** Cada valor de % de β-Hex representa a média ± desvio padrão de determinações em triplicata. A liberação espontânea de β-Hex está representada em preto. Análise de One-way ANOVA, seguido pelo teste de Dunett indicaram significância estatística de *P<0,05 e ** P<0,01 em relação ao controle. 82

Figura 33. Liberação de β-hexosaminidase em mastócitos estimuladas pelo antígeno DNP-BSA (0,1 µg/mL) na presença de diferentes concentrações de quercetina e concentrações fixas de mangiferina: **(A)** Mgf 20 µM, **(B)** Mgf 40 µM, **(C)** Mgf 80µM, **(D)** Mgf 160 µM e **(E)** representação de todas as curvas**.** Cada valor de % de β-Hex representa a média ± desvio padrão de determinações em triplicata. A liberação espontânea de β-Hex está representada em preto. Análise de One-way ANOVA, seguido pelo teste de Dunett indicaram significância estatística de *P<0,05 e ** P<0,01 em relação ao controle. 83

Figura 34. Liberação de β-hexosaminidase em mastócitos estimuladas pelo antígeno DNP-BSA (0,1 µg/mL) na presença de diferentes concentrações de mangiferina e concentrações fixas catequina: **(A)** cateq 20 µM, **(B)** cateq 40 µM, **(C)** cateq 80µM e **(D)** representação de todas as curvas**.** Cada valor de % de β-Hex representa a média ± desvio padrão de determinações em triplicata. A liberação espontânea de β-Hex está representada em preto. Análise de One-way ANOVA, seguido pelo teste de Dunett indicaram significância estatística de *P<0,05 e ** P<0,01 em relação ao controle. 84

Figura 35. Liberação de β-hexosaminidase em mastócitos estimuladas pelo antígeno DNP-BSA (0,1 µg/mL) na presença de diferentes concentrações de mangiferina e concentrações fixas ácido gálico: **(A)** Gal 5 µM, **(B)** Gal 10 µM, **(C)** Gal 20µM e **(D)** representação de todas as curvas**.** Cada valor de % de β-Hex representa a média ± desvio padrão de determinações em triplicata. A liberação espontânea de β-Hex está representada em preto. Análise de One-way ANOVA, seguido pelo teste de Dunett indicaram significância estatística de *P<0,05 e ** P<0,01 em relação ao controle. 85

Figura 36. Liberação de β-hexosaminidase em mastócitos estimuladas pelo antígeno DNP-BSA (0,1 µg/mL) na presença de diferentes concentrações de mangiferina e concentrações fixas ácido benzóico: **(A)** Benz 10 µM, **(B)** Benz 20 µM, **(C)** Benz 40µM e **(D)** representação de todas as curvas**.** Cada valor de % de β-Hex representa a média ± desvio padrão de determinações em triplicata. A liberação espontânea de β-Hex está representada em preto. Análise de One-way ANOVA, seguido pelo teste de Dunett indicaram significância estatística de *P<0,05 e ** P<0,01 em relação ao controle. 86

Figura 37. Liberação de β-hexosaminidase em mastócitos estimuladas pelo antígeno DNP-BSA (0,1 µg/mL) na presença de diferentes concentrações de mangiferina e concentrações fixas quercetina: **(A)** Qc 0,2 µM, **(B)** Qc 0,4 µM, **(C)** Qc 0,8µM e **(D)** Qc 1,6µM e **(E)** representação de todas as curvas**.** Cada valor de % de β-Hex representa a média ± desvio padrão de determinações em triplicata. A liberação espontânea de β-Hex está representada em preto. Análise de One-way ANOVA, seguido pelo teste de Dunett indicaram significância estatística de *P<0,05 e ** P<0,01 em relação ao controle. 87

Figura 38. Liberação de β-hexosaminidase em mastócitos estimuladas pelo antígeno DNP-BSA (0,1 µg/mL) na presença de diferentes concentrações de mangiferina e concentrações fixas quercetina: **(A)** Qc 1 µM, **(B)** Qc 5 µM, **(C)** Qc 10µM e **(D)** representação de todas as curvas**.** Cada valor de % de β-Hex representa a média ± desvio padrão de determinações em triplicata. A liberação espontânea de β-Hex está representada em preto. Análise de One-way ANOVA, seguido pelo teste de Dunett indicaram significância estatística de *P<0,05 e ** P<0,01 em relação ao controle. 88

Figura 39. Gráficos de IC_{50} da quercetina obtidos a partir de combinações com diferentes concentrações fixas de catequina **(A)**; ácido gálico **(B)**; ácido benzóico **(C)** e mangiferina **(D).** 90

Figura 40. Gráficos de IC_{50} da mangiferina obtidos a partir de combinações com diferentes concentrações fixas de catequina **(A)**; ácido gálico **(B)**; ácido benzóico **(C)** e quercetina **(D).** 90

Figura 41. Isobolograma da variável β-hexosaminidase com os valores de dose necessária para obter 50 % de inibição da liberação de β-Hex (IC_{50}), obtidos de curvas de resposta às doses de quercetina e mangiferina, aplicadas isoladamete e em associação 92

Figura 42. Efeito de presença dos flavonóides mangiferina **(A)** e quercetina **(B)** na atividade da enzima β-hexosaminidase. Análise de One-way ANOVA, seguido pelo teste de Dunett indicaram significância estatística de *P<0,05 e ** P<0,01 em relação ao controle. 94

Figura 43. Porcentagem de viabilidade celular na presença de diferentes concentrações da quercetina **(A)** e mangiferina **(B).** Cada valor representa a média ± desvio padrão de determinações em triplicata. Análise de One-way ANOVA, seguido pelo teste de Dunett indicaram significância estatística de *P<0,05 e ** P<0,01 em relação ao controle. 95

Figura 44. Perfil representativo do efeito de lipossomos de DMPC, carregados com mangiferia, na liberação da degranulação de mastócitos estimulados por antígeno (DNP-BSA 0,1 µg/mL) preparados pelo método da Injeção Etanólica. 96

Figura 45. Perfil representativo do efeito de lipossomos de DMPC, carregados com mangiferia, na liberação da degranulação de mastócitos estimulados por antígeno (DNP-BSA 0,1 µg/mL) preparados pelo método do Filme Lipídico. 98

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Coeficientes de absortividade molar (ε) da mangiferina, em diferentes pHs, obtidos no comprimento de onda de 365 nm, a temperatura ambiente 41

Tabela 02. Absorbância da mangiferina obtida para soluções centrifugadas (UC) e sem ultracentrifugar (sem UC), e eficiência de incorporação (EI) do fármaco nos lipossomos de DMPC, nos diferentes pHs estudados 44

Tabela 03. Absorbância da mangiferina obtida para soluções centrifugadas (UC) e sem ultracentrifugar (sem UC) e eficiência de incorporação (EI) do fármaco em lipossomos de DMPC:colesterol, preparados em tampão de Tyrode, pH 7,4. 52

Tabela 04. Absorbâncias obtidas para a mangiferina em soluções centrifugadas (UC) e sem ultracentrifugar (sem UC), e eficiência de incorporação (EI) do flavonóide em lipossomos de DMPC preparados em diferentes proporções fármaco:lípídio, em tampão acetato, pH 2. 54

Tabela 05. Tamanho da partícula e Índice de polidispersividade (PdI) de lipossomos de DMPC preparados na ausência ou presença de mangiferina (Mgf) em pHs 2, 4 e 7,4. 61

Tabela 06. Influência a força iônica no tamanho da partícula, potencial zeta e Índice de polidispersividade (PdI) de lipossomos vazios (DMPC) e contendo Mgf (DMPC + Mgf). 67

Tabela 07. Tamanho, potencial zeta e índice de polidispersividade (PdI) de lipossomos preparados pelo método do filme lipídico, na presença de colesterol, na proporção DMPC:colesterol (9:1). 67

Tabela 08. Valores de CI_{50} para o extrato Vimang e para as substâncias isoladas deste, quercetina e mangiferina, determinados em tampão de Tyrode. 78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
anti-DNP-IgE	Anticorpo monoclonal específico para reconhecimento de dinitrofenil
BSA	Soro albumina bovina
Ca^{2+} Cálcio	Cálcio
CI50	Concentração para 50% de inibição da atividade biológica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNP	Dinitro-fenil
DMPC:	Dimiristoil L-α-Fosfatidilcolina
FcξRI	Receptor de alta afinidade para IgE
LAT	*Linker for activation of T cells*
MEM	Meio mínimo essencial de cultura
MUG	4-metil-umbeliferil-N-acetil-β-D-glucosamida
PKC	Proteína quinase C
PLA2	Fosfolipase A2
PLC	Fosfolipase C
Syk	*Spleen tyrosine kinase*
RBL-2H3	linhagem de células de mastócitos de ratos

SUMÁRIO

Resumo i
Abstract ii
Lista de figuras iii
Lista de tabelas..... viii
Lista de abreviaturas e siglas..... xix

1. INTRODUÇÃO 1

1.1 Doenças alérgicas..... 1

1.2 Mastócito..... 2

1.3. Ativação mastocitária via IgE e liberação de mediadores alérgicos..... 2

1.4. Mastócitos como alvo terapêutico no tratamento de alergias..... 6

1.5. Aplicação do modelo biossensor baseado em mastócitos no estudo do potencial anti-alérgico de substâncias naturais..... 7

1.6. Substâncias naturais e sinergismo..... 11

1.7. Mangiferina..... 13

1.8. Lipossomos..... 14

1.8.1. Composição química dos lipossomos..... 14

1.8.2. Formação dos lipossomos..... 16

1.8.3. Determinação do Diâmetro dos lipossomos..... 18

1.8.3.1. Espalhamento Dinâmico de luz (DLS)..... 19

1.8.3.2. Potencial zeta..... 19

1.8.4. Aplicações biológicas dos lipossomos..... 21

2. OBJETIVOS 23

2.1. Objetivos gerais 23

2.2. Objetivos específicos 23

3. MATERIAIS E MÉTODOS 24

3.1 Material..... 25

3.2 Métodos..... 25

3.2.1. Determinação dos coeficientes de absortividade molar (ε) da mangiferina

em meio tamponado..... 25

3.2.2 Preparação dos lipossomos..... 25

3.2.2.1 Método da injeção etanólica..... 26

3.2.2.2 Método de hidratação do filme lipídico..... 26

3.2.3. Determinação da eficiência de incorporação (EI) da mangiferina em

lipossomos preparados pelo método da injeção etanólica e filme lipídico..... 27

3.2.3.1. Método da injeção etanólica..... 27

3.2.3.2. Método do filme lipídico..... 28

3.2.4 Determinação do tamanho e estabilidade fisico-química dos lipossomos
na ausência e presença do flavonoide..... 29

3.2.5 Constantes de ligação (K_b) do flavonóide nos lipossomos de DMPC..... 29

3.2.6 Cultura de células..... 30

3.2.7 Ensaio direto para a quantificação da β-hexosaminidase..... 31

3.2.8 Viabilidade celular..... 31

3.2.9 Análise dos resultados..... 32

3.2.10 Análise estatística..... 33

4. RESULTADOS..... 33

PARTE I: INCORPORAÇÃO DA MANGIFERINA EM LIPOSSOMOS DE

DIMIRISTOILFOSFATIDILCOLINA (DMPC) PARA APLICAÇÃO EM ENSAIOS

BIOLÓGICOS..... 33

4.1. Preparação e caracterização físico-química dos lipossomos de DMPC,

preparados pelo método da injeção etanólica, na ausência e presença de mangiferina.. 33

4.1.1. Determinação das curvas de calibração da mangiferina em diferentes pHs..... 34

4.1.2. Eficiências de incorporação (EI) da mangiferina em lipossomos de DMPC, preparados pelo método da injeção etanólica, determinadas nos pHs de interesse..... 41

4.1.2.1. Influência de colesterol na determinação da eficiência de incorporação da mangiferina em lipossomos de DMPC preparados pelo método da injeção etanólica.... 49

4.1.2.2. Influência da proporção fármaco:lipídio na eficiência de incorporação da mangiferina em lipossomos de DMPC, preparados pelo método da injeção etanólica... 53

4.2.3. Determinação do coeficiente de partição (log*P*) da mangiferina em lipossomos de DMPC:colesterol (9:1) preparados pelo método da injeção etanólica..... 54

4.3 Estudo da estabilidade dos lipossomos: determinação do Potencial Zeta (ζ), tamanho de partícula e Índice de polidispersividade..... 58

4.3.1 Influência do pH..... 58

4.3.2 Influência da força iônica 65

4.4. Incorporação da mangiferina em lipossomos de DMPC:colestrol (9:1) preparados pelo método do filme lipídico..... 73

PARTE II: ESTUDO DO POTENCIAL ANTIALÉRGIC: SINERGISMO E INFLUÊNCIA DOS LIPOSSOMOS..... 73

4.4. Atividade antialérgica..... 73

4.4.1 Avaliação da concentração ótima de antígeno para o estímulo das células RBL-2H3..... 73

4.4.2 Perfil de inibição da degranulação de mastócitos: utilização do fármaco antialérgico Fumarato de Cetotifeno como controle positivo..... 74

4.4.3 Atividade antialérgica dos flavonóides isolados do extrato Vimang..... 73

4.5 Sinergismo..... 75

4.6 Inibição da atividade da enzima β-hexosaminidase..... 92

4.7 Avaliação da viabilidade celular dos mastócitos na presença das substâncias de interesse..... 93

4.8. Avaliação da atividade antialérgica da mangiferina livre e incorporda em lipossomos de DMPC: comparação dos métodos da injeção etanólica e filme lipídico..... 95

6. CONCLUSÃO..... 98

7. REFERÊNCIAS..... 101

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças alérgicas

Alergias são reações de hipersensibilidade imuno-mediadas que afetam principalmente a pele e as vias respiratórias (TRAIDL-HOFFMANN, JAKOB *et al.*, 2009). Tratam-se de reações altamente paciente-específicas, as quais incluem a asma, rinite, dermatite atópica e alergia a medicamentos, alimentos e insetos (BAEAE, LEEA *et al.*, 2011).

A prevalência da alergia cresce, mundialmente, especialmente em países ocidentais. Embora a susceptibilidade para estas condições apresente um elemento hereditário, alterações no meio ambiente, bem como no estilo de vida da sociedade contemporânea, são claramente importantes (HOLGATE e POLOSA, 2008; HAWRYLOWICZ e RYANNA, 2010).

A rinite alérgica atinge aproximadamente 500 milhões de pessoas no mundo e apesar dos medicamentos existentes, os pacientes ainda sofrem com dor e desconforto o que afeta consideravelmente a qualidade de vida destes (ROBINSON *et al.*, 2011). A asma é uma das doenças crônicas mais comuns na infância e tem como uma das causas a urbanização e o aumento da poluição (BUSSE, W. W., 2000). O número de pacientes que sofrem de asma alérgica é estimado em 300 milhões de pessoas e sua incidência continua a crescer, com a previsão de mais 100 milhões de pessoas acometidas até o ano de 2025 (KUPZCZYK, HAAHTELA *et al.*, 2010; ROBINSON *et al.*, 2011). Destaca-se o fato de que o Brasil pertence ao grupo dos cinco países que apresentam as maiores taxas de prevalência de asma e rinite alérgica no mundo (IBIAPINA, SARINHO *et al.*, 2008).

Apesar dos tratamentos utilizados, como o uso de corticóides e anti-histamínicos, essas classes de fármacos não são totalmente eficazes contra os sintomas mais severos das doenças alérgicas e podem provocar vários efeitos colaterais (TAMAGAWA-MINEOKA, *et al.*, 2011). A patofisiologia destas condições alérgicas envolve a ativação

de células imunes e tem sido amplamente estudada a fim de converter este conhecimento em novos medicamentos (JI, LI *et al.*, 2009).

1.2. Mastócitos

Os mastócitos são células do sistema imune derivadas de células progenitoras hematopoiéticas, originárias da medula óssea, as quais circulam no sangue e na linfa como células indiferenciadas e, posteriormente, migram para tecidos periféricos onde proliferam e se diferenciam em mastócitos maduros (TAYLOR e METCLAFE, 2001). Estas células desempenham um papel importante em vertebrados, uma vez que trabalham na manutenção da homeostase, atuando como células sentinelas nos tecidos vascularizados tais como pele, trato-gastrointestinal e vias respiratórias (MIGALOVICH-SHEIKHET *et al*., 2012).

Os mastócitos são historicamente conhecidos por seu papel nas reações alérgicas as quais são desenvolvidas em decorrência do estímulo celular por alérgenos (pólen, poeira, pelos de animais, etc...), os quais induzem, não somente, a liberação rápida de mediadores armazenados em grânulos secretórios (como histamina, proteases, heparina, proteoglicanos e leucotrienos), mas também a síntese *de novo* de metabólitos do ácido araquidônico e uma série de quimiocinas e citocinas (MIGALOVICH-SHEIKHET *et al*., 2012; ANDERSEN *et al*., 2012; STONE *et al*., 2010; TAYLOR e METCALFE, 2001), responsáveis por vários sintomas das doenças alérgicas.

1.3. Ativação mastocitária via IgE e liberação de mediadores alérgicos

A captura dos alérgenos pelas células apresentadoras de antígeno na mucosa das vias aéreas, e apresentação destes no trato intestinal ou linfonodos, é um dos primeiros eventos na patogênese da alergia que levam ao desenvolvimento de uma população de células T-helper 2. Quando encontram o alérgeno, estas células ativam as células B por meio da liberação de citocinas, como IL-4 e IL-3 e a expressão de CD40 ligante que induzem a troca de classe de imunoglobulinas (Ig) para a síntese de imunoglobulinas

específicas como IgE (STONE *et al*., 2010). Estas, por sua vez, se ligam aos receptores de alta afinidade por IgE (FcεRI), localizados na membrana de mastócitos, o que leva à sensibilização destas células como esquematizado na **Figura 01** (HOLOWKA e BAIRD, 1996; MINAI-FLEMINGER e LEVI-SCHAFFER, 2009; KRANEVELD *et al*., 2011; SPIRKOSKI, J. *et al*., 2012).

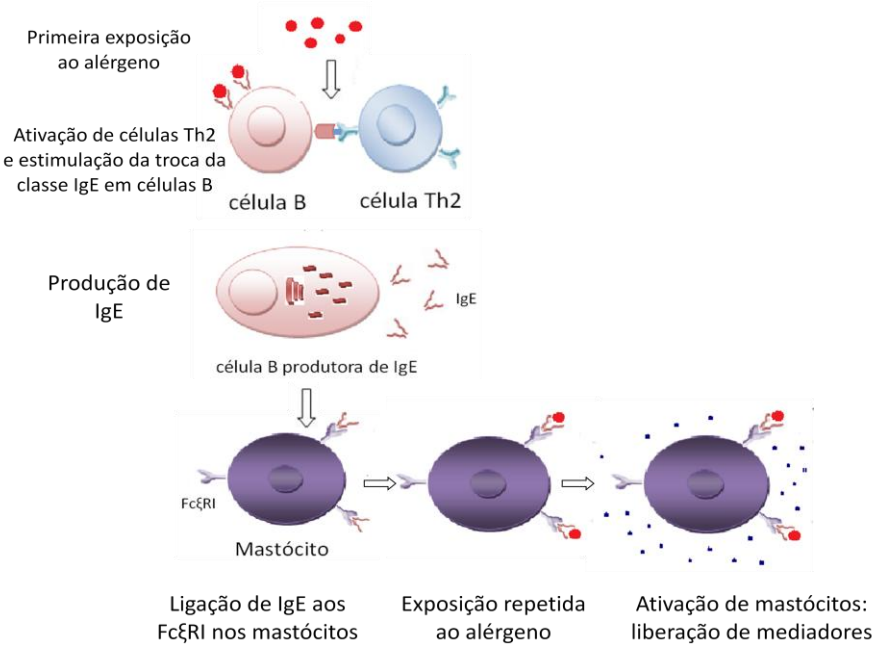


Figura 01. Sequência de eventos em reações de hipersensibilidade imediata: Adaptado de ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Imunologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

O receptor FcεRI, esquematizado na **Figura 02**, é um complexo tetramérico o qual consiste de uma cadeia α, uma cadeia β e duas cadeias γ, estas últimas, ligadas por ponte dissulfeto (KEEGAN e PAUL, 1992; WU, L. C., 2010). A subunidade α do receptor FcεRI se liga à porção Fc da IgE e consiste de um domínio extracelular, um domínio transmembrana e uma cauda citoplasmática curta. A subunidade β consiste de quatro domínios transmembrana com um único ITAM (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), sendo este, um segmento de aminoácidos contendo resíduos canônicos de tirosina, os quais são fosforilados para dar início à transdução de sinais (CAMBIER, J. C., 1995). A subunidade dimérica γ apresenta um domínio ITAM em cada uma das duas cadeias (NADLER *et al*., 2001; STONE *et al*., 2010) como ilustra a **Figura 02**.

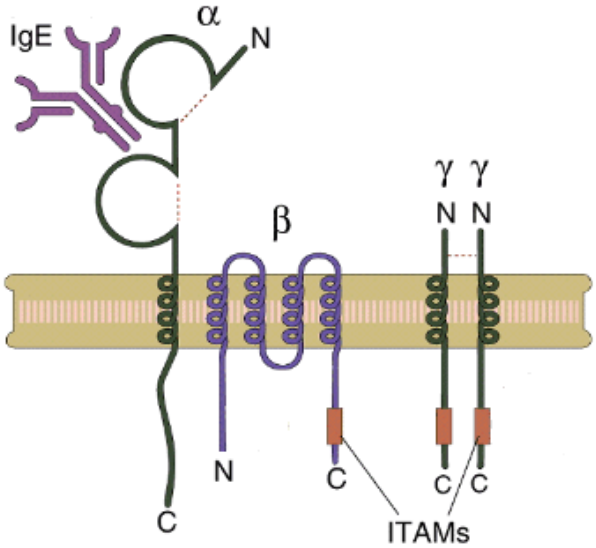


Figura 02. Estrutura polipeptídica do receptor FcεRI. A molécula de FcεRI é composta por 3 subunidades: uma cadeia α, que intermedia a ligação com IgE, e três cadeias que contribuem para a sinalização intracelular, através de seus domínios ITAMs, sendo uma cadeia β e um dímero de cadeias γ. Adaptado de ABBAS *et al*., 2000.

O reconhecimento do alérgeno pelo imuno-complexo IgE:FcεRI resulta na ligação cruzada antígeno/anticorpo, disparando uma sequência de eventos de sinalização intracelular **(Figura 03)** que tem como resultado três tipos de resposta biológica: **1)** a liberação de conteúdos pré-formados nos grânulos, num processo chamado desgranulação ou exocitose; **2)** a síntese e secreção de citocinas e **3)** a síntese e

secreção de mediadores lipídicos (ABBAS e LITCHMANN, 2005; BAEAE, LEEA *et al.*, 2011).

A ocorrência das ligações cruzadas entre as moléculas de IgE, resulta na ativação da proteinoquinase Lyn, que ativada, fosforila resíduos de tirosina dos ITAMs das cadeias β e γ do receptor FcεRI. Os ITAMs fosforilados atuam como sítios de ligação para uma segunda proteinoquinase, a Syk, que recruta e ativa uma série de proteínas adaptadoras, dentre elas a LAT (*Linker for activation of T cells*), que ativa a proteína fosfolipase Cγ (PLCγ). A PLCγ ativada, quebra o fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2) em inositol tri-fosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 atravessa o citoplasma dos mastócitos para encontrar os receptores do retículo endoplasmático e promover a liberação das reservas intracelulares de cálcio. O DAG ativa a proteinoquinase C (PKC), que juntamente com os elevados níveis de cálcio, fosforilam a cadeia leve da miosina, promovendo um desarranjo do complexo actina-miosina, permitindo que os grânulos contendo mediadores pré-formados entrem em contato com a membrana plasmática, com a posterior fusão dos grânulos e liberação de mediadores como a histamina. A mesma Syk ativada irá recrutar e ativar proteínas ativadoras da via das map-kinases (MAPKs – *Mitogen-activated protein kinases*), as quais, irão, por sua vez, ativar fatores de transcrição nucleares como nf-kb, nfat e ap-1, que irão atuar sobre sítios regulatórios da expressão de genes para citocinas, promovendo a síntese e secreção de citocinas, como TNF.

As MAPKs ativadas irão, juntamente com os elevados níveis de cálcio citoplasmáticos, ativar a fosfolipase A2 (PLA_2), que irá hidrolisar fosfolipídios de membrana em intermediários como o ácido araquidônico. Este será convertido em mediadores lipídicos, como prostaglandinas e leucotrienos, pela via das lipoxigenases e cicloxigenases (ABBAS e LITCHMANN, 2005). A liberação destes mediadores têm importante papel na fase imediata da resposta alérgica e resulta em vasodilatação, edema e/ou broncoconstrição além da ativação de células T e eosinófilos na fase tardia da resposta. Desta forma, é dito que os mastócitos desempenham papel central em várias doenças alérgicas o que faz destas células um alvo importante para o controle

destes processos (KRANEVELD *et al.*, 2011); ou seja, compostos capazes de modular qualquer uma das etapas mencionadas, fornecem a promessa de tratamento de doenças alérgicas

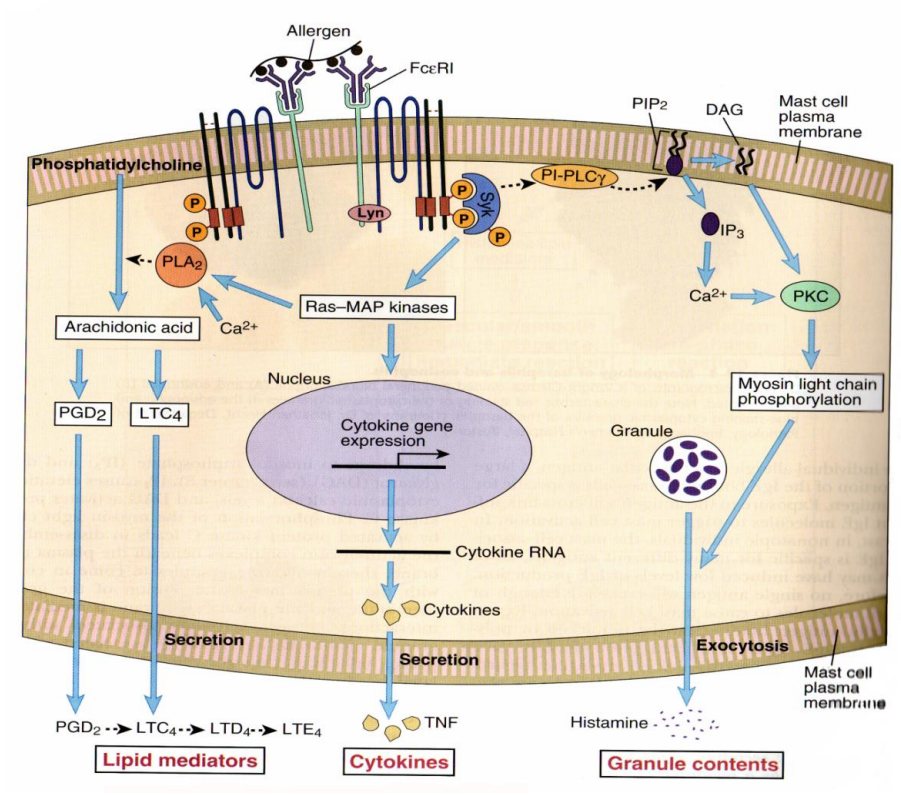


Figura 03. Eventos na transdução de sinais em mastócitos: Adaptado de ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Imunologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

1.4. Mastócitos como alvo terapêutico no tratamento de alergias

As opções de tratamento de condições alérgicas incluem evitar a exposição ao alérgeno, o que é frequentemente impraticável; a imunoterapia alérgeno-específica, alternativa complexa, que demanda tempo e ainda se encontra em fase de otimização; e a terapia mais comum, baseada no uso de medicamentos, como os antihistamínicos bloqueadores do receptor H_1, que têm como alvo antagonizar a ação dos mediadores que causam os sintomas da alergia.

Os antihistaminicos H_1 agem ocupando os receptores de histamina, impedem a ligação desta citocina no receptor e inibem sua ativação. São divididos em duas classes:

anti-H_1 de primeira geração e anti-H_1 de segunda geração; os primeiros, como a difenidramina, são fármacos lipofílicos e apresentam vários efeitos adversos por atuarem em receptores muscarínicos (xerostomia, retenção urinária, taquicardia sinusal), serotoninérgicos (aumento do apetite) e adrenérgicos (hipotensão, tontura), entre outros. Além disso, estes fármacos cruzam facilmente a barreira hematoencefálica ligando-se a receptores H_1 e causando sedação (CRIADO *et al*., 2010). Os anti-H_1 de segunda geração, como a fexofenadina, loratadina e olopaladina se diferenciam dos fármacos de primeira geração devido à maior eficácia e especificidade, sendo desenvolvidos para melhorar a qualidade de vida de pacientes portadores de alergias (HIROYUKI, AMI *et al*, 2012); no entanto, já foram relatados efeitos colaterais relevantes como os cardiotóxicos (CAMELO-NUNES, 2006).

Desta forma, como já mencionado, a cascata de sinalização intracelular de mastócitos, iniciada pela ligação cruzada antígeno/IgE-FcεRI (MASUDA e SCHMITZ, 2008) torna-se um alvo importante a ser estudado; e moléculas, ou sistemas, que possam atuar em uma destas etapas podem ser de grande importância no desenvolvimento de fármacos anti-alérgicos mais eficazes e seguros no tratamento terapêutico.

1.5. Aplicação do modelo biossensor baseado em mastócitos no estudo do potencial anti-alérgico de substâncias naturais

Biossensores são dispositivos analíticos que integram um componente biológico a um transdutor eletrônico, o qual converte o sinal biológico em uma resposta elétrica quantificável. O transdutor de sinais pode ser eletroquímico, acústico, óptico ou eletrônico (SCHELLER *et al*., 2001). A função do biossensor dependerá da especificidade bioquímica do material biologicamente ativo (DURICK e NEGULESCU, 2001; STENGER *et al*., 2001). Tais dispositivos podem dispor de bactérias e fungos (KARUBE, 1989), células vegetais (SIDWELL e RECHNITZ, 1986), células animais (MARGINEAU e VAIS, 1990) e até mesmo tecidos completos (WIJESURIYA e RECHNITZ, 1993).

Os sensores biológicos que empregam células como elemento sensível constituem um campo emergente com aplicações diversas, incluindo o *screening* de compostos bioativos, monitoramento ambiental e diagnóstico clínico (CURTIS *et al.*, 2008). Estes sistemas biossensores oferecem muitas vantagens sobre os dispositivos baseados somente em enzimas ou anticorpos (MCCORMACK, 1998) uma vez que as células são uma fonte de grande produção de proteínas em seu ambiente natural, onde os caminhos enzimáticos já estão otimizados e os cofatores, substratos e reagentes estão disponíveis. Além disso, os receptores e proteínas sinalizadoras, sensíveis a um analito, são mantidos e regenerados pela própria célula conforme necessário (PANCRÁZIO *et al*, 1999).

Os mastócitos oferecem um potencial excelente para a aplicação em biossensores uma vez que estas células são robustas e podem ser facilmente sensibilizadas para reconhecer antígenos específicos, o que conduz a eventos de ativação potencialmente transdutíveis, quando precedidos pela exposição antigênica (PAGE e PIZZICONI, 1997). Devido a sua similaridade com basófilos e mastócitos de mucosa, a linhagem de células RBL-2H3 (*Rat Basophilic Leukemia*) se tornou uma ferramenta, *in vitro,* importante no delineamento de estudos de desgranulação e investigações acerca de estabilizadores de mastócitos e das propriedades físico-químicas do receptor FcεRI (PASSANTE e FRANKISH, 2009). Estas células crescem em cultura, associadas a substratos sólidos, e podem expressar mais do que $1x10^5$ receptores FcεRI por célula. Ao contrário de mastócitos nativos, cujos receptores já são ligados à moléculas de IgE de especificidade desconhecida, as células RBL podem ser marcadas com IgE exógenas de especificidade conhecida o que lhes confere ampla aplicabilidade no reconhecimento de moléculas diversas (XU, WILLIAMS *et al.*, 1998). Como a ligação de IgE ao receptor FcεRI é forte, ($Ka \cong 10^{-10}\ M^{-1}$) (MIGALOVICH-SHEIKHET *et al.*, 2012) este último pode ser totalmente ocupado em concentrações de IgE menores do que $5x10^{-10}$ M (aproximadamente 1 µg/mL). Além disso, somente poucas centenas de moléculas de FcεRI, na membrana celular, precisam ser intercruzadas para disparar a exocitose de grânulos secretórios. Por esse motivo, os mastócitos da linhagem RBL-2H3 podem ser sensibilizados com um

anticorpo IgE simples e caracterizados como um sistema biossensor altamente sensível, apto para identificar moléculas inibidoras do processo de desgranulação mastocitária.

Como consequência do processo de desgranulação, uma série de mediadores alérgicos são secretados pelos mastócitos. Dentre estes mediadores, a histamina é certamente o mais estudado e desempenha papéis subsequentes nos processos alérgicos relacionados à ativação de outras células inflamatórias (PASSANTE e FRANKISH, 2009). Além da histamina, a enzima β-hexosaminidase também se encontra armazenada em grânulos secretórios e é liberada em consequência da desgranulação. O papel da β-hexosaminidase em processos inflamatórios e alérgicos permanece desconhecido, embora hipóteses expliquem que esta enzima pode estar atuando, em conjunto com triptases e quimases, no processo de degradação de glicoproteínas e proteoglicanas da matriz extracelular, um evento importante para a remodelagem de tecidos inflamados (PASSANTE e FRANKISH, 2009). Pelo fato de que a β-hexosaminidase é liberada em paralelo com a histamina, esta enzima tem sido amplamente empregada como um marcador para a desgranulação de mastócitos (MATSUDA *et al*., 2002; MORIKAWA *et al*., 2003; KAWA *et al*., 2003).

Neste sentido, ensaios biológicos para a quantificação de β-hexosaminidase (NAAL *et al*., 2004) são convenientes tanto para estudar os mecanismos de transdução de sinais que levam à exocitose (BAROODY, 2003), quanto para monitorar o potencial de novas molélulas em bloquear a ativação e desgranulação de mastócitos (GRANBERG *et al*., 2001). Além disso, esse ensaio pode ser empregado para a detecção de antígenos que se ligam a imuno-complexos localizados na membrana de mastócitos (HOFFMANN *et al*., 1999).

Métodos atuais para a quantificação de β-hexosaminidase usam substratos enzimáticos colorimétricos (SEREBRIISKI e GOLEMIS, 2000; AKETANI *et al*., 2001) ou fluorimétricos (DEMO *et al*., 1999; FISCHER e DE MOL, 1999). No presente estudo, a quantificação da enzima β-hexosaminidase baseou-se em sua capacidade de clivar o substrato fluorogênico metilumbeliferil-N-acetil-β-D-glucosaminida (MUG), que gera o produto fluorescente metilumbeliferona como mostra a **Figura 04.**

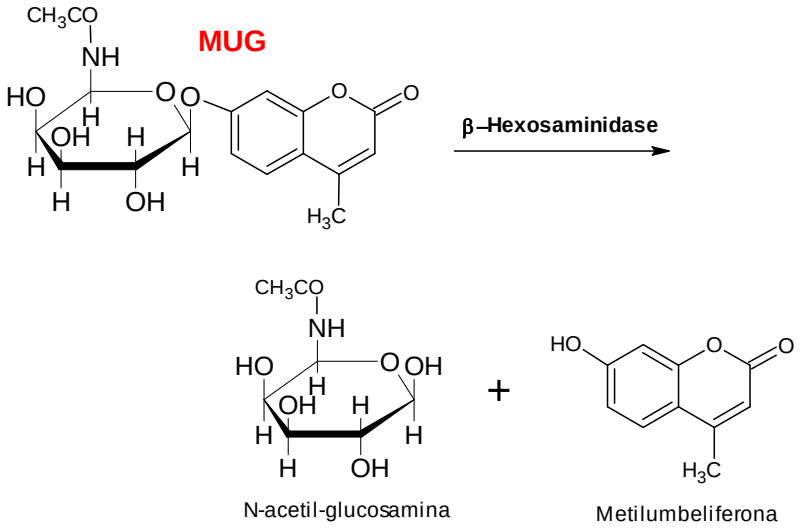


Figura 04. Reação da clivagem de metilumbeliferil-N-acetil-β-D-glucosaminida (MUG) para a formação do produto fluorescente, metilumbeliferona. A quantificação de metilumbeliferona é frequentemente empregada como uma medida da desgranulação mastocitária.

A quantificação clássica de β-hexosaminidase baseia-se em um ensaio conhecido como padrão (**Figura 05**), que consiste em um considerável número de etapas, as quais incluem a sensibilização de células com IgE, estímulo antigênico, remoção do sobrenadante para a reação enzima-substrato e medida da fluorescência da metilumbeliferona produzida. A reação enzima-substrato é realizada em pH 4,4, valor considerado ótimo para a atividade da β-hexosaminidase, seguida pelo aumento de pH (pH=10), no qual ocorre supressão da reação enzimática (**Figura 05**). Estas etapas sucessivas, incluindo a transferência do sobrenadante das células aderidas, fazem com que o ensaio padrão seja inapropriado para análises que requeiram alta capacidade de processamento. Para adaptar esta resposta celular foi desenvolvido um ensaio direto para a quantificação da β-hexosaminidase, realizado *in situ*, em um leitor de fluorescência para microplacas, o qual permite a análise de um grande número de amostras de células com alta sensibilidade e reprodutibilidade, tornando este ensaio muito conveniente para aplicações na triagem de substâncias com potencial terapêutico (**Figura 05**).

ENSAIO PADRÃO	ENSAIO DIRETO
Sensibilização celular com anticorpo ↓ Estímulo antigênico em pH 7,45 ↓ incubação a 37 °C por 60 min Parada da desgranulação no gelo ↓ Aliquotamento do sobrenadante ↓ Adição de substrato fluorogênico em pH 4,4 ↓ incubação a 37 °C por 30 min Adição de tampão pH 10 para finalizar reação ↓ Leitura de fluorescência	Sensibilização celular com anticorpo ↓ Adição de antígeno e substrato fluorogênico em pH 7,45 ↓ Incubação a 37 °C por 90 min ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ Leitura de fluorescência

Figura 05. Protocolo para os ensaios padrão e direto de quantificação da enzima β-hexosaminidase. O número menor de etapas requerido para o ensaio direto, associado ao fato de que este ensaio é realizado na presença de células, possibilita sua aplicação como um biossensor celular na triagem de moléculas com potencial anti-alérgico.

1.6. Substâncias naturais e sinergismo

O interesse na vasta diversidade química dos produtos naturais tem sido focado há muito tempo no descobrimento de novas estruturas com potencial terapêutico para o tratamento de doenças diversas (ALEXANDRAKIS, SINGH *et al.*, 1999; NEWMAN, CRAGG *et al.*, 2000; KINGSTON e NEWMAN, 2002; BAKER e ALVI, 2004; BOLDI, 2004; NEWMAN, 2008). Tais estudos têm sido fundamentais na determinação de vários princípios ativos elucidados com base na suposição de que uma planta tem um, ou poucos, componentes que determinam sua eficiência terapêutica. Porém, sistemas tradicionais tais como a medicina Chinesa ou a fitoterapia Européia, focados em medicamentos naturais, geralmente assumem que o sinergismo de todos os ingredientes de uma planta responde pela eficiência terapêutica máxima observada para vários

extratos (ULRICH-MERZENICH, PANEK *et al.*, 2010). Quando em 1936, Rusznyák e Szent-Györgyi reportaram a presença da então chamada vitamina “P” em frutas cítricas, eles já preconizavam que flavonóides e vitamina C trabalhavam sinergisticamente no fortalecimento capilar. Subsequentemente, outros estudos mostraram que interações sinérgicas entre flavonóides e algumas vitaminas ocorriam em modelos *in vitro* e *in vivo*. Frank e colaboradores (2006) mostraram que a inclusão de quercetina, catequina e epicatequina na dieta de ratos levou a um aumento da concentração de δ-tocoferol no plasma e fígado. Stermitz e colaboradores (2000) mostraram que o elevado potencial antimicrobiano de *Berberis* spp. é causado, não somente, por agentes antimicrobianos tal como berberine, mas também por outros inibidores tal como 5’-metóxi-hidnocarpina, sendo que este ultimo não é ativo, mas potencializa o efeito biológico de outras moléculas. Saw e colaboradores (2010) estudaram os efeitos sinergísticos de curcumina e ácidos graxos e observaram a potencialização das atividades anti-inflamatória e anti-oxidante. Hidalgo e colaboradores (2010) observaram que existem interações sinérgicas e antagonistas entre flavonóides presentes em extratos alimentares os quais podem explicar os diversos resultados obtidos para a atividade antioxidante. Grande parte dos estudos focados no sinergismo de moléculas bioativas são dedicados, principalmente, às atividades antioxidante (LIANG, HAN *et al.*, 2009; HIDALGO, SANCHEZ-MORENO *et al.*, 2010; KANCHEVA, BORANOVA *et al.*, 2010) e antimicrobiana (ZHAO, HU *et al.*, 2001; HU, ZHAO *et al.*, 2002; ZAGO, USHIMARU *et al.*, 2009; MANDALARI, BISIGNANO *et al.*, 2010) com pequeno enfoque na atividade anti-alérgica, que é assunto de nosso interesse.

Neste contexto chama-nos a atenção o extrato obtido de árvores do gênero *Mangifera indica* L. (popular mangueira) cujo nome foi registrado como *Vimang,* tradicionalmente utilizado em Cuba devido às suas propriedades anti-inflamatória, antioxidante, analgésica, imunomodulatória, entre outras (RIVERA, BALMASEDA *et al.*, 2006; WAUTHOZ, BALDE *et al.*, 2007; GARCÍA-RIVERA *et al*., 2011).

A investigação fitoquímica de extratos obtidos das cascas destas árvores levou ao isolamento de vários constituintes fenólicos, entre os quais estão ácido gálico, ácido

benzóico, (+)-catequina, quercetina e mangiferina (NÚNEZ-SELLÉS, VÉLEZ-CASTRO *et al.*, 2002).

Rivera e colaboradores (2006) estudaram as propriedades anti-alérgicas do extrato *Vimang* e da mangiferina e observaram que ambos apresentam potencial inibidor embora o extrato seja mais eficiente nesta questão, o que reforça a importância do sinergismo entre os componentes de uma planta. No entanto, apesar dos estudos bem elaborados relativos aos potencias biológicos diversos do *Vimang* e da mangiferina (WAUTHOZ, BALDE *et al.*, 2007), nenhum trabalho até o momento relata um estudo sistemático acerca do efeito sinergístico anti-alérgico envolvendo os constituintes principais isolados do extrato *Vimang*.

1.6.1. Mangiferina

O extrato Vimang possui uma mistura complexa de compostos e tem como flavonóide majoritário, a mangiferina **(Figura 06)** (C2-β-*D*-glucopiranosil-1,3,6,7-tetrahidroxi-xantona) que tem se mostrado promissora como substância bioativa (DUANG *et al.*, 2011). Em modelos animais de alergias, a mangiferina reduz significativamente os níveis de IgE, as reações anafiláticas, as reações cutâneas induzidas por histamina e inibe a proliferação de linfócitos (RIVERA, BALMASEDA *et al.*, 2006). Dentre os estudos realizados com a mangiferina, além da atividade anti-alérgica, o composto apresenta atividades anti-inflamatória, antitumoral, anti-diabética, antioxidante, antimicrobiana e anti-HIV, além de efeitos imunomoduladores e radioprotetores (PARDO-ANDREU, BARRIOS *et al.*, 2008; PRABHU, NARAYAN *et al.*, 2009; DUANG *et al.*, 2011).

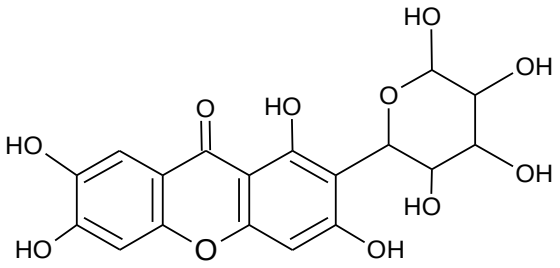


Figura 06. Estrutura da mangiferina

Apesar do excelente potencial biológico a mangiferina é pouco solúvel em meio aquoso - devido à presença de anéis aromáticos em sua estrutura - e apresenta baixa

biodisponibilidade (HU, ZHAO *et al.*, 2002) o que compromete, não somente a eficiência terapêutica, como também o desempenho de bioensaios (JULLIAN, MOYANO *et al.*, 2007). No caso dos flavonóides, existem também problemas decorrentes de oxidação química, ou fotodegradação, que podem contribuir para a redução da eficiência da mangiferina como um bioativo. Várias alternativas para contornar a solubilidade e estabilidade de flavonóides, e outras classes de substâncias, tem sido empregadas e estas vão desde a modificação estrutural por reações químicas e ação de microorganismos até o emprego de sistemas carreadores tais como lipossomos (ALEXOPOULOU, GEORGOPOULOS *et al.*, 2006; PAWLIKOSWSKA-PAWLEGA, GRUSZECKI *et al.*, 2007; NOBLE, GUO *et al.*, 2009; YANG, PORNPATTANANANGKUL *et al.*, 2009), ciclodextrinas ou uma combinação de ambos (GILLET, GRAMMENOS *et al.*, 2009; LIRA, FERRAZ *et al.*, 2009), sendo que o primeiro é de nosso interesse em função de sua habilidade como nanocarreador e de suas características únicas de mimetização da membrana biológica.

1.8. Lipossomos

1.8.1. Composição química dos lipossomos

Os lipossomos são geralmente formados por fosfolipídios, que são os principais componentes da membrana biológica. Estes fosfolipídios caracterizam-se por suas propriedades anfipáticas, ou seja, possuem uma parte polar e outra apolar (**Figura 07**). Dentre os fosfolipídios, as fosfatidilcolinas, classificadas como glicerofosfolipídios, são as mais comuns e possuem como estrutura química dois ácidos graxos, unidos em uma ligação éster ao primeiro e segundo carbono do glicerol, e uma colina na parte polar ligada ao glicerol por um grupo fosfodiéster (**Figura 07**).

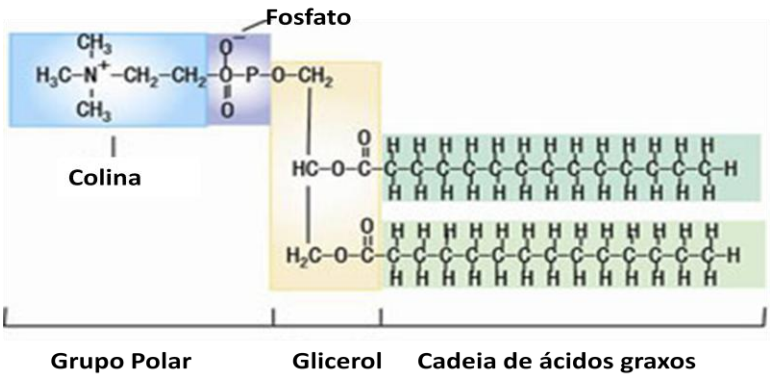


Figura 07. Estrutura química do lipídio Dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC)

Em solução aquosa, essas moléculas alinham-se formando uma bicamada plana laminar, a fim de minimizar interações desfavoráveis entre a fase aquosa e as cadeias hidrocarbônicas de ácidos graxos, e se dobram para formar vesículas fechadas. Desta forma, as fosfatidilcolinas são amplamente utilizadas para a preparação de lipossomos.

Os fosfolipídios são caracterizados por uma temperatura de transição de fases (Tc) que é a temperatura mínima necessária para a água penetrar entre as moléculas dos lipídios (**Figura 08**); abaixo desta Tc, a membrana está em uma fase gel na qual a cadeia hidrocarbônica do lipídio está ordenada formando uma estrutura lamelar, e acima da Tc, a membrana passa para uma fase chamada cristal-líquido, na qual as moléculas tornam-se mais livres e os radicais hidrofílicos hidratados. O controle da temperatura de transição de fases é de extrema importância já que estas transições podem induzir a agregação dos lipossomos e, também, a liberação do fármaco encapsulado (LASIC, 1998).

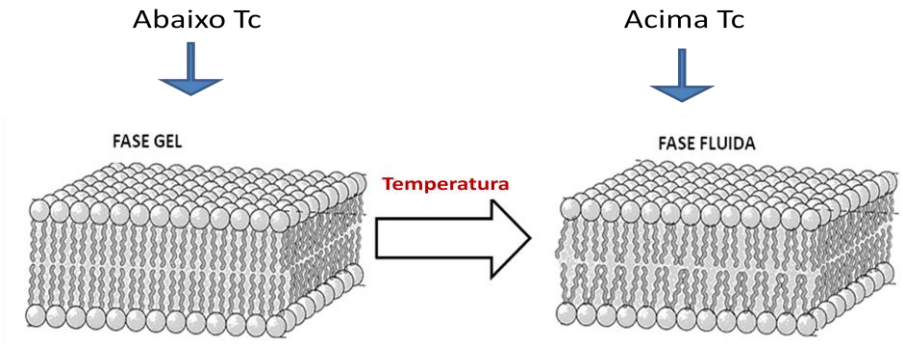


Figura 08. Ilustração mostrando a transição de fases em lipossomos

O comprimento e saturação da cadeia lipídica que compõe o lipossomo influenciam a Tc; assim, em uma mesma temperatura, membranas compostas por diferentes lipídios exibem diferentes níveis de fluidez (LASIC, 1998; STOLL, *et al*., 2011).

As características físico-químicas relativas ao tipo e quantidade de lipídios usados nas formulações de lipossomos interferem no transporte de drogas específicas. Os lipídios com carga negativa e positiva conferem maior estabilidade quando incorporados nos lipossomos pois a carga pode impedir a agregação ou fusão destas vesículas e influenciar na taxa de encapsulação das substâncias (FRÉZARD *et al.*, 2005; BARENHOLZ, *et al*., 2011).

Um dos lipídios utilizados para a formação de lipossomos é o DMPC (1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina) com carga líquida neutra em pH 7,4, uma cabeça polar zwitteriônica e duas caudas hidrofóbicas com 16 carbonos, como mostra a **Figura 07**. O DMPC apresenta temperatura de transição de fases (Tc) de 23°C e concentração micelar crítica de 6 nM.

Outros componentes da membrana como o colesterol e proteínas também tem seu papel na fluidez da membrana (STOLL, et al., 2011). O colesterol, por exemplo, atua como um estabilizador de membranas, uma vez que causa um efeito perturbador da bicamada fosfolipídica na fase gel, fazendo com que a membrana fique mais fluida mesmo a temperaturas baixas. Na fase cristal-líquido causa um estiramento das cadeias acil fosfolipídicas desordenadas e reduz a área da cabeça polar (HERNÁNDEZ e SCHOLZ, 2008).

1.8.2. Formação dos lipossomos

Lipossomos são vesículas constituídas de uma ou mais bicamadas fosfolipídicas orientadas, concentricamente, em torno de um compartimento aquoso e servem como carreadores de substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas (**Figura 09**). As moléculas hidrofílicas são encapsuladas na cavidade interna, onde estão presentes os grupos polares dos fosfolipídios; as lipofílicas se acomodam na região apolar da bicamada e as

anfifílicas ao longo de toda sua extensão, interagindo com as regiões apolar e polar. (BATISTA, CARVALHO *et al.*, 2007; ZASADZINSKI, *et al.*, 2011).

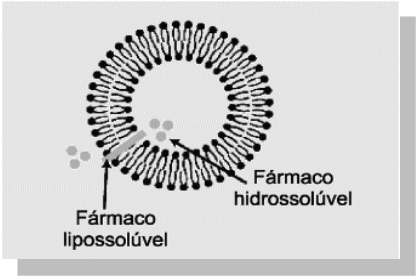


Figura 09. Corte transversal de um lipossomo mostrando a encapsulação de substâncias hidrofílicas e lipofílicas.
(Adaptado de: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322007000400003).

Os lipossomos são formados por substâncias biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicas, altamente versáteis para pesquisa, terapêutica e aplicações analíticas (BATISTA, CARVALHO *et al.*, 2007; HILLARIEAU e COUVREUR, 2009). De acordo com sua estrutura molecular, composição e tamanho eles são classificados conforme abaixo (GREGORIARDIS, 1993; SHARMA e SHARMA, 1997):

- **Lipossomos multilamelares (MLVs):** várias camadas fosfolipídicas concêntricas, intercaladas por compartimentos aquosos e com diâmetro de 400 nm até micrômetros.
- **Lipossomos unilamelares pequenos (SUVs):** uma bicamada lipídica e um pequeno compartimento aquoso, com diâmetro entre 20 e 100 nm.
- **Lipossomos unilamelares grandes (LUVs):** uma bicamada lipídica e um compartimento aquoso grande, com diâmetro entre 100 nm e 1 µm.
- **Lipossomos gigantes (GVs):** geralmente unilamelares, com diâmetro superior a 1 µm.

O tipo de estrutura obtida depende do processo de preparação. As vesículas unilamelares são os modelos de membrana mais utilizados; a dispersão mecânica dos lipídios em água resulta geralmente em estruturas multilamelares (MLVs) que são difíceis de serem estudadas devido ao tamanho, heterogeneidade e presença de muitos compartimentos internos. Além disso, os lipossomos menores são opsonizados pelos

macrófagos mais lentamente, e em menor quantidade, quando comparados com os maiores, permanecendo mais tempo na circulação e apresentando uma liberação mais prolongada. O processo de transformação destas vesículas multilamelares diretamente em lipossomos unilamelares requer energia e são utilizados os métodos de extrusão a baixas pressões, homogeneização ou sonicação, formando os SUVs e/ou LUVs, estes geralmente mais estáveis. O processo de hidratação do fosfolipídio em uma fase orgânica como etanol ou éter resulta na formação direta de LUVs (SHARMA e SHARMA, 1997; TEJERA-GARCIA *et al.*, 2011).

A escolha do método de preparação também influencia na porcentagem de encapsulação da substância e é um parâmetro importante a ser analisado quando se trata de formulações farmacêuticas. A taxa de encapsulação e a relação fármaco/lipídio devem ser maximizadas já que quanto menor a quantidade de lipídio administrada a um paciente, menores as chances de ocorrência de efeitos colaterais (FRÉZARD *et al.*, 2005).

Vários parâmetros físico-químicos tais como pH, força iônica, fluidez de membrana, tamanho e densidade superficial de carga podem interferir na estabilidade dos lipossomos, na interação dos mesmos com a membrana plasmática e na extensão de incorporação e liberação do fármaco. Portanto, o monitoramento de tais parâmetros é fundamental para a aplicação dos mesmos e para a compreensão dos resultados obtidos em estudos de atividade biológica.

1.8.3. Determinação do diâmetro dos lipossomos

A estabilidade do lipossomo e a capacidade de extravasamento do fármaco diminuem com o aumento do diâmetro do mesmo (LASIC, 1998). Em geral, a influência dos parâmetros fisico-químicos na formação e estabilidade dos lipossomos é monitorada por medidas de tamanho e distribuição homogênea das vesículas (LASIC, 1998). Ressalta-se o fato de que o tamanho compreendido entre 50 e 150 nm é uma faixa que garante a eficiência de incorporação a qual aumenta em função do aumento do diâmetro

lipossomal. Neste trabalho foi empregada a técnica denominada espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering*) na análise do diâmetro das vesículas lipossomais como será comentado a seguir.

1.8.3.1. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

As partículas de uma solução movem-se de acordo com o movimento Browniano que depende do tamanho destas (LASIC, 1998; *Dynamic Light Scattering,* em www.malvern.co.uk). Estas partículas em movimento alteram o comprimento de onda da radiação pelo efeito Doppler e as mudanças qualitativas da reflexão da luz, chamadas de "flutuação" são medidas pelo Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS). Esta técnica permite determinar o tamanho de partículas de 3 nm até micrômetros e a intensidade de luz detectada é relacionada com a velocidade de difusão: partículas maiores se movimentam mais lentamente do que as menores; logo a taxa de flutuação das primeiras é mais lenta. A análise das flutuações permite medir o coeficiente de Difusão (D) que é dependente do tamanho das partículas (d), conforme Descrito pela equação de Stokes-Einstein (**Equação 01**):

$$D = \frac{KT}{3\pi\eta d} \qquad \textbf{(01)}$$

onde K é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta e η é a viscosidade do solvente (*Dynamic Light Scattering,* em www.malvern.co.uk; TEJERA-GARCIA *et al.*, 2011).

1.8.3.2. Potencial zeta

A medida do potencial zeta é uma ferramenta muito útil na detecção da magnitude de interações repulsivas entre as partículas coloidais e é comumente utilizada para avaliar a estabilidade dos colóides (CASALS *et al.,* 2003).

O potencial zeta pode ser definido como a carga existente na fronteira entre a superfície de uma partícula individual e seus íons associados, no plano de cisalhamento **(Figura 10)**. A carga não pode ser medida diretamente, mas pode-se determinar a grandeza da carga elétrica pelas medidas da mobilidade eletroforética das partículas submetidas à aplicação de um determinado campo elétrico (FLORENCE e ATTWOOD, 2003).

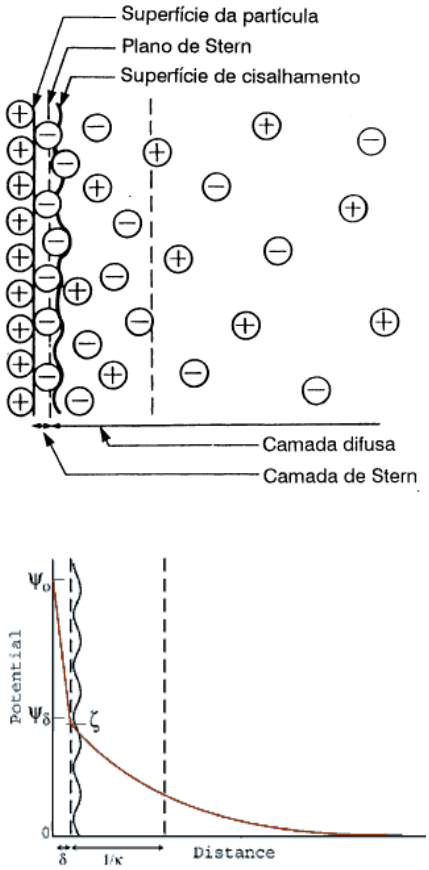


Figura 10. Diagrama representativo do potencial Zeta (ζ). Representação das condições de uma superfície negativa, com uma camada de íons positivos adsorvidos, configurando o plano de Stern. O número de íons negativos aumenta e o número de íons positivos diminui com o aumento da distância da superfície, até o ponto no qual as concentrações iônicas são iguais e o potencial elétrico torna-se zero. Conforme a partícula se move, a superfície efetiva é definida como superfície de cisalhamento, a qual está situada um pouco mais para frente do plano de Stern, dependendo da rugosidade da superfície de macromoléculas adsorvidas, etc. É no plano de cisalhamento que está localizado o potencial Zeta (ζ).

Para a determinação do potencial zeta dos lipossomos foi utilizado um método que consiste na incidência de um feixe de luz e aplicação de um campo elétrico de força conhecida através da amostra. Neste método, as partículas carregadas se deslocam com velocidades distintas induzindo deslocamentos da frequência do feixe de luz incidente, gerando um espectro de frequências.

As frequências são utilizadas para os cálculos de velocidades, as quais são convertidas para valores de mobilidades eletroforéticas. O potencial Zeta das partículas pode, assim, ser determinado através da aplicação da equação de Henry de acordo com a **Equação 02** abaixo, onde U é a mobilidade eletroforética, ε é a constante dielétrica da amostra, *Z* é o potencial zeta, f(Ka) é a função de Henry e η é a viscosidade do solvente.

$$U = \frac{2\varepsilon Z f(ka)}{3\eta} \qquad \textbf{(02)}$$

Nesta equação, a função de Henry, f(Ka), pode ser representada pela aproximação de Huckel, igual a 1, quando o diâmetro da partícula é muito menor que a espessura da dupla camada de cargas ao redor da partícula. Utiliza-se a aproximação de Smoluchowsky, igual a 1,5, quando o diâmetro da partícula é maior que a espessura da dupla camada de cargas (Dynamic Light Scattering, em www.malvern.co.uk).

1.8.4. Aplicações biológicas dos lipossomos

Os estudos sobre a aplicação biológica de lipossomos como carreadores de fármacos relatam uma série de vantagens como relacionado a seguir: **1)** Os fosfolipídios, componentes estruturais dos lipossomos e os principais componentes da membrana celular, são atóxicos; **2)** Os agregados lipossomais formados por esses fosfolipídios podem coalescer com as membranas celulares, possibilitando a liberação do seu conteúdo para dentro da célula; **3)** A substância encapsulada nos lipossomos está protegida da ação de enzimas presentes nos fluídos biológicos e, assim, a encapsulação

previne a degradação do fármaco e **4)** A liberação do fármaco encapsulado em lipossomos ocorre gradualmente, aumentando o seu tempo de ação no organismo (SANTOS e CASTANHO, 2002; LARINOVA, DUCHENE *et al.*, 2008; KELLY *et al*., 2011; WILCZEWSKA *et al*. 2012).

Apesar das vantagens e da ampla aplicação de formulações lipossomais, comercializadas desde os anos 80, para tratamentos de infecções fúngicas sistêmicas e de câncer, problemas de ordem tecnológica e biológica fazem com que os lipossomos sejam, ainda hoje, amplamente estudados visando o desenvolvimento de formulações estáveis no organismo e aplicáveis à terapia de várias doenças (BATISTA, CARVALHO *et al.*, 2007; ZASADZINSKI, *et al.*, 2011).

A busca por formulações estáveis, principalmente quando se trata de um fármaco pouco explorado, como a mangiferina, por exemplo, requer estudos físico-químicos prévios sobre a influência de pH, força iônica, tipo de tampão e aditivos, os quais respondem perguntas sobre a estabilidade e a interação do fármaco com as membranas biológicas, que são ítens fundamentais para as aplicações pretendidas.

Devido à sua versatilidade, atoxicidade e biodegradabilidade, como mencionado acima, o uso de lipossomos como carreadores de fármacos tem sido empregado em estudos relacionados à anestésicos (FRACETO, PINTO *et al.*, 2002; FRACETO e DE PAULA, 2006; BATISTA, CARVALHO *et al.*, 2007), fármacos anti-inflamatórios (MANCONI, MURA *et al.*, 2009), antioxidantes (LANDI-LIBRANDI *et al.*, 2011; CHAUDHURI, BANERJEE *et al.*, 2007) e anti-câncer (XIAO, LUO *et al.*, 2009). No caso específico dos flavonóides, grande parte dos estudos com lipossomos estão focados na atividade antioxidante como relatam vários trabalhos na literatura (LANDI-LIBRANDI *et al.*, 2011; ARORA, NAIR *et al.*, 1998a; b; ALEXOPOULOU, GEORGOPOULOS *et al.*, 2006; GABRIELSKA, SOCZYNSKA-KORDALA *et al.*, 2006; PAWLIKOWSKA-PAWLEGA, GRUSZECKI *et al.*, 2007).

No caso de flavonóides, por exemplo, Movileanu e colaboradores (2000) examinaram o efeito de quercetina sobre as propriedades elétricas de bicamadas lipídicas e observaram que o pH influencia a profundidade de incorporação do fármaco

(MOVILEANU, NEAGOE *et al.*, 2000). Areias e colaboradores avaliaram o grau de partição de flavonóides na membrana e sugeriram que a maior atividade antioxidante observada para estas moléculas naturais depende de sua capacidade para interagir e permear a membrana biológica (AREIAS, REGO *et al.*, 2001). Portanto, para os estudos que visam a aplicação de lipossomos como carreadores de fármacos é fundamental que seja compreendido, previamente, o comportamento de partição e incorporação dos mesmos frente a tais sistemas e em diferentes condições experimentais.

Para a mangiferina, substância natural de interesse neste estudo, não foi publicado até o momento trabalhos que explorem a incorporação deste bioativo em lipossomos e como estes influenciam a inibição da desgranulação em mastócitos, o que justifica um dos objetivos do presente estudo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O presente trabalho visa avaliar o potencial anti-alérgico do extrato Vimang e o sinergismo entre seus componentes (mangiferina, quercetina, catequina, ácido gálico e ácido benzóico) bem como o efeito de lipossomos na bioatividade da mangiferina, o componente majoritário do referido extrato.

2.2. Objetivos específicos

- Estudar o potencial anti-alérgico do extrato Vimang e de seus componentes majoritários e avaliar o efeito sinergístico de tais substâncias no processo de desgranulação dos mastócitos
- Estudar a incorporação do flavonóide mangiferina em vesículas lipossomais formadas por DMPC bem como a estabilidade desses sistemas frente a diferentes parâmetros físico-químicos tais como pH e força iônica.

• Avaliar a influência de colesterol e concentração de lipídio na eficiência de incorporação da mangiferina nos lipossomos de DMPC.

• Avaliar o potencial anti-alérgico da mangiferina livre e incorporada em lipossomos preparados pelo método da injeção etanólica e filme lipídico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

- Substâncias naturais: Foram obtidas da Sigma ou gentilmente doadas pelo Dr. Gilberto Pardo-Andreu (Universidade de Havana - Cuba)

- Anticorpo monoclonal específico para reconhecimento de dinitrofenil (anti-DNP-IgE): foi purificado de fluidos peritoniais de células de ratos por afinidade cromatográfica (HOLOWKA e METZGER, 1982) e filtração a gel (SUBRAMANIAN, HOLOWKA *et al.*, 1996). O anticorpo foi cedido, gentilmente, pelo grupo Baird-Holowka do Department of Chemistry and Chemical Biology - Baker Laboratory - Cornell University -USA.

- DNP-BSA: Soro Albumina Bovina (BSA) conjugada com uma média de 15 grupos de dinitrofenil (DNP), conforme descrito por Weetall e colaboradores (WEETALL, HOLOWKA *et al.*, 1993). Esse antígeno, específico para a ligação com o anticorpo anti-DNP-IgE, foi cedido, também, pelo Grupo Baird-Holowka-Cornell University.

- 4-metil-umbeliferil-N-acetil-β-*D*-glucosamida: Sigma. A solução estoque foi preparada pela solubilização em dimetilsulfóxido (concentração final de 0,12 M) e armazenada a -20 °C. Para cada experimento foi utilizada uma solução recém preparada, na concentração de 1,2 M, em tampão salino (135 mM NaCl, 1,8 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 5,6 mM glicose, 1 mg/mL soro albumina bovina e 20 mM HEPES; pH 7,4).

- Linhagem de células RBL-2H3 de mastócitos de ratos: Foi inicialmente fornecida pelo grupo das Profas. Dras. Maria Célia Jamur e Connie Oliver, FMRP - USP e cultivadas atualmente em nosso laboratório.

- Meio mínimo essencial de cultura (MEM) - CellGro: Foi preparado pela mistura de 800 mL de MEM, suplementado com sal de Eagles, 200 mL de soro fetal bovino, 20 mL de L-glutamina e 1 mL de gentamicina.

O material relacionado foi usado sem tratamento prévio: soro albumina bovina (BSA) 96% (Sigma); soro bovino fetal (Atlanta Bilogicals); L-glutamina (Gibco BRL); gentamicina (Gibco BRL), Triton X-100 (Sigma), EDTA (Gibco), NaCl (Gibco), HEPES (Gibco), KCl (Gibco), Dimiristoil-L-α-Fosfatidilcolina (Sigma) e colesterol (Sigma).

3.2. Métodos

3.2.1. Determinação dos coeficientes de absortividade molar (ε) da mangiferina em meio tamponado

As soluções, em triplicatas, foram preparadas em meio aquoso a partir da solução estoque de 0,80 mM da substância natural (DMSO:água 1:1) com diluições sucessivas, em solução tampão (acetato, fosfato ou Tyrode), variando-se as concentrações de 5,0 a 80 μM.

Em seguida, foram registrados os espectros de absorção e as respectivas absorbâncias no comprimento de onda de 365 nm. Os valores dos coeficientes de absortividade molar médio (ε) da mangiferina foram obtidos através da inclinação de gráficos de absorbância em função da concentração do fármaco.

3.2.2. Preparação dos lipossomos

Como o método de preparação influencia na eficiência de incorporação do fármaco (NEUNERT, POLEWSKI *et al.*, 2010) os lipossomos foram preparados por dois métodos distintos, o método da injeção etanólica e o método de hidratação do filme lipídico.

3.2.2.1. Método da injeção etanólica

Os lipossomos unilamelares de dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC) foram preparados de acordo com o método descrito por De Oliveira e colaboradores (DE OLIVEIRA, MACHADO *et al.*, 2005). A solução estoque, 20 mM da mangiferina, foi preparada em DMSO:água (1:1) e conservada sob refrigeração até o momento de uso. Uma solução etanólica de lipídios (3, 10 e 30 mg/mL) e colesterol (lipidio:colesterol = 1:0, 2:1, 3:1, 5:1 e 9:1) contendo o flavonóide (concentração final de 100 µM), foi injetada por meio de uma seringa de insulina, em 10 mL de solução tampão (acetato, pH 2; fosfato, pH 4,; Tyrode, pH 7,4; e borato, pHs 10 e 12), mantidos em uma proveta, a 30-32 ˚C, sob agitação constante. O excesso de etanol e o flavonóide não incorporado ao lipossomo foram removidos por ultracentrifugação a 4˚C e 40000 rpm, durante 2 horas (Ultracentrífuga da Beckman modelo XL-70); o precipitado foi ressuspendido na solução tampão de interesse até a completa solubilização da mesma (PONS, FORADADA *et al.*, 1993). As soluções lipossomais foram filtradas em filtro Millipore (0**,**22 µm) para produzir lipossomos de diâmetro uniforme (DE OLIVEIRA, MACHADO *et al.*, 2005). A variação da força iônica foi mantida pela adição de NaCl nas concentrações de 10 e 20 mM.

3.2.2.2. Método de hidratação do filme lipídico

Os lipossomos foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico, como descrito por Londoño-Londoño (2010). O lipídio DMPC (30 mg/mL) foi dissolvido em etanol, na presença de colesterol (lipídio:colesterol 9:1), e o flavonóide (100 µM) foi dissolvido também em etanol. As soluções misturadas em diferentes proporções foram secadas sob rotaevaporação para a obtenção de um filme lipídico. A seguir, as amostras foram hidratadas pela adição de tampão de Tyrode (pH 7,4), a 31-32 °C, e agitadas em Vórtex durante 10 min. As amostras foram homogeneizadas em um agitador tipo Turrax (modelo T25-Ika-Werke), tratadas em um Homogeneizador de Alta Pressão (EmulsiFlex-C3 – Avestin) e filtradas em filtro Millipore de 0,45 µm para a obtenção de vesículas unilamelares homogêneas.

3.2.3. Determinação da eficiência de incorporação (EI) da mangiferina em lipossomos preparados pelo método da injeção etanólica e filme lipídico

3.2.3.1. Método da injeção etanólica

Para a determinação da eficiência de incorporação (EI) da mangiferina em lipossomos de DMPC, preparados pelo método da injeção etanólica, foram preparadas duas baterias de soluções: na primeira, a amostra foi ultracentrifugada (UC) e ressuspendida em solução tampão para eliminar o fármaco não incorporado; enquanto na segunda, a amostra não foi ultracentrifugada (sem UC). Os lipossomos contendo a mangiferina foram rompidos pela adição de etanol, na proporção etanol:lipossomo (2:1) e as leituras de absorbância registradas em 365 nm. O mesmo procedimento foi adotado para os lipossomos vazios os quais foram usados como "branco" na determinação da absorbância da mangiferina. A eficiência de incorporação foi calculada de acordo com a **Equação 03,** na qual $[\text{Flavonóide}]_{(UC)}$ é a concentração da mangiferina incorporada no lipossomo obtida após ultracentrifugação (UC); $[\text{Flavonóide}]_{semUC}$ é a concentração total de mangiferina incorporada, ou não, no lipossomo cuja solução não é submetida à ultracentrifugação (sem UC).

$$\text{EI}(\%) = \frac{[\text{Flavonoide}]\text{UC}}{[\text{Flavonoide}]\text{semUC}} \text{ x } 100 \qquad \textbf{(03)}$$

A concentração de mangiferina incorporada nos lipossomos foi calculada de acordo com as seguintes relações:

$$[\text{Flavonóide}](\text{UC}) = \frac{\text{Absorbância (UC)}}{\varepsilon \text{ Mgf}}$$

$$[\text{Flavonóide}](\text{semUC}) = \frac{\text{Absorbância (semUC)}}{\varepsilon \text{ Mgf}}$$

Nas quais Absorbância (UC) e Absorbância (sem UC) são, respectivamente, as absorbâncias da mangiferina obtidas em lipossomos ultracentrifugados (mangiferina incorporada) e não-ultracentrifugados (mangiferina total); ε_{Mgf} é o coeficiente de

absortividade molar da mangiferina obtido na solução tampão de interesse (acetato, fosfato ou Tyrode).

3.2.3.2. Método do filme lipídico

Após a preparação dos lipossomos, uma alíquota de 2 mL foi colocada em um tubo tipo Amicon contendo um dispositivo de filtração centrífuga (**Figura 11**) para centrifugação da solução lipossomal a 4000g durante 40 minutos. Após este processo, como ilustra a **Figura 11**, os lipossomos permaneceram retidos no filtro do tubo e o material que não foi incorporado, ou seja, a mangiferina livre, atravessou o filtro

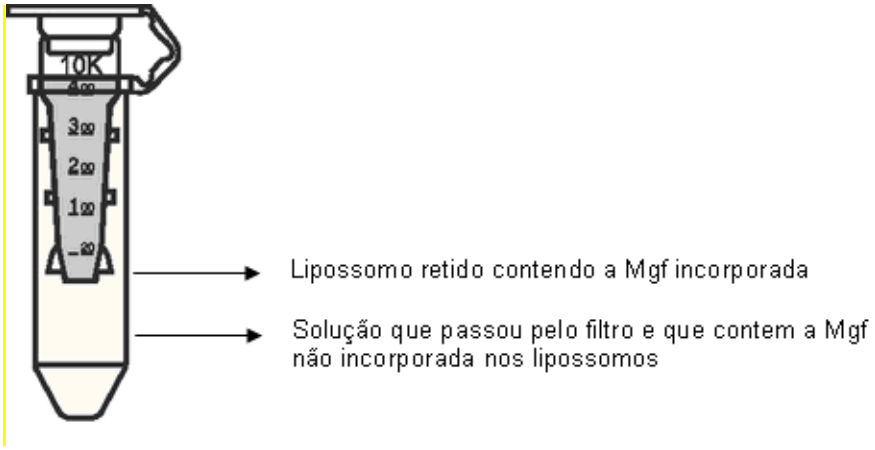


Figura 11. Figura ilustrativa do dispositivo Amicon usado na centrifugação das soluções lipossomais; adaptado de http://www.millipore.com/catalogue/module/c82301.

A eficiência de incorporação (EI) foi determinada através da relação entre a absorbância total da amostra, não submetida à centrifugação, e a absorbância da solução centrifugada a qual passou pelo filtro, como mostra a **Equação 04**.

$$\mathrm{EI}\ (\%) = \left[\left(\frac{A_{total} - A_{centrifugado}}{A_{total}}\right)\right] \times 100 \qquad \textbf{(04)}$$

Na qual, A_{total} é a absorbância total da mangiferina, livre ou incorporada no lipossomo, e $A_{centrifugado}$ é a absorbância da mangiferina livre.

3.2.4. Determinação do tamanho e estabilidade fisico-química dos lipossomos na ausência e presença do flavonóide

O tamanho e a estabilidade dos lipossomos preparados pelo método da injeção etanólica foi determinado em um equipamento Zetasizer Nano - DLS com titulador automático MPT-2 (MPT-2 multi purpose titrator) da Malvern Instruments, locado no Laboratório de Farmacotécnica - FCFRP, sob responsabilidade da Profa. Maria Vitória L. B. Bentley. Para os lipossomos preparados pelo método do filme lipídico, o tamanho e a estabilidade foram monitorados em um equipamento Zetasizer Nano - ZS90 da Malvern Instruments, locado no laboratório de Tecnologia Farmacêutica – FCFRP, sob responsabilidade da Profa. Renata F. V. Lopez. A estabilidade físico-química em função do tempo (0, 24, 48, 72 e 96 hrs) foi monitorada através do diâmetro hidrodinâmico e do potencial de superfície dos agregados lipossomais.

3.2.5. Constantes de ligação (K_b) da mangiferina nos lipossomos de DMPC

A constante de ligação (K_b) da mangiferina nos lipossomos de DMPC:colesterol (9:1) foi determinada por espectroscopia de fluorescência pela titulação de soluções do fármaco em tampão de Tyrode (CHAUDHURI, BASU *et al.*, 2008). Em uma cubeta de fluorescência de quartzo, com caminho óptico de 1 cm, foram pipetados 2,50 mL da solução tampão, no pH 7,4, contendo 50 μM do fármaco. Os espectros de fluorescência foram registrados após cada adição da solução de lipossomo, empregando-se comprimentos de onda de excitação e emissão iguais a 386 nm e 550 nm, respectivamente, e fendas de 5 nm. A constante de ligação foi calculada a partir da inclinação e intersecção de gráficos de $1/\Delta F$ versus 1/[Lipidio], pelo método do duplo-recíproco de acordo com a **Equação 05**:

$$\frac{1}{\Delta F} = \frac{1}{K_b \,.\Delta F_{max}} \text{x} \frac{1}{[\text{Lipidio}]} + \frac{1}{\Delta F_{max}} \qquad \textbf{(05)}$$

Onde $\Delta F = F - F_0$ e $\Delta F_{max} = F_{max} - F_0$; F, F_0 e F_{max} são a fluorescência na presença, na ausência e na concentração de saturação do lipídio, respectivamente.

Além deste parâmetro pode-se determinar, pela mesma técnica, a constante de partição (Kp) dos flavonóides em lipossomos. Kp é a razão entre concentrações de uma substância, em condições de equilíbrio, em um sistema bifásico constituído por uma fase orgânica e uma fase aquosa, ou seja, quanto maior for o seu valor, o fármaco será menos hidrofílico (menos polar). A constante de partição foi calculada a partir da inclinação e intersecção de gráficos de 1/ΔF versus 1/[Lipidio], pelo método do duplo-recíproco de acordo com a **Equação 06**:

$$\frac{1}{\Delta F} = \frac{55{,}6}{K_p.\Delta F_{max}} \text{ x } \frac{1}{[\text{Lipidio}]} + \frac{1}{\Delta F_{max}} \qquad \textbf{(06)}$$

Onde $F = F\text{-}F_0$ e $\Delta F_{max} = F_{max}\text{-}F_0$; F, F_0 e F_{max} são a fluorescência na presença, na ausência e na concentração de saturação do lipidio, respectivamente; 55,6 mol/L é a concentração molar da água e Kp é a constante de partição. Comparando as Equações 05 e 06, é possível simplificá-las pela Equação (**Equação 07**):

$$\text{Kp} = 55{,}6 \text{ x Kb} \qquad \textbf{(07)}$$

3.2.6. Cultura de Células

Os mastócitos da linhagem RBL-2H3 (BARSUMIAN, ISERSKY *et al.*, 1981) foram crescidos em monocamadas, em frascos de cultura de células, com capacidade para 250 mL, em meio mínimo essencial (MEM) suplementado com 15% de soro fetal bovino e 50 μg/mL de gentamicina, a 37 °C e 5% de CO_2, por um período mínimo de 48 h. O sub-cultivo celular foi realizado a cada 2 ou 3 dias, em garrafas de 25 ou 75 cm^3 (Corning Incorp., Corning, NY, EUA) conforme descrito a seguir. As células foram tratadas com 5 mL de tripsina-EDTA, por 5 minutos, a 37 °C, e lavadas com meio de cultura através de centrifugação por 5 min, a 25 °C, e 100 rpm (centrífuga Sorvall Legend, modelo Mach 1.6R). O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em meio de cultura em uma concentração de $1x10^6$ células/mL.

3.2.7. Ensaio direto para a quantificação da β-hexosaminidase

As células sensibilizadas e aderidas em micro placas foram lavadas com tampão de Tyrode e estimuladas por uma série de 150 μL do antígeno seguido pela adição de 150 μL do substrato fluorimétrico para β-hex (2,4 mM) e as microplacas incubadas por 90 minutos, a 37 °C. A liberação espontânea e a liberação total da β-hex, foram determinadas para as células, em tampão (sem antígeno) e com 0,1% de Triton X-100, respectivamente. A atividade de β-hex no sobrenadante foi quantificada por fluorescência em um leitor de fluorescência para micro placas com comprimentos de onda de excitação e emissão iguais a 360 e 450 nm, respectivamente.

Para o teste sobre a atividade biológica dos flavonóides livres ou incorporados nos lipossomos, as células foram sensibilizadas conforme descrito acima, lavadas com tampão de Tyrode e pré-tratadas com diferentes concentrações (0,01 a 100 μM) da mangiferina, quercetina, catequina, ácido gálico e ácido benzóico bem como em diferentes combinações destas substâncias, isoladas do extrato *Vimang,* por 15 minutos, antes do estímulo pelo antígeno. Após esse tempo, o ensaio foi conduzido como descrito acima.

3.2.8. Viabilidade celular

O ensaio foi conduzido utilizando o método modificado de Mosmann (MOSMANN, 1983). As células foram ressuspensas na concentração de 8 x 10^4 células/mL e 250 µL da suspensão celular foi semeada na placa de cultura de 96 poços e incubadas durante toda a noite a 37°C e 5% de CO_2. Após este período, o meio foi removido e a placa foi lavada uma vez com 200 µL de PBS. Nos poços destinados ao branco e ao controle, adicionou-se 200 µL de MEM e nos poços reservados para o controle de morte, colocou-se 200 µL de Triton X-100 (1%) preparado em MEM. Nos demais poços foram acrescentados 200 µL das diluições das substâncias naturais preparadas em MEM em várias concentrações (0,01 a 100 µM). Realizou-se uma nova incubação por 24 h a 37°C e 5% de CO_2. Posteriormente, o meio de cultura foi descartado e 200 µL de MEM foram adicionados nos poços do branco. Nos poços restantes foram colocados 20 µL de

brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) e 180 µL de MEM, seguindo-se incubação por 4 h a 37°C e 5% de CO_2. O sobrenadante foi, então, cuidadosamente removido e o produto insolúvel (cristais de formazan) foi dissolvido em DMSO. Após incubação por 4 h a densidade óptica foi monitorada em 570 nm usando um leitor de microplacas. A densidade óptica dos sais de formazan no controle não tratado serviu como um indicador de 100% de viabilidade celular, permitindo a obtenção dos gráficos de % viabilidade celular *versus* concentração da amostra teste pela **Equação 08**.

$$\% \text{ Viabilidade celular} = \left(\frac{S - B}{C - B}\right) \times 100 \qquad \textbf{(08)}$$

(S) Amostra - célula (+), MTT (+), presença da substância natural;

(B) Branco - célula (+), MTT (-); **(C) Controle** - célula (+), MTT (+).

3.2.9. Análise dos resultados

Os valores para a enzima β-hexosaninidase liberada durante o ensaio biológico foram expressos como a porcentagem da β-hexosaminidase total (**Equação 09**), determinada pelas células destruídas em Triton-X 100.

$$\% \ \beta - Hexosa\,\mathrm{min}idase = \left(\frac{S - N}{T - N}\right) x100 \qquad \textbf{(09)}$$

(S) Amostra: DNP-BSA (+); ausência e presença da substância natural;

(N) Normal: DNP-BSA (-); amostra teste (-), ausência de células;

(T) Total: DNP-BSA (+); amostra teste (-); em Triton-X-100.

A liberação espontânea (controle) de β-hexosaminidase foi medida para eliminar componentes não-específicos da desgranulação. A reação enzimática foi realizada na presença da solução Tyrode/BSA para eliminar as interferências causadas pela fluorescência do mesmo. A contribuição da amostra teste para a liberação espontânea (controle) de β-hex foi medida para eliminar componentes não-específicos da

desgranulação. A reação enzimática foi realizada na presença da solução Tyrode/BSA para eliminar as interferências causadas pela fluorescência do mesmo. A contribuição da amostra teste para a fluorescência foi avaliada e subtraída caso necessário. Os valores de CI_{50} foram determinados de curvas de porcentagem de β-hex versus concentração da amostra testada. Cada teste foi conduzido em triplicata.

3.2.10. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do software GraphPad Prism versão 3.0 para Windows empregando-se a análise de variância (ANOVA ONE-WAY), com pós-testes de Tukey ou Mann-Whitney, conforme indicado nas legendas das figuras. Valores de $p < 0,05$ e $p<0,01$ foram considerados significativos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

PARTE I: INCORPORAÇÃO DA MANGIFERINA EM LIPOSSOMOS DE DIMIRISTOILFOSFATIDILCOLINA (DMPC) PARA APLICAÇÃO EM ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.1. Preparação e caracterização físico-química dos lipossomos de DMPC, preparados pelo método da injeção etanólica, na ausência e presença de mangiferina

A aplicação de lipossomos como sistemas carreadores de fármacos requer a avaliação prévia de parâmetros tais como tamanho das vesículas e eficiência de incorporação, pois estes influenciam diretamente no comportamento dos agregados em meio biológico (LASIC, 1998; LONDOÑO-LONDOÑO *et al.*, 2010, LANDI-LIBRANDI *et al.*, 2011). As técnicas de preparação, pH, força iônica, composição do lipossomo, tipo de lipídio empregado e quantidade do fármaco, respondem pelas propriedades físico-químicas destes agregados, tais como tamanho e carga, os quais influenciam a estabilidade, a eficiência de incorporação e a interação com o meio biológico (VAN DICK

et al., 2000; LONDOÑO-LONDOÑO *et al*., 2010, LANDI-LIBRANDI *et al.*, 2011; LÚCIO *et al*., 2010). Assim, na primeira parte deste trabalho serão apresentados e discutidos os resultados pertinentes aos parâmetros mencionados acima e como estes influenciam a incorporação de mangiferina em lipossomos de DMPC. O monitoramento de tais parâmetros requer a determinação de curvas de calibração e, consequentemente, de eficiências de incorporação, bem como o monitoramento de potenciais zeta e índices de polidispersividade dos agregados para a avaliação da estabilidade e homogeneidade da suspensão lipossomal.

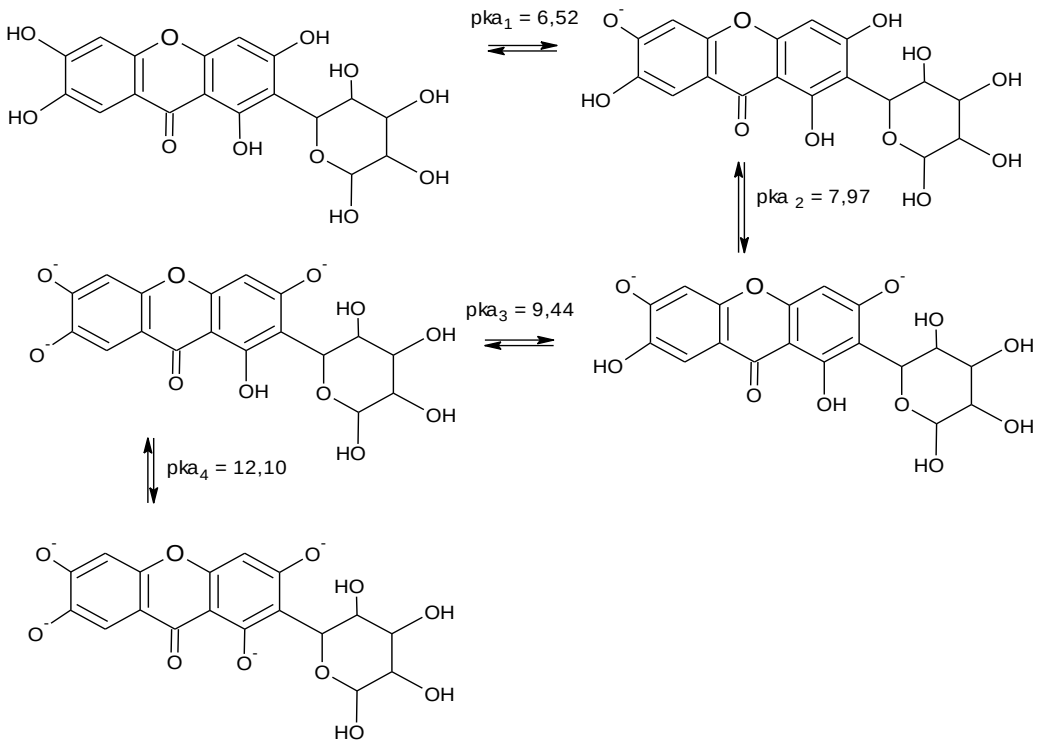
4.1.1. Determinação das curvas de calibração da mangiferina em diferentes pHs.

As curvas de calibração da mangiferina foram determinadas, nos diferentes pHs estudados (pHs 2; 4; 7,4; 10 e 12) com a finalidade de obtenção do coeficiente de absortividade molar (ε) e determinação da concentração de mangiferina incorporada nos lipossomos. As **Figuras 12-A a 16-A** mostram os espectros de absorção bem como as curvas de calibração da mangiferina nos diferentes pHs.

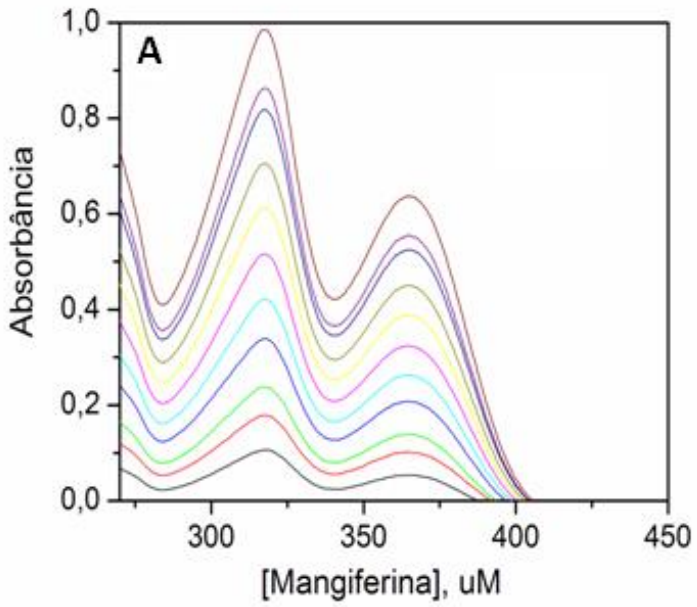
As **Figuras 12-A e 13-A** mostram os espectros de absorção da mangiferina em pHs 2 e 4, respectivamente. A banda em 317 nm, está relacionada à transições do tipo n $\rightarrow \pi^*$ no anel aromático enquanto a banda em 365 nm é atribuída à transferência de carga intramolecular, como descrito por GÓMEZ-ZALETA *et al.*, 2006. Para estes pHs ácidos não há mudança significativa nos espectros de absorção.

Em pH 7,4 observa-se redução da banda em 317 nm e aumento da banda em 365 nm (**Figura 14-A**) ao passo que em pHs 10 e 12, observa-se o aparecimento de um ombro em aproximadamente 340 nm bem como o deslocamento batocrômico da banda de 365 nm para 380 nm (**Figuras 15-A** e **16-A**, respectivamente). Essa mudança no comportamento dos espectros de absorção é explicada pelas diferentes formas assumidas pela mangiferina em função do pH, como mostra o equilíbrio de dissociação no **Esquema 01**.

Para as soluções ácidas empregadas neste estudo, ou seja, nos pHs 2 e 4, a mangiferina está na sua forma neutra, uma vez que o primeiro pka do fármaco é igual a 6,52 (GOLDSBY, 2002; GÓMEZ-ZALETA *et al.*, 2006). Em pH 7,4, a mangiferina está parcialmente na forma monoaniônica (pka_2 = 7,97) com uma carga negativa no carbono 4' e, finalmente, nos pHs 10 e 12 a mesma encontra-se totalmente dissociada (pka_3 = 9,44). As diferentes formas assumidas pela mangiferina, em decorrência da mudança de pH, levam à alterações tanto nos espectros de absorção como nos coeficientes de absortividade molar, cujos valores estão relacionados na **Tabela 01**.



Esquema 01. Estrutura da mangiferina e valores de pka para as constantes de dissociação ácida (GOLDSBY, 2002).



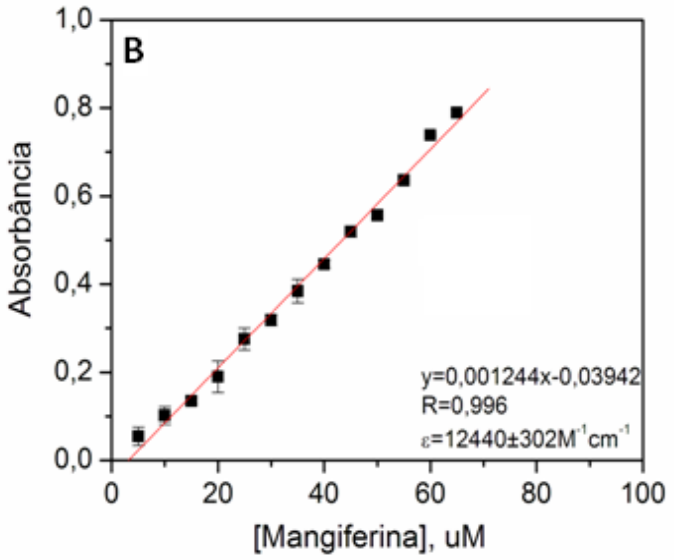


Figura 12. Espectro de absorção **(A)** e curva de calibração **(B)** da mangiferina em tampão acetato, pH 2,0, obtidos de resultados em duplicata. Comprimento de onda de absorção da mangiferina obtido em 365 nm.

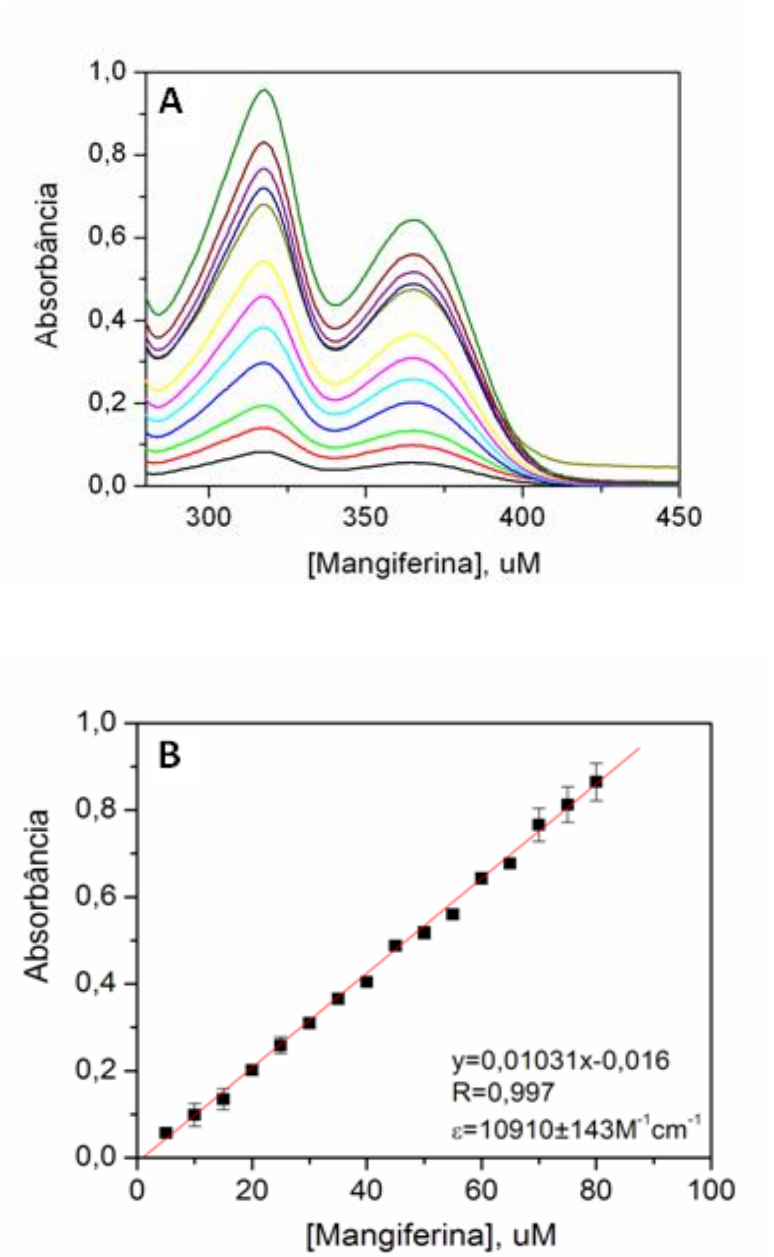
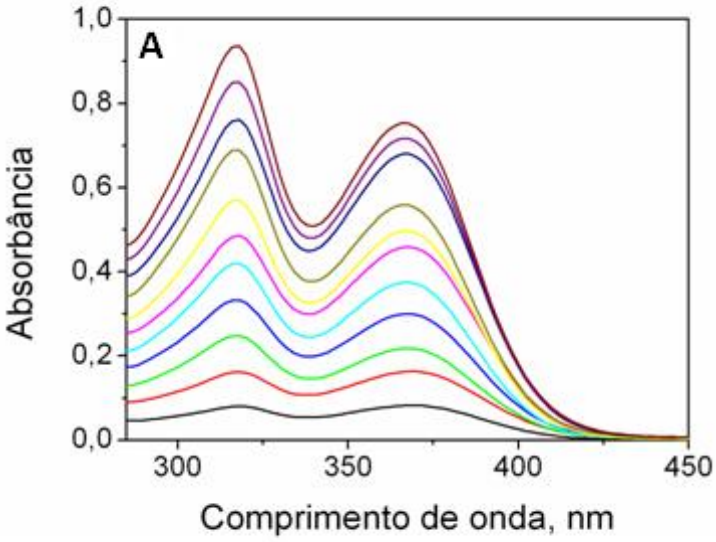


Figura 13. Espectro de absorção **(A)** e curva de calibração **(B)** da mangiferina em tampão fosfato, pH 4,0, obtidos de resultados em duplicata. Comprimento de onda de absorção da mangiferina obtido em 365 nm.



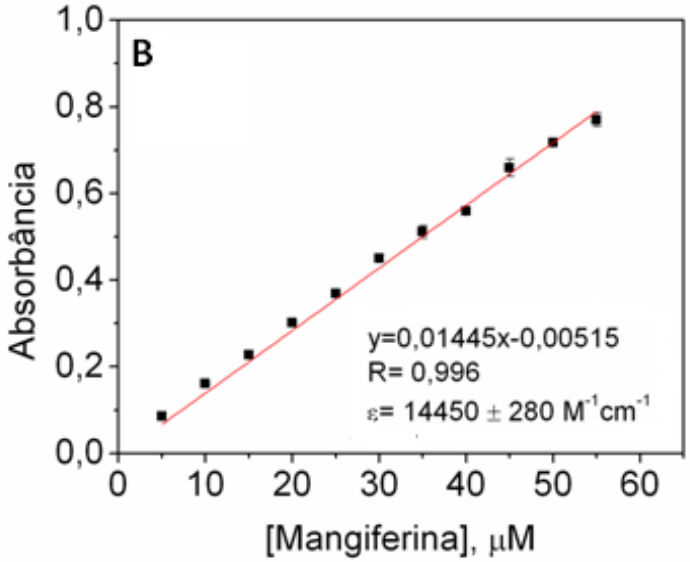


Figura 14. Espectro de absorção **(A)** e curva de calibração **(B)** da mangiferina em tampão de Tyrode, pH 7,4, obtidos de resultados em duplicata. Comprimento de onda de absorção da mangiferina obtido em 365 nm.

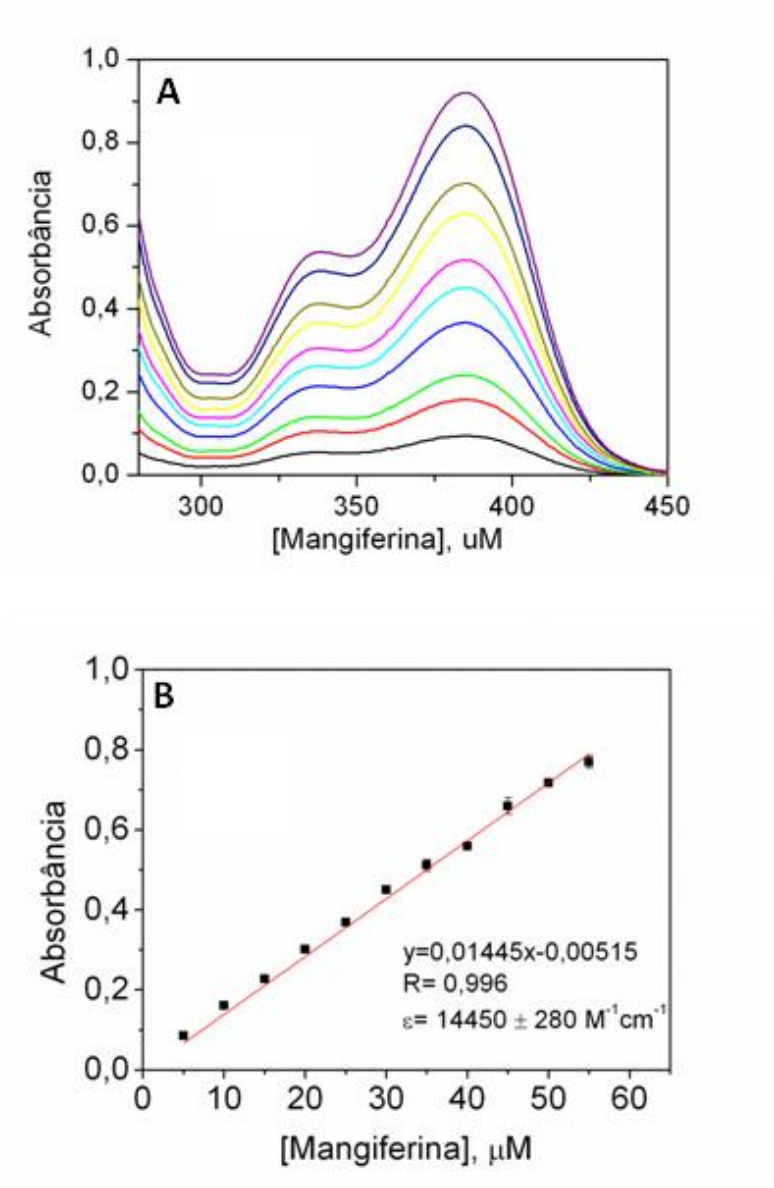


Figura 15. Espectro de absorção **(A)** e curva de calibração **(B)** da mangiferina em tampão borato, pH 10,0, obtidos de resultados em duplicata. Comprimento de onda de absorção da mangiferina obtido em 365 nm.

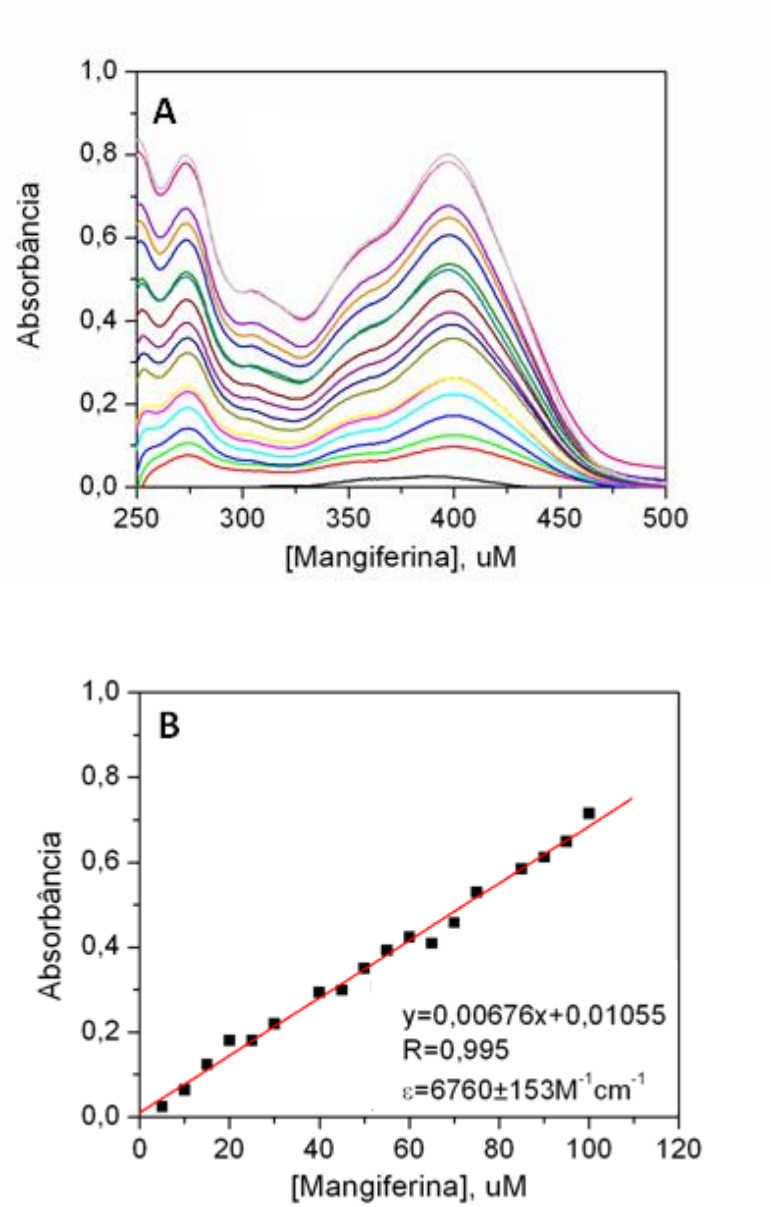


Figura 16. Espectro de absorção **(A)** e curva de calibração **(B)** da mangiferina em tampão borato, pH 12,0, obtidos de resultados em duplicata. Comprimento de onda de absorção da mangiferina obtido em 365 nm.

Tabela 01. Coeficientes de absortividade molar (ε) da mangiferina, em diferentes pHs, obtidos no comprimento de onda de 365 nm, na temperatura ambiente

	$(\varepsilon)_{365}$, $M^{-1}cm^{-1}$
pH 2	12440 ± 302
pH 4	10910 ± 143
pH 7,4	10810 ± 305
pH 10	18480 ± 211
pH 12	6760 ± 153

Os valores dos coeficientes de absortividade molar (ε) da mangiferina variam em função do pH empregado, como mostra a **Tabela 01,** o que justifica a cuidadosa determinação deste parâmetro para a aplicação nos estudos de eficiência de incorporação. Independente do pH, os coeficientes de absortividade molar obtidos para a mangiferina são maiores do que 10^3 $M^{-1}cm^{-1}$, característicos de transições eletrônicas do tipo π-π* (ε π*-π = 1000 a 10000 $M^{-1}cm^{-1}$) (SKOOG e LEARY, 1992)

4.1.2. Eficiências de incorporação (EI) da mangiferina em lipossomos de DMPC, preparados pelo método da injeção etanólica, determinadas nos pHs de interesse

A determinação da eficiência de incorporação de bioativos em lipossomos é fundamental para as aplicações destes agregados nos ensaios biológicos pretendidos. No caso da mangiferina, este parâmetro deve ser cuidadosamente explorado uma vez que não há na literatura nenhum estudo sobre a incorporação deste bioativo em agregados lipossomais.

Embora os ensaios de atividade biológica sejam coduzidos em pH fisiológico, outros pHs, incluindo pHs ácidos, foram investigados com base em três fatores principais: **1)** A mangiferina é um ácido fraco cujo comportamento varia em função do pH, como já mencionado; **2)** Sítios inflamatórios crônicos e tumores de animais glicêmicos tem pHs ácidos (FARR *et al*. 1985; JAHDE e RAJEWSKI, 1982) e **3)** Alguns alimentos tais como cremes de baixo teor de gordura, que podem conter lipossomos, são processados em pHs ácidos (GORDON *et al.,* 1998).

Os métodos empregados na determinação da eficiência de incorporação estão relacionados com a separação do fármaco encapsulado daquele não encapsulado. Os procedimentos adotados para isso incluem cromatografia por exclusão de tamanho (FATOUROS *et al*., 2001), diálise, filtração ou centrifugação (FALLON *et al*., 2006), sendo este último adotado no presente estudo.

Após a preparação da solução lipossomal, esta é dividida em duas partes: a primeira parte não é ultracentrifugada (semUC) e detém a concentração total da mangiferina adicionada à solução e a segunda parte é ultracentrifugada (UC) e contém somente a mangiferina incorporada no lipossomo. Para esta ultima, é desprezado o sobrenadante e o filme ressuspendido na solução tampão de interesse (acetato, fosfato, Tyrode ou borato).

Após a ruptura dos lipossomos (UC e semUC) pela adição de etanol, os espectros de absorção são monitorados e os valores de absorção nos comprimentos de onda de 365 nm são medidos a fim de determinar a eficiência de incorporação. Para o pH 12 não foi possível obter esse parâmetro uma vez que a amostra tornou-se turva pela adição de etanol, e devido à esta ocorrência, o pH 12 foi descartado deste estudo.

As Figuras 17 (A – D) mostram os espectros de absorção dos lipossomos de DMPC, contendo mangiferina, em amostras ultracentrifugadas (UC) e sem ultracentrifugar (semUC), nos pHs 2, 4, 7,4 e 10, respectivamente. Os valores de absorção para as soluções ultracentrifugadas (UC) e sem ultracentrifugar (semUC), medidos nos comprimentos de onda de 365 nm, bem como as respectivas eficiências de

incorporação (EI) da mangiferina em lipossomos de DMPC, estão relacionados na **Tabela 02.**

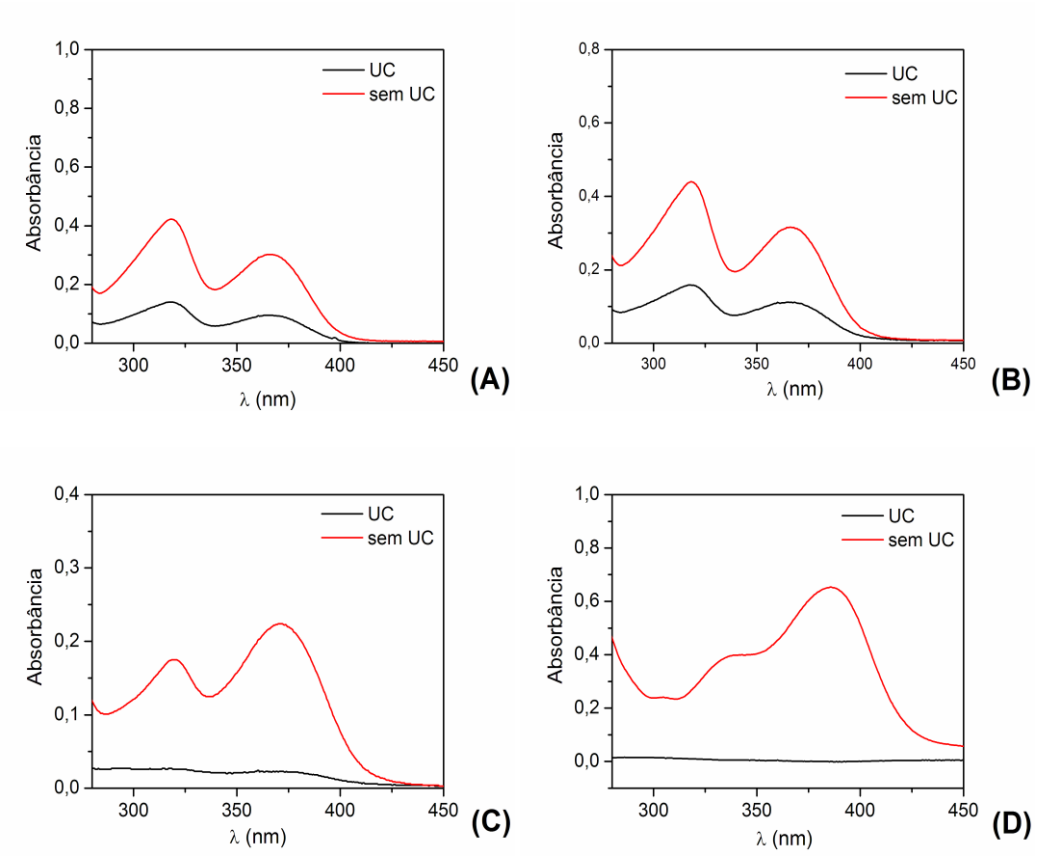


Figura 17. Espectros de absorção da mangiferina em tampão acetato, pH 2,0 **(A),** tampão fosfato, pH 4,0 **(B),** tampão de Tyrode, pH 7,4 **(C)** e tampão borato, pH 10 **(D),** obtidos de resultados em duplicata; pkas da mangiferina: pka_1=6,52; pka_2=7,97; pka_3=9,44; pka_4=12,10.

Tabela 02. Absorbância da mangiferina obtida para soluções centrifugadas (UC) e não centrifugadas (semUC), e eficiência de incorporação (EI) do fármaco nos lipossomos de DMPC, obtidos em diferentes pHs.

	365 nM		EI, %
pH	**semUC**	**UC**	
2	0,302	0,095	**32 ± 2**
4	0,315	0,111	**35 ± 1**
7,4	0,221	0,028	**13 ± 2**
10	0,481	0,006	**1,8 ± 0,5**

Os resultados na **Tabela 02** evidenciam a forte influência do pH na incorporação do bioativo. As maiores eficiências de incorporação foram observadas para as soluções com pHs ácidos (pHs 2 e 4) uma vez que a mangiferina está na forma neutra, mais hidrofóbica, com maior afinidade pelo lipossomo. No pH fisiológico, 76% do fármaco está na forma hidrofílica com maior solubilidade e menor afinidade pela bicamada lipídica. No pH 10, a mangiferina encontra-se totalmente ionizada (pka_3=9,4) o que reduz consideravelmente a afinidade pelo lipossomo em função de sua maior solubilidade. Além disso, conforme aumenta o pH, os íons H^+ vão se dissociando da parte colina das cabeças de grupo do fofosfolipídio (**Figura 18**), em particular do grupo fosfato, e, com isso, em pHs alcalinos, os lipossomos passam a apresentar um potencial de superfície negativo (FALLON *et al.*, 2006). Esse comportamento é observado principalmente em soluções alcalinas com pHs próximos do pka do fosfolipídio (pka = 11,25) e justifica a baixa eficiência de incorporação da mangiferina, pela ocorrência de repulsão eletrostática entre o fármaco dissociado e o lipossomo.

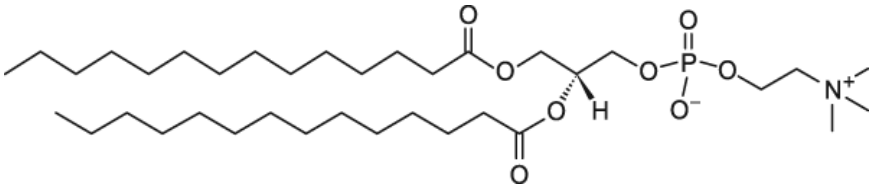


Figura 18. Estrutura do lipídio dimiristoil-L-α-fosfatidilcolina (DMPC).

No entanto, não é apenas a solubilidade que deve ser considerada nos estudos sobre a eficiência de incorporação de fármacos em lipossomos. A conformação do flavonóide tem um papel fundamental na afinidade de um fármaco pela bicamada lipidica e nas perturbações que estes causam na membrana lipossomal.

Van Dick e colaboradores (2000) estudaram a hidrofobicidade relativa e a afinidade de flavonóides por membranas artificiais usando lipossomos como modelo biomimético e observaram, como esperado, que a hidrofobicidade relativa de flavonóides diminui com o aumento da hidroxilação. Comparando a estrutura das **flavonas**, crisina, apigenina e luteolina, com as **flavanonas**, estruturalmente análogas, pinocembrina, naringenina e eridioctiol, na **Figura 19,** é evidente, para ambas as classes, que há redução da hidrofobicidade em função do aumento no número de grupos hidroxila. No entanto, para as flavonas e flavanonas com o mesmo grau de hidroxilação, Van Dick e colaboradores (2000) determinaram que as primeiras são um pouco mais hidrofóbicas do que as ultimas; possivelmente devido às diferenças em suas configurações tridimensionais (VAN DICK *et al*., 2000).

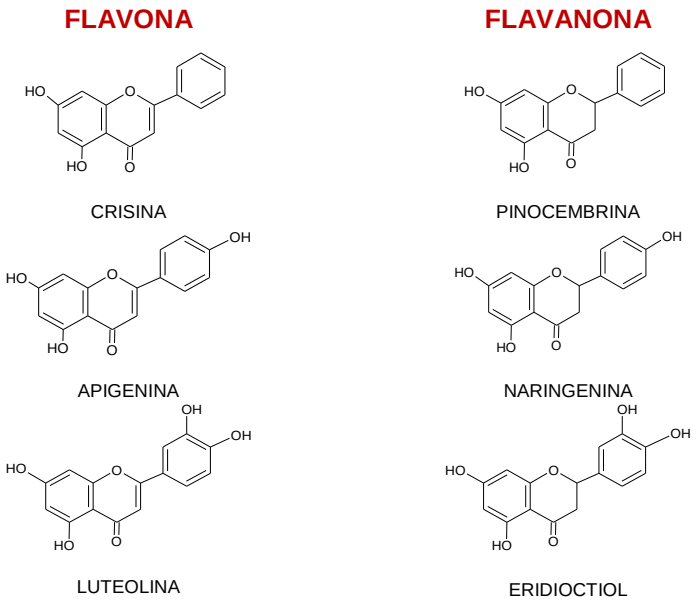
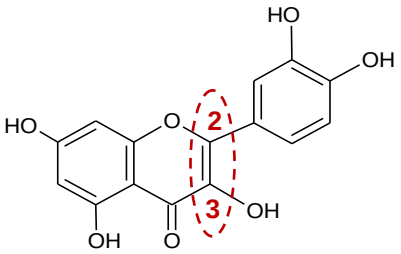
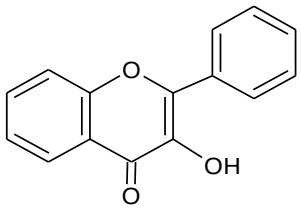


Figura 19. Exemplos de flavonóides das sub-classes flavonas e flavanonas.

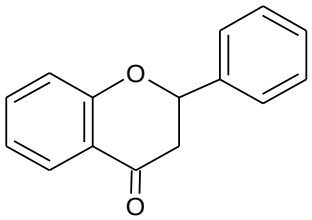
Estudos realizados por Glusker e Rossi (1986) mostraram, por análise de raios-X, que o flavonóide quercetina (**Esquema 02**) é planar, o que explica sua alta afinidade pela membrana biológica (LANDI-LIBRANDI *et al.*, 2011). Em contrapartida a naringenina (**Figura 20**), com estrutura similar à quercetina e carente de dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 (**Esquema 02**), sustenta seu grupo fenil exocíclico extensivamente torcido para fora do plano da molécula. Essa diferença conformacional, associada à influência do pH na dissociação dos grupos hidroxila, pode explicar as diferenças na incorporação dos flavonóides e justificar a baixa eficiência de incorporação da mangiferina, mesmo em pHs ácidos, nos quais a molécula está em sua forma neutra, mais hidrofóbica e menos solúvel. Quando são comparadas flavanonas e flavonóis (**Esquema 03**) observa-se que as flavanonas são mais hidrofóbicas do que os flavonóis. Porém, segundo van Dick e colaboradores (2000), a afinidade dos últimos (mais hidrofílicos) por lipossomos de dioleoil-fosfatidilcolina (DOPC) é substancialmente maior do que a afinidade de flavanonas (mais hidrofóbicas). A diferença nos valores de constantes de dissociação entre os flavonóis e flavanonas (**Esquema 03**) estudados por Van Dick e colaboradores (2000) foi de, pelo menos, uma ordem de grandeza. Portanto, é evidente que a conformação planar dos flavonóis (GLUSKER & ROSSI, 1986) ao contrário da configuração torcida das flavanonas, favorece a intercalação dos primeiros nas estruturas organizadas da membrana lipossomal.



Esquema 02. Quercetina (flavonol)



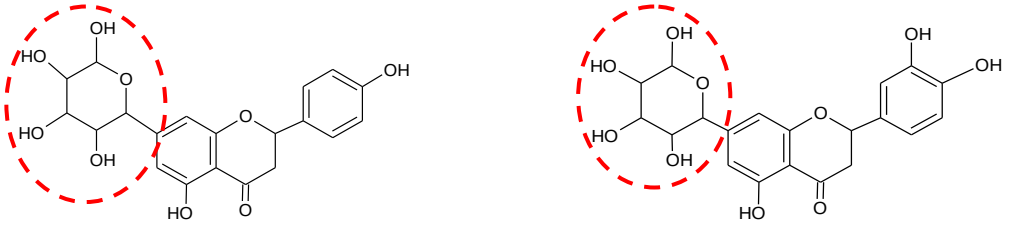
FLANONOL



FLAVANONA

Esquema 03. Esqueleto de flavonóides das sub-classes flavonol e flavanona

A priori, nossa interpretação para a baixa incorporação da mangiferina em lipossomos de DMPC foi em funcão de uma estrutura mais hidrofílica devido à presença de um grupo glicosídico na estrutura da molécula (vide **Esquema 01**). No entanto, para flavonóides tais como naringenina e eriodictiol, a glicosilação (linha tracejada vermelha – **Esquema 04**), resultou em maior afinidade pelo lipossomo quando comparadas às correspondentes agliconas (VAN DICK *et al.*, 2000). Esse resultado foi explicado por um decréscimo na torção entre o anel fenil e o resto da estrutura favorecendo uma conformação mais planar e maior afinidade pela membrana.



Naringenina glicosilada

Eridioctiol glicosilado

Esquema 04. Estrutura glicosilada da naringenina e eridioctiol.

A estrutura química dos flavonóides, de um modo geral, sugere afinidade por ambientes de baixa polaridade, como lipossomos, uma vez que estes compostos naturais possuem caráter anfifílico com uma porção aromática (hidrofóbica) e a presença de grupos hidroxila os quais conferem afinidade por ambientes polares. Estudos recentes mostraram que o aumento no pH favorece o caráter hidrofílico dos flavonóides e sugerem a interação destes com a interface da membrana (OTEIZA *et al.*, 2005; OLLILA *et al.*, 2002; PAWLIKOWSKA-PAWLEGA *et al.*, 2007).

No caso da mangiferina, sua baixa solubilidade em água, bem como a alta constante de incorporação em ciclodextrinas, investigadas em nosso grupo, corrobora com a hipótese de que a baixa eficiência de incorporação em lipossomos se deve, provavelmente, à sua forma conformacional a qual dificulta a intercalação em membranas fosfolipídicas de DPMC ou, ainda, à dificuldade de incorporação em função do pequeno tamanho dos lipossomos preparados pelo método da injeção etanólica.

O equilíbrio de desprotonação da mangiferina ilustrado no **Esquema 01** pode, também, explicar a baixa eficiência de incorporação deste bioativo em lipossomos de DMPC. Em soluções de pHs ácidos, abaixo do primeiro pka (pka_1= 6,52), espera-se que a porção xantona da mangiferina, mais hidrofóbica, esteja intercalada na bicamada lipídica com o grupo glicosídico exposto para a fase aquosa. Em solução de pH fisiológico, próximo do segundo pka (pka_2=7,97), a maior parte das moléculas estão na forma aniônica com uma carga negativa no carbono 4' o que dificulta a intercalação nos lipossomos. Quando se trata da incorporação de fármacos nas formas hidrofílicas espera-se que estes estejam incorporados no compartimento aquoso destes agregados ou associados à região da cabeça de grupo da bicamada, como já mencionado, um evento infuenciado pela forma de preparação e tamanho lipossomal (LASIC, 1998, FRÉZARD *et al.*, 2005; BARENHOLZ**,** *et al*., 2011).

Como um dos objetivos deste estudo é melhorar a solubilidade e biodisponibilidade da mangiferina em ensaios de atividade anti-alérgica, é fundamental que haja um esforço no sentido de otimizar o sistema lipossomal idealizado para esse fim.

É importante ressaltar, como já mencionado, que a mangiferina é um flavonóide com várias propriedades biológicas, entre elas as atividades antioxidante, anti-inflamatória, anti-diabética, antimicrobial e antitumoral (WAUTHOZ *et al*., 2007) as quais estão, certamente, relacionadas com a sua capacidade de interagir com a membrana biológica, seja na forma glicosilada (presença do glicosídeo) ou aglicona (ausência do glicosídeo). Assim, é provável que modificações na composição da bicamada lipídica, tais como inserção de colesterol ou lipídios iônicos, possa favorecer o processo de incorporação do fármaco em função de modificações no empacotamento dos fosfolipídios (HALLING *et al*., 2008; CASTELLI *et al*.,1991). No caso do colesterol, por exemplo, este possui a propriedade de perturbar a membrana biológica formando espaços entre as cadeias lipidicas de forma a permitir uma melhor acomodação de moléculas tais como os flavonóides (LANDI-LIBRANDI *et al.*, 2011); e tal perturbação depende do tipo de colesterol empregado (HALLING *et al.*, 2008).

Estudos realizados com a quercetina mostraram que a incorporação deste fármaco diminui a temperatura de transição de fases (T_m) de lipossomos de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e aumenta a T_m de lipossomos de fosfatidilcolina (PC) o que corrobora com o fato de que os lipídios interagem de forma diferente com o bioativo (PAWLIKOWSKA-PAWLEGA *et al*., 2007).

Além da composição lipídica, outros fatores podem influenciar a incorporação de fármacos em lipossomos; entre eles pode-se citar o método de preparação, o qual pode levar à formação de lipossomos unilamelares ou multilamelares de diferentes tamanhos (FALLON *et al*., 2006; LANDI-LIBRANDI *et al*., 2011), e a proporção fármaco:lipídio a qual pode influenciar a formação e a estabilidade da bicamada (GILLET *et al*., 2009). Como a eficiência de incorporação da mangiferina em lipossomos de DMPC propostos para este estudo foi baixa, outras alternativas tais como inserção de colesterol na preparação do lipossomo e variação na proporção fármaco:lipídio foram igualmente estudadas.

4.1.2.1. Influência de colesterol na eficiência de incorporação da mangiferina em lipossomos de DMPC preparados pelo método da injeção etanólica

A membrana plasmática é constituída por uma dupla camada lipídica e proteínas, além da presença de moléculas de colesterol. Por possuir características lipofílicas, o colesterol (**Figura 20**) orienta-se na bicamada lipidica entre as moléculas de fosfolipídio mantendo o grupo hidroxila dirigido para a fase aquosa e o anel tricíclico incorporado entre os carbonos das cadeias alquílicas, resultando em um efeito de empacotamento de moléculas na bicamada (HATTORI *et al*., 2005; SULKOWSKI *et al*., 2006). Além disso, o colesterol pode afetar a fluidez da membrana lipídica de duas formas; na fase líquido-cristalina, ele causa redução na mobilidade das cadeias hidrocarbônicas dos fosfolipídios levando à rigidez da bicamada. Em contrapartida, na fase gel, mais rígida, ele causa aumento da mobilidade dos lipídios com consequente alteração na temperatura de transição de fases e aumento na fluidez da membrana. Por esse motivo, esse esteróide tem sido amplamente empregado na preparação de lipossomos visando

melhorar as características de incorporação e a estabilidade da bicamada (SULKOWSKI *et al*. 2006; LEHNINGHER *et al*., 2000).

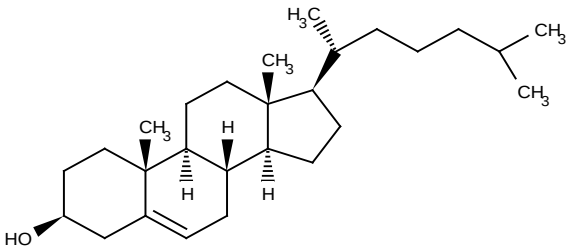


Figura 20. Estrutura química do colesterol

Assim, neste estudo, foram preparados lipossomos de DMPC:colesterol a fim de analisar a influência deste último na eficiência de incorporação da mangiferina. Foram determinadas a eficiência de incorporação da mangiferina em diferentes proporções de DMPC:colesterol (1:0, 1:1, 2:1, 3:1, 5:1 e 9:1) de acordo com o método descrito no **ítem 3.2.1.1.**

A **Figura 21** mostra os espectros de absorção dos lipossomos contendo a mangiferina, em diversas proporções de DMPC:colesterol, preparados em tampão de Tyrode, pH 7,4. Os valores de eficiência de incorporação dos fármacos incorporados em lipossomos, nas diferentes concentrações de colesterol, estão relacionados na **Tabela 03**.

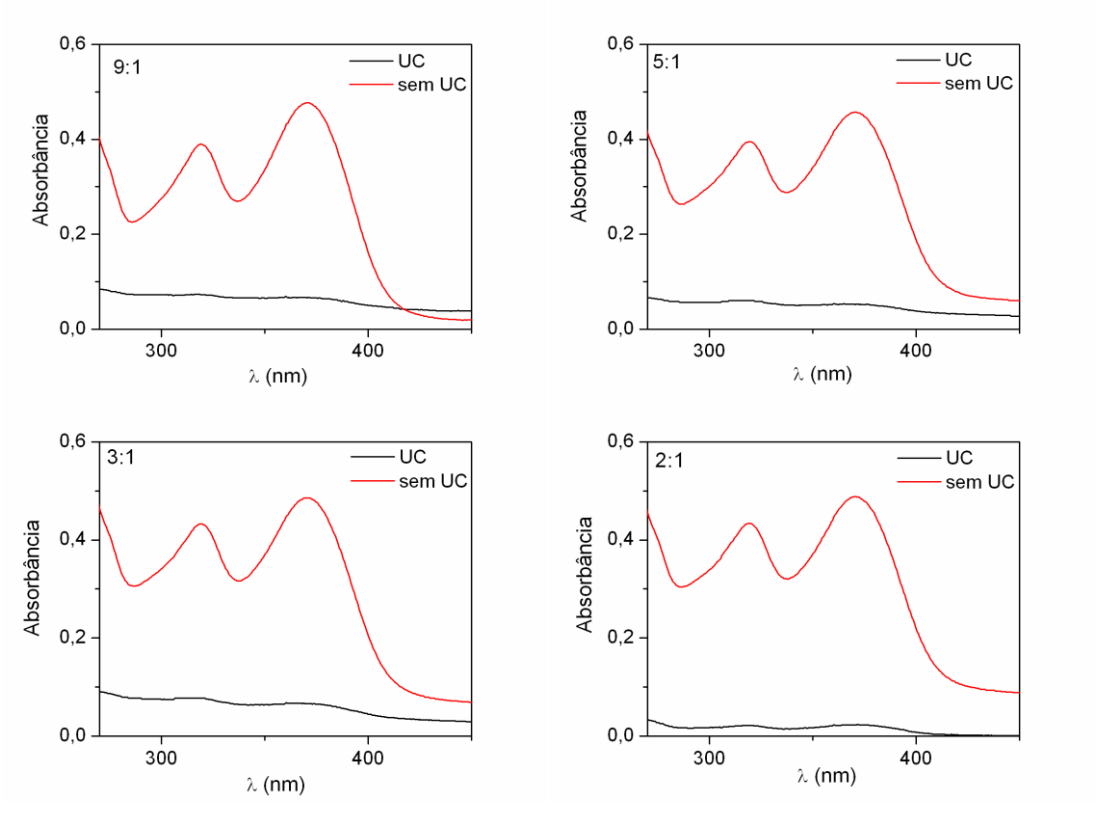


Figura 21. Espectros de absorção da mangiferina em lipossomos preparados por diferentes proporções de DMPC:colesterol, em tampão de Tyrode, pH 7,4. Soluções lipossomais sem ultracentrifugar (sem UC) e ultracentrifugadas (UC) são representadas pelas linhas vermelhas e pretas, respectivamente.

Tabela 03. Absorbância da mangiferina obtida para soluções centrifugadas (UC) e sem ultracentrifugar (sem UC) e eficiência de incorporação (EI) do fármaco em lipossomos de DMPC:colesterol preparados em tampão de Tyrode, pH 7,4.

DMPC:col	365 nM		EI, %
	UC	Sem UC	
1:0	0,023	0,216	**13 ± 2**
2:1	0,023	0,475	**5 ± 1**
3:1	0,067	0,473	**16 ± 2**
5:1	0,054	0,444	**12 ± 2**
9:1	0,067	0,462	**17 ± 2**

Os resultados na **Tabela 03** mostram que a eficiência de incorporação da mangiferina diminui com o aumento da proporção de colesterol. Este resultado pode estar ocorrendo em função de uma competição entre o flavonóide e o colesterol no arranjo das moléculas durante a formação da vesícula lipossomal, dificultando assim a incorporação do flavonóide no lipossomo. Além disso, o colesterol pode ter um comportamento inverso ao esperado, ou seja, em maior proporção pode aumentar a rigidez da membrana lipossomal na fase cristalina e com isso dificultar a incorporação do fármaco. Resultados semelhantes foram obtidos quando propanolol, um fármaco lipofílico, e nistatina, um antibiótico anfipático, foram incorporados respectivamente em lipossomos preparados de DMPC:colesterol e DPPC:colesterol (BETAGERI e PARSONS, 1992; MORIBE *et al.*, 1999).

Quando são comparadas as eficiências de incorporação da mangiferina em lipossomos contendo apenas DMPC (EI = 13 %) com lipossomos contendo DMPC:colesterol 9:1 (EI = 17 %) observa-se que em lipossomos contendo baixa proporção de colesterol (9:1) a eficiência de incorporação é um pouco maior sugerindo, para este caso, aumento da fluidez lipossomal e influência positiva do colesterol na incorporação da mangiferina em lipossomos de DMPC.

4.1.2.2. Influência da proporção fármaco:lipídio na eficiência de incorporação da mangiferina em lipossomos de DMPC, preparados pelo método da injeção etanólica.

A proporção fármaco:lipídio tem sido investigada para diferentes fármacos e composições lipídicas tendo em vista a importância desse parâmetro não somente para o desenvolvimento de uma formulação farmacêutica mas também para a otimização da eficiência de incorporação e conhecimento sobre o comportamento lipossomal (FRÉZARD *et al*., 2005; JOHNSTON *et al*., 2008). Segundo Frézard (2005) a relação fármaco:lipídio dever ser maximizada, visto que esta determina a quantidade de lipídio a ser ministrada ao paciente; quanto menor for a quantidade de lipídio veiculada, menores serão os riscos decorrentes de efeitos colaterais associados aos mesmos (FRÉZARD *et al*., 2005). Johnston e colaboradores (2008) avaliaram a influência da razão fármaco:lipídio na integridade de lipossomos de DSPC:colesterol e nas propriedades de liberação de doxorubicina. Foram observadas distorções morfológicas das vesículas e redução na eficiência de incorporação do fármaco com o aumento da razão fármaco:lipídio (JOHNSTON *et al.*, 2008).

Neste estudo, a razão fármaco:lipídio foi avaliada em pH ácido (pH 2) por ser o pH com maior eficiência de incorporação da mangiferina em lipossomos de DMPC preparados pelo método da injeção etanólica. Os resultados na **Tabela 04** mostram que a eficiência de incorporação diminui com a redução da mangiferina na composição lipídica; assim, os estudos subsequentes, realizados em tampão fisiológico, foram conduzidos utilizando a maior proporção mangiferina:DMPC (25:100). As propriedades físico-químicas dos lipossomos nas diferentes proporções mangiferina:DMPC não foram investigadas nesta etapa.

Tabela 04. Absorbâncias obtidas para a mangiferina em soluções centrifugadas (UC) e sem ultracentrifugar (semUC), e eficiência de incorporação (EI) do flavonóide em lipossomos de DMPC preparados em diferentes proporções fármaco:lípidio, em tampão acetato, pH 2.

pH 2	365 nM		
Razão fármaco:lipídio	**UC**	**semUC**	**EI, %**
25:100	0,095	0,302	**32**
7:100	0,022	0,278	**8**
2,5:100	0,011	0,265	**3**

4.2. Determinação do coeficiente de partição (log*P*) da mangiferina em lipossomos de DMPC:colesterol (9:1), preparados pelo método da injeção etanólica

Os efeitos biológicos de um fármaco, in vivo, dependem de sua absorção e distribuição para os tecidos via circulação sistêmica. Na ausência de sistemas de transporte ativo, o fármaco deve difundir passivamente através das membranas biológicas, não somente para absorção no intestino, mas também para entrar nas células e tecidos da circulação sistêmica (ROTWELL *et al*., 2005).

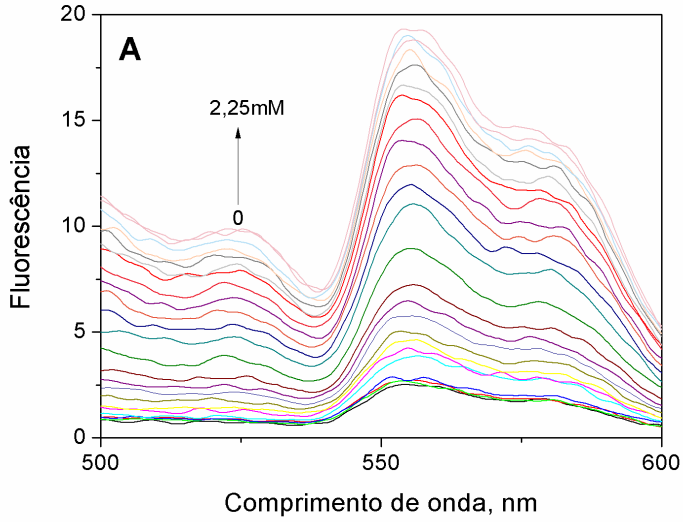
O transporte e distribuição de fármacos através de membranas biológicas depende substancialmente de sua lipofilicidade a qual pode ser expressa pelo coeficiente de partição (log*P*), um parâmetro que relaciona a partição de um soluto entre as fases polar e apolar.

O coeficiente de partição é usualmente medido pela distribuição de um bioativo em um sistema bifásico, tal como octanol-água, o qual simula respectivamente a membrana e a fase aquosa. No entanto, vários estudos de fármacos tem demonstrado que sistemas lipossomo-água são modelos mais apropriados para predizer o log *P* de compostos, uma vez que os lipossomos mimetizam o núcleo hidrofóbico e a superfície polar carregada de fosfolipídios presentes em biomembranas (SEYDEL e WISE, 2002; FERREIRA *et al*., 2003). Somente moléculas de lipofilicidade apropriada podem difundir-se através da

membrana fosfolipídica; aquelas muito hidrofílicas estão indisponíveis para o interior celular e aquelas muito hidrofóbicas são incapazes de reagir em meio aquoso. Portanto, a bioatividade de compostos, naturais ou sintéticos, depende do balanço entre hidrofobicidade e hidrofilicidade determinado pelo coeficiente de partição (BRITTES *et al*., 2010; LIAO *et al.,* 2000; SANTOS e*t al.,* 2003). Assim, estudos que visam a interação de compostos com modelos de membrana biológica, ou a aplicação de tais sistemas, requerem a determinação de constantes de ligação (K_b) e coeficientes de partição (log*P*).

Uma série de trabalhos sobre técnicas de determinação de coeficientes de partição tem sido descritos com ênfase em problemas toxicológicos, farmacêuticos, alimentares e ambientais (SANTOS *et al.,* 2003). Entre as técnicas utilizadas, a espectroscopia de fluorescência está entre as mais sensíveis sendo que concentrações muito baixas de soluto podem ser empregadas, levando a pequenas perturbações na membrana.

Neste trabalho, uma análise quantitativa da associação da mangiferina aos lipossomos pôde ser feita através da determinação de constantes de ligação (Kb) e de partição (Kp) do fármaco aos lipossomos de DMPC. Esta análise foi viabilizada pela fluorescência da mangiferina cujo comportamento varia em função de sua associação com as bicamadas lipídicas. A **Figura 22** mostra os espectros de emissão de fluorescência da mangiferina em lipossomos de DMPC:colesterol (9:1) preparados em tampão de Tyrode, pelo método da injeção etanólica. Foi observado um aumento considerável da fluorescência, com um pequeno deslocamento para o vermelho, conforme foi aumentada a concentração de lipossomos. Este aumento de fluorescência, acompanhado de um deslocamento batocrômico, caracteriza mudança de polaridade do meio no qual o fármaco se encontra associado, mostrando a associação do mesmo com os agregados lipossomais (LAKOWICZ, 2006).



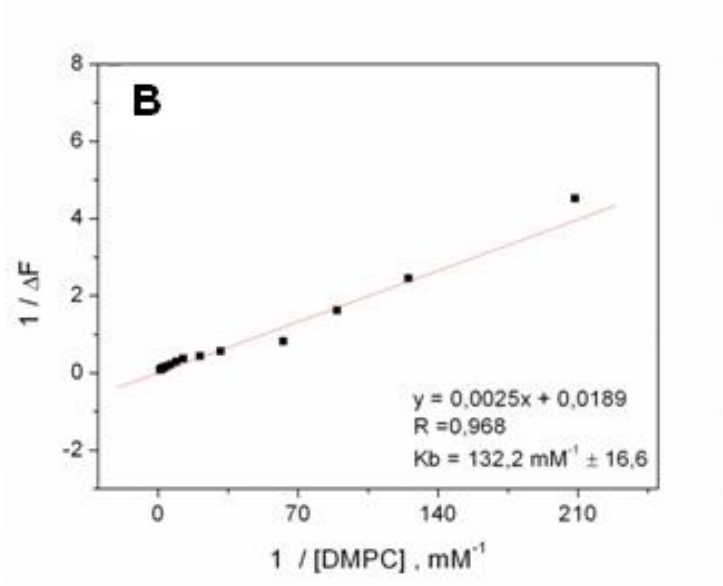


Figura 22. (A) Espectro de fluorescência da mangiferina em diferentes concentrações (0 a 0,33 M) de lipossomos de DMPC:colesterol (9:1), preparados em tampão de Tyrode; **(B)** Gráfico de 1/ΔF versus 1/[DMPC] para a mangiferina em soluções de DMPC:colesterol (9:1). A regressão linear em altas concentrações de lipossomos permite a determinação da constante de ligação (Kb) e de partição (Kp).

Os valores das constantes de ligação (Kb) e de partição (Kp) foram determinados através do método do duplo recíproco de acordo com as **Equações 05, 06** e 0**7** (SANTOS *et al.,* 2003). O valor de K_b obtido para a mangiferina foi igual a 132 mM^{-1}; porém, não existe nenhum dado na literatura, para a mangiferina incorporada em lipossomos, que possa ser usado como referência neste trabalho. A partir do valor de K_b (132 M^{-1}), foi obtido o valor de K_P igual a 7,34 e finalmente o valor do log *P* igual a 0,86, sendo este ultimo consistente com resultados obtidos por Rothwell e colaboradores (2005) os quais determinaram, para flavonóides glicosilados, valores de log *P* na faixa de 0,32 a 0,98. Segundo estudo realizado por esses autores, os valores de log *P* para genisteína, quercetina e daidzeína, respectivamente iguais a 3,04, 1,82 e 2,51 foram reduzidos para 0,97, 0,76 e 0,32, respectivamente, quando monoglicosídeos foram introduzidos em suas moléculas (ROTHWELL *et al.*, 2005). Constatou-se que as forças intramoleculares que dão origem à hidrofobicidade conferida pela adição de um glicosídeo são mais influentes no log *P* do que aquelas criadas por grupos OH substituídos nos anéis do flavonóide. A contribuição de um flavonóide aglicona para o log *P* torna-se insignificante quando ligado à uma glicose. Por exemplo, como citado acima, quercetina-3-glicosídeo e genisteína-7-glicosídeo possuem valores de log *P* similares (0,76 e 0,97) apesar de uma grande diferença entre as respectivas agliconas quercetina e genisteína (1,82 e 2,51).

A capacidade de um flavonóide difundir através da membrana plasmática não pode se considerada similar para todos os flavonóies dadas as variações em suas estruturas e propriedades físico-químicas. No entanto, valores muito baixos para o log *P* obtidos para os diferentes glicosídeos estudados por Rothwell e colaboradores (2005), bem como o baixo valor obtido para a mangiferina em nossos estudos, evidenciam a dificuldade destes compostos em serem absorvidos pelo intestino via difusão passiva. Estudos recentes sugerem que glicosídeos ingeridos não são encontrados dentro de células epiteliais do intestino (DAY, GEE *et al*., 2003) ou no plasma de sangue humano (SESINK, O'LEARY, *et al.*, 2001) e que a hidrólise é um pré-requisito para a difusão. Os glicosídeos ingeridos devem sofrer hidrólise enzimática pelas lactases e β-

hexosaminidases no trato gastorintestinal, clivando a ligação glicosídica e liberando a aglicona para difundir-se passivamente através da membrana celular (DAY, CANADA, *et al*., 2000). Portanto, espera-se que a mangiferina, com baixo log *P* (igual a 0,86), não tenha habilidade para atravessar a membrana biológica. É provável que esse flavonóide seja carreado pelo lipossomo, associado à interface apolar-polar, e que sua ação no sítio alvo seja dependente de hidrólise prévia.

4.3. Estudo da estabilidade dos lipossomos preparados pelo método da injeção etanólica: determinação do Potencial Zeta (ζ), tamanho de partícula e Índice de polidispersividade.

4.3.1. Influência do pH

A estabilidade dos lipossomos de DMPC empregados neste estudo, foi avaliada em função do tempo (máximo de uma semana) através de medidas do potencial zeta, tamanho de partícula e índice de polidispersividade. Os resultados na **Tabelas 05** mostram agregados lipossomais polidispersos com índice de polidispersividade (PdI) maiores do que 0,3. Em função desse comportamento polidisperso, os valores de tamanho lipossomal foram representados como a média de duas populações diferentes (vide picos 1 e 2). Nota-se que os lipossomos maiores são aqueles que aparecem em maior porcentagem com valores que ultrapassam 70 % (maioria no pico 1). Nossos dados mostram que, em pH 2 e ausência de mangiferina, os lipossomos são estáveis até o terceiro dia de preparação, a partir do qual aumentam de tamanho caracterizando um processo de agregação e, portanto, baixa estabilidade. Na presença da mangiferina, os lipossomo aumentam um pouco de tamanho em relação aos lipossomos vazios, o que sugere alguma influência do flavonóide nas características estruturais da bicamada lipídica. Nota-se que a porcentagem das populações dos picos 1 e 2 se mantem praticamente constantes quando comparados lipossomos vazios e contendo a mangiferina. No entanto para lipossomos contendo a mangiferina, após 96 hs de

preparação, observa-se a formação de agregados maiores, da ordem de micrometros (µm), sugerindo que a mangiferina, neste pH, diminui a estabilidade dos lipossomos e favorece o processo de agregação dos mesmos.

Os resultados em pH 4 são semelhantes àqueles observados em pH 2. No entanto, não foi observado aumento de agregação após 96 hs de preparação o que sugere maior estabilidade em relação ao pH 2. Ressalta-se , ainda, o fato de que não houve um aumento significativo de tamanho do lipossomo para a mangiferina incorporada, o que sugere menor interação da mangiferina com o lipossomo. Esse comportamento foi surpreendente pois no pH 4, assim como no pH 2, a mangiferina está na sua forma neutra e esperávamos um comportamento semelhante entre ambos.

Em pH fisiológico, pH 7,4, praticamente não há variação no tamanho do lipossomo. Nota-se, nesse caso, que os lipossomos vazios aumentam de tamanho após 96 hs de preparação como observado para os pHs 2 e 4; no entanto, na presença de mangiferina o aumento de tamanho começa a se manifestar após 72 hs de preparação e atinge um valor da ordem de µm após 96 hs. Esse resultado reforça a hipótese de que a mangiferina interage com os lipossomos e perturba a bicamada lipídica, levando à um processo de agregação das vesículas lipossomais.

Estudos de espectroscopia de fluorescência mostraram que moléculas de flavonóides interagem com os lipossomos e se localizam na região hidrofóbica ou na interface polar da membrana dependendo dos grupos hidroxila e das ligações de hidrogênio (KLYNENCKO *et al.*, 2008). Tais interações perturbam a bicamada lipídica em proporções que dependem de vários fatores, tais como a estrutura do flavonóide, tipo de lipídio, força iônica, presença de aditivos, entre outros.

Saija e colaboradores (1995) mostraram que o flavonóide quercetina perturba a membrana e altera a temperatura de transição de fases de lipossomos de DPPC; por outro lado, a rutina, que é o glicosídeo correspondente, não causa nenhuma mudança mensurável na transição de fases desse lipídio. Lehtonen e colaboradores (1996) mostraram, por turbidimetria, que o flavonóide daidzeina induz a agregação de lipossomos e esse efeito depende do tipo de lipídio usado na preparação dos lipossomos

(LEHTONEN, *et al*., 1996). Segundo esses autores, a agregação é causada pela diminuição na hidratação da superfície da membrana, pela presença do flavonóide. Essa observação nos leva a supor que um comportamento semelhante pode estar ocorrendo no caso da mangiferina cuja interação com o lipossomo, em pH 7,4, deve ocorrer na região da cabeça de grupo do lipídio. No entanto, a constatação dessas suposiçõs depende de experimentos baseados em técnicas tais como EPR (elétron spin ressonância), supressão de fluorescência ou polarização de fluorescência as quais fornecem suporte para a interpretação do efeito de fármacos sobre a fluidez e ordem da membrana lipidica, bem como sua localização.

Em pHs alcalinos, iguais a 10 e 12, os lipossomos são estáveis durante o período de 96 hs; mas, em contrapartida, não interagem com a mangiferina e porisso não foram mostrados. Para todos os pHs estudados, foi observado que, até o terceiro dia de preparação não há descaracterização dos lipossomos cujos tamanhos se mantem entre 200 a 1000 nm, ou seja, na faixa de tamanho de LUVs.

Tabela 05. Tamanho de partícula e Índice de polidispersividade (PdI) de lipossomos de DMPC preparados na ausência e presença de mangiferina (Mgf) em pHs 2, 4 e 7,4.

pH 2	PdI DMPC	Tamanho DMPC	PICO 1	%PICO 1	PICO 2	%PICO 2	PdI DMPC+Mgf	Tamanho DMPC+Mgf	PICO 1	%PICO 1	PICO 2	%PICO 2
0	0,404±0,01	114±8	211±64	68±5	112±75	31±4	0,393±0,5	149±3	260±27	73±10	59±12	27±9
24	0,486±0,02	166±22	274±14	74±7	61±1	26±7	0,435±0,08	206±25	361±80	76±9	78±18	24±8
48	0,345±0,01	208±12	267±11	84±11	57±3	14±12	0,411±0,07	302±64	447±112	85±6	1298±194	15±5
72	0,428±0,10	192±13	248±57	90±15	-	-	0,412±0,03	302±43	390±67	82±8	1448±185	18±8
96	0,458±0,01	418±44	310±170	93±10	-	-	0,445±0,15	405±99	1775±72	29±33	1512±173	71±6
pH 4	**PdI DMPC**	**Tamanho DMPC**	**PICO 1**	**%PICO 1**	**PICO 2**	**%PICO 2**	**PdI DMPC+Mgf**	**Tamanho DMPC+Mgf**	**PICO 1**	**%PICO 1**	**PICO 2**	**%PICO 2**
0	0,250±0,03	112±35	144±8	100±	-	-	0,551±0,09	210±69	252±253	56±6	100±60	32±18
24	0,317±0,04	177±66	267±101	88±2	54,7±18	11±2	0,303±0,04	130±23	154±3	99±1	-	-
48	0,099±0,14	75±107	93±132	50±71	-	-	0,194±0,27	258±364	218±308	47±67	42±60	2±3
72	0,313±0,02	142±70	181±42	100±0	-	-	0,371±0,03	176±27	227±4	81±18	55±17	19±18
96	0,360±0,01	167±90	179±56	94±1	2309±321	6±1	0,416±0,01	192±44	240±1	87±9	49±15	12±8

Continuação da **Tabela 05**

pH 7	PdI DMPC	Tamanho DMPC	PICO 1	%PICO 1	PICO 2	%PICO 2	PdI DMPC+Mgf	Tamanho DMPC+Mgf	PICO 1	%PICO 1	PICO 2	%PICO 2
0	0,431±0,16	115±36	245±121	74±28	22±31	22±30	0,45±0,21	148±39	279±134	74±15	103±77	25±34
24	0,385±0,06	298±110	279±86	93±10	30±42	7±9	0,645±0,49	306±225	244±14	85±21	129±181	10±14
48	0,419±0,01	330±59	314±44	96±6	25±36	4±5	0,693±0,43	329±210	191±75	82±22	322±203	9±10
72	0,595±0,19	342±15	436±65	89±1	2403±332	9±1	0,557±0,21	576±509	229±66	87±6	166±75	13±6
96	0,571±0,19	651±258	709±95	75±14	127±36	22±18	0,515±0,18	1032±111	273±179	82±23	2892±342	9±11

Considerando que os lipossomos estão em suspensão, estes possuem uma carga superficial decorrente da adsorção de íons ou ionização de grupos superficiais na cabeça de grupo do lipídio. Essa carga é influenciada pelo pH, força iônica e, em alguns casos, pelos fármacos presentes no meio os quais eventualmente interagem com esses agregados. Para caracterizar as cargas lipossomais e compreender o efeito do pH no comportamento dos lipossomos de DMPC, e na incorporação da mangiferina, as medidas de potencial zeta foram conduzidas nos diferentes pHs discutidos anteriormente. É importante enfatizar que medidas de potencial zeta não rendem informação direta da carga superficial de um lipossomo, mas sim da carga medida no ponto onde a camada de Stern e a dupla camada difusa se encontram, ou seja, no plano de cisalhamento. No entanto, considera-se que essa medida rende uma aproximação significativa do potencial de superfície do agregado (GARCIA-MANYES *et al*., 2006).

Os resultados na **Figura 23** mostram que o potencial aumenta conforme diminui o valor de pH. Esta observação experimental indica que, em pHs ácidos, os íons H^+ estão ligados à metade colina da cabeça de grupo do fosfolipídio, em particular do grupo fosfato, gerando, assim, uma carga líquida positiva. Conforme aumenta o pH esses íons H^+ se dissociam do grupo fosfato e com isso o potencial zeta tende a dimimuir atingindo valores negativos. De acordo com a **Figura 23**, os lipossomos de DMPC apresentam carga superficial positiva para os pHs 2 e 4; carga neutra para o pH 7,4 e carga negativa para os pHs 10 e 12.

Como via de regra, valores absolutos de potencial zeta podem ser relacionados com a estabilidade. Quanto maior o potencial zeta, mais espessa é a camada difusa e mais estável é a supensão lipossomal (MISHRA, 2009). Para valores de potencial zeta ao redor de 60 mv considera-se agregados de excelente estabilidade; valores ao redor de 30 mv, agregados de boa estabilidade; valores ao redor de 20 mv, média estabilidade e valores na faixa de -5 a +5 mv, rápida agregação e, portanto, baixa estabilidade. No entanto, esses valores podem ser alterados em função de componentes do meio, como já mencionado (MISHRA, 2009).

Segundo alguns autores (MISHRA, 2009; GARCIA-MANYES *et al*., 2006), a presença de sais no meio, principalmente provenientes de soluções fisiológicas, pode alterar os valores de potencial zeta requeridos para uma boa estabilidade lipossomal, o que pode ser confirmado pelo monitoramento do tamanho do agregado como realizado neste estudo para lipossomos de DMPC em ausência e presença de mangiferina.

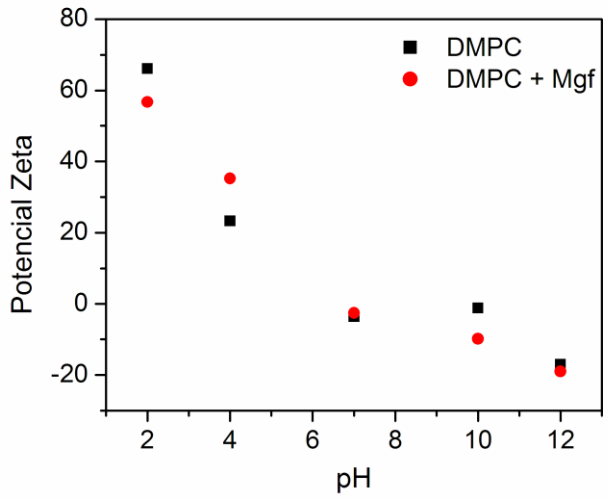


Figura 23. Evolução dos valores de potencial zeta, em função do pH, para lipossomos unilamelares de DMPC na ausência ou presença de mangiferina (DMPC+Mgf) medidos no dia da preparação.

No caso deste estudo, observa-se que em pHs 2 e 4 o potencial zeta está na faixa considerada de excelente e boa estabilidade, respectivamente; enquanto no pH fisiológico o potencial está na faixa considerada de baixa estabilidade. Essa observação é compatível com os resultados obtidos que mostram maior variação de tamanho, e menor estabilidade do lipossomo, para o pH 7,4. Nota-se ainda que não há variação significativa do potencial zeta quando comparados lipossomos vazios e contendo mangiferina, o que corrobora com a hipótese de que o flavonóide interage na superfície do lipossomo e não compromete a organização da bicamada lipídica.

4.3.2. Influência da força iônica

O papel da força iônica na estabilidade lipossomal foi avaliado para os lipossomos de DMPC, preparados pelo método da injeção etanólica, em presença e ausência de mangiferina.

O pH foi mantido constante, em pH 7,4 e foram monitorados o potencial zeta, bem como tamanho lipossomal. A força iônica foi variada pela adição de NaCl (0, 10 e 20 mM) em tampão Hepes, o qual foi selecionado em função da ausência de NaCl. Os resultados na **Tabela 06** mostram valores de potencial zeta negativos os quais variam em magnitude dependendo da presença de mangiferina e da força iônica do meio.

Na ausência de mangiferina, e sem adição de NaCl, o potencial zeta é negativo e diminui com o tempo de preparação, o que não ocorre na presença de NaCl 10 e 20 mM para os quais são obtidos potenciais negativos cujas grandezas se mantém com o tempo de preparação. É interessante observar que na ausência de NaCl, o tamanho do lipossomo vazio é praticamente constante com um baixo índice de polidispersividade. Porém, na presença da mangiferina, ao contrario do que foi observado em tampão de Tyrode (vide **Tabela 05**), o tamanho do lipossomo e o índice de polidispersividade aumentam em relação ao lipossomo vazio, sugerindo um processo de agregação dos lipossomos, favorecido pela mangiferina. Nota-se na **Tabela 06,** que a EI da mangiferina nessas condições é apenas 8 % (em tampão Hepes), praticamente a metade daquela observada em tampão de Tyrode (EI =13 %). Este resultado sugere que a composição do tampão influencia o comportamento do lipossomo e o processo de incorporação da mangiferina.

Na presença de NaCl 10 mM, os lipossomos vazios aumentam de tamanho o que é mais evidente após 96 hs de preparação. Esse resultado justifica-se pelo fato de que o aumento da força iônica diminui a repulsão eletrônica entre as cabeças de grupo dos lipídios as quais podem estar mais próximas umas das outras favorecendo a agregação. Na presença de mangiferina, a eficiência de incorporação é de apenas 4,3 % e não há mudança significativa do tamanho lipossomal, inclusive após 96 hs de preparação.

Chama-nos a atenção o fato de que a mangiferina previne o aumento de tamanho do lipossomo após 96 hs de preparação. Além disso, o índice de polidispersividade na presença da mangiferina (PdI=0,469) é menor do que aquele determinado para lipossomos vazios (PdI=0,632). Nota-se, ainda, um pequeno aumento do potencial zeta em relação ao lipossomo vazio.

Quando a força iônica é aumentada ou seja, na presença de NaCl 20 mM, os lipossomos vazios são maiores do aqueles contendo mangiferina e tendem à agregação com o tempo, como observado para NaCl 10 mM. O potencial zeta neste caso é menos negativo do que aquele obtido em 10 mM de NaCl (**Tabela 06)**.

Na presença da mangiferina, os lipossomos são menores em relação aos lipossomos vazios e se mantem constantes com o tempo de preparação sugerindo que a mangiferina, na presença de NaCl, impede a agregação do lipossomo. É intereressante observar, no entanto, que há um considerável aumento nos valores de potencial zeta (tornam-se menos negativos) decorrente de uma alteração na carga superfícial do lipossomo.

Se for analisada a estrutura dos lipossomos de DMPC usados neste estudo (**Figura 06**) pode-se observar que estes são formados por lipídios neutros, cada um contendo um grupo fosfatidil (negativo) e um grupo colina (positivo) em suas moléculas. Apesar disso, estes lipossomos tem um potencial elétrico de superfície diferente de zero. Na ausência de sal, este potencial negativo pode ser justificado pela perda de prótons associados ao grupo fosfatidil; na presença de sal existe a possibilidade da ligação de alguns ânions à porção colina dos lipossomos neutros deixando-os com uma superfície negativamente carregada (MAKINO *et al*., 1991). Com base nesta observação, poderia-se supor que ânions, tais como os íons Cl^-, provenientes do NaCl se associariam ao grupo colina deixando o lipossomo com carga superficial ainda mais negativa e, consequentemente, com um potencial zeta mais negativo. No entanto, não é o que ocorre uma vez que os resultados na **Tabela 06** mostram valores de potencial zeta mais positivos na presença de NaCl. Esse comportamento é, ainda, acentuado pela mangiferina cuja presença não só influencia o potencial de superfície como previne a agregação dos lipossomos.

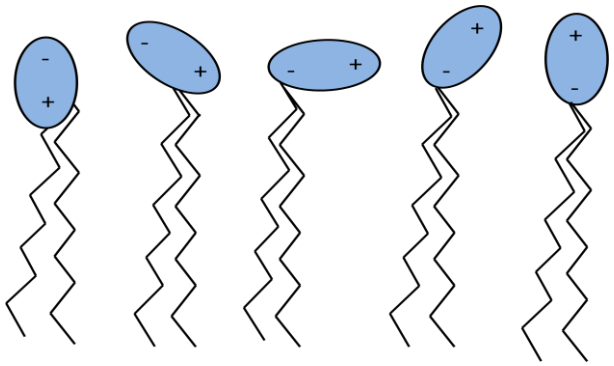
Tabela 06. Influência da força iônica no tamanho da partícula, potencial zeta e Índice de polidispersividade (PdI) de lipossomos vazios (DMPC) e contendo mangiferina (DMPC + Mgf).

	Tamanho DMPC	Pot Zeta DMPC	PdI DMPC	Tamanho DMPC+Mgf	Pot. Zeta DMPC+Mgf	PdI DMPC+Mgf
HEPES (EI = 8 %)						
0 hs	91,9	-21,5	0,246	149	-35,1	0,287
24 hs	105	-37,2	0,295	175	-29,6	0,307
48 hs	98	-25,8	0,208	269	-35,1	0,435
72 hs	101	-42,4	0,267	174	-36,0	0,399
96 hs	97,3	-59,0	0,223	284	-34,4	0,491
10 mM NaCl (EI = 4,3 %)						
0 hs	191	-96,4	0,270	141	-104,0	0,451
24 hs	186	-30,5	0,275	89,6	-26,4	0,364
48 hs	141	-45,5	0,260	118	-35,2	0,381
72 hs	138	-42,2	0,264	155	-37,4	0,282
96 hs	741	-47,0	0,632	117	-35,9	0,469
20 mM NaCl (EI = 1,7 %)						
0 hs	213	-27,8	0,341	157	-9,26	0,369
24 hs	268	-25,7	0,423	137	-9,72	0,273
48 hs	199	-24,8	0,591	137	-11,1	0,294
72 hs	315	-30,5	0,358	129	-21,8	0,283
96 hs	537	-30,4	0,559	178	-18,2	0,464

Makino e colaboradores (1991) estudaram o efeito da força iônica e temperatura na conformação das cabeças de grupo de liposomos formados por DMPC, DPPC e DSPC e usaram para este estudo o tampão de Tyrode, em ausência de íons Cl^-, para excluir a possibilidade de adsorção destes íons na superfície dos lipossomos. Foi observado um potencial zeta negativo que aumenta com o aumento da força iônica. Garcia-Manyes e colaboradores (2006) estudaram o efeito da força iônica na nanomecânia de lipossomos de DMPC usando tampão Hepes com adição de NaCl e observaram, também, o aumento

do potencial zeta com o aumento da força iônica do meio. Em ambos os casos foi observado um comportamento semelhante àquele encontrado em nossos estudos.

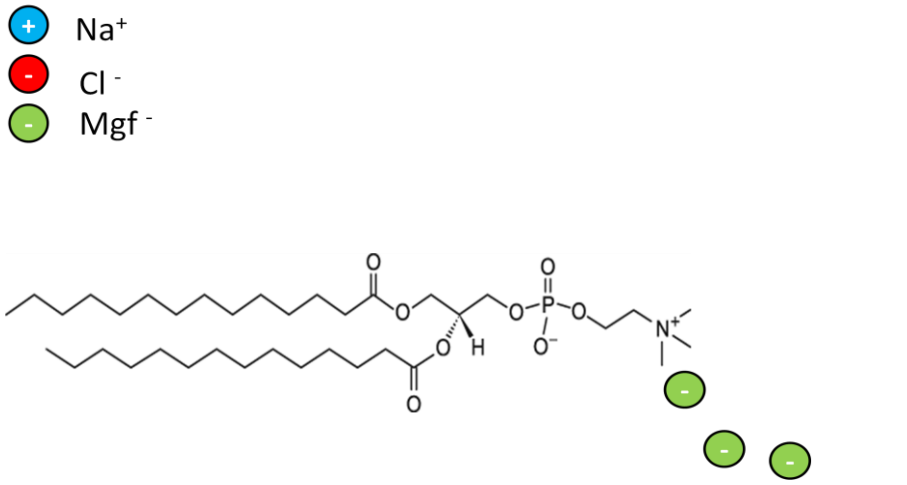
A interpretação destes resultados pode ser explicada por diversos fatores. Segundo Makino e colaboradores (1991), a mudança na força iônica induz mudanças conformacionais nas cabeças de grupo dos lipídios como mostra o **Esquema 05**. Segundo esse autores, dependendo da força iônica e da temperatura de transição de fases dos lipídios, a orientação desses grupos na superficie lipossomal muda e influencia a carga superficial e o potencial zeta. Garcia-Manyes e colaboradores (2006) atribuem o aumento de potencial zeta, decorrente da força iônica, à ligação de cátions aos lipídios.



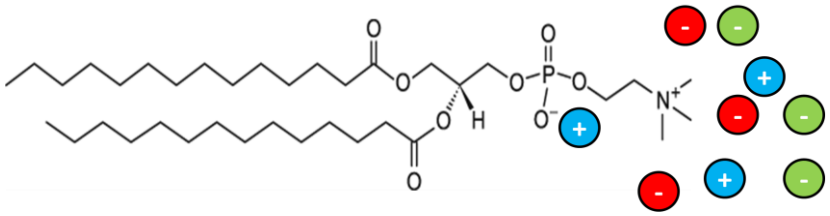
Esquema 05. Modelo para as diferentes conformações assumidas pelas cabeças de grupo dos lipídios em função da variação da força iônica e temperatura de transição de fases dos lipídios (MAKINO *et al*., 1991).

A correlação dos trabalhos de Makino (1991) e Garcia-Maynes (2006) com os resultados obtidos neste estudo depende da forma assumida pela mangiferina e pelos lipídios em pH neutro. Sabe-se que em pH 7,4, os lipídios e a maior parte das moléculas da mangiferina estão na forma aniônica, como já discutido, e estas últimas poderiam ser repelidas pela superfície de potencial negativo do lipossomo. No entanto, com o aumento da força iônica, observa-se que a mangiferina influencia consideravelmente o potencial zeta os quais tornam-se mais positivos.

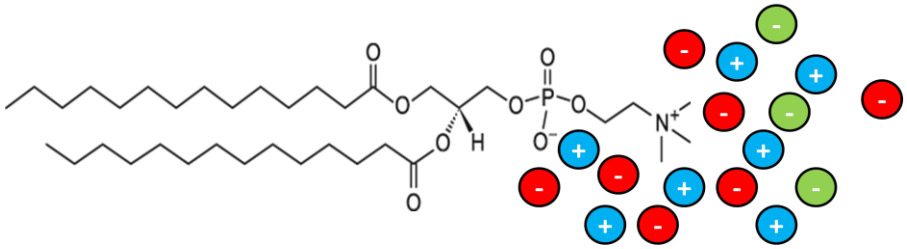
Em ausência de NaCl, descarta-se a possibilidade de ligação de íons Cl^- ou Na^+ às cabeças de grupo do lipídio; porém, a mangiferina na sua forma aniônica pode fazer esse papel e associar-se eletrostaticamente à porção colina do lipídio (**Esquema 06**). Com isso, há redução da repulsão entre os lipossomos com consequente agregação e aumento do tamanho lipossomal, sem variação significativa no potencial zeta (**Tabela 06**). Na presença de NaCl 10 mM, nota-se que a estabilidade lipossomal é mantida pela mangiferina a qual é responsável, também, por valores de potenciais zeta mais positivos em relação aos lipossomos vazios. Esse resultado pode ser explicado por mudanças na conformação do lipídio ou ainda pela associação eletrostática de íons Na^+ à porção fosfatidil do lipídio levando à uma carga superficial mais positiva (**Esquema 06**). A presença de sal no meio pode também blindar a associação da mangiferina monoaniônica à porção colina do lipídio (**Esquema 06**), o que diminui a eficiência de incorporação e previne a agregação dos lipossomos. Esta hipótese é rerforçada pela presença de NaCl 20 mM, onde observam-se potenciais Zeta ainda mais positivos, comparados à NaCl 10 mM, e lipossomos mais estáveis na presença de mangiferina.



Ausência de NaCl



NaCl 10 mM



NaCl 20 mM

Esquema 06. Esquema ilustrativo de associação da mangiferina aos lipossomos de DMPC em ausência e presença de NaCl. Efeito da força iônica no potencial de superfície dos lipossomos.

4.4. Incorporação da mangiferina em lipossomos de DMPC:colestrol (9:1) preparados pelo método do filme lipídico

A eficiência de incorporação para os lipossomos de DMPC: colesterol preparados pelo método do filme lipídico foi 45%, consideravelmente maior do que aquele obtido para lipossomos preparados pelo método da injeção etanólica (EI = 13 %). O potencial zeta manteve-se ao redor de 1 a 3 mv (**Tabela 07**), semelhante àquele obtido, em pH fisiológico, para lipossomos preparados pelo método da injeção etanólica. Esse resultado é pertinente uma vez que não houve inserção de lipídios com carga positiva ou negativa, na composição lipossomal. O tamanho médio dos lipossomos não sofreu variação significativa após o tempo de 72 h; no entanto, o índice de polidispersividade indica a formação de sistemas lipossomais polidispersos (**Tabela 07)** com valores de PdI ao redor de 0,8 - 0,9, muito acima daquele considerado apropriado (PdI = 0,3)para aplicações diversas. Tais resultados são confirmados pela **Figura 24** a qual mostra populações de diferentes tamanhos obtidas no dia da preparação dos lipossomos. Apesar da polidispersividade observada no dia da preparação, esta é mantida no período de 72 hs e porisso essas soluções lipossomais foram aplicadas nos ensaios biológicos

Tabela 07. Tamanho, potencial zeta e índice de polidispersividade (PdI) de lipossomos preparados pelo método do filme lipídico, na presença de colesterol, na proporção DMPC:colesterol (9:1).

Tempo (h)	Potencial Zeta DMPC (mV)	Tamanho DMPC (nm)	PdI DMPC	Potencial Zeta DMPC + Mgf (mV)	Tamanho DMPC + Mgf (nm)	PdI DMPC + Mgf
0	1,98 ± 0,62	222,6 ± 9,0	0,726 ± 0,086	1,67 ± 0,53	171,7 ± 4,4	0,785 ± 0,061
72	2,28 ± 0,08	273,4 ± 25,4	0,969 ± 0,031	2,54 ± 0,51	216,8 ± 8,6	0,972 ± 0,028

Results

			Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Z-Average (d.nm):	167,9	Peak 1:	2636	42,6	619,7
PdI:	0,807	Peak 2:	102,0	41,8	18,69
Intercept:	0,938	Peak 3:	403,6	9,0	64,59

Result quality : Refer to quality report

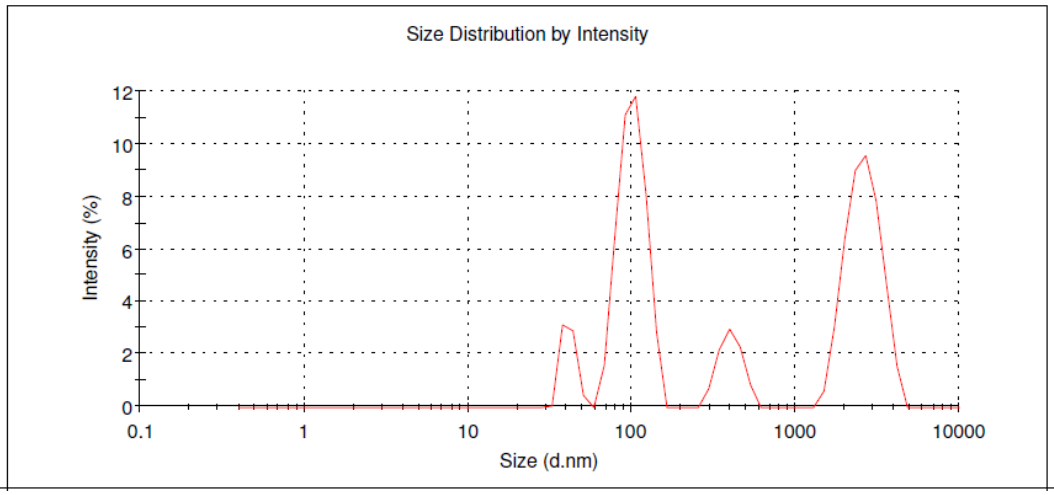


Figura 24. Tamanho e PdI de lipossomos de DMPC preparados pelo método do filme lipídico na proporção DMPC:colesterol (9:1), determinados pelo equipamento DLS Zetasizer Nano, no dia da preparação (0h).

PARTE II: ESTUDO DO POTENCIAL ANTIALÉRGICO: SINERGISMO E INFLUÊNCIA DOS LIPOSSOMOS

4.5. Atividade antialérgica

O modelo biossensor empregado neste trabalho é baseado na exocitose (ou desgranulação) de mastócitos estimulados por um antígeno (NAAL *et al.*, 2004), o que possibilita estudos, *in vitro*, focados em atividade antialérgica.

A desgranulação é o processo de fusão entre os grânulos secretórios e a membrana plasmática, resultando na secreção de conteúdos vesiculares para o espaço extracelular, com a liberação de mediadores químicos responsáveis pelas alergias (HOLOWKA e BAIRD, 1996; HOLGATE e POLOSA, 2006). Entre os mediadores químicos está a enzima β-hexosaminidase que é usada como um marcador da atividade antialérgica das substâncias de interesse; como já mencionado. A enzima é quantificada pela medida da intensidade de fluorescência do produto metilumbeliferona, mostrado anteriormente pela **Figura 03**. Portanto, quanto maior a desgranulação, maior é a quantidade de enzima liberada e maior é a fluorescência. Além disso, quando as células sofrem algum tipo de dano, ou estímulo, observa-se um aumento considerável da liberação da β-hexosaminidase, o que significa que a quantificação dessa enzima no ensaio biológico pode sinalizar, também, processos de estímulo ou morte celular.

4.5.1. Avaliação da concentração ótima de antígeno para o estímulo das células RBL-2H3

Apesar da resposta imediata das células estimuladas, alguns cuidados devem ser tomados para garantir a resposta ótima dos mastócitos e obter uma porcentagem de liberação de β-hexosaminidase suficiente para monitorar o processo de inibição. A concentração de antígeno é fundamental para o sucesso do modelo empregado.

Estudos anteriores mostraram que a concentração ótima de antígeno, tanto para o ensaio padrão (XU *et al*., 1998) quanto para o modelo biossensor (NAAL *et al*., 2004), é 0,1 µg/mL o que, de fato, foi demonstrado, também, no presente estudo (**Figura 25**). O pico da curva de concentração-resposta ocorre em 0,1 µg/mL, a partir do qual se observa

um declínio da porcentagem de β-hexosaminidase liberada devido, provavelmente, a um mecanismo de dessensibilização dos receptores FCεRI e redução do processo de *crosslinking* das moléculas de IgE (WEETALL *et al.*, 1993). Assim, essa concentração de antígeno foi usada no estímulo dos mastócitos durante os ensaios biológicos.

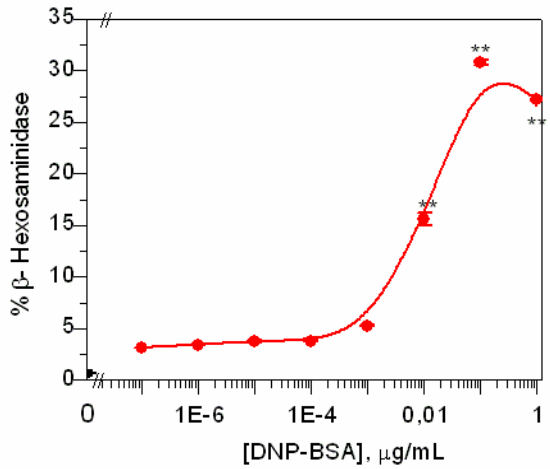


Figura 25. Porcentagem de β-hexosaminidase liberada, para as células estimuladas na presença de diferentes concentrações do antígeno DNP-BSA, usando o modelo biossensor (NAAL *et al.*, 2004). Cada valor representa a média ± desvio padrão de determinações em quadruplicata; **p<0,01 em comparação ao controle.

4.5.2. Perfil de inibição da desgranulação de mastócitos: utilização do fármaco antialérgico fumarato de cetotifeno como controle positivo

O efeito inibidor das substâncias investigadas (componentes do extrato Vimang) foi comparado ao fármaco antialérgico fumarato de cetotifeno que atua como antagonista de receptores histamínicos H_1 e estabilizador de mastócitos (SERNA *et al.*, 2006), sendo portanto empregado como controle positivo para este tipo de estudo (MASTSUDA *et al.*, 2002). O perfil de inibição da liberação da enzima β-hexosaminidase em função da concentração de fumarato de cetotifeno é apresentado na **Figura 26,** a partir da qual foi calculado o valor de CI_{50} (concentração de substância necessária para inibir 50% da desgranulação). O valor de CI_{50} para o fumarato de cetotifeno foi igual a 154 ± 6 μM.

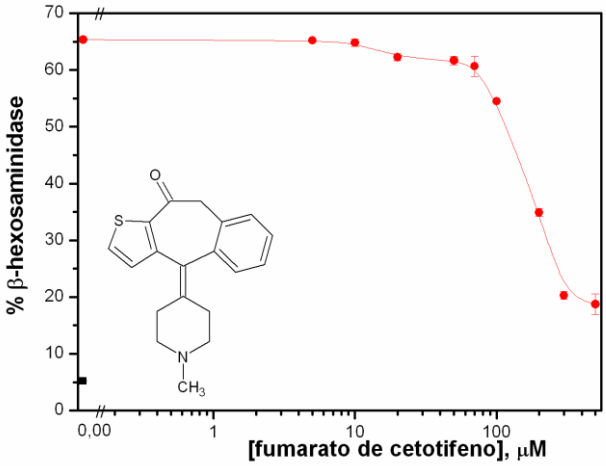


Figura 26. Porcentagem de β-hexosaminidase liberada, para as células estimuladas pelo antígeno DNP-BSA (0,1 μg/mL) na presença de diferentes concentrações de fumarato de cetotifeno. Cada valor representa a média ± desvio padrão de determinações em quadruplicata; (CI_{50}= 154 ± 6 μM).

4.5.3. Atividade antialérgica dos flavonóides isolados do extrato Vimang

A atividade antialérgica do extrato Vimang bem como de seus componentes majoritários (mangiferina, quercetina, catequina, ácido gálico e ácido benzóico) foi avaliada através do ensaio direto de inibição da liberação da enzima β-hexosaminidase (modelo biossensor) conforme mencionado anteriormente. Para cada componente, obteve-se uma curva de porcentagem de liberação de β-hexosaminidase *versus* concentração da amostra teste (**Figura 27**), a partir dais quais foram calculados os valores de CI_{50} para cada substância estudada, como mostra a **Tabela 08**. Os valores de CI_{50} obtidos foram comparados ao valor de CI_{50} do fármaco de referência fumarato de cetotifeno (154 ± 6 μM), e as substâncias com valores próximos, ou menores que este, foram consideradas com atividade antialérgica.

Entre as substâncias isoladas, somente a quercetina e a mangiferina foram efetivas na inibição da desgranulação com valores de CI_{50} iguais a 5,2 µM e 80 µM, respectivamente, os quais são menores do que o fármaco de referência fumarato de cetotifeno. As demais substâncias (ácido gálico, catequina e ácido benzóico) não deram uma boa inibição da liberação da beta-hexosaminidase, o que significa que estes compostos isolados não apresentam atividade antialérgica.

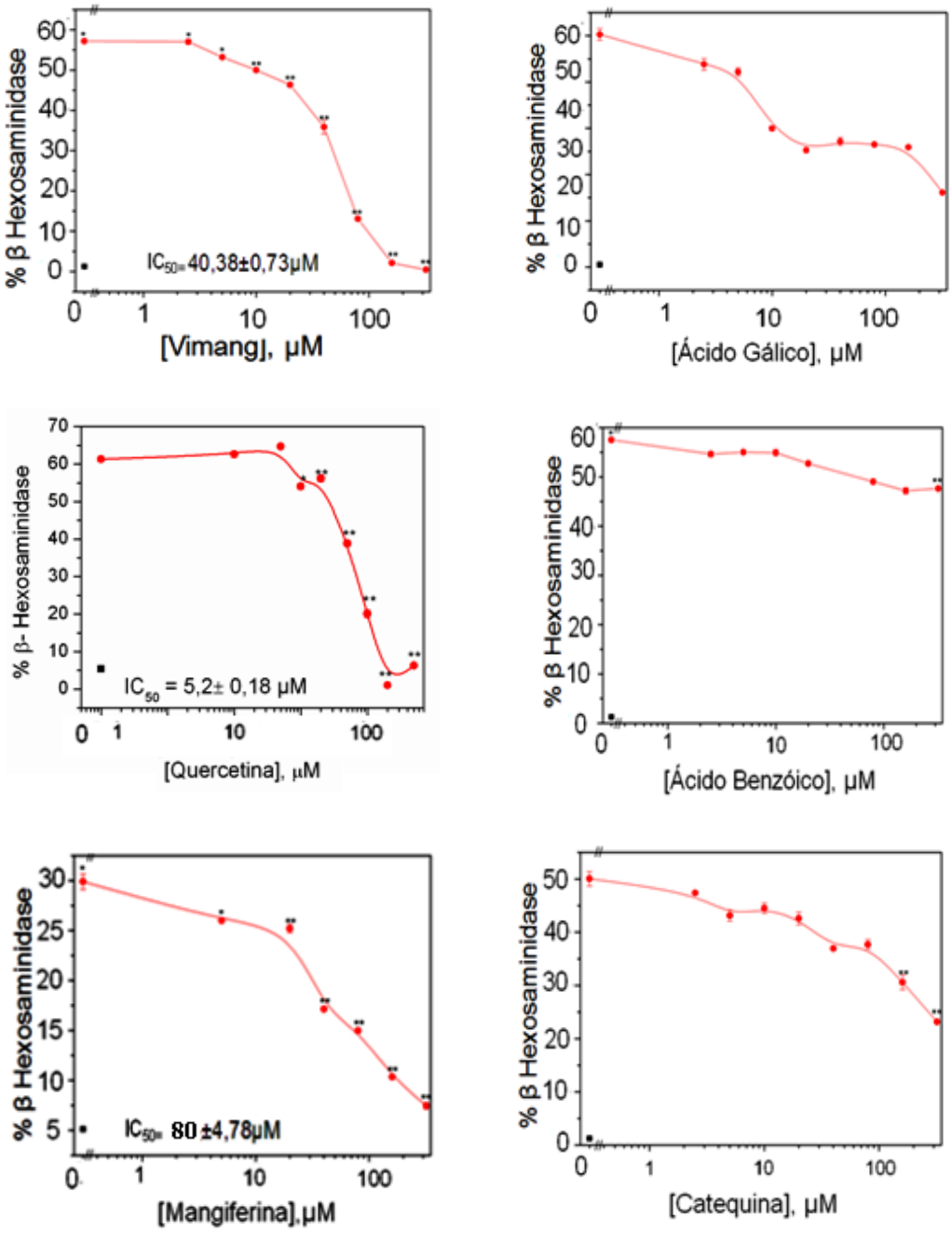


Figura 27. Liberação de β-hexosaminidase em células RBL-2H3 estimuladas pelo antígeno DNP-BSA (0,1 μg/mL) na presença de diferentes concentrações do extrato Vimang e de compostos isolados do mesmo tais como ácido gálico, quercetina, ácido benzóico, mangiferina e catequina. Cada valor representa a média ± desvio padrão de determinações em triplicata. Análise de One-way ANOVA, seguido pelo teste de Dunett indicaram significância estatística de *P<0,05 e ** P<0,01 em relação ao controle.

Tabela 08. Valores de CI_{50} para o extrato Vimang e para as substâncias isoladas deste, quercetina e mangiferina, determinados em tampão de Tyrode.

Composto	CI_{50} (µg/mL)	CI_{50} (µM)
Vimang	40,4 ± 0,7	-
Quercetina	0,46 ± 0,01	5,2 ± 0,2
Mangiferina	33,8 ± 2,0	80 ± 5

4.6. Sinergismo

A definição de sinergia, de um ponto de vista farmacológico, é muito difícil de ser dada, mas o método da isobole de Berenbaun (ULRICH-MERZENICH *et al.*, 2010) (**Figura 28**) parece ser um dos métodos mais convenientes experimentalmente e também o mais demonstrativo, até agora, proposto para provar os efeitos de sinergismo. A representação gráfica de doses isoladas, e em combinação, que causam 50 % de efeito (CI_{50}) de dois agentes farmacológicos é chamada de **Isobolograma**, a quaL é representada por isoboles de aditividade, sinergismo e antagonismo, como mostra a **Figura 28**.

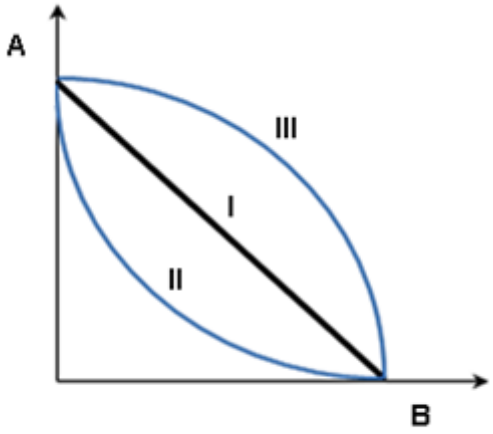


Figura 28. Isoboles de Aditividade **(I)**, Sinergismo **(II)** e Antagonismo **(III)**; (I) Efeito da adição de Substâncias individuais. (II) Interação positiva. (III) Interação negativa.

No isobolograma, as doses da **Substância A** são representadas nas abcissas e as doses da **Substância B** nas ordenadas, sendo que cada ponto representa um par de doses que atingem o CI_{50} quando estão associados. Os valores de CI_{50} provenientes da aplicação isolada de cada substância são unidos, gerando a isobole de aditividade. Os demais valores de CI_{50} obtidos de associações em diferentes proporções dos componentes investigados podem ser avaliados em relação à sua posição diante da isobole de aditividade. Se esses pontos estiverem localizados em torno da isobole de aditividade, a ação é de aditividade; se estiverem localizados abaixo, a ação é de sinergismo e se estiverem localizados acima, a ação é de antagonismo. O sinergismo, no entanto, é dependente, em parte, da concentração das drogas combinadas e, em altas concentrações, pode não haver sinergismo (SAW *et al*., 2010).

Para o estudo de sinergismo entre as substâncias isoladas do extrato Vimang, foram realizados experimentos alternando as substâncias em pares (1 e 2), sendo que a concentração da substância 1 foi fixada em um determinado valor e a concentração da substância 2 foi variada. Os pares investigados foram: **a)** quercetina e mangiferina; **b)** quercetina e catequina; **c)** quercetina e ácido gálico; **d)** quercetina e ácido benzóico; **e)** mangiferina e ácido gálico; **f)** mangiferina e catequina; **g)** mangiferina e ácido benzóico e **h)** mangiferina e quercetina. As curvas de concentração em função da porcentagem de β-hexosaminidase liberada para as diferentes combinações estão apresentadas nas **Figuras 29** a **38**.

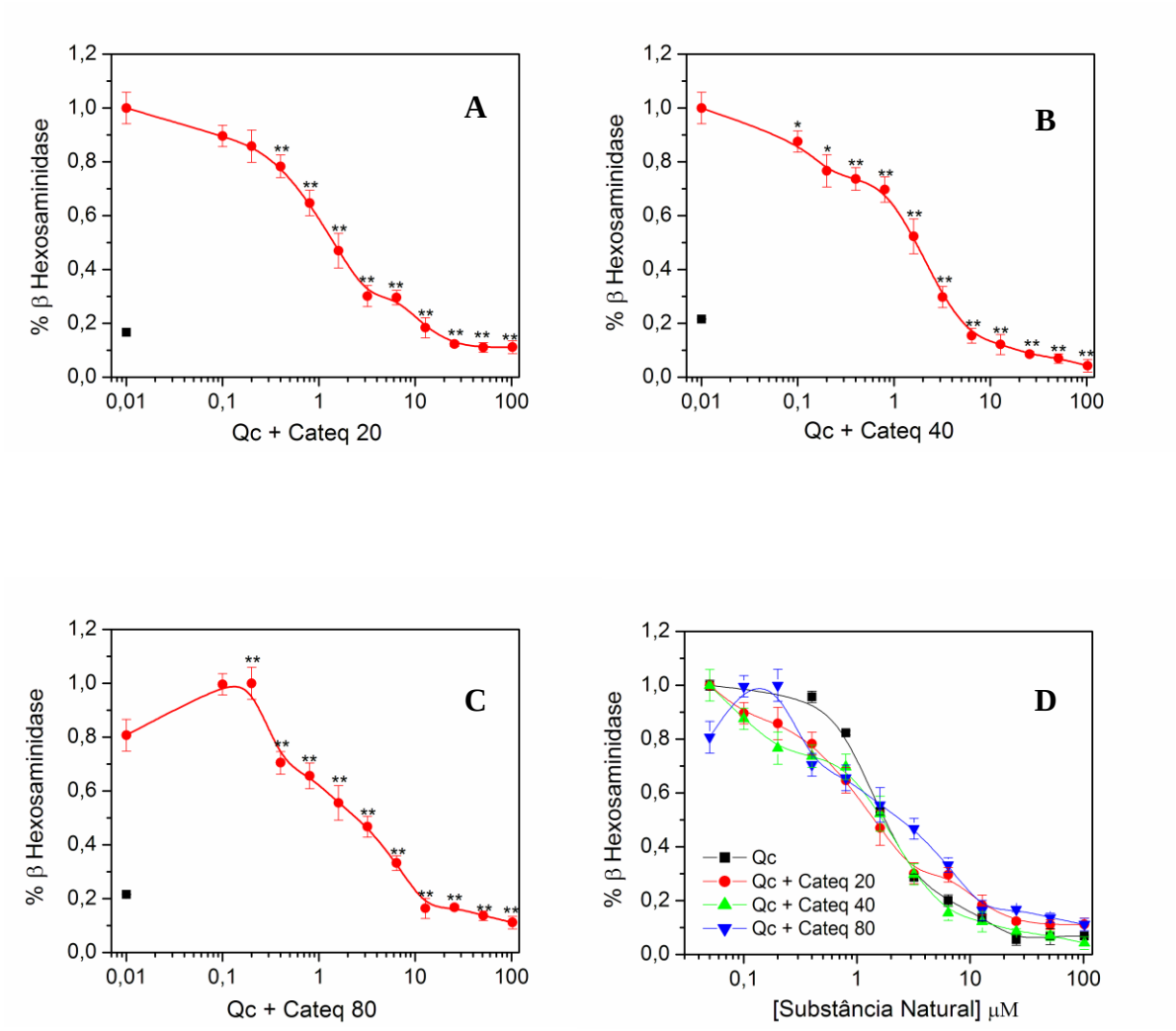


Figura 29. Liberação de β-hexosaminidase em mastócitos estimuladas pelo antígeno DNP-BSA (0,1 µg/mL) na presença de diferentes concentrações de quercetina e concentrações fixas de catequina: **(A)** Cateq 20 µM, **(B)** Cateq 40 µM, **(C)** cateq 80µM e **(D)** representação de todas as curvas**.** Cada valor de % de β-Hex representa a média ± desvio padrão de determinações em triplicata. A liberação espontânea de β-Hex está representada em preto. Análise de One-way ANOVA, seguido pelo teste de Dunett indicaram significância estatística de *P<0.05 e ** P<0.01 em relação ao controle.

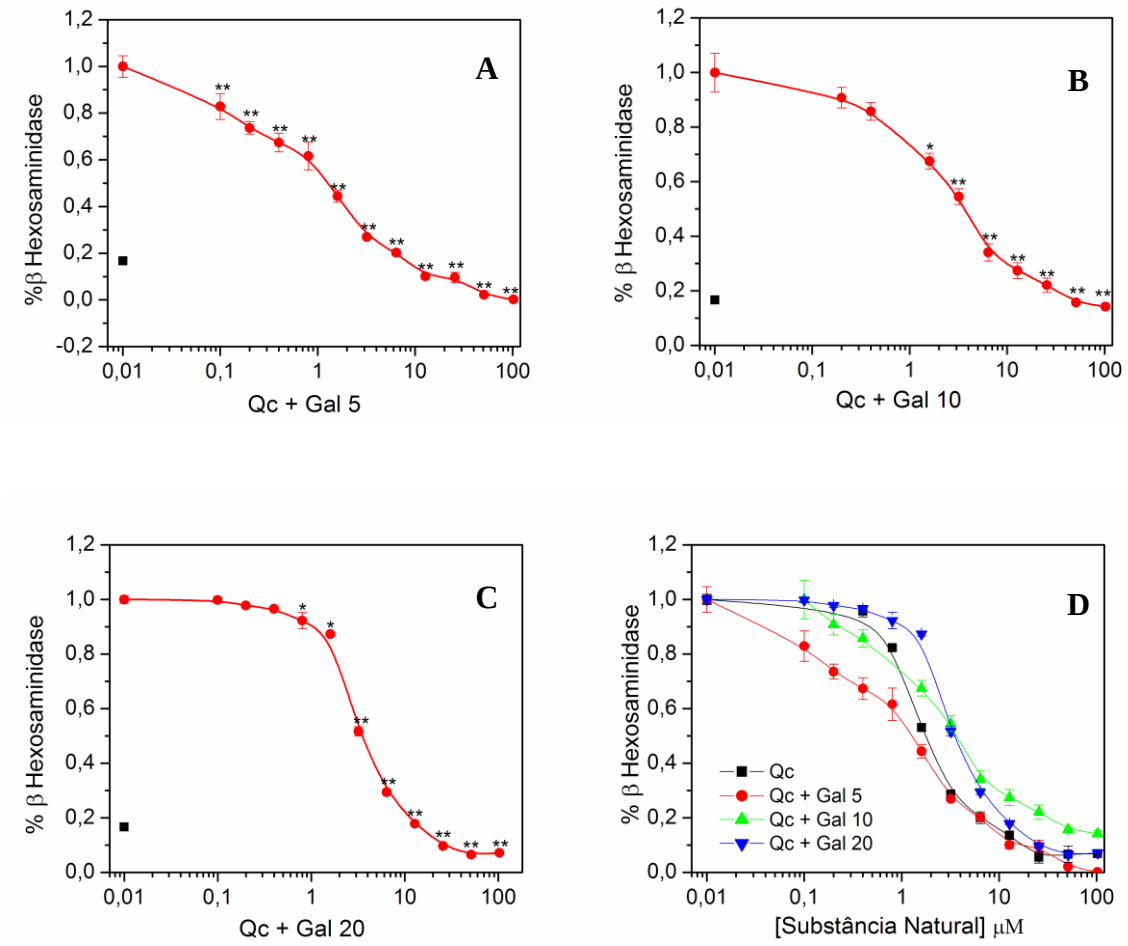


Figura 30. Liberação de β-hexosaminidase em mastócitos estimuladas pelo antígeno DNP-BSA (0,1 μg/mL) na presença de diferentes concentrações de quercetina e concentrações fixas de ácido gálico: **(A)** Gal 5 μM, **(B)** Gal 10 μM, **(C)** Gal 20μM e **(D)** representação de todas as curvas**.** Cada valor de % de β-Hex representa a média ± desvio padrão de determinações em triplicata. A liberação espontânea de β-Hex está representada em preto. Análise de One-way ANOVA, seguido pelo teste de Dunett indicaram significância estatística de *P<0,05 e ** P<0,01 em relação ao controle.

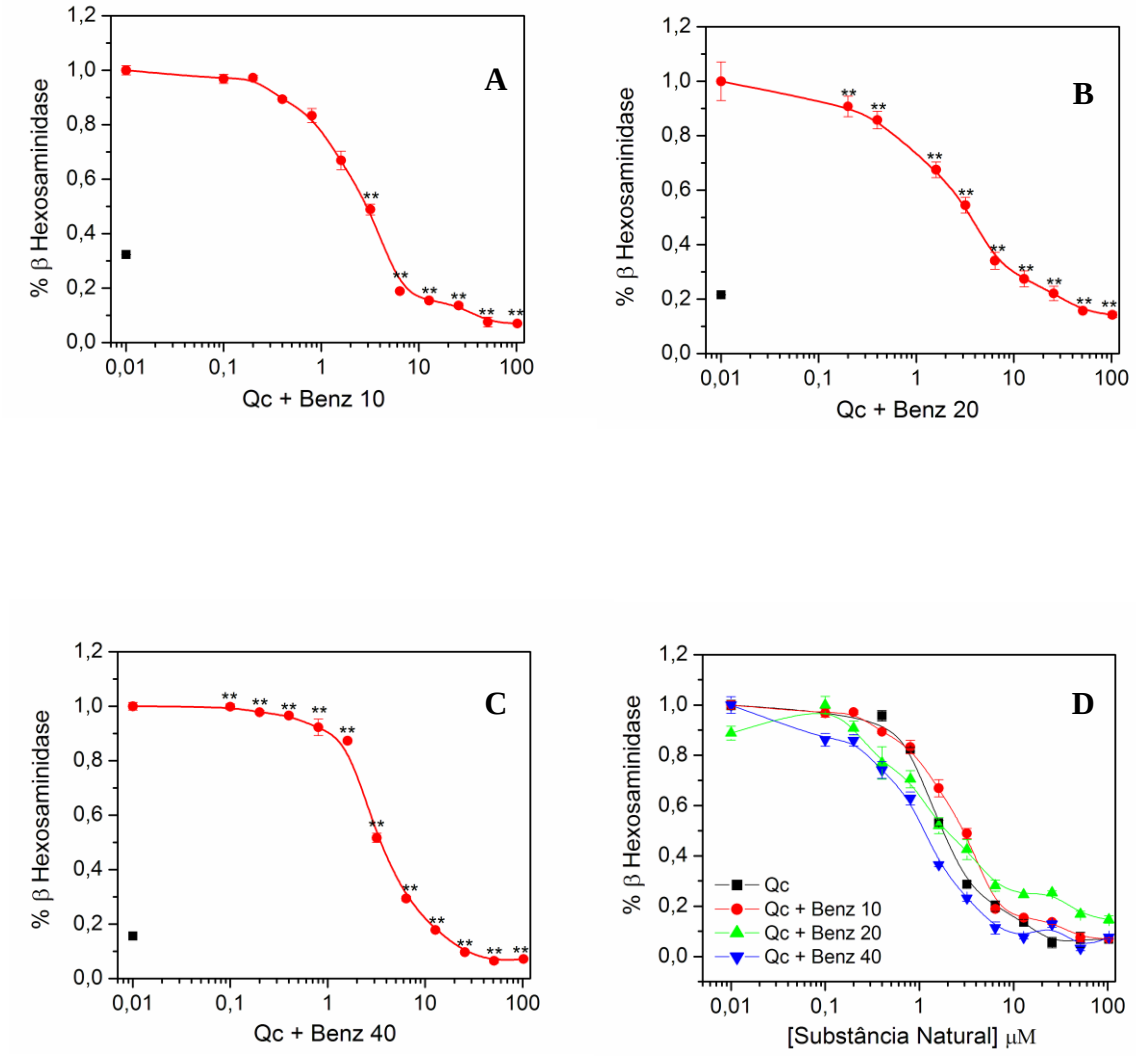


Figura 31. Liberação de β-hexosaminidase em mastócitos estimuladas pelo antígeno DNP-BSA (0,1 μg/mL) na presença de diferentes concentrações de quercetina e concentrações fixas de ácido benzóico: **(A)** Benz 10 μM, **(B)** Benz 20 μM, **(C)** Benz 40μM e **(D)** representação de todas as curvas**.** Cada valor de % de β-Hex representa a média ± desvio padrão de determinações em triplicata. A liberação espontânea de β-Hex está representada em preto. Análise de One-way ANOVA, seguido pelo teste de Dunett indicaram significância estatística de *P<0,05 e ** P<0,01 em relação ao controle.

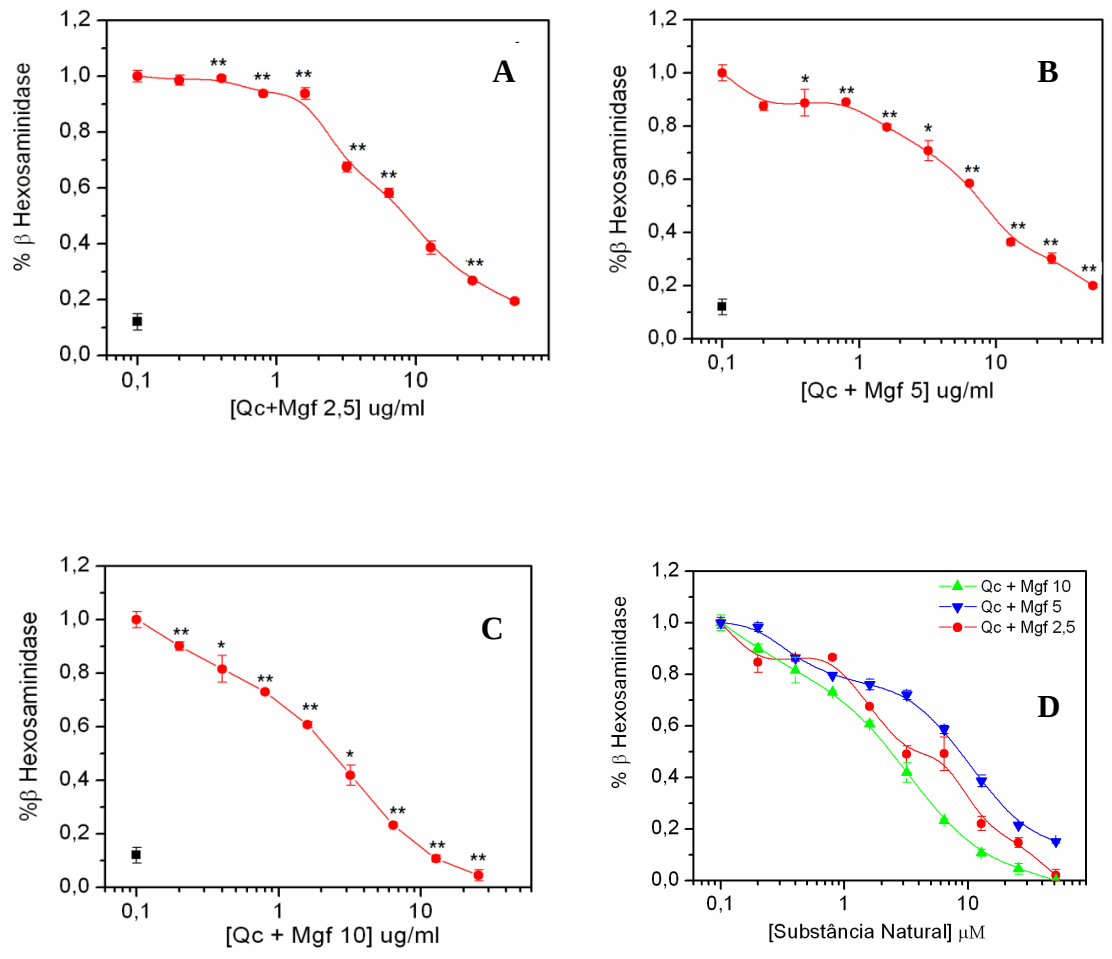


Figura 32. Liberação de β-hexosaminidase em mastócitos estimuladas pelo antígeno DNP-BSA (0,1 μg/mL) na presença de diferentes concentrações de mangiferina e concentrações fixas quercetina: **(A)** Mgf 2,5 μM, **(B)** Mgf 5 μM, **(C)** Mgf 10 μM e **(D)** representação de todas as curvas**.** Cada valor de % de β-Hex representa a média ± desvio padrão de determinações em triplicata. A liberação espontânea de β-Hex está representada em preto. Análise de One-way ANOVA, seguido pelo teste de Dunett indicaram significância estatística de *P<0,05 e ** P<0,01 em relação ao controle.

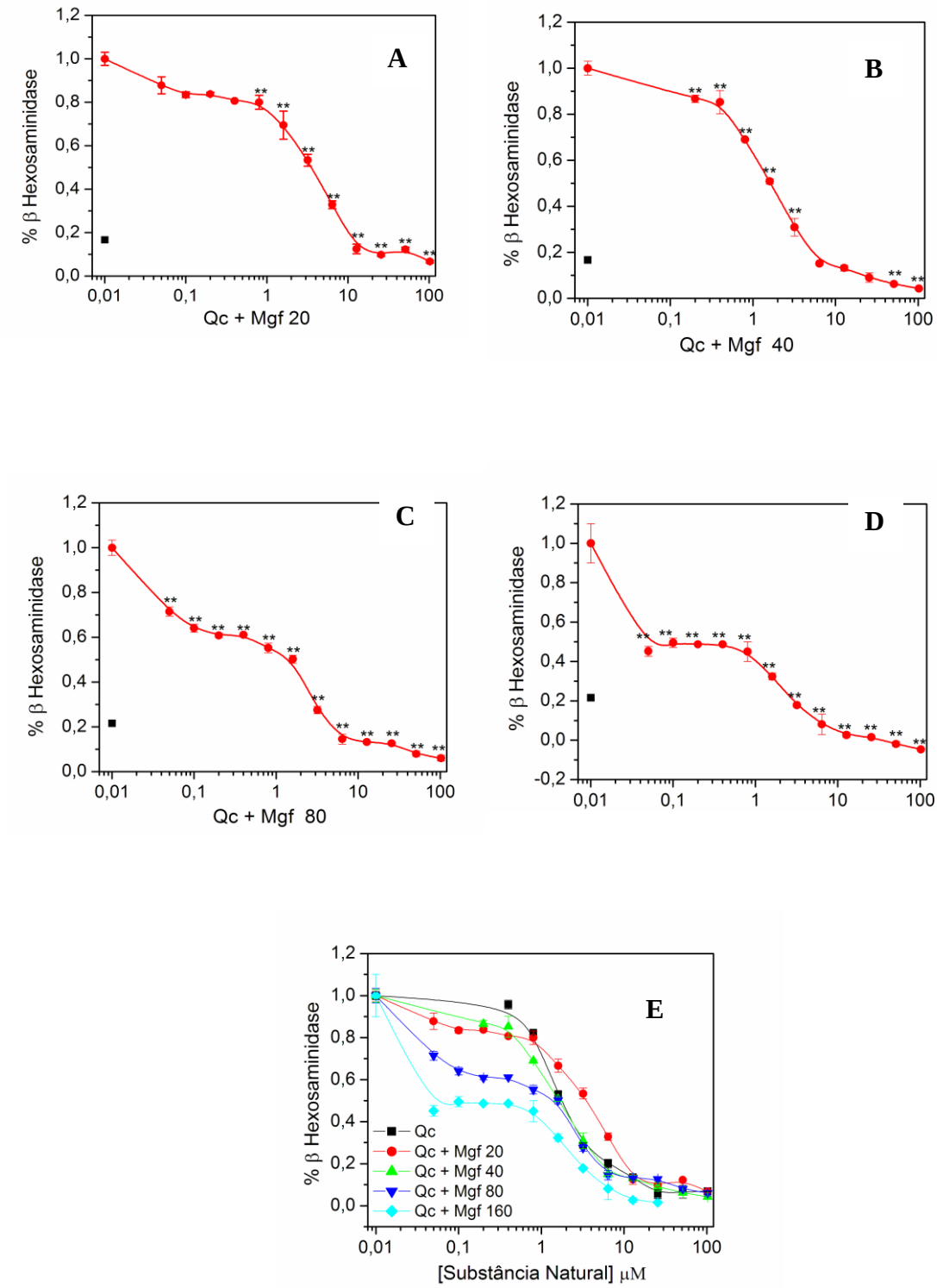


Figura 33. Liberação de β-hexosaminidase em mastócitos estimuladas pelo antígeno DNP-BSA (0,1 µg/mL) na presença de diferentes concentrações de quercetina e concentrações fixas de mangiferina: **(A)** Mgf 20 µM, **(B)** Mgf 40 µM, **(C)** Mgf 80µM, **(D)** Mgf 160 µM e **(E)** representação de todas as curvas**.** Cada valor de % de β-Hex representa a média ± desvio padrão de determinações em triplicata. A liberação espontânea de β-Hex está representada em preto. Análise de One-way ANOVA, seguido pelo teste de Dunett indicaram significância estatística de *P<0.05 e ** P<0.01 em relacão ao controle.

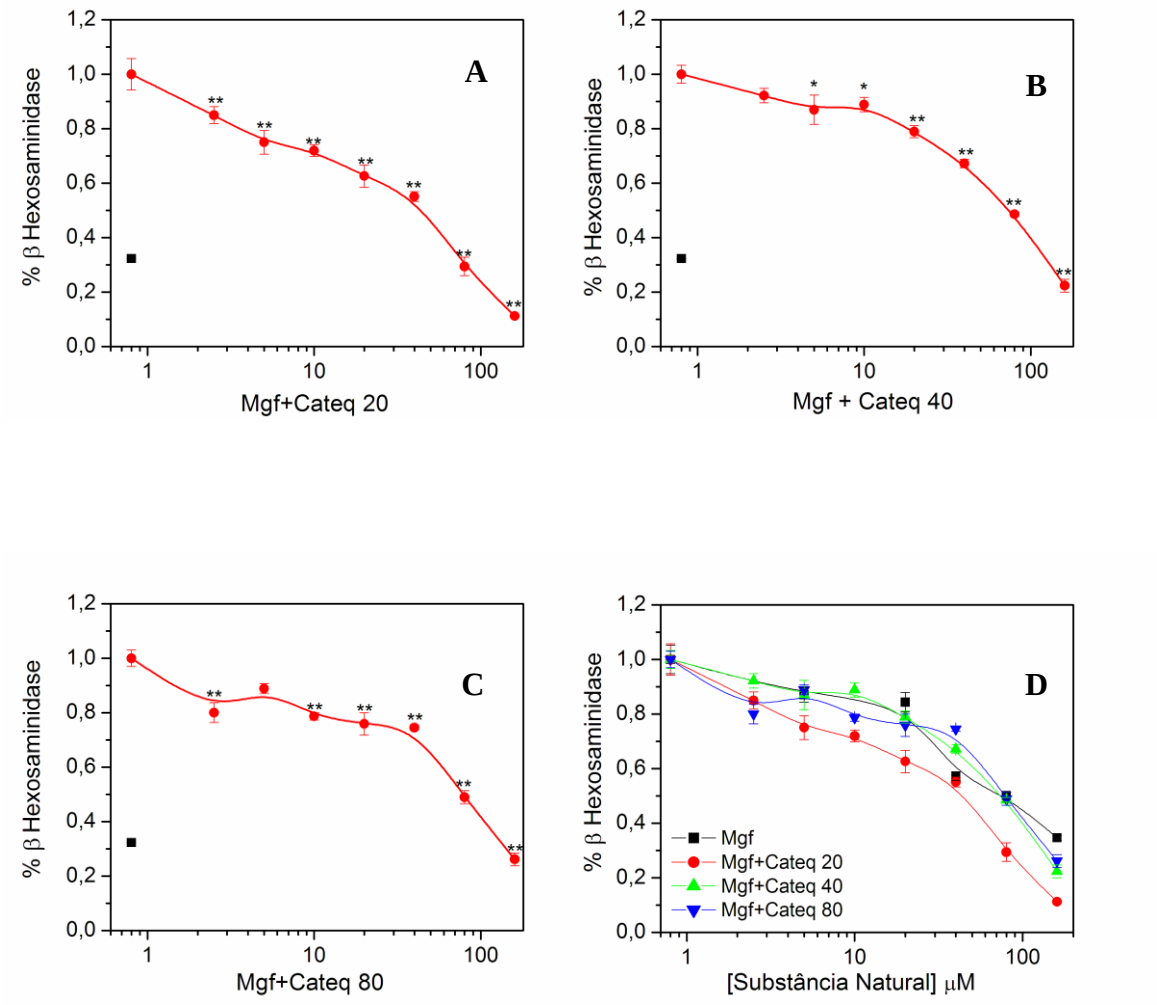


Figura 34. Liberação de β-hexosaminidase em mastócitos estimuladas pelo antígeno DNP-BSA (0,1 µg/mL) na presença de diferentes concentrações de mangiferina e concentrações fixas catequina: **(A)** cateq 20 µM, **(B)** cateq 40 µM, **(C)** cateq 80µM e **(D)** representação de todas as curvas**.** Cada valor de % de β-Hex representa a média ± desvio padrão de determinações em triplicata. A liberação espontânea de β-Hex está representada em preto. Análise de One-way ANOVA, seguido pelo teste de Dunett indicaram significância estatística de *P<0,05 e ** P<0,01 em relação ao controle.

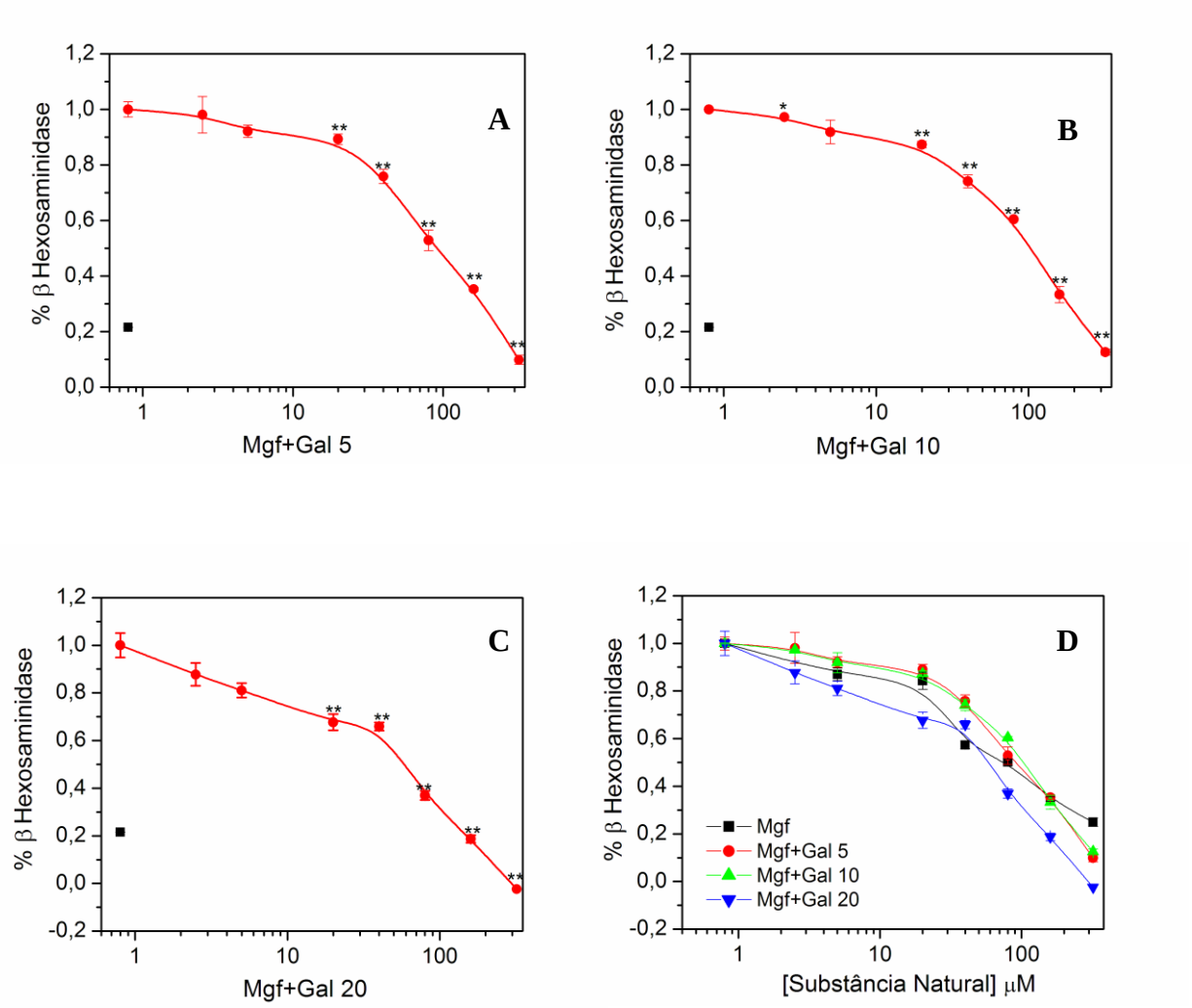


Figura 35. Liberação de β-hexosaminidase em mastócitos estimuladas pelo antígeno DNP-BSA (0,1 μg/mL) na presença de diferentes concentrações de mangiferina e concentrações fixas ácido gálico: **(A)** Gal 5 μM, **(B)** Gal 10 μM, **(C)** Gal 20μM e **(D)** representação de todas as curvas**.** Cada valor de % de β-Hex representa a média ± desvio padrão de determinações em triplicata. A liberação espontânea de β-Hex está representada em preto. Análise de One-way ANOVA, seguido pelo teste de Dunett indicaram significância estatística de *P<0,05 e ** P<0,01 em relação ao controle.

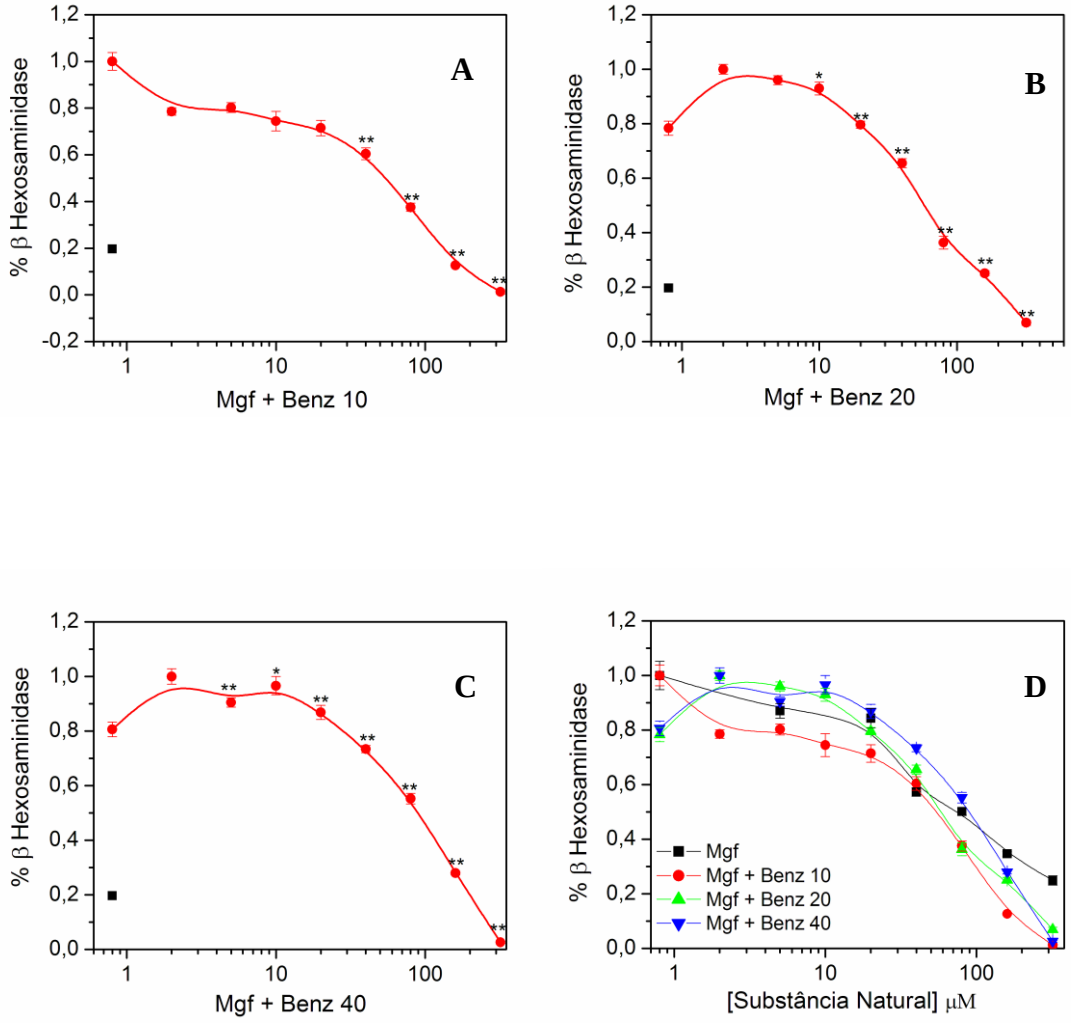


Figura 36. Liberação de β-hexosaminidase em mastócitos estimuladas pelo antígeno DNP-BSA (0,1 µg/mL) na presença de diferentes concentrações de mangiferina e concentrações fixas ácido benzóico: **(A)** Benz 10 µM, **(B)** Benz 20 µM, **(C)** Benz 40µM e **(D)** representação de todas as curvas**.** Cada valor de % de β-Hex representa a média ± desvio padrão de determinações em triplicata. A liberação espontânea de β-Hex está representada em preto. Análise de One-way ANOVA, seguido pelo teste de Dunett indicaram significância estatística de *P<0,05 e ** P<0,01 em relação ao controle.

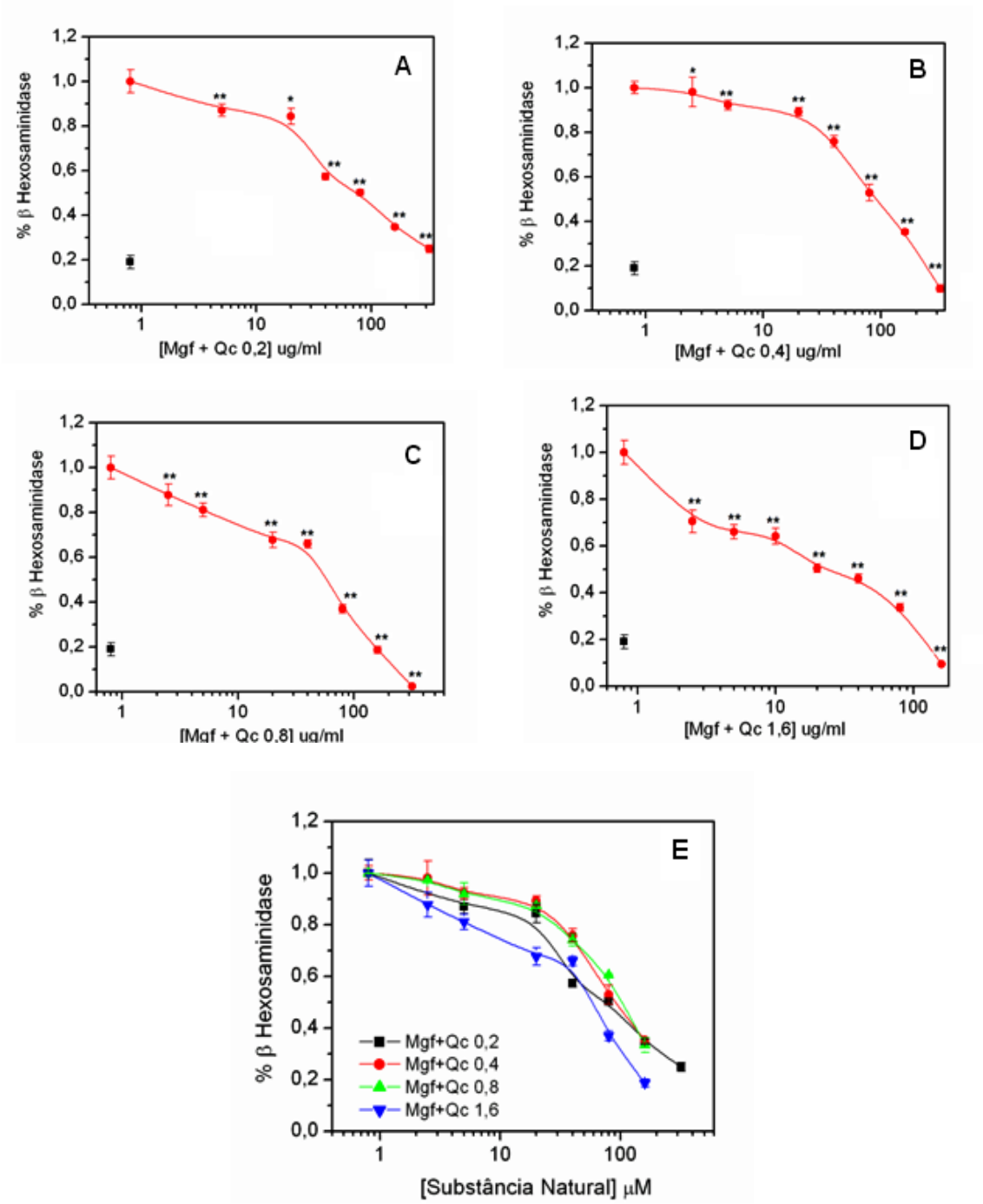


Figura 37. Liberação de β-hexosaminidase em mastócitos estimuladas pelo antígeno DNP-BSA (0,1 μg/mL) na presença de diferentes concentrações de mangiferina e concentrações fixas quercetina: **(A)** Qc 0,2 μM, **(B)** Qc 0,4 μM, **(C)** Qc 0,8μM e **(D)** Qc 1,6μM e **(E)** representação de todas as curvas**.** Cada valor de % de β-Hex representa a média ± desvio padrão de determinações em triplicata. A liberação espontânea de β-Hex está representada em preto. Análise de One-way ANOVA, seguido pelo teste de Dunett indicaram significância estatística de *P<0,05 e ** P<0,01 em relação ao controle.

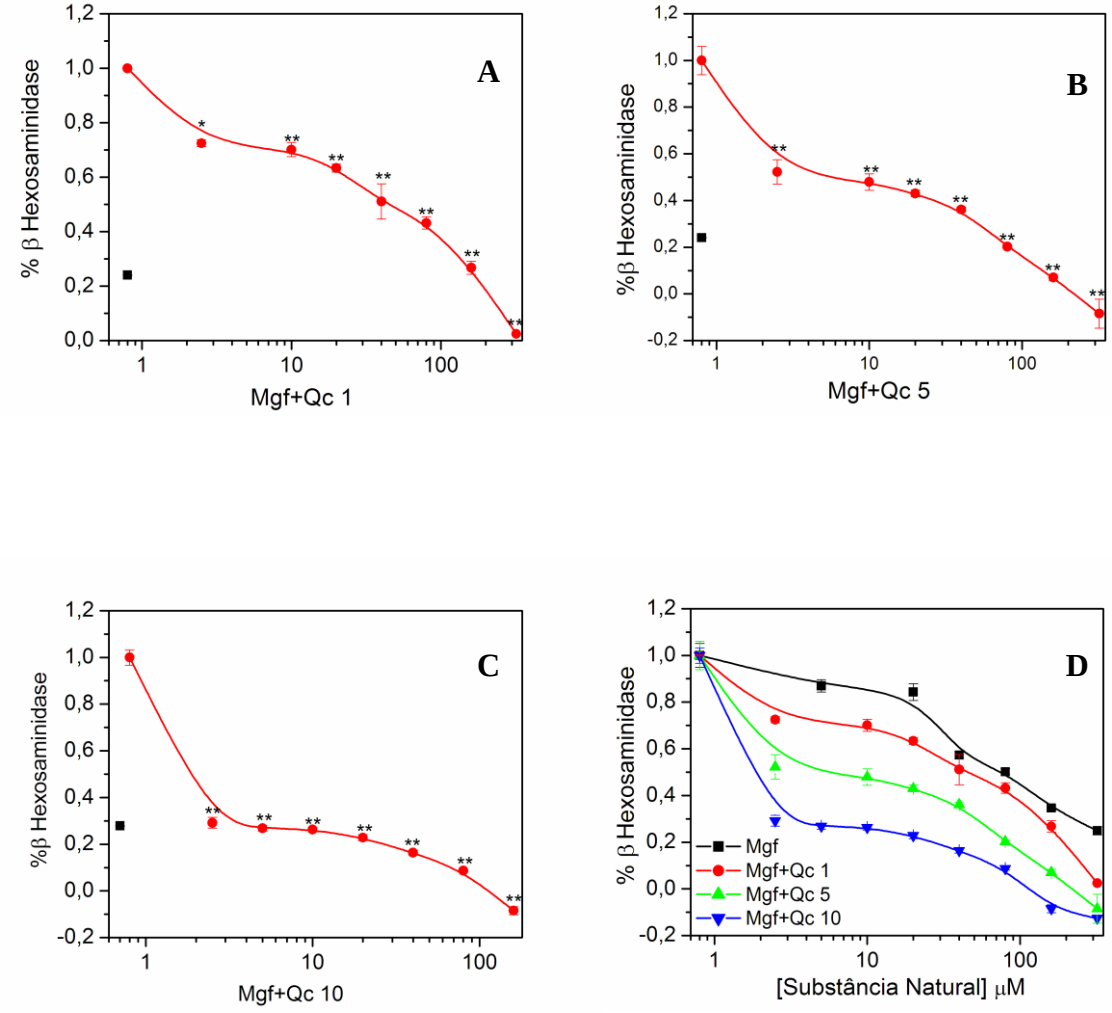


Figura 38. Liberação de β-hexosaminidase em mastócitos estimuladas pelo antígeno DNP-BSA (0,1 μg/mL) na presença de diferentes concentrações de mangiferina e concentrações fixas quercetina: **(A)** Qc 1 μM, **(B)** Qc 5 μM, **(C)** Qc 10μM e **(D)** representação de todas as curvas**.** Cada valor de % de β-Hex representa a média ± desvio padrão de determinações em triplicata. A liberação espontânea de β-Hex está representada em preto. Análise de One-way ANOVA, seguido pelo teste de Dunett indicaram significância estatística de *P<0,05 e ** P<0,01 em relação ao controle.

Os valores de CI_{50} obtidos para a quercetina, nas diferentes combinações dos demais componentes do Vimang, mostraram que a catequina (**Figura 39-A**) e o ácido gálico (**Figura 39-B**) aparentemente interferem de forma negativa na atividade antialérgica da quercetina, ao passo que a mangiferina contribui para o aumento da bioatividade. O ácido benzóico, embora não tenha mostrado atividade biológica quando testado isoladamente, tem um comportamento que interfere na bioatividade da quercetina de forma dependente da concentração, ou seja, a atividade antialérgica da quercetina diminui até a concentração de 10 µM de ácido benzóico e aumenta para as concentrações de 20 e 40 µM (**Figura 39-C**).

Para a mangiferina, as combinações com diversas doses do ácido gálico, ácido benzóico, catequina e quercetina levaram a comportamentos bem diferentes daqueles observados para a quercetina. Os resultados na **Figura 40 (A-D)** mostraram que a catequina, na concentração de 20 µM, aumenta a atividade antialérgica da mangiferina; no entanto, a partir dessa concentração não se nota nenhuma influência sobre a bioatividade desse flavonóide (**Figura 40-A**). Na presença do ácido gálico (**Figura 40-B**), observa-se uma diminuição da atividade até a concentração de 10 µM, a partir da qual ocorre redução no valor de CI_{50} e, portanto, uma interferência positiva na resposta de inibição da desgranulação. Na presença do ácido benzóico nota-se um aumento de atividade da mangiferina apenas nas concentrações de 20 e 40 µM (**Figura 40-C**). Finalmente, no ensaio biológico com a mangiferina, em presença de quercetina, houve um aumento consideravel da atividade antialérgica da mangiferina até a concentração de 5 µM, a partir da qual a interferência foi reduzida até chegar a um valor constante.

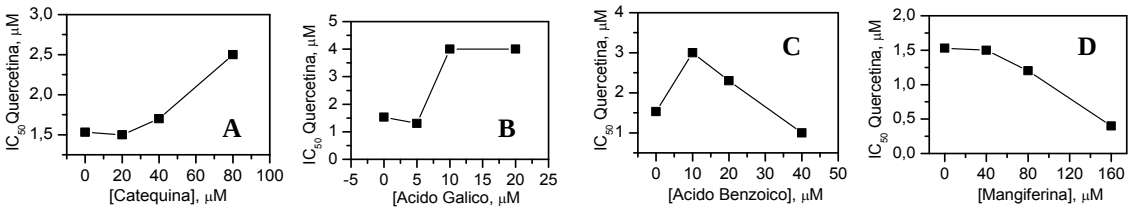


Figura 39. Gráficos de IC_{50} da quercetina obtidos a partir de combinações com diferentes concentrações fixas de catequina **(A)**; ácido gálico **(B)**; ácido benzóico **(C)** e mangiferina **(D).**

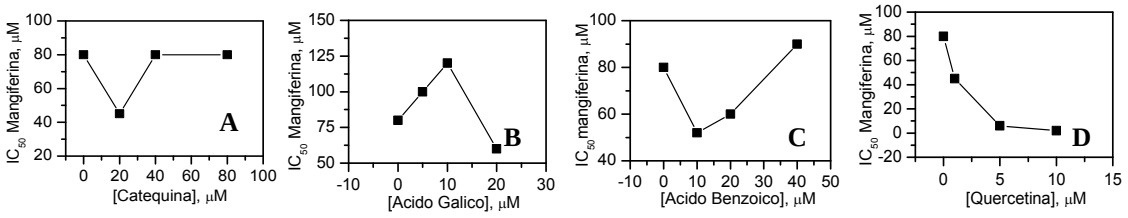


Figura 40. Gráficos de IC_{50} da mangiferina obtidos a partir de combinações com diferentes concentrações fixas de catequina **(A)**; ácido gálico **(B)**; ácido benzóico **(C)** e quercetina **(D).**

Os resultados nas **Figuras 39 e 40** sugerem que a atividade antialérgica da quercetina e mangiferina, comprovadamente bioativas, podem ser influenciadas pela presença de outras substâncias presentes no extrato, tais como catequina, ácido gálico e ácido benzóico. No entanto, como mencionado anteriormente, a constatação de sinergismo depende da construção de um isobolograma a partir da combinação de duas substâncias bioativas de interesse.

Neste estudo foram escolhidas para a construção do isobolograma, as duas substâncias que, de fato, mostraram atividade antialérgica, que são quercetina e mangiferina. Foram feitas 14 combinações com 7 doses de mangiferina e 7 doses de quercetina. Para a mangiferina foram empregadas as doses de 2,5, 5, 10, 20, 40, 80 e 160 µM, as quais foram combinadas com várias concentrações de quercetina. Para a quercetina foram usadas as doses de 0,2, 0,4, 0,8, 1, 1,6, 5 e 10 que foram combinadas, igualmente, com várias concentrações de mangiferina. As doses referentes aos valores de CI_{50} obtidos para cada fármaco aplicados isoladamente foram unidas gerando a isobole de aditividade como mostra a **Figura 41** (KRUSE *et al.*, 2006). Em torno da isobole de aditividade foram traçadas linhas unindo os intervalos de confiança (IC) bilaterais de 90 e 95% de cada um dos CI_{50} de quercetina e mangiferina isoladas, as

quais foram denominadas faixas de confiança. O isobolograma formado para a variavel beta-hexosaminidase traçada entre os valores de CI_{50} de quercetina e mangiferina está representado na **Figura 41**. As combinações nas quais foram usadas doses de quercetina iguais a 5 e 10 µM e dose de mangiferina igual a 160 µM foram excluídas por estarem muito acima da isobole de aditividade.

Segundo Mandalari e colaboradores (2010), os quais estudaram o sinergismo na atividade antimicrobiana de polifenóis provenientes de peles de amendoa, a interação antagonística entre duas substâncias pode ser o resultado de mecanismos tais como competição pelo sítio alvo ou inibição da captação celular desses compostos.

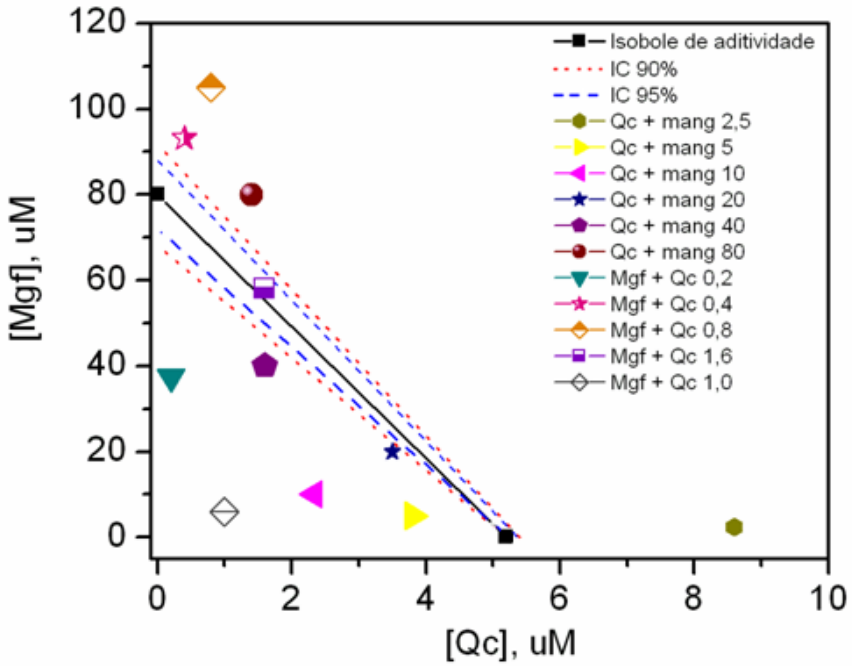


Figura 41. Isobolograma da variável β-hexosaminidase com os valores de dose necessária para obter 50 % de inibição da liberação de β-Hex (IC_{50}), obtidos de curvas de resposta às doses de quercetina e mangiferina, aplicadas isoladamete e em associação.

Analisando-se a quercetina combinada com proporções fixas de mangiferina, observa-se que as associações com mangiferina 5 (Qc+mang 5), 10 (Qc+mang 10), 20 (Qc+mang 20) e 40 (Qc+mang 40) permitim prever, com probabilidade maior que 90%,

que há sinergismo nessas combinações, já que os pontos encontram-se abaixo da isobole de aditividade e do Intervalo de Confiança de 90% (CI 90%). Para as concentrações 2,5 (Qc+mang 2,5) e 80 (Qc+mang 80) nota-se que as associações situam-se acima da Isobole de Aditividade resultando em antagonismo. Provavelmente, maiores concentrações de mangiferina atrapalham o sinergismo desta com a quercetina e concentrações muito baixas não são suficientes para exercer um efeito sinérgico.

Quando se compara a mangiferina combinada com proporções fixas de quercetina, as associações de 0,2 (Mgf + Qc 0,2) e 1 (Mgf + Qc 1) mostram-se sinérgicas com probabilidade maior que 90%. Para a combinação de 1,6 (Mgf + Qc 1,6), observa-se que o ponto resultante está situado em cima do Intervalo de Confiança de 95%, o que pode-se inferir para esta associação 95% de chance de haver sinergismo. Por outro lado, a associação de 0,4 (Mgf + Qc 0,4) e 0,8 (Mgf + Qc 0,8) mostram o efeito de antagonismo, com probabilidade maior que 90% de obtenção desta interação. Apesar do isobolograma não ter mostrado a existência de sinergismo nas associações de Mgf+Qc 0,4 e Mgf+Qc 0,8, as maiores concentrações de quercetina (Mgf + Qc 1 e Mgf + Qc 1,6) parecem melhorar a interação desta com a mangiferina e consequentemente a chance de sinergismo entre estas substâncias.

4.7. Inibição da atividade da enzima β-hexosaminidase

A inibição da atividade enzimática da β-hexosaminidase foi avaliada na presença das substâncias que inibiram o processo alérgico com a finalidade de investigar se a atividade observada ocorre devido à inibição da liberação da β-hexosaminidase (desgranulação mastocitária) ou devido à inibição da atividade da enzima. A **Figura 42 (A-B)** mostra o perfil de inibição da atividade da enzima β-hexosaminidase em função da concentração da mangiferina e quercetina as quais, como já mencionado, foram as substâncias mais ativas no ensaio de liberação enzimática. Para os compostos testados observa-se que a quercetina e mangiferina não mostraram inibição na faixa de concentração estudada (**Figura 42- A e B**).

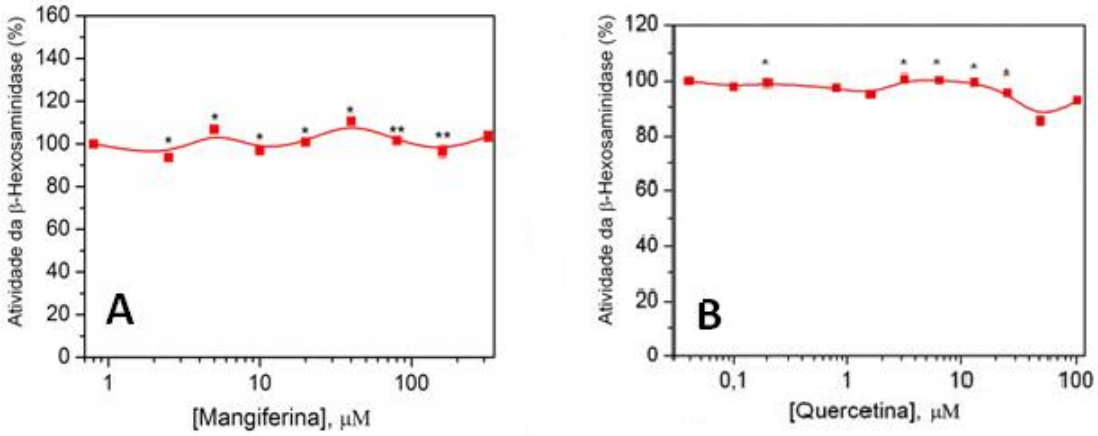


Figura 42. Efeito de presença dos flavonóides mangiferina **(A)** e quercetina **(B)** na atividade da enzima β-hexosaminidase. Análise de One-way ANOVA, seguido pelo teste de Dunett indicaram significância estatística de *P<0,05 e ** P<0,01 em relação ao controle.

4.8. Avaliação da viabilidade celular dos mastócitos na presença das substâncias de interesse

As substâncias naturais de interesse, mangiferina e quercetina, que inibiram a desgranulação mastocitária, foram submetidas ao ensaio do MTT para verificar a toxicidade para as células RBL-2H3.

O ensaio colorimétrico do MTT foi desenvolvido por Mosmann e colaboradores (MOSMANN *et al.*, 1983) para a avaliação da proliferação e viabilidade celulares. O método consiste na medida da atividade de redutases mitocondriais hábeis para reduzir a molécula de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium) em formazan. A redução da molécula de MTT só acontece em células vivas quando as enzimas mitocondriais

estão ativas, o que permite utilizar o ensaio como um índice de viabilidade celular. As

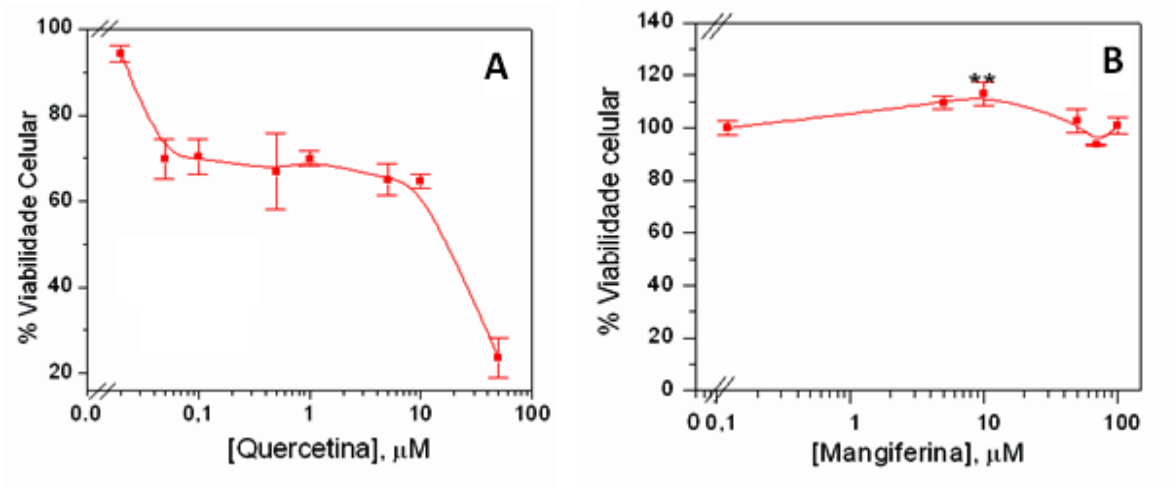


Figura 43. Viabilidade celular de mastócitos da linhagem RBL-2H3, na presença de diferentes concentrações da quercetina **(A)** e mangiferina **(B).** Cada valor representa a média ± desvio padrão de determinações em triplicata. Análise de One-way ANOVA, seguido pelo teste de Dunett indicaram significância estatística de *P<0,05 e ** P<0,01 em relação ao controle.

4.9. Avaliação da atividade antialérgica da mangiferina livre e incorporda em lipossomos de DMPC: comparação dos métodos da injeção etanólica e filme lipídico

O efeito de lipossomos de DMPC contendo, ou não, a mangiferina sobre a desgranulação de mastócitos estimulados por antígeno foi investigado através da quantificação da enzima β-hexosaninidase, como já mencionado. Os lipossomos foram inicialmente preparados pelo método da injeção etanólica, em tampão de Tyrode, pH 7,4, na proporção DMPC:colesterol (9:1), os quais resultaram em maior eficiência de incorporação da mangiferina (~17%).

Os resultados na **Figura 44** mostram que os lipossomos vazios, independente da concentração empregada, não causam mudanças significativas na desgranulação dos mastócitos, sugerindo que estes agregados, não inibem a desgranulação ou a fluorescência da metilumbeliferona produzida pela ação da enzima β-hexosaminidase.

Estes resultados foram comparados com o controle positivo de estímulo celular para o qual as células são estimuladas pelo antígeno (DNP-BSA) na ausência de inibidores.

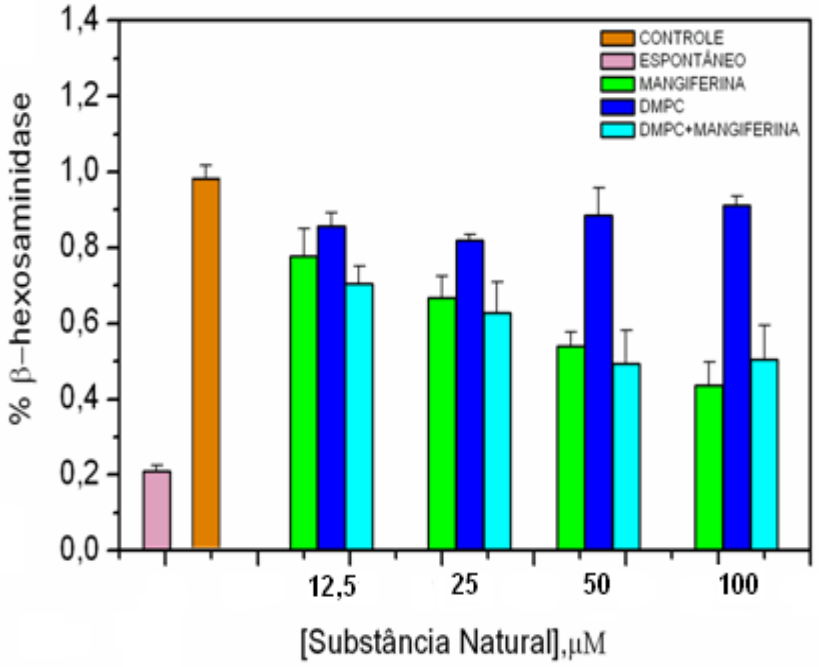


Figura 44. Perfil representativo do efeito de lipossomos de DMPC:colesterol (9:1), preparados pelo método da injeção etanólica, na liberação da desgranulação de mastócitos estimulados por antígeno (DNP-BSA 0,1 µg/mL).

A presença da mangiferina inibe a desgranulação dos mastócitos de forma concentração-dependente; no entanto, a presença de lipossomos não altera significativamente esse perfil. Este resultado pode ser explicado pela baixa eficiência de incorporação da mangiferina em lipossomos preparados pelo método da injeção etanólica. Segundo alguns autores, a forma de preparação interfere na eficiência de incorporação a qual deve ser alta o suficiente para garantir a liberação de uma quantidade da droga suficiente para promover seu efeito terapêutico (NEW, 1997; LANDI-LIBRANDI, *et al*., 2011). Se a eficiência de incorporação é baixa espera-se que não haja mudança significativa na bioatividade do fármaco. Por outro lado, sabe-se que flavonóides previnem a peroxidação lipídica de lipossomos (ARORA *et al*., 1998; OTEIZA *et al*., 2005) e o fato de ter havido associação da mangiferina com os lipossomos de

DPMC, mesmo em pequena porcentagem, sem interferência na bioatividade pode ser visto como uma vantagem na preparação de formulações mais estáveis para aplicações da mangiferina em tratamentos diversos.

Como a mangiferina é um flavonóide glicosilado, com uma carga monoaniônica quando em pH fisiológico, espera-se que esta esteja associada na interface aquosa do lipossomo, sem prejuízo de sua bioatividade. Esta hipótese, bem como os comentários acima levaram-nos a modificar a forma de preparação dos lipossomos, cujos agregados foram preparados pelo método do filme lipídico mantendo-se a proporção DMPC:colesterol (9:1) como adotado no método da injeção etanólica.

A eficiência de incorporação obtida foi de 45%, ou seja, consideravelmente maior do que aquela observada para lipossomos preparados pelo método da injeção etanólica (EI = 17 %). Os resultados de potencial antialérgico da mangiferina, na ausência ou presença dos lipossomos **(Figura 46)**, foram comparados ao controle positivo de estímulo celular como adotado no método da injeção etanólica. Em baixa concentração de mangiferina, igual a 12,5 μM, não há inibição da desgranulação. Para a concentração de 25 μM nota-se que o lipossomo impede a ação do bioativo; no entanto em altas concentrações, ou seja, em 50 e 100 μM, observa-se o aumento significativo do potencial anti-alérgico da mangiferina. Este resultado reforça a influência positiva de carreadores, tais como lipossomos no aumento da biodisponibilidade de compostos pouco solúveis.

A influência positiva dos lipossomos na atividade antialérgica da mangiferina foi maior para lipossomos preparados pelo método do filme lipídico onde foi observada a maior eficiência de incorporação. Esses resultados abrem perspectivas de novos estudos acerca destes agregados na busca de sistemas lipossomais mais estáveis, com maior eficiência de incorporação e que possam ser aplicados em ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo*.

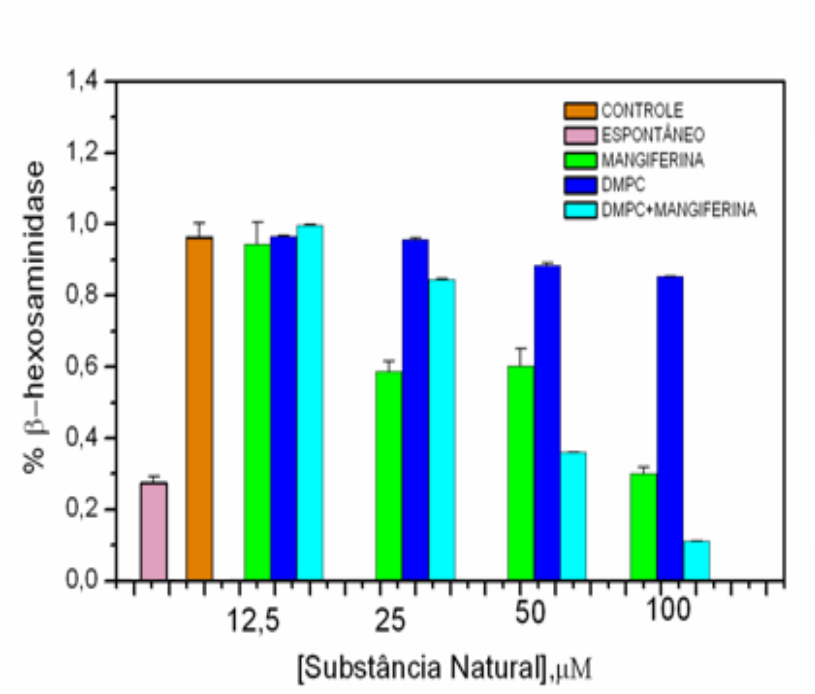


Figura 45. Perfil representativo do efeito de lipossomos de DMPC, carregados com mangiferia, na liberação da desgranulação de mastócitos estimulados por antígeno (DNP-BSA 0,1 μg/mL) preparados pelo método do filme lipídico.

5. CONCLUSÃO

O presente trabalho visou avaliar o potencial anti-alérgico do extrato Vimang e o sinergismo entre seus componentes (mangiferina, quercetina, catequina, ácido gálico e ácido benzóico) bem como o efeito de lipossomos de DMPC na bioatividade da mangiferina, o componente majoritário do referido extrato. Foram avaliados o efeito do pH, força iônica e composição lipídica na estabilidade lipossomal e eficiência de incorporação da mangiferina em lipossomos preparados pelo método da injeção etanólica. Os potenciais anti-alérgicos da mangiferina livre e incorporada em lipossomos foram avaliados considerando dois métodos distintos de preparação dos lipossomos, os métodos da injeção etanólica e filme lipídico.

O extrato Vimang inibe consideravelmente a desgranulação dos mastócitos. Entre os componentes deste extrato, apenas a quercetina e a mangiferina são potencialmente ativas. Os demais componentes do Vimang, tais como catequina, ácido gálico e ácido

benzóico, não inibem a desgranulação e porisso não foram incluídos na determinação do isobolograma de aditividade, o qual depende do CI_{50} de substâncias bioativas bem como das associações entre elas.

A construção do isobolograma de aditividade baseado no potencial anti-alérgico da quercetina e mangiferina, mostra grande probabilidade de sinergismo para as associações com mangiferina 5 μM (Qc+mang 5), 10 μM (Qc+mang 10), 20 μM (Qc + mang 20) e 40 μM (Qc+mang 40); e quercetina 0,2 μM (Mgf + Qc 0,2), 1 μM (Mgf + Qc 1) e 1,6 μM (Mgf + Qc 1,6). Por outro lado, o isobolograma aponta para a existência de antagonismo na associação com mangiferina 80 μM (Qc+mang 80) e quercetina 0,4 μM (Mgf+Qc 0,4) e 0,8 μM (Mgf+Qc 0,8). Com base nesses resultados, é possível afirmar que altas concentrações de mangiferina atrapalham a interação sinérgica entre estas substâncias e altas concentrações de quercetina exercem um efeito contrário, ou seja, contribuem para o sinergismo entre quercetina e mangiferina.

Os resultados para a incorporação da mangiferina em lipossomos de DMPC mostram que o pH influencia a eficiência de incorporação da mangiferina a qual é consideravelmente maior em pHs ácidos em função da maior hidrofobicidade da molécula, a qual assume a forma neutra em pHs menores do que 6,5. Em soluções de pH ácido, ou fisiológico, observa-se aumento de tamanho do lipossomo na presença da mangiferina, o que reforça a hipótese de que a molécula do flavonóide interage com os lipossomos e perturba a bicamada lipídica, levando à um processo de agregação das vesículas lipossomais. Além disso, independente da presença de mangiferina, o pH influencia a carga superficial do lipossomo cujo potencial zeta aumenta com o pH, chegando à valores próximos de zero, contribuindo para a menor estabilidade do agregado.

O aumento da força iônica, na ausência da mangiferina, diminui a estabilidade do lipossomo, um resultado justificado pela redução da repulsão eletrônica entre as cabeças de grupo dos lipídios, as quais podem estar mais próximas umas das outras, favorecendo a agregação. Na ausência de sal, a mangiferina favorece a formação de agregados e diminui a estabilidade dos lipossomos. Na presença de sal, esse comportamento é

invertido, ou seja, a mangiferina passa a ter um papel de prevenção da agregação e estabilização dos agregados lipossomais. Esses resultados podem ser interpretados pela associação de íons à porção fosfatidilcolina dos lipídios ou, ainda, às mudanças conformacionais nas cabeças de grupo dos lipídios, induzidas pela presença de sal e mangiferina, os quais influenciam o potencial zeta e consequentemente a estabilidade lipossomal.

A eficiência de incorporação da mangiferina nos liposomos de DMPC preparados pelo método da injeção etanólica, em pH fisiológico, foram ao redor de 13%, considerados baixos para aplicações biológicas. A tentativa de otimizar a eficiência de incorporação foi realizada pela adição de colesterol em diferentes proporções lipídio:colesterol. Um aumento discreto de 13% para 17% foi observado para a proporção DMPC:colesterol (9:1) e essa composição lipídica foi adotada nos experimentos de bioatividade.

A mangiferina livre inibe a desgranulação dos mastócitos de forma concentração-dependente; no entanto, a presença de lipossomos, preparados pelo método da injeção etanólica, não altera significativamente esse perfil. Este resultado pode ser explicado pela baixa eficiência de incorporação da mangiferina em lipossomos preparados por esse método. Se a eficiência de incorporação é baixa espera-se que não haja mudança significativa na bioatividade do fármaco. Por outro lado, sabe-se que flavonóides previnem a peroxidação lipídica de lipossomos e o fato de ter havido associação da mangiferina com os lipossomos de DPMC, sem interferência na bioatividade, pode ser visto como uma vantagem na preparação de formulações mais estáveis para aplicações da mangiferina em tratamentos diversos.

A eficiência de incorporação da mangiferina em lipossomos de DMPC:colesterol (9:1), preparados pelo método do filme lipídico, foi igual a 45 % e consideravelmente maior do que aquela obtida pelo método da injeção etanólica (EI=17%).

Os resultados de potencial antialérgico mostraram que os lipossomos de DMPC, preparados pelo método do filme lipídico, favorecem o potencial antialérgico da mangiferina em concentrações acima de 25 μM, onde nota-see menor solubilidade do

fármaco. Este resultado corrobora com a hipótese de que carreadores aumentam a biodisponibilidade de fármacos e consequentemente o desempenho de bioensaios. Tais resultados abrem perspectivas para novos estudos onde sejam explorados sistemas lipossomais mais estáveis com maior eficiência de incorporação da mangiferina.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K., A. H. LICHTMAN, *et al*. (2008). Imunologia celular e molecular. Rio de Janeiro, Elsevier Medicina.

AGNIESZKA Z. WILCZEWSKA, KATARZYNA NIEMIROWICZ, *et al*. Nanoparticles as drug delivery systems. Pharmacol Rep 64(5): 1020-1037. 2012

AKETANI, S., TESHIMA, R., UMEZAWA, Y., SAWADA, J. Correlation between cytosolic calcium concentration and degranulation in RBL-2H3 cells in the presence of various concentrations of antigen-specific IgEs. Immunology Letters,75: 185-189, 2001.

ALEXANDRAKIS, M., L. SINGH*, et al.* Differential effect of flavonoids on inhibition of secretion and accumulation of secretory granules in rat basophilic leukemia cells. International Journal of Immunopharmacology, 21(6): 379-390, 1999.

ALEXOPOULOU, E., A. GEORGOPOULOS*, et al.* Preparation and characterization of lyophilized liposomes with incorporated quercetin. Journal of Liposome Research, 16(1): 17-25, 2006.

ANDERSEN, C. L., T. K. KRISTENSEN, *et al*. Systemic mastocytosis--a systematic review. Dan Med J 59(3): A4397, 2012.

AREIAS, F. M., A. C. REGO*, et al.* Antioxidant effect of flavonoids after ascorbate/Fe2+-induced oxidative stress in cultured retinal cells. Biochemical Pharmacology, 62(1): 111-118, 2001.

ARORA, A., M. G. NAIR*, et al.* Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. Archives of Biochemistry and Biophysics, 356(2): 133-141, 1998.

BAEAE, Y., S. LEEA, *et al*. Chrysin suppresses mast cell-mediated allergic inflammation: Involvement of calcium, caspase-1 and nuclear factor-κB. Toxicology and Applied Pharmacology 254: 56-64, 2011.

BAKER, D. D. e K. A. ALVI. Small-molecule natural products: new structures, new activities. Current Opinion in Biotechnology, 15(6): 576-583, 2004.

BARENHOLZ, Y., C. BOMBELLI, *et al*. Influence of lipid composition on the thermotropic behavior and size distribution of mixed cationic liposomes. Journal of Colloid and Interface Science 356(1): 46-53, 2011.

BARSUMIAN, E. L., C. ISERSKY*, et al.* Ige-Induced Histamine-Release from Rat Basophilic Leukemia-Cell Lines - Isolation of Releasing and Non-Releasing Clones. European Journal of Immunology, 11(4): 317-323, 1981.

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

BASSO, L. G. M., R. Z. RODRIGUES, *et al*. Effects of the antimalarial drug primaquine on the dynamic structure of lipid model membranes. Biochimica et Biophysica Acta 1808: 55–64, 2011.

BATISTA, C. M., C. M. CARVALHO*, et al.* Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 43(2): 167-179, 2007.

BETAGERI, G. V., and PARSONS, D. L. Drug encapsulation and release from multilamellar and unilamellar liposomes. Int. J. Pharm., 81(2-3): 235–241, 1992.

BRITTES, J., M. LÚCIO, *et al*. Effects of resveratrol on membrane biophysical properties: relevance for its pharmacological effects. Chemistry and Physics of Lipids 163(8): 747-754, 2006.

BOLDI, A. M. Libraries from natural product-like scaffolds. Current Opinion in Chemical Biology, 8(3): 281-286, 2004.

BUSSE, W.W. Mechanisms and advances in allergic diseases. The Journal of Allergy and Clinical Immunology,105: 593-S598, 2000.

CAMBIER, J. C. New nomenclature for the Reth motif (or RH1/TAM/ARAM/YXXL). Immunology Today, 16: 110, 1995.

CAMELO-NUNES, I. C. New antihistamines: a critical view. J Pediatr 82(5 Suppl): S173-180, 2006.

CASALS, E., A. M. GALÁN, *et al.* Physical stability of liposomes bearing hemostatic activity.Chem Phys Lipids. 125(2): 139-146, 2003

CASTELLI, F., G. GIAMMONA, *et al*. Macromolecular prodrug interaction with mixed lipid membrane. A calorimetric study of naproxen linked to polyaspartamide interacting with phosphatidylcholine and phosphatidylcholine-phosphatidic acid vesicles. International Journal of Pharmacy 70: 43-52, 1991.

CHAUDHURI, S., A. BANERJEE*, et al.* Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: Antioxidant and antihemolytic effects. International Journal of Biological Macromolecules, 41(1): 42-48, 2007.

CHAUDHURI, S., K. BASU*, et al.* Ground- and excited-state proton transfer and antioxidant activity of 3-hydroxyflavone in egg yolk phosphatidylicholine liposomes: absorption and fluorescence spectroscopic studies. Luminescence, 23(6): 397-403, 2008.

CHAUDHURI, S., B. PAHARI, *et al*. Binding of the bioflavonoid robinetin with model membranes and hemoglobin: Inhibition of lipid peroxidation and protein glycosylation. J Photochem Photobiol B 98(1): 12-19. 2010.

CIARA KELLY, CAROLINE JEFFERIES, *et al*. Targeted Liposomal Drug Delivery to Monocytes and Macrophages. Journal of Drug Delivery. 2011.

CRIADO, P. R., R. F. J. CRIADO, *et al*. Histamine, histamine receptors and antihistamines: new concepts. An Bras Dermatol. 85(2): 195-210, 2010.

CURTIS, J. R., A. JOHN, *et al.* Dyslipidemia and changes in lipid profiles associated with rheumatoid arthritis and initiation of anti-tumor necrosis factor therapy. Arthritis Care Res (Hoboken) 64(9): 1282-1291, 2012

DAY A.J., CANADA F.J., *et al*. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. FEBS Lett. 468(2-3): 166-170, 2000.

DAY,A.J., GEE, J.M., *et al*. “Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4′-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter.” Biochemical Pharmacology 65(7):1199–1206,2003.

DE OLIVEIRA, C. A., A. E. H. MACHADO*, et al.* Preparation of 100 nm diameter unilamellar vesicles containing zinc phthalocyanine and cholesterol for use in photodynamic therapy. Chemistry and Physics of Lipids, 133 (1): 69-78, 2005.

DEMO, S. D., MASUDA, E., ROSSI, A. B., THRODSET, A. B., GERARD, A. L., CHAN, E. H., ARMSTRONG, R. J., FOX, B. P., LORENS, J. B., PAYAN, D. G., SHCELLER, R.

H., FISHER, J. M. Quantitative measurement of mast cell degranulation using a novel flow cytometric annexin-V binding assay. Cytometry, .36 (4): 340-348, 1999.

DICK, C. V., A. J. M. DRIESSEN, *et al*. The uncoupling efficiency and affinity of flavonoids for vesicles. Biochemical Pharmacology 60: 1593-1600, 2000.

DUANG, X., Q. WANGA, *et al*. Mangiferin: A possible strategy for periodontal disease to therapy. Medical Hypotheses 76(4): 486-488, 2011.

DURICK, K.; NEGULESCO, P. Cellular biosensors for drug discovery. Biosensors & Biolelectronics, 16: 587-592, 2001.

Dynamic Light Scattering, Disponível em www.malvern.co.uk. Acesso em julho de 2011.

ERLUND, I.Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. Nutr. Res 24: 851–874, 2004.

FALLON, M. and CHAUHAN, A. Sequestration of amitriptyline by liposomes. J. Collid Interface Sci., 300:7-19, 2006.

FARR, M.; BOLD, K. *et al*., Significance of the hydrogen ion concentration in synovial fluid in rheumatoid arthritis. Clin. Rxp. Rheumatol., 3: 99-104, 1985.

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, .48: 569-574, 1999.

FATOUROS, D. G., K. HATZIDIMITRIOU, *et al*. Liposomes encapsulating prednisolone and prednisolone-cyclodextrin complexes: comparison of membrane integrity and drug release. Eur J Pharm Sci. 13(3): 287-296, 2001.

FERREIRA, H., LÚCIO M, *et al*. Partition and location of nimesulide in EPC liposomes: a spectrophotometric and fluorescence study. Analytical and Bioanalytical Chemistry 377(2): 293-298, 2003.

FLORENCE, A. T., ATTWOOD, D. Emulsões, suspensões e dispersões. Princípios fisico-químicos em farmácia. 3 ed. São Paulo: Editora da Universidadede São Paulo, Cap. 7, p. 345-411, 2003.

FRACETO, L. F. e E. DE PAULA. Ineração de anestésicos locais com lipossomos determinada por espectroscopia de infravermelho. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 27(1): 27-35, 2006.

FRACETO, L. F., L. D. A. PINTO*, et al.* Spectroscopic evidence for a preferential location of lidocaine inside phospholipid bilayers. Biophysical Chemistry, 99(3): 229-243, 2002.

FRANK, J., A. BUDEK, *et al*. Dietary flavonoids with a catechol structure increase alpha-tocopherol in rats and protect the vitamin from oxidation in vitro. J Lipid Res. 47(12): 2718-2725, 2006.

FRÉZARD, F., D. A. SCHETTINI, *et al*. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. Química Nova 28(3): 511-518, 2005.

GABRIELSKA, J., M. SOCZYNSKA-KORDALA*, et al.* Antioxidative effect of quercetin and its equimolar mixtures with phenyltin compounds on liposome membranes. Journal of Agricultural and Food Chemistry,54(20): 7735-7746, 2006.

GARCÍA-RIVERA, D., R. DELGADO, *et al*. Gallic acid indanone and mangiferin xanthone are strong determinants of immunosuppressive anti-tumour effects of Mangifera indica L. bark in MDA-MB231 breast cancer cells. Cancer Letters 305: 21–31, 2011.

GARCIA-MANYES, S., G. ONCINS, *et al*. Effect of pH and ionic strength on phospholipid nanomechanics and on deposition process onto hydrophilic surfaces measured by AFM. Electrochimica Acta 51(24): 5029-5036, 2006.

GILLET, A., A. GRAMMENOS*, et al.* Development of a new topical system: Drug-in-cyclodextrin-in-deformable liposome. International Journal of Pharmaceutics, 380(1-2): 174-180, 2009.

GOLDSBY, R., KINDT ,T. E OSBORNO ,B. Kuby Imunologia. 4a ed. Editora Revinter, 2002.

GÓMEZ-ZALETA, B., M. T. RAMÍREZ-SILVA, *et al.* UV/vis, 1H, and 13C NMR spectroscopic studies to determine mangiferin pKa values. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 64(4): 1002-1009, 2006

GORDON, M. H. and A. ROEDIG-PENMAN. Antioxidant activity of quercetin and myricetin in liposomes. Chem Phys Lipids 97(1): 79-85, 1998.

GLUSSKER, J. P. and M. ROSSI. Molecular aspects of chemical carcinogens and bioflavonoids. Plant flavonoids in Biology and Medicine (Eds Cody V., Middleton E. Jr. and Harborne, J. B. 213: 395-410, 1986.

GRANBERG, M., C. J. FOWLER*, et al.* 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, 364(1): 66-73, 2001.

GREGORIARDIS, G. Liposome preparation and related techniques, Informa Healthcare. 2007

HALLING, K.K.; RAMSTEDT, B. et al., Cholesterol Interactions with Fluid-Phase Phospholipids: Effect on the Lateral Organization of the Bilayer. Biophysics Journal 95(8): 11, 2008.

HAWRYLOWICZ, C. e K. RYANNA. BENCH TO BEDSIDE The early beginnings. Nature Medicine, 16(3): 274-275, 2010.

HATTORI, Y., S. SUZUKI, et al. The role of dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) in targeted gene delivery with mannosylated cationic liposomes via intravenous route. J Control Release 108(2-3): 484-495, 2005.

HERNÁNDEZ, V. A. and F. SCHOLZ. The lipid composition determines the kinetics of adhesion and spreading of liposomes on mercury electrodes. Bioelectrochemistry 74(149-156), 2008.

HIDALGO, M., C. SANCHEZ-MORENO*, et al.* Flavonoid-flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. Food Chemistry,121(3): 691-696, 2010.

HILLAREAU, H. e P. COUVREUR. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. Cellular and Molecular Life Sciences, 66(17): 2873-2896, 2009.

HIROYUKI K., AMI I., *et al*. Effects of single therapeutic doses of promethazine, fexofenadine and olopatadine on psychomotor function and histamine-induced wheal- and flare-responses: a randomized double-blind, placebo-controlled study in healthy volunteers. Arch Dermatol Res. 304(4): 263-272, 2012.

HOFFMANN, A., JAMIN, A., FOESTISCH, K., MAY, S., AULEPP, H., HAUSTEIN, D., VIETHS, S. Determination of the allergenic activity of birch pollen and apple prick test solutions by measurement of beta- hexosaminidase release from RBL-2H(3) cells. Comparison with classical methods in allergen standardization. Allergy, 54: 446-454, 1999.

HOLGATE, S. T. e R. POLOSA. Treatment strategies for allergy and asthma. Nature 8: 218-230. 2008.

HOLGATE, S. T. e R. POLOSA. The mechanisms, diagnosis, and management of severe asthma in adults.Lancet 368(9537): 780-793. Review, 2006.

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

HOLOWKA D., D. SIL*, et al.* Insights into immunoglobulin E receptor signaling from structurally defined ligands. Immunological Reviews, 217: 269-279, 2007.

HOLOWKA D. & METZGER, H. Further characterization of the beta-component of the receptor for immunoglobulin E. Molecular immunology,19: 219-227, 1982.

HU, Z. Q., W. H. ZHA*, et al.* Epigallocatechin gallate synergistically enhances the activity of carbapenems against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 46(2): 558-560, 2002.

IBIAPINA, C. C., E. S. C. SARINHO*, et al.* Rinite alérgica: aspectos epidemiológicos, diagnósticos e terapêuticos. Jornal Brasileiro de Epidemiologia, 34(4): 230-240, 2008.

IBRAHIM, A. R. and Y. J. ABUL-HAJ. Microbiological transformation of (+/-)-flavanone and (+/-)-isoflavanone. J. Nat. Prod 53: 644–656, 1990.

JAHDE, E. and RAJEWSKI, M.F., Tumour-selective modification of cellular microenvironments in vivo: effect of glucose infusion on the pH in normal and malignant rat tissues. Cancer Res., 42: 15050-1512, 1982.

JI, H. F., X. J. LI*, et al.* Natural products and drug discovery Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia? Embo Reports, 10(3): 194-200, 2009.

JOHNSTON M. J. W., G. K. EDWARD, *et al*. Influence of drug-to-lipid ratio on drug release properties and liposome integrity in liposomal doxorubicin formulations. J Liposome Res 18(2): 145-157. 2008.

JULLIAN, C., L. MOYANO*, et al.* Complexation of quercetin with three kinds of cyclodextrins: An antioxidant study. Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, .67: 230-234, 2007.

KANCHEVA, V. D., P. V. BORANOVA*, et al.* Structure-activity relationships of new-hydroxy bis-coumarins as radical scavengers and chain-braking antioxidants. Biochimie, p.1-9, 2010.

KAWA, T., TAKEDA, K., HARADA, S., HATTA, T., MORIGUCHI, J., MIKI, S., MORIMOTO, S., ITOH, H., NAKATA, T., SASAKI, S., NAKAHAWA, M. The role of the hypothalamic nitric oxide in the pressor responses elicited by acute environmental stress in awake rats. Life Sciences, 72: 2427-2428. 2003.

KEEGAN, A. D. and W. E. PAUL. Multichain immune recognition receptors: similarities in structure and signaling pathways. Immunol Today 13(2): 63-68, 1992

KINGSTON, D. G. I. e D. J. NEWMAN. Mother nature's combinatorial libraries; their influence on the synthesis of drugs. Current Opinion in Drug Discovery & Development, 5(2): 304-316, 2002.

KUPCZYK, M., T. HAAHTELA*, et al.* Reduction of asthma burden is possible through National Asthma Plans. Allergy, .65(4): 415-419, 2010.

KLYNENKO, A. S., G. DUPORTAIL, *et al*. Bimodal distribution and fluorescence response of environment-sensitive probes in lipid bilayers. Biophys Journal 86: 2929-2941, 2004.

KRANEVELD, A. D., S. SAGAR, *et al*. The two faces of mast cells in food allergy and allergic asthma: The possible concept of Yin Yang. Biochimica et Biophysica Acta,1822: 93–99, 2012.

KRUSE, N. D., R. A. VIDAL, *et al*. Curvas de resposta e isobolograma como forma de descrever a associação de herbicidas inibidores do fotossistema II e da síntese de carotenóides. Dose-response curve and isobolograma used to describe the mixture of herbicides inhibitors of the photosystem II and carotenoid Synthesis. Planta Daninha 24(3): 579-587, 2006.

LANDI-LIBRANDI, A. P., C. A. d. OLIVEIRA, *et al*. In vitro evaluation of the antioxidant activity os lipossomal flavonols by the HRP-H2O2-luminol system. Journal of Microemcapsulation 28(4): 258-267, 2011.

LARIONOVA, N. I., D. DUCHENE*, et al.* Development of micro- and nanosystems for drug delivery. Russian Journal of General Chemistry, 78(11): 2220-2229, 2008.

LASIC, D. D. Novel applications of liposomes. Trends Biotechnol 16(7): 307-321, 1998

LEHNINGER, A.L. *et al*. Princípios de bioquímica. São Paulo: SARVER. 2000.

LEHTONEN, J. Y., H. ADLERCREUTZ, *et al*. Binding of daidzein to liposomes. Biochim Biophys Acta 1285: 91-100, 1996

LIAO, K. and M. YIN. Individual and combined antioxidant effects of seven phenolic agents in human erythrocyte membrane ghosts and phosphatidylcholine liposome systems: importance of the partition coefficient. J Agric Food Chem. 48(6): 2266-2270, 2000.

LIANG, R., R. M. HAN*, et al.* Baicalin in Radical Scavenging and Its Synergistic Effect with beta-Carotene in Antilipoxidation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(15): 7118-7124, 2009.

LIRA, M. C. B., M. S. FERRAZ*, et al.* Inclusion complex of usnic acid with beta-cyclodextrin: characterization and nanoencapsulation into liposomes. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 64(3-4):215-224. 2009.

LONDOÑO-LONDOÑO, J., V. R. LIMA, *et al*. Hesperidin and hesperetin membrane interaction: understanding the role of 7-O-glycoside moiety in flavonoids. Arch Biochem Biophys. 499(1-2): 6-16, 2010.

LÚCIO, M., LIMA, J.L.F.C., REIS, S. Drug-membrane interactions: Significance for medicinal chemistry. Curr Med Chem 17*:* 1795–1809*,* 2010.

LUESCHER-MATTLIA, M. and E. i. MARTI. Microcalorimetric investigations of the binding of flavonoids to synthetic and natural membranes. Thermochimica Acta 85(1): 501–504. 1985

MARGINEAU, D.G.; VAIS, H. Bioelectrochemical sensors with living cells. Butterworths, Boston. 1990.

MAKINO, K., T. YAMADA, *et al*. Temperature- and ionic strength-induced conformational changes in the lipid head group region of liposomes as suggested by zeta potential data. Biophys Chem 41(2): 175-183, 1991.

MANCONI, M., S. MURA*, et al.* Development and characterization of liposomes containing glycols as carriers for diclofenac. Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects, 342(1-3): 53-58, 2009.

MANDALARI, G., C. BISIGNANO*, et al.* Antimicrobial potential of polyphenols extracted from almond skins. Letters in Applied Microbiology, 51(1): 83-89, 2010.

MASUDA, E. S. e J. SCHMITZ. Syk inhibitors as treatment for allergic rhinits. Pulmonary Pharmacology & Therapeutics 21: 461-467, 2008.

MASTUDA, H., MORIKAWA, T., UEDA, K., MANAGI, H., YOSHIKAWA, M. Structural requirements of flavonoids for inhibition of antigen-induced degranulation, TNF-alpha and IL-4 production from RBL-2H3 cells. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 10: 3123-3128, 2002.

MIGALOVICH-SHEIKHET, H., S. FRIEDMAN, *et al*. Novel identified receptors on mast cells. Front Immunol 3: 238, 2012.

MINAI-FLEMINGER, Y. e F. LEVI-SCHAFFER. Mast cells and eosinophils: the two key effector cells in allergic inflammation. Inflammation Research, 58(10): 631-638, 2009.

MISHRA, P. R., L. AL SHAAL, *et al.* Production and characterization of Hesperetin nanosuspensions for dermal delivery. Int J Pharm 371(1-2): 182-189, 2009

MORIKAWA, T., TAO, J., UEDA, K., MATSUDA, H., YOSHIKAWA, M. Medicinal foodstuffs. XXXI. Structures of new aromatic constituents and inhibitors of degranulation in RBL-2H3 cells from a Japanese folk medicine, the stem bark of *Acer nikoense*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 51: 62-67. 2003.

MORIBE, K., MARUYAMA, K., *et al*. Encapsulation characteristics of nystatin in liposomes: effects of cholesterol and polyethylene glycol derivatives. Int J Pharm 188(2): 193-202, 1999

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival - application to proliferation and cyto-toxicity assays. Journal of Immunological Methods, 65: 55-63, 1983.

MOVILEANU, L., I. NEAGOE*, et al.* Interaction of the antioxidant flavonoid quercetin with planar lipid bilayers. International Journal of Pharmaceutics, 205(1-2): 135-146, 2000.

NAAL, R. M. Z. G., E. P. HOLOWKA*, et al.* Antigen-stimulated trafficking from the recycling compartment to the plasma membrane in RBL mast cells. Traffic, 4(3): 190-200, 2003.

NAAL, R. M. Z. G., J. TABB*, et al.* In situ measurement of degranulation as a biosensor based on RBL-2H3 mast cells. Biosensors and Bioelectronics, 20(4), 2004.

NADLER, M. J., S. A. MATTEWS, *et al*. Signal transduction by the high-affinity immunoglobulin E receptor Fc epsilon RI: coupling form to function. Adv Immunol.(76): 325-355, 2001

NEUNERT, G., P. POLOWSKI*, et al.* Partition of tocopheryl glucopyranoside into liposome membranes studied by fluorescence methods. Biophysical Chemistry, 146(2-3):.92-97. 2010

NEW, C. Liposomes: A practical approach. Oxford:IRL Press, 1997

NEWMAN, D. J. Natural products as leads to potential drugs: An old process or the new hope for drug discovery? Journal of Medicinal Chemistry, 51(9): 2589-2599, 2008.

NEWMAN, D. J., G. M. CRAGG*, et al.* The influence of natural products upon drug discovery. Natural Product Reports, 17(3): 215-234, 2000.

NOBLE, C. O., Z. X. GUO*, et al.* Characterization of highly stable liposomal and immunoliposomal formulations of vincristine and vinblastine. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 64(4): 741-751, 2009.

NÚNEZ-SELLÉZ, A. J., H. T. VÉLEZ-CASTRO*, 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 nutritional supplement. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 50: 762-766, 2002.

OLLILA, F.; HALLING, P. *et al*. Characterization of flavonoid-biomembrande interations. Arch. Biochem. Biophysics, 399: 103-108, 2002.

OTEIZA, P.I.; ERLEJMAN, A.G.., Flavonoid- membrane interactions: a protective roleof flavonoids at the membrane surface? Clin. Dev. Immunol., 12: 19-15, 2005.

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

PARDO-ANDREU, G. L., M. F. BARRIOS*, et al.* Protective effects of Mangifera indica L extract (Vimang), and its major component mangiferin, on iron-induced oxidative damage to rat serum and liver. Pharmacological Research, 57(1): 79-86, 2008.

PASSANTE, E. e N. FRANKISH. The RBL-2H3 cell line: its provenance and suitability as a model for the mast cell. Inflammation Research, 58(11): 737-745. 2009.

PRABHU, S., S. NARAYAN*, et al.* Mechanism of Protective Action of Mangiferin on Suppression of Inflammatory Response and Lysosomal Instability in Rat Model of Myocardial Infarction. Phytotherapy Research, 23(6): 756-760, 2009.

PANCRAZIO, J. J., J. P. WHELAN, *et al.* Development and application of cell-based biosensors. Annals of Biomedical Engineering, 27(6): 697-711, 1999.

PAWLIKOWSKA-PAWLEGA, B., W. I. GRUSZECKI, *et al.* Modification of membranes by quercetin, a naturally occurring flavonoid, via its incorporation in the polar head group. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 1768(9): 2195-2204, 2007.

PONS, M., M. FORADADA, *et al.* Liposomes Obtained by the Ethanol Injection Method. International Journal of Pharmaceutics, 95(1-3): 51-56, 1993.

RAGINI, S., J. K. G. MANO, *et al.* Modyfing effect of quercetin on model biomembranes: studied by molecular dynamic simulation, DSC and NMR. International Journal of Current Pharmaceutical Research 4(1): 70-79.2012.

RIVERA, D. G., I. H. BALMASEDA, *et al.* Anti-allergic properties of Mangifera indica L. extract (Vimang) and contribution of its glucosylxanthone mangiferin. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 58(3): 385-392, 2006.

ROBINSON, C. L., L. M. BAUMANN, *et al*. Effect of urbanisation on asthma, allergy and airways inflammation in a developing country setting. Thorax 66(12): 1051-1057, 2011.

ROTHWELL, J. A., DAY A.J., *et al*. Experimental determination of octanol-water partition coefficients of quercetin and related flavonoids. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(11): 4355-4360, 2005.

SANTOS, Nuno C. and CASTANHO, Miguel A. R. B.. Lipossomas: a bala mágica acertou?. Quím. Nova 25(6): 1181-1185, 2002.

SANTOS, S. F., D. ZANETTE, *et al*. A systematic study of bovine serum albumin (BSA) and sodium dodecyl sulfate (SDS) interactions by surface tension and small angle X-ray scattering. J Colloid Interface **262**(2): 400-408, 2003

SAUDE., M. D. III Consenso Brasileiro no Manejo da Asma. Journal of Pneumology,28: S4-S5, 2002.

SAW, C. L. L., Y. HUANG, *et al.* Synergistic anti-inflammatory effects of low doses of curcumin in combination with polyunsaturated fatty acids: Docosahexaenoic acid or eicosapentaenoic acid. Biochemical Pharmacology, 79(3): 421-430, 2010.

SAIJA, A., F. BONINA, *et al*. Flavonoid-biomembrane interaction : a calorimetric study on dipalmithoylphosphatidylcholine vesicles. International journal of Pharmaceutics 124: 1-8., 1995.

SCHELLER, F. W., WOLLENBERGER, U., WARSINKE, A., LISDAT, F.. Research and development in biosensors. Current Opinion in Biotechnology,12: 35-40, 2001.

SEYDEL, J. K. and M. WIESE. "Drug-Membrane Interactions: Analysis, Drug Distribution, Modeling." Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2002.

SEREBRIISKII, I. G.; E. A. GOLEMIS. Uses of lacZ to study gene function: Evaluation of beta-galactosidase assays employed in the yeast two-hybrid system. Analytical Biochemistry,285: 1-15. 2000.

SERNA, H., M. PORRAS, *et al.* 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." J Pharmacol Exp Ther. 319(3): 1104-1111,2006.

SESINK A.L., O'LEARY K.A., *et al*. Quercetin glucuronides but not glucosides are present in human plasma after consumption of quercetin-3-glucoside or quercetin-4'-glucoside. J Nutr 131(7): 1938-1941, 2001.

SHARMA, A. and U. S. SHARMA. Liposomes in drug delivery: progress and limitation. 154: 123-140, 1999.

SIDWELL, J.S.; RECHNITZ, G.A. Progress and challenges for biosensors using plant tissue materials. Biosensors, 2: 221-233, 1986.

SUBRAMANIAN, K., D. HOLOWKA*, et al.* The Fc segment of IgE influences the kinetics of dissociation of a symmetrical bivalent ligand from cyclic dimeric complexes. Biochemistry, .35(17): 5518-5527. 1996.

SKOOG and LEARY. Principles of Instrumental Analysis, 4thEdition, Saunders College Publishing, 1992.

SPIRKOSKI, J., F. R. MELO, *et al*. "Mast cell apoptosis induced by siramesine, a sigma-2 receptor agonist." Biochem Pharmacol.2012.

STENGER, D. A., GROSS, G. W., KEEFER, E. W., SHAFFER, K. M., ANDREADIS, J. D., PANCRAZIO, J. J. Detection of physiologically active compounds using cell-based biosensors. Trends in Biotechnology, 19: 304-309, 2001.

STERMITZ, F. R., P. LORENZ*, et al.* Synergy in a medicinal plant: Antimicrobial action of berberine potentiated by 5 '-methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97(4): 1433-1437, 2000.

STOLL, C., H. STADINICK, *et al.* Liposomes alter thermal phase behavior and composition of red blood cell membranes. Biochim Biophys Acta 1808(1): 474-481, 2011.

STONE, K. D.; PRUSSIN. C.; METCALFE, D. D. IgE, mast cell, basophils, and eosinophils. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 125: S73-80, 2010.

SULKOWSKI, W.W.; PENTAK, D. The influence of temperature and pH on the structure of liposomes formed from DMPC. J. Molecular Strucuture, 792-793: 257-264, 2006.

TAYLOR, M. L.; METCALFE, D. D. Mast cells in allergy and host defense. Asthma and Allergy Proceedings, 22: 115-119, 2001.

TAMAGAWA-MINEOKA, R., T. KISHIDA, *et al*. IL-21 Reduces Immediate Hypersensitivity Reactions in Mouse Skin by Suppressing Mast Cell Activation or IgE Production. Journal of Investigative Dermatology 131: 1513–1520, 2011.

TRAIDL-HOFFMANN, C., T. JAKOB*, et al.* Determinants of allergenicity. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 123(3): 558-566, 2009.

TEJERA-GARCIA, R., S. RANJAN, *et al*. Making unilamellar liposomes using focused ultrasound. Langmuir 27(16): 10088-10097, 2011.

ULRICH-MERZENICH, G., D. PANEK, *et al*. Drug development from natural products: exploiting synergistic effects. Indian Journal of Experimental Biology 48: 208-219, 2010.

VAN DIJK, C.; DRIESSEN, A.J., The uncoupling efficiency and affinity of flavonoids for vesicles . Biochem Pharmacol, 60: 1593-1600, 2000.

WAUTHOZ, N., A. BALDE*, et al.* Ethnopharmacology of *Mangifera indica* L. bark and pharmacological studies of its main C-glucosylxanthone, mangiferin. International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences, 1(2): 112-119, 2007.

WEETALL, M., D. HOLOWKA*, et al.* Heterologous Desensitization of the High-Affinity Receptor for Ige (Fc-Epsilon-R1) on Rbl Cells. Journal of Immunology, 150(9): 4072-4083, 1993.

WIJESURIYA, D.C.; REZHNITZ, G.A. Biosensors based on plant and animal tissues. Biosensors & Bioelectronics, 8: 155-160, 1993.

WILCZEWSKA, A.Z., N. K., MARKIEWICZ, K. H., CAR H. Nanoparticles as drug delivery systems. Pharmacol Rep 64(5): 1020-1037, 2012.

WU, L. C. Immunoglobulin E receptor signaling and asthma. The Journal of Biological Chesmitry, 286: 32891-32897, 2010.

XIAO, K., J. T. LUO*, et al.* A self-assembling nanoparticle for paclitaxel delivery in ovarian cancer. Biomaterials, 30(30): 6006-6016, 2009.

XU, K., R. M. WILLIAMS*, 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, 111: 2385-2396, 1998.

YANG, D. R., D. PORNPATTANANANGKUL*, et al.* The antimicrobial activity of liposomal lauric acids against Propionibacterium acnes. Biomaterials, 30(30): 6035-6040, 2009.

ZAGO, J. A. A., P. I. USHIMARU*, et al.* Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianassobre linhagens de *Staphylococus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 19(4): 828-833, 2009.

ZASADZINSKI, J. A., B. WONG, *et al.* Novel methods of enhanced retention in and rapid, targeted release from liposomes. Curr Opin Colloid Interface Sci 16(3): 203-214, 2011.

ZHAO, W. H., Z. Q. HU*, et al.* Mechanism of synergy between epigallocatechin gallate and beta-lactams against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45(6): 1737-1742, 2001.