

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Aplicação de CLAE-DAD-EM e CG-EM na caracterização de *Blechnum* sp. e abordagens *in vitro* e *in silico* para avaliar o perfil multifuncional do ácido rosmarínico em alvos relacionados à neurodegeneração e toxicidade em células-tronco

JULIANA MARIA DE MELLO ANDRADE

Porto Alegre, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Aplicação de CLAE-DAD-EM e CG-EM na caracterização de *Blechnum* sp. e abordagens *in vitro* e *in silico* para avaliar o perfil multifuncional do ácido rosmarínico em alvos relacionados à neurodegeneração e toxicidade em células-tronco

Tese apresentada por **Juliana Maria de Mello Andrade** para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Profa. Dra. Amélia T. Henriques

Porto Alegre, 2015

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 17 de agosto de 2015, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Daniel Pens Gelain

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. José Ângelo da Silveira Zuanazzi

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Rivaldo Niero

Universidade do Vale do Itajaí

de Mello Andrade, Juliana Maria

Aplicação de CLAE-DAD-EM e CG-EM na caracterização de *Blechnum* sp. e abordagens *in vitro* e *in silico* para avaliar o perfil multifuncional do ácido rosmarínico em alvos relacionados à neurodegeneração e toxicidade em células-tronco / Juliana Maria de Mello Andrade. -- 2015.

264 f.

Orientador: Amélia Teresinha Henriques.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. *Blechnum*. 2. Antioxidantes. 3. Inibidores da MAO e COMT. 4. Docking molecular. 5. Ácido rosmarínico. I. Henriques, Amélia Teresinha, orient.

II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação da Profa. Dra. Amélia Henriques no laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os estudos químicos foram realizados, adicionalmente, no Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, com colaboração do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes. Estudos de interações moleculares foram desenvolvidos no grupo de Química Farmacêutica da *School of Pharmaceutical Sciences, University of Geneva, University of Lausanne*, pela Dra. Carolina dos Santos Passos. As análises envolvendo células-tronco foram realizadas no Laboratório de Hematologia e Células-tronco da Faculdade de Farmácia da UFRGS e no Instituto de Pesquisa em Células-tronco da mesma universidade, com colaboração da Profa. Dra. Patrícia Pranke. A autora recebeu bolsa de estudos da CAPES e o trabalho contou com financiamento do CNPq e da FAPERGS.

*“Deus não perguntará quantas coisas boas você fez na vida, mas sim
quanto de amor você colocou naquilo que fez.”*

Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha vida, pela oportunidade do doutorado, pelas pessoas que Ele coloca no meu caminho, tornando tudo possível.

À Profa. Dra. Amélia Henriques pela orientação, desde a iniciação científica, por todas as oportunidades que me proporcionou e pelas conversas sempre muito proveitosas, sendo minha "mãe científica".

Ao Prof. Dr. Norberto P. Lopes, por ter dado todo suporte para as análises realizadas no período em que estive na USP-Ribeirão Preto, contribuindo muito para o desenvolvimento do trabalho.

À Profa. Dra. Patrícia Pranke pelo incentivo e contribuição nos estudos realizados com células-tronco, sendo sempre muito receptiva e solícita.

À Dra. Maria Angélica Kieling-Rubio pelo trabalho botânico realizado. À Pós-doutoranda Carolina S. Passos pelos conselhos e discussões acerca do trabalho e experimentos em colaboração que proporcionaram maior conhecimento do assunto, além da amizade e apoio. À Pós-doutoranda Natasha Maurmann pela amizade e auxílio nos métodos com células-tronco. À Doutoranda Jacqueline Mendonça pela receptividade e ajuda nas análises químicas realizadas em Ribeirão Preto.

Aos meus pais, Antonio e Zuleica Andrade, pelo amor incondicional, pelos momentos de alegria e por todo carinho que sempre me deram, nunca medindo esforços para me proporcionar estudo de boa qualidade.

Ao meu marido, Daniel Fasolo, pelo amor, confiança, pelos momentos juntos no laboratório e fora dele, por fazer minha vida ter sentido, por estar sempre ao meu lado. Deus te fez para mim!

À minha avó Juracy Simões, e à minha tia Nelza Simões, pela educação, carinho, conselhos e, principalmente, imenso amor. Ao meu avô, José Caetano, que sempre me

proporciona momentos felizes ao seu lado, me fazendo crer que a vida é feita de amor, saúde, fé e estudo. A todos meus familiares e amigos que estiveram sempre ao meu lado e que acreditaram em mim e no meu trabalho desde o início.

À minha "segunda família", Maria Helena, Omar, Rafael e Mariana Fasolo por terem me acolhido e incentivado em todo o período do doutorado e pelos momentos felizes que passamos juntos. Às minhas irmãs de coração, Greice, Tatiana e Laura pelo companheirismo, amizade sincera e incentivo. A todos os amigos do MCIJ, especialmente aos meus irmãos: Leti, Léo, Manu, Tiago, Anne, Éverton, Carol e Paulo pelo apoio e momentos de oração que, sem dúvida, me deram força para concluir esse trabalho.

Ao laboratório de Farmacognosia, Prof. Dr. José Ângelo Zuanazzi, Profa. Dra. Miriam Apel e aos colegas: Mariana, Grazielle, Luiz, Marina, Melissa, Roger, Maria Júlia, Letícia, Pablo, Andressa e Bruno. Obrigada por fazerem parte desta longa caminhada, pelos momentos de descontração e pela troca de conhecimentos. Às bolsistas de iniciação científica Cristina, Daniela e Kathleen pela imensa colaboração, sou muito grata pelo trabalho que desenvolveram ao meu lado. Aos amigos e compadres, Renata e Douglas Rambo, pela força, momentos de alegrias e por compartilhar conhecimento e emoções.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, à Faculdade de Farmácia e à UFRGS, por toda formação acadêmica proporcionada, da qual tenho muito orgulho.

À CAPES pela bolsa de doutorado e ao CNPq e à FAPERGS pelo auxílio financeiro.

RESUMO

As plantas medicinais são consideradas importantes fontes de compostos biologicamente ativos. Para muitas doenças crônicas, como as neurodegenerações, substâncias que apresentam atividades simultâneas em mais de um alvo relacionado à etiopatologia dessas desordens, constituem potenciais agentes terapêuticos. Nesse contexto, os objetivos deste trabalho foram a avaliação química e biológica de três espécies de samambaias de ocorrência no sul do Brasil: *Blechnum binervatum*, *B. brasiliense* e *B. occidentale*. O isolamento bioguiado foi utilizado para a identificação da(s) substância(s) com potencial atividade em modelos *in vitro* e *in silico* relacionados às desordens neurodegenerativas. A avaliação dos extratos e frações permitiu destacar a fração acetato de etila de *B. brasiliense* como a mais ativa na estabilização de radicais hidroxila (CI₅₀: 12,5 µg/mL) e na inibição da lipoperoxidação (CI₅₀: 10,4 µg/mL), sendo uma das mais ativas frente ao óxido nítrico (CI₅₀: 55,6 µg/mL). Adicionalmente, na inibição da isoforma A da enzima monoamina oxidase (MAO), esta fração foi a que apresentou menor valor de CI₅₀ (28,6 µg/mL). As frações diclorometano também apresentaram bons resultados na inibição da MAO-A, sendo algumas ativas igualmente como antioxidantes. Frente à MAO-B, os extratos e frações das três espécies vegetais demonstraram menores efeitos e foram inativos frente às enzimas acetil e butiril colinesterase, não demonstrando toxicidade em células polimorfonucleares (PMN) de ratos Wistar, na concentração de 1 mg/mL. Utilizando células-tronco cultivadas, os extratos e frações selecionadas, nas concentrações de 100 a 500 µg/mL, não afetaram a viabilidade celular e não apresentaram efeitos tóxicos. Análises químicas por cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada a detector de arranjo de diodos e espectrometria de massas, permitiram a identificação de isômeros dos ácidos cafeoil quínico e cafeoil chiquímico nos extratos das três espécies estudadas. *B. binervatum* apresentou, ainda, ácido cafeico glicosilado, ácido isosalvianólico A e ácido rosmarínico sulfatado. Ácido salvianólico F foi identificado em *B. binervatum* e *B. occidentale*, bem como isômeros do ácido brainico. Ácido rosmarínico foi caracterizado em *B. binervatum* e *B. brasiliense*. Quercetina 3-O-glicosídeo e vicenina-2 também foram identificadas. As análises por cromatografia gasosa, acoplada à

espectrometria de massas demonstraram que o diterpeno neofitadieno foi o composto majoritário nas frações diclorometano de *Blechnum* e nas frações hexano de *B. occidentale* e *B. binervatum*. Para a fração hexano de *B. brasiliense*, β -sitosterol foi o principal componente. A partir da fração acetato de etila de *B. brasiliense* foi isolado o ácido rosmarínico, o qual se mostrou ativo nos ensaios de atividade antioxidante, na inibição da catecol-*O*-metil transferase (CI₅₀: 26,7 μ M) e da MAO-A (CI₅₀: 50,1 μ M), sendo proposto mecanismo reversível de inibição desta enzima. Nos estudos de *docking* foram verificadas as interações moleculares entre o composto e as enzimas MAO-A e COMT, por ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas nos sítios ativos enzimáticos. O composto não apresentou efeitos tóxicos em células PMN de roedores, nas concentrações de 0,5 e 5 mM. Os ácidos rosmarínico e clorogênico isolados do extrato de *B. binervatum* não influenciaram na viabilidade celular e não induziram efeito tóxico sobre células-tronco (100 a 500 μ M), sendo que o ácido rosmarínico foi capaz, ainda, de induzir proliferação celular. Capacidade protetora contra danos celulares causados por H₂O₂ (1400 μ M) foi observada para ambas as substâncias, nas concentrações de 10-100 μ M, sendo os resultados corroborados pelas imagens de microscopia celular. O ácido rosmarínico apresentou melhores respostas quando comparado ao ácido clorogênico, sendo mais efetivo na inibição dos danos por H₂O₂. O conjunto dos resultados obtidos ressalta a importância dos estudos associados químico-biológico de espécies vegetais e aponta para as potencialidades de samambaias como fontes de produtos bioativos, capazes de atuar sobre múltiplos alvos enzimáticos e não-enzimáticos relacionados a doenças neurodegenerativas.

Palavras-chave: *Blechnum*, análise química, antioxidantes, inibidores da MAO e COMT, ácido rosmarínico, *docking* molecular, células-tronco.

ABSTRACT

Applying HPLC-DAD-MS and GC-MS in the characterization of Blechnum sp. and in vitro, in silico approaches to evaluate multifunction profile of rosmarinic acid on targets related with neurodegeneration and stem cells toxicity

Medicinal plants are considered important sources of biologically active compounds. For many chronic diseases, such as neurodegenerations, substances that present simultaneous activities in more than one target related to the etiopathology of these disorders are considered potential therapeutic agents. In this context, the aims of the study were the chemical and biological evaluation of three fern species, occurring in south Brazil: *Blechnum binervatum*, *B. brasiliense* and *B. occidentale*. The bioguided isolation was employed to identify compound(s) with potential activities at *in vitro* and *in silico* models associated to neurodegenerative disorders. The biological evaluation of extracts and fractions allowed to highlight the ethyl acetate fraction of *B. brasiliense*, which was the most active in the stabilization of hydroxyl radicals (IC₅₀: 12.5 µg/mL) and on lipoperoxidation inhibition (IC₅₀: 10.4 µg/mL), being one of the most active sample against nitric oxide (IC₅₀: 55.6 µg/mL). Furthermore, on the inhibition of isoform A from monoamine oxidase (MAO), this fraction showed the lowest IC₅₀ value (28.6 µg/mL). The dichloromethane fractions also presented good results in the MAO-A inhibition, being some of them active as antioxidants, too. Against MAO-B, extracts and fractions of the three species demonstrated reduced effects and all samples were inactive in the acetyl and butyryl cholinesterase inhibition, showing no toxic effects to polymorphonuclear cells (PMN) from Wistar rats, at 1 mg/mL. Using cultured stem cells, the selected extracts and fractions at 100 to 500 µg/mL did not affect cell viability and absence of cytotoxic effects was observed. The chemical analysis by high performance liquid chromatography, coupled to photodiode array detector and mass spectrometry, allowed the identification of caffeoyl quinic acid and caffeoyl shikimic acid isomers in the three studied fern species. *B. binervatum* presented also glycosilated caffeic acid, isosalvianolic acid A and sulphated rosmarinic acid. Salvianolic acid F was identified in *B. binervatum* and *B. occidentale*, as well as, brainic acid isomers. Rosmarinic acid was characterized in *B. binervatum* and *B.*

brasiliense. Quercetin 3-*O*-glycoside and vicenin-2 were also found. Analysis by gas chromatography with mass spectrometry showed the diterpene neophytadiene was the major compound in dichloromethane fractions of *Blechnum* and in hexane fractions of *B. occidentale* and *B. binervatum*. For the hexane fraction from *B. brasiliense*, β -sitosterol was majority. From the ethyl acetate fraction of *B. brasiliense* was isolated rosmarinic acid, which was shown to be active in antioxidant assays, in the inhibition of catechol-*O*-methyltransferase (IC₅₀: 26.7 μ M) and MAO-A (IC₅₀: 50.1 μ M), being suggested a reversible inhibition mechanism against this enzyme. In docking studies were observed molecular interactions between the compound and MAO-A and COMT enzymes, via hydrogen bonds and hydrophobic interactions in enzyme active sites. The compound did not induce toxic effects to rodent PMN cells, at concentrations of 0.5 and 5 mM. The rosmarinic and chlorogenic acids, isolated from *B. binervatum* extract, did not influence cell viability and did not induce toxicity to stem cells (100 to 500 μ M), the rosmarinic acid was also capable to induce cell proliferation. Protective ability against H₂O₂-induced cell damage (1400 μ M) was observed for both substances at concentrations of 10-100 μ M, and the results were supported by cellular microscopy images. Rosmarinic acid presented better responses compared with chlorogenic acid, being powerful inhibitor against H₂O₂-induced damage. The overall results highlights the importance of associated chemical-biological studies of plant species and points at the potential of ferns as sources of bioactive compounds, capable of modulating multiple enzymatic and non-enzymatic targets related to neurodegenerative diseases.

Keywords: *Blechnum*, chemical analysis, antioxidants, MAO and COMT inhibitors, rosmarinic acid, molecular *docking*, stem cells.

LISTA DE FIGURAS

3. REVISÃO DO TEMA

- Figura 1:** Proporção (em porcentagem) de espécies da flora brasileira distribuídas nos grupos das samambaias e licófitas, das algas, das angiospermas, das briófitas, dos fungos e das gimnospermas 32
- Figura 2:** Fotografia das espécies A) *Blechnum binervatum*; B) *B. brasiliense*; C) *B. occidentale*. 44
- Figura 3:** Esquema representativo da desaminação oxidativa de monoaminas catalisada pela MAO mitocondrial. Reproduzido de YOUDIM e BAKHLE (2005) 59
- Figura 4:** Abordagem proposta para triagem de compostos visando a avaliação de potenciais compostos multifuncionais de interesse para o tratamento das Doenças de Parkinson e Alzheimer. Adaptado de NOVAROLI e colaboradores (2005). 64

4. PARTE I

- Figura 1:** Esquema representativo do procedimento de fracionamento da espécie *Blechnum binervatum*. 68
- Figura 2:** Esquema representativo do procedimento de fracionamento da espécie *Blechnum brasiliense*. 69
- Figura 3:** Esquema representativo do procedimento de fracionamento da espécie *Blechnum occidentale* 70
- Figura 4:** Esquema representativo da Reação de Fenton. 80
- Figura 5:** Resultados do método de LDH para avaliação da citotoxicidade. 87
- Figura 6:** Potencial de diferenciação das células-tronco mesenquimais, derivadas de dentes decíduos, nas três linhagens mesodérmicas 88
- Figura 7:** Efeito dos extratos brutos de *B. binervatum*, *B. brasiliense* e *B. occidentale* na viabilidade de células-tronco (ensaio de MTT) 89
- Figura 8:** A) Efeito das frações acetato de etila das três espécies de *Blechnum* na viabilidade das células-tronco; B) avaliação da influência das frações diclorometano sobre as células, através do ensaio de MTT. 90

Figura 9: Avaliação dos efeitos citotóxicos dos extratos brutos de *B. binervatum*, *B. brasiliense* e *B. occidentale* sobre células-tronco (ensaio de liberação da LDH) 91

Figura 10: A) Influência das frações acetato de etila das três espécies de *Blechnum* na toxicidade sobre células-tronco; B) avaliação do efeito das frações diclorometano sobre as células, através do método de liberação da LDH..... 92

5. PARTE II

Figura 1: Cromatograma a 320 nm, obtido para o extrato bruto metanólico de *B. binervatum*, após análises por CLAE-DAD 97

Figura 2: Cromatograma a 320 nm, obtido para o extrato bruto metanólico de *B. brasiliense*, após análises por CLAE-DAD..... 98

Figura 3: Cromatograma a 320 nm, obtido para o extrato bruto metanólico de *B. occidentale*, após análises por CLAE-DAD..... 99

Figura 4: Espectro de ultravioleta e espectro de massas de íons produto no modo negativo, obtidos para: A) o isômero com tempo de retenção de, aproximadamente, 14,9 minutos, denominado: ácido (1 ou 3)-*O*-cafeoil quínico; B) o ácido 5-*O*-cafeoil quínico; C) o ácido 4-*O*-cafeoil quínico, utilizando CLAE-DAD-EM/EM 104

Figura 5: Espectro de ultravioleta e espectro de massas de íons produto no modo negativo, obtidos para o ácido cafeoil chiquímico (isômeros), utilizando CLAE-DAD-EM/EM..... 105

Figura 6: Espectro de ultravioleta e espectro de massas de íons produto no modo negativo, obtidos para o ácido salvianólico F, utilizando CLAE-DAD-EM/EM. 106

Figura 7: Espectro de ultravioleta e espectro de massas de íons produto no modo negativo, obtidos para os isômeros do ácido brainico, utilizando CLAE-DAD-EM/EM.. 107

Figura 8: Proposta de padrão de fragmentação por EM, no modo negativo, atribuída para o composto ácido brainico 108

Figura 9: Espectro de ultravioleta e espectro de massas de íons produto no modo negativo, obtidos para o ácido rosmarínico, utilizando CLAE-DAD-EM/EM..... 109

Figura 10: Espectro de ultravioleta e espectro de massas de íons produto no modo negativo, obtidos para o ácido isosalvianólico A, utilizando CLAE-DAD-EM/EM.	110
Figura 11: Espectro de ultravioleta e espectro de massas de íons produto no modo negativo, obtidos para o flavonoide: quercetina 3- <i>O</i> -glicosídeo, utilizando CLAE-DAD-EM/EM.....	111
Figura 12: Espectro de ultravioleta e espectro de massas de íons produto no modo negativo, obtidos para o flavonoide: vicenina-2, utilizando CLAE-DAD-EM/EM.	112
Figura 13: Estruturas químicas dos compostos: ácido quínico, ácido chiquímico, ácido cafeico, ácido <i>p</i> -cumárico, ácido ferúlico, ácido 1- <i>O</i> -cafeoil-quínico, ácido 3- <i>O</i> -cafeoil-quínico, ácido 4- <i>O</i> -cafeoil-quínico, ácido 5- <i>O</i> -cafeoil-quínico, ácido rosmarínico, ácido salvianólico F, ácido brainico, ácido isosalvianólico A, quercetina 3- <i>O</i> -glicosídeo, vicenina-2.....	113
Figura 14: Estrutura química do neofitadieno, composto majoritário nas frações diclorometano de <i>Blechnum</i>	114
6. ARTIGO I	
Figure 1: A) Chromatogram of the EAF obtained from <i>B. brasiliense</i> by HPLC-DAD analysis, extracted at 320 nm; B) ultraviolet spectra; C) mass profile at negative mode; D) MS/MS spectra of pseudomolecular ion at m/z 359.08 $[M-H]^-$ of rosmarinic acid (retention time: 37.9 minutes)	131
Figure 2: Chemical structure of rosmarinic acid.....	132
Figure 3: Inhibition of lipid peroxidation by different concentrations of RA. All values of % inhibition were considered statistically different ($p < 0.05$).....	133
Figure 4: Time-dependent inhibition of MAO-A by RA at 0, 15, 30 and 60 min after incubation with target enzyme.....	136
Figure 5: Molecular docking results of RA (ChemPLP score 75.4) and CGA (ChemPLP score 61.9) in the MAO-A (PDB ID: 2Z5X) active site.....	142
Figure 6: Docking of RA in human <i>S</i> -COMT (grey, PDB ID: 3BWB) (RUTHERFORD e colaboradores, 2008).....	145

Figure 7: Docking of CGA and CA in human S-COMT (grey, PDB ID: 3BWB) (RUTHERFORD e colaboradores, 2008).....	146
Figure 8: Effects of RA on rat PMN cells, evaluated by the LDH leakage assay.....	147
Figure S1: Re-docking of co-crystallized 3,5-dinitrocatechol (DNC) in the human S-COMT (grey, PDB ID: 3BWM).....	155

7. ARTIGO II

Figure 1: Chemical structures of the phenolic acids isolated from <i>Blechnum</i> extract: chlorogenic acid and rosmarinic acid	161
Figure 2: Fingerprint of <i>B. binervatum</i> extract by HPLC-DAD analysis (A). Ultraviolet profile (UV _{max} . 218; 324 nm) and MS/MS spectrum of pseudomolecular ion m/z 353 [M-H] ⁻ from CGA (B). UV profile (UV _{max} . 219; 328 nm) and MS/MS spectrum of m/z 359 [M-H] ⁻ from RA (C).....	168
Figure 3: Trilineage mesenchymal differentiation potential of MSCs.	169
Figure 4: Effects of CGA and RA on cell viability (MTT test) (A) and cytotoxicity (LDH leakage) (B).....	171
Figure 5: Effects of H ₂ O ₂ on cell viability by MTT assay (A) and induction of cytotoxicity by LDH leakage (B).	172
Figure 6: A) Cell nuclei of stem cells treated with different concentrations of hydrogen peroxide (800-1,800 μM), compared with untreated cells (control), observed by representative fluorescence photomicrographs (DAPI colored). B) Effects of H ₂ O ₂ on cell viability (MTT test). C) Results of cytotoxicity (LDH assay) induced by H ₂ O ₂ at the cited concentrations	173
Figure 7: Effects of CGA from <i>B. binervatum</i> on H ₂ O ₂ -induced cell damage. Fluorescence microscope images of stem cell nuclei (Nikon Ti Eclipse, DAPI colored) treated with different concentrations of CGA, in the presence or absence of H ₂ O ₂ (A) and viability of the cells (B).	174
Figure 8: Stem cells were treated with RA at 10, 50 and 100 μM concentration in the absence or presence of 1,400 μM H ₂ O ₂ . Fluorescence microscope images of stem cell	

nuclei (DAPI colored) were taken (A) and the effects of RA from *B. binervatum* on cell viability, by MTT assay, with/without H₂O₂ were calculated (B)..... 176

Figure 9: Fluorescence microscope cell pictures, obtained for untreated and treated stem cells, using H₂O₂ at 1,400 μM, CGA and RA at 100 μM added of H₂O₂. Nuclei cells were blue stained with DAPI (A) and labeling of cytoskeleton, in red color, was performed with phalloidin (B). The digital overlay of DAPI and phalloidin images of human mesenchymal stem cells was obtained (C)..... 177

Figure 10: Curves of CGA and RA effects in the presence and absence of H₂O₂. 178

8. DISCUSSÃO GERAL

Figura 1: Estrutura do ácido rosmarínico isolado de *B. brasiliense* com indicação numérica dos átomos cujos ligantes realizam interações com enzimas-chave do processo neurodegenerativo..... 198

LISTA DE TABELAS

3. REVISÃO DO TEMA

Tabela 1: Estruturas de alguns metabólitos secundários encontrados em diferentes espécies de samambaias..... 47

4. PARTE I

Tabela 1: Quantidade de material vegetal coletado e rendimentos de extratos metanólicos brutos..... 67

Tabela 2: CI_{50} obtidos para os extratos brutos e para as frações de *Blechnum*, bem como para os padrões de ácido clorogênico e cafeico, utilizados nos experimentos frente ao radical hidroxila 79

Tabela 3: Valores de CI_{50} para extratos brutos e frações de *Blechnum*, bem como para os padrões utilizados nos experimentos frente ao radical óxido nítrico..... 81

Tabela 4: Resultados do experimento para detecção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, expressos como valores de CI_{50} dos extratos brutos e das frações de *Blechnum*..... 82

Tabela 5: Inibição enzimática observada para os extratos e frações de *Blechnum*, frente às isoformas A e B da monoamina oxidase..... 85

5. PARTE II

Tabela 1: Parâmetros cromatográficos utilizados na análise por CLAE das amostras de diferentes espécies de *Blechnum* 94

Tabela 2: Sistema gradiente linear utilizado para análise por CLAE..... 95

Tabela 3: Identificação dos picos cromatográficos do extrato bruto de *B. binervatum*, dados de UV, EM e EM/EM 100

Tabela 4: Dados de UV, EM e EM/EM dos compostos presentes no extrato bruto de *B. brasiliense*, após análise por CLAE..... 101

Tabela 5: Identificação dos picos cromatográficos do extrato bruto de *B. occidentale*, dados de UV, EM e EM/EM 102

Tabela 6: Compostos voláteis identificados nas frações diclorometano das três espécies de *Blechnum*..... 116

Tabela 7: Compostos voláteis identificados nas frações hexano das três espécies de *Blechnum*..... 117

6. ARTIGO I

Table 1: IC₅₀ values for the *B. brasiliense* EAF and for RA isolated compound, obtained in the employed antioxidant assays, using non-linear regression curves of % inhibition vs. inhibitor concentration..... 134

Table 2: The IC₅₀ values for the inhibition of MAO-A, MAO-B, AChE, BChE and COMT by *Blechnum* phenolic acids and standard substances. 138

Table S1: Linear gradient system employed in HPLC analysis.. 154

7. ARTIGO II

Table S1: Linear gradient system employed in HPLC analysis... 188

LISTA DE ABREVIACOES

6-OHDA	6-Hidrxi-dopamina
ABTS	cido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfnico)
AChE	Acetilcolinesterase
ADH	Aldedo Desidrogenase
ATP	Adenosina Trifosfato
BChE	Butirilcolinesterase
CG	Cromatografia Gasosa
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada  Espectrometria de Massas
CI ₅₀	Concentração Inibitória média
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodos
CLAE-DAD-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodos e Espectrômetro de Massas
CLAE-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Ultravioleta
COMT	Catecol- <i>O</i> -metil-transferase
DA	Doença de Alzheimer
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Doença de Parkinson
DPPH	Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil
DTNB	cido 5-5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)
EDTA	cido Etilenodiamino Tetra-acético
EM	Espectrometria de Massas
EM/EM	Detector de Massas com análise de Espectrometria de Massas sequencial no espaço
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxignio
ESI	Fonte de ionização por <i>electrospray</i>
FTC-β1	Fator de Transformação de Crescimento
IACHe	Inibidor da Acetilcolinesterase
Iβ-amiloide	Inibidores da Agregação da Proteína β-amiloide
ICOMT	Inibidor da Catecol- <i>O</i> -metil-transferase
IL1-β	Interleucina 1-beta
IMAO	Inibidor da Monoamina Oxidase
ITS	Insulina-transferrina-selnio
LDH	Lactato Desidrogenase
L-DOPA	cido (S)-2-amino-3-(3,4-di-hidrxifenil propanoico)

MAO	Monoamina Oxidase
MAO-A	Isoforma A da enzima Monoamina Oxidase
MAO-B	Isoforma B da enzima Monoamina Oxidase
MPP+	1-Metil-4-fenilpiridina
MPTP	1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NMDA	Receptor de N-metil-D-aspartato
PVDF	Membrana Filtrante de Fluoreto de Polivinilideno
SFB	Soro Fetal Bovino
SHED	<i>Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TIC	Corrente Total de Íons
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TRAP	Potencial Antioxidante Total
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. OBJETIVOS	28
2.1. Objetivos gerais	29
2.2. Objetivos específicos.....	29
3. REVISÃO DO TEMA	30
3.1. Samambaias e Licófitas.....	31
3.1.1. Aspectos Botânicos	32
3.1.2. Aspectos Químicos.....	34
3.1.3. Aspectos Farmacológicos	38
3.2. O Gênero <i>Blechnum</i>	43
3.3. Doenças Neurodegenerativas	57
3.3.1. Importância da Enzima Monoamina Oxidase	59
3.3.2. Antioxidantes e Neurodegeneração	61
3.3.3. Compostos Multifuncionais	63
4. PARTE I: Atividades Biológicas de Extratos e Frações de <i>Blechnum</i>	66
4.1. Parte Experimental.....	67
4.2. Resultados e Discussão.....	78
5. PARTE II: Análise e Identificação Química	93
5.1. Materiais e Métodos.	94
5.2. Resultados e Discussão.....	97
6. ARTIGO I. Combining molecular docking and <i>in vitro</i> techniques to evaluate the multifunctional capacity in neurodegenerative disorders of rosmarinic acid, isolated from <i>Blechnum brasiliense</i>	119
7. ARTIGO II. Stem cells applied to primary toxicity and peroxide damage prevention testing of rosmarinic and chlorogenic acid isolated from ferns	156
8. DISCUSSÃO GERAL	189

9. CONCLUSÕES	205
10. PERSPECTIVAS	207
11. REFERÊNCIAS	209
ANEXOS	238

1. INTRODUÇÃO

A utilização de produtos vegetais iniciou-se há milhares de anos por populações primitivas na busca de tratamento, cura e/ou prevenção para inúmeras patologias, apresentando-se como uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (SOUSA *et al.*, 2008). Apesar do aumento no uso de medicamentos sintéticos nos últimos anos, seu emprego continua sendo o tratamento de escolha em diversos países, desenvolvidos ou em desenvolvimento, como remédios caseiros, medicamentos fitoterápicos ou matérias-primas para a indústria farmacêutica (SANTOS *et al.*, 2011).

As plantas medicinais constituem importantes fontes de compostos biologicamente ativos, podendo ser utilizadas na forma de derivados, em medicamentos fitoterápicos, ou para isolamento de produtos para desenvolvimento de fármacos. Os compostos encontrados em vegetais possuem ampla diversidade estrutural e consequente variedade nas propriedades físico-químicas e farmacológicas. SILVA (2014) relata que, entre 2010 e 2012, 80 novos medicamentos fitoterápicos foram desenvolvidos e, de acordo com a Plataforma Internacional para Registro de Ensaio Clínicos (*International Clinical Trials Registry Platform, ICTRP*), atualmente 354 estudos de segurança e eficácia estão sendo abordando derivados de plantas medicinais (WHO, 2015).

Através do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e das Práticas Integrativas e Complementares na Atenção Básica, vem sendo estimulada a utilização de produtos vegetais no sistema público de saúde brasileiro, principalmente no tratamento primário de problemas de saúde. Esses produtos são empregados como forma alternativa ou complementar aos medicamentos sintéticos, culminando no uso sustentável da biodiversidade e no uso racional das plantas medicinais, aliando o saber popular às descobertas científicas para a melhora da qualidade de vida da população (BRASIL, 2009; BRASIL, 2012).

O estudo acerca de plantas medicinais e seus derivados envolve áreas distintas da ciência, que abrangem desde a botânica até a química e a farmacologia incluindo, ainda, tecnologia, etnofarmacologia, agronomia, entre outras (VILLAS BOAS; GADELHA, 2007). A descoberta de novas entidades químicas a partir de fontes naturais deve,

portanto, constituir-se de uma atividade multidisciplinar, garantindo o sucesso dessa busca, bem como incentivando o aumento da utilização correta, segura e responsável das plantas medicinais e dos fitoterápicos, pela população.

O Brasil apresenta a maior biodiversidade mundial, sendo a flora brasileira composta por, aproximadamente, 46.000 espécies conhecidas, incluindo fungos, algas, briófitas, gimnospermas, angiospermas e samambaias/licófitas (LISTA DE ESPÉCIES DA FLORA DO BRASIL, 2015). Essa flora encontra-se distribuída em diversos biomas, como floresta amazônica, cerrado, mata atlântica, pampa, pantanal e caatinga. Devido a essas características, apresenta-se como uma das mais ricas fontes de substâncias bioativas. Apesar da grande diversidade, esse potencial é insuficientemente explorado ou desconhecido, e ressalta a importância da pesquisa visando a identificação de novos candidatos a fármacos (JOLY *et al.*, 2011).

Dentre os constituintes químicos dos vegetais estão os metabólitos secundários, os quais desempenham funções ecológicas importantes para a sobrevivência das espécies. Neste grupo, destacam-se as substâncias fenólicas, abundantes em inúmeras espécies para as quais, isoladamente ou em extratos complexos foram evidenciadas diversas atividades biológicas, avaliadas tanto em modelos *in vitro*, quanto em experimentos *in vivo*. Estas substâncias fenólicas estão distribuídas em inúmeras classes químicas, como flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, xantonas, dentre outras (SIMÕES *et al.*, 2010).

A presença de polifenóis já foi relatada em espécies de samambaias, pertencentes ao grupo botânico das pteridófitas (samambaias e licófitas), extenso grupo de plantas vasculares e amplamente distribuídas. Para essas plantas, existem relatos da presença, principalmente, de ácidos hidroxicinâmicos e derivados glicosilados de flavonoides (IWASHINA *et al.*, 1995; BRIGHENTE *et al.*, 2007; IMPERATO, 2007; FANG *et al.*, 2008; CAZAROLLI *et al.*, 2009). Além disso, outros metabólitos secundários, tais como terpenos, foram também relatados (LI *et al.*, 2009; GOMES *et al.*, 2012).

Diversas propriedades farmacológicas foram atribuídas aos compostos fenólicos, tais como: atividades anti-inflamatória e antioxidante, inibição enzimática, antitumoral,

neuroprotetora, hipocolesterolêmica, antibacteriana e antifúngica, dentre outras (SELA *et al.*, 2010; SUN *et al.*, 2011; KANG *et al.*, 2013; SZLISZKA; KROL, 2013). Entre estas, a neuroproteção pode ser destacada, uma vez que as patologias ligadas ao Sistema Nervoso Central (SNC) vêm apresentando incidência rapidamente aumentada devido, principalmente, ao aumento da expectativa de vida e ao estresse (TORRÃO *et al.*, 2012). Estudos do grupo, realizados com plantas pertencentes à família Lycopodiaceae, demonstraram que seus extratos apresentam atividade inibitória sobre a enzima acetilcolinesterase e potencial antioxidante (KONRATH, 2011).

A neurodegeneração é caracterizada por um conjunto de doenças que afetam principalmente a população de faixa etária mais elevada, impactando na vida e na saúde de milhões de pessoas, representando um dos desafios para o desenvolvimento global (ABBOTT, 2011). Assim, compostos que apresentam características neuroprotetoras vem sendo explorados na busca de novas entidades farmacologicamente ativas, afim de ampliar os recursos terapêuticos para essas doenças de natureza complexa, envolvendo várias vias intracelulares ativadas na cascata de morte celular (GELDENHUYS; VAN DER SCHYF, 2013).

Compostos neuroprotetores são capazes de promover a prevenção da morte neuronal e a manutenção de suas funções basais, sem afetar os mecanismos bioquímicos relacionados à etiologia dessas doenças (YOUDIM, 2010). Substâncias antioxidantes foram as primeiras drogas a serem estudadas em uma tentativa de retardar o progresso dessas doenças (SCHAPIRA; OLANOW, 2004). Inibidores da enzima monoamina oxidase (IMAO) também foram avaliados em relação a uma potencial habilidade em diminuir a degeneração neuronal, dada a sua capacidade de inibir a formação de radicais livres derivados do metabolismo de dopamina. Compostos que atuam sobre essa enzima são utilizados no tratamento de parkinsonismo e considerados como alternativas no tratamento da doença de Alzheimer (WEINREB *et al.*, 2012; FOLLMER, 2013).

Neste contexto, a busca por entidades químicas em espécies integrantes da biodiversidade brasileira, que apresentem potencial neuroprotetor, representa uma

ferramenta importante no desenvolvimento de fármacos para compor o arsenal terapêutico e constituem alternativas às opções já existentes no mercado. Atualmente, modelos *in silico* vêm sendo introduzidos, o que tem facilitado o entendimento e a busca por compostos dirigidos a alvos biológicos selecionados.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Tendo em vista a possibilidade de obtenção de compostos multiativos com potencial para utilização em tratamentos de doenças neurodegenerativas, este trabalho teve como objetivo geral o isolamento e a identificação da(s) substância(s) com potencial atividade biológica extraídas de três espécies de samambaias: *Blechnum binervatum*, *Blechnum brasiliense* e *Blechnum occidentale*, coletadas na região sul do Brasil.

2.2. Objetivos Específicos:

- Obtenção dos extratos brutos metanólicos das frondes de *B. binervatum*, *B. brasiliense* e *B. occidentale*;
- Fracionamento, por partição dos extratos, utilizando solventes de diferentes polaridades;
- Avaliação de atividades antioxidantes;
- Investigação da inibição das enzimas monoamina oxidase (MAO), isoformas A e B (MAO-A e MAO-B), acetil (AChE) e butirilcolinesterase (BChE);
- Avaliação da toxicidade e viabilidade celular dos extratos;
- Análise química por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), acoplada a detector de arranjo de diodos (DAD) e espectrômetro de massas (EM) e cromatografia gasosa (CG) acoplada a espectrômetro de massas (EM);
- Isolamento de compostos ativos;
- Investigação do comportamento das substâncias isoladas quanto à ligação à enzima MAO-A, através da análise por *docking* molecular;
- Avaliação *in vitro* da inibição da catecol-*O*-metiltransferase (COMT) pelos compostos isolados, bem como, investigação das interações moleculares *in silico*;
- Investigação da citotoxicidade e viabilidade de células-tronco, após exposição às substâncias isoladas e, avaliação da citoproteção desses compostos, após danos induzidos por peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

3. REVISÃO DO TEMA

3.1. Samambaias e Licófitas

Samambaias e licófitas são plantas vasculares, ampla e mundialmente distribuídas, englobando uma riqueza estimada em, aproximadamente, 13.600 espécies, sendo encontradas principalmente em climas tropicais e subtropicais (MORAN, 2008). São dependentes de umidade para realizar seu ciclo de vida e, além disso, não produzem flores, frutos ou sementes e são adaptadas à absorção de luz de baixa intensidade que penetra no interior das matas. No Brasil, são constituintes importantes em formações vegetais do Bioma Mata Atlântica.

Em classificações anteriores, essas plantas foram tratadas como um grupo único: as pteridófitas. Porém, estudos baseados em filogenia molecular demonstraram que esses vegetais constituem duas linhagens evolutivas monofiléticas e não proximamente relacionadas (PRYER *et al.*, 2001). As licófitas (plantas com folhas micrófilas, esporângios axilares, laterais ao caule e com deiscência completa e distal) e as monilófitas, ou samambaias (caracterizadas pelas folhas megáfilas e esporângios variados, mas nunca axilares) (SMITH *et al.*, 2006).

Os gêneros de samambaias como: *Equisetum*, *Alsophila*, *Asplenium*, *Cyathea*, dentre outros, são apresentados seguindo a classificação de SMITH e colaboradores (2006, 2008), complementada por ROTHFELS e colaboradores (2012), para as monilófitas. Para as licófitas, como: *Selaginella* e *Lycopodium*, segue-se a classificação estabelecida por KRAMER e GREEN (1990) (PRADO; SYLVESTRE, 2015).

No Brasil, atualmente são reconhecidas 36 famílias de samambaias e licófitas, incluindo 133 gêneros e 1.253 espécies. Este grupo representa cerca de 2,8% do total de plantas catalogadas na flora brasileira (Figura 1) (LISTA DE ESPÉCIES DA FLORA DO BRASIL, 2015).

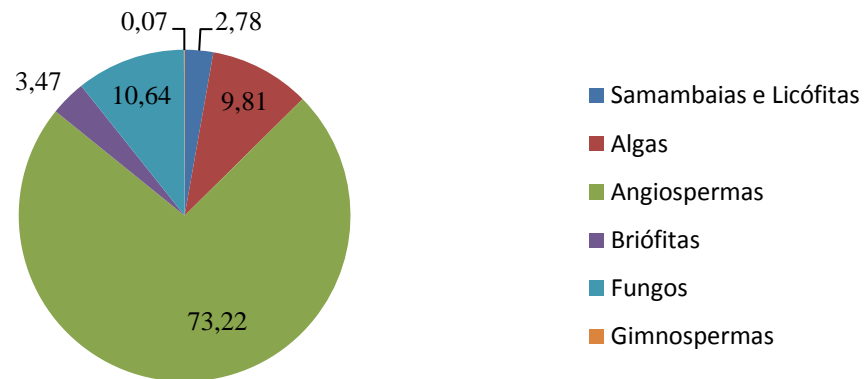


Figura 1. Proporção (em porcentagem) de espécies da flora brasileira distribuídas nos grupos das samambaias e licófitas, das algas, das angiospermas, das briófitas, dos fungos e das gimnospermas.

3.1.1. Aspectos Botânicos

As samambaias possuem, em sua maioria, folhas verdes brilhantes, muitas apresentando tamanhos grandes, tornando-as visualmente atraentes, sendo que várias delas são utilizadas e comercializadas como plantas ornamentais. Algumas espécies são abundantes, enquanto outras são raras, sendo de extrema importância a melhor compreensão das correlações ecológicas que afetam a abundância das espécies para sua conservação (HUBBELL, 2001). O ciclo de vida sexual das samambaias é caracterizado pela alternância de duas gerações, sendo uma delas esporofítica diplóide dominante e a outra, gametofítica haplóide (MEHLTRETER *et al.*, 2010).

O ambiente úmido é o preferencial para desenvolvimento dessas plantas. Entre os motivos citados para a preferência por ambientes úmidos estão a incapacidade de algumas folhas em se adaptar às variações ambientais, sistema de transporte de água menos eficiente e menor taxa fotossintética de algumas espécies, comparada a plantas com sementes (PAGE, 2002; BRODRIBB *et al.*, 2007). Entretanto, o número de samambaias xerófitas sugere que sua origem evolutiva não as exclui de habitats áridos. As causas para as diferentes estratégias de adaptação à seca são provavelmente genéticas e refletem sua

origem evolutiva. Vários fatores fundamentais, ou apenas um, permitem adaptações de uma espécie a diferentes condições (MEHLTRETER *et al.*, 2010).

As adaptações das samambaias permitiram que elas se desenvolvessem em uma vasta gama de habitats, ao longo de muitos anos, incluindo aqueles com extremos de temperatura, umidade e luz (SHARPE; JERNSTEDT, 1990; MILIUS, 2007), apresentando, assim, diversas espécies de plantas terrestres, bem como uma variedade de outras formas de crescimento, como samambaias epífitas, hemiepífitas e rupestres (SALINO, 2000).

Nas florestas tropicais encontra-se a sua maior diversidade, apresentando cerca de 65% das espécies, porém, mesmo em terras áridas ou em superfícies expostas ao fogo, desmatamentos ou deslizamentos de terra, as samambaias podem estar presentes e às vezes apresentam-se dominantes no local. As notáveis adaptações a diversas perturbações, inclusive sua capacidade de acumular toxinas em seu ambiente, sugerem um papel importante destas plantas na conservação e restauração do ambiente em que vivem (MEHLTRETER *et al.*, 2010). Um exemplo disto está demonstrado nos estudos desenvolvidos por TU e MA (2005), nos quais foi possível observar que a espécie *Pteris vittata* é capaz de hiperacumular arsênio, removendo quantidades significativas do composto em terrenos inóspitos.

Diversas famílias de samambaias ocorrem no Estado do Rio Grande do Sul (RS). Inventários realizados por FRAGA (2007) no RS demonstraram a ocorrência de 31 espécies somente para a região de São Francisco de Paula, pertencentes a 17 gêneros e a 8 famílias. As famílias com maior incidência foram Polypodiaceae e Aspleniaceae; e o gênero que apresentou maior número de espécies encontradas na região foi *Asplenium*.

Estudo realizado no município de Osório, situado na região nordeste do RS, permitiu verificar a presença de 53 espécies de samambaias e licófitas compondo a vegetação local, sendo essas distribuídas em 31 gêneros e 16 famílias. Dessas famílias, 14 foram de samambaias, dentre elas, a família mais representativa nesse estudo, que foi Polypodiaceae com 13 espécies, assim como, Dryopteridaceae, Thelypteridaceae, Blechnaceae, Pteridaceae, Aspleniaceae, Schizaeaceae, Cyatheaceae, Davaliaceae,

Dennstaedtiaceae, Gleicheniaceae, Hymenophyllaceae, Osmundaceae e Vittariaceae. Somente as famílias Selaginellaceae e Lycopodiaceae, apresentadas no estudo, pertencem ao grupo das licófitas (SANTOS; WINDISCH, 2008).

Em levantamento florístico realizado no Morro da Harmonia, no município de Teutônia, RS, foi apresentada uma listagem de 71 espécies de samambaias, pertencentes a 36 gêneros. Espécies terrestres compreenderam 69,01% do total, enquanto que as epifíticas representaram 14,08%. Polypodiaceae (com 16 espécies), Pteridaceae (com 15) e Dryopteridaceae (com 9) foram as famílias que apresentam maior diversidade (STEFFENS; WINDISCH, 2007).

3.1.2. Aspectos Químicos

Estudos demonstram que os polifenóis são majoritários nestas espécies, com destaque para derivados dos flavonoides canferol e quercetina. Também foram relatados lignoides, xantonas e ácidos hidroxicinâmicos (Tabela 1). Palmatosídeos A, B e C, multiflorinas A e B e afzelina, todos derivados do canferol, foram isolados de extratos de raízes da samambaia *Neochheiropteris palmatopedata* (YANG *et al.*, 2010). Em estudo realizado por UMILKASOM e HARBORNE (1991), foram identificados flavonoides em espécies da família Aspleniaceae, dos quais canferol foi encontrado em 80%, quercetina em 53% e proantocianidina em 13% das espécies estudadas. Canferol 3-*O*-metil-éter foi encontrado somente em *Asplenium marinum*. Acacetina e genkwanina foram encontradas pela primeira vez em *A. normale*. Hispidulina e pectolinangenina foram detectados em *A. glaucophyllum*. Além desses, escutelareína foi detectada em *A. belangeri*.

Plantas da família Aspleniaceae são bastante estudadas quanto à sua composição química. Dezesesseis flavonoides glicosilados, derivados de quercetina e canferol foram identificados e isolados de *Asplenium trichomanes-ramosum* (IWASHINA *et al.*, 1995). Híbridos originados de espécies de *Asplenium* demonstraram presença de flavonoides em extratos de suas frondes, incluindo: derivados glicosilados de apigenina e luteolina

(MATSUMOTO *et al.*, 2003). Para *Asplenium adiantum-nigrum*, *Asplenium montanum* e *Cystopteris fragilis* foi relatada a presença de C- e O-glicosil-xantonas na composição química dessas espécies, sendo a mangiferina e a iso-mangiferina os compostos majoritários dessa classe (SMITH; HARBORNE, 1971; IMPERATO, 1980; RICHARDSON; LORENZ-LIBURNAU, 1982; IMPERATO, 1991a; IMPERATO, 1991b). Nosso grupo também demonstrou a presença de mangiferina em espécie de *Asplenium* (*A. serra*), bem como relatou a ocorrência de hesperidina e derivados da quercetina em *A. gastonis* (ANDRADE *et al.*, 2014).

Para o extrato bruto metanólico de *Cheilanthes glauca* foi verificada presença de dois derivados glicosilados dos flavonóis quercetina e canferol (PASTENE *et al.*, 2001). *Cheilanthes farinosa* foi a primeira espécie desse gênero na qual se identificou a presença de cheilantanas (cheilantatriol), caracterizadas como um grupo de sesquiterpenoides tricíclicos, que possuem inúmeras atividades biológicas relatadas (KHAN *et al.*, 1971). Estudos mais recentes apontam a existência de mais de 50 cheilantanas conhecidas, encontradas em outras fontes vegetais e organismos marinhos (UNGUR; KULCITXKI, 2009).

Relatos da presença de xantonas e flavonoides foram encontrados para diversas espécies da família Hymenophyllaceae. *Hymenophyllum barbatum* possui apigenina e quercetina em sua composição; canferol foi identificado para outras espécies dessa família, tais como: *H. polyanthosae*, *Trichomanes thysanossoma*, *T. javanicum* e *T. recurvum*. Além desses compostos, outras espécies também demonstraram presença de flavonas glicosiladas como, vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina. As xantonas: mangiferina, isomangiferina e seus derivados também foram caracterizados (MARKAM; WALLACE, 1980).

Espécies representantes da família Cyatheaceae acumulam flavonóis O-glicosídeos, predominantemente derivados do canferol e da quercetina, além de C-glicosilflavonas e flavanonas (WALLACE, 1989). Estudos com *Cyathea podophylla* e *Cyathea spinulosa* detectaram a presença de constituintes triterpenoides nestas espécies (ARAI *et al.*, 2003). Canferol e seus derivados, assim como derivados do ácido cafeico,

do ácido cumárico e do sitosterol foram identificados em diferentes frações do caule de *C. phalerata* (HORT, 2006). Para esta espécie, PIZZOLATTI e colaboradores (2007) relatam a presença de ciatenosina A, um derivado spiropiranosil do ácido protocatecuico em extratos do caule dessa planta. Derivados dos ácidos cafeico e cumárico também foram identificados, corroborando os resultados do outro autor. Estudos em nosso grupo de pesquisa já demonstraram presença de derivados do canferol em extratos das frondes de *C. phalerata* (ANDRADE *et al.*, 2014).

BRESCIANI e colaboradores (2003) estudaram a composição de uma fração não-polar de *Adiantum cuneatum*, coletada no Brasil, a qual apresentou filiceno e filicenal como constituintes majoritários. Essa constituição está em conformidade com relatos para a mesma espécie, oriunda de outros países. Em pesquisa realizada com raízes de *Didymochlaena truncatula*, os autores encontraram derivados de lignana, como didimoclaenonas A e B, estilbeno e derivados de estigmasterol. Esses compostos foram testados quanto às suas atividades citotóxicas frente a linhagens celulares cancerosas de ovário. Os resultados demonstraram que apenas o estilbeno foi ativo, apresentando valor de CI_{50} de 10 $\mu\text{g/mL}$ (CAO *et al.*, 2006).

Pteridium aquilinum é uma samambaia conhecida por apresentar ptaquilosídeo, um glicosídeo sesquiterpenoide, composto cancerígeno e mutagênico considerado o principal constituinte dessa planta (CARVALHO *et al.*, 2006; GOMES *et al.*, 2012). O ápice do broto é a região que concentra a maior quantidade dessa substância, sendo que o tipo de solo, o clima e a geografia são fatores determinantes no teor do constituinte (ALONSO-AMELOT, 1999; SMITH *et al.*, 1999). Além disso, pterosinas, sesquiterpenos com esqueleto 1-indanona, foram originalmente identificadas em *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum* (HIKINO *et al.*, 1970). Para outra espécie deste gênero, *P. revolutum*, recentemente foram isolados derivados glicosilados de pterosinas (CHEN *et al.*, 2015).

Cinco lactonas: angiopterlactonas A e B, osmundalactona, osmundalina e 3,5-dihidróxi- γ -caprolactona, foram isoladas a partir do rizoma de *Angiopteris caudatiformis*. Esta planta é muito utilizada na medicina popular chinesa no tratamento de doenças infecciosas, como a disenteria e a tuberculose (YU *et al.*, 2009). Flavonas,

diidrochalconas, chalconas, flavonoides e sesquiterpenos foram isolados do extrato diclorometano das frondes de *Woodsia scopulina* (ECONOMIDES; ADAM, 1998).

Outra classe de substâncias descrita em samambaias são os floroglucinóis, compostos orgânicos caracterizados como benzenotrióis, os quais já foram encontrados em espécies da família Dryopteridaceae, nos gêneros *Elaphoglossum* e *Dryopteris* (LEE *et al.*, 2003; SOCOLSKY *et al.*, 2009; SOCOLSKY *et al.*, 2010; NUÑEZ *et al.*, 2015). SOCOLSKY e colaboradores (2012a) isolaram dos rizomas e raízes de *E. crassipes* nove novos acilfloroglucinóis terpenilados, denominados crassipinas A-I. Estudo dos mesmos autores revelou a presença de outros acilfloroglucinóis terpenilados nos rizomas de *D. wallichiana* (SOCOLSKY *et al.*, 2012b).

Em revisão elaborada por SANTOS e colaboradores (2010) acerca das espécies de samambaias e licófitas identificadas no Brasil, os autores encontraram 78 estudos químicos de 60 espécies e 2 variedades de plantas desses grupos, sendo a sua grande maioria pertencente à classe das samambaias.

Em apenas uma espécie de samambaia brasileira, *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia*, a composição química do seu óleo volátil foi analisada e os autores relataram a presença de isoafricanol, um sesquiterpeno muito raro (SANTOS *et al.*, 2006). PINTO e colaboradores (2009) detectaram a presença de outros sesquiterpenos, como o silfiperfolano, isocumeno, cariofileno, dentre outros, no óleo dessa planta. Em estudos adicionais, os autores detectaram 31 substâncias presentes no óleo.

Para as espécies do gênero *Equisetum*, POUNY e colaboradores (2011) identificaram as substâncias inéditas: 2',3'-diidroprotogenquanona e 2',3'-diidro-2'-hidróxiprotoapigenona, além dos compostos já conhecidos: protoapigenona, protogenquanona, protoapigenina e 4'-O- β -D-glicopiranosil protoapigenina, em *E. fluviatile*. Na espécie sulamericana *E. giganteum*, foram demonstrados alcaloides, saponinas e flavonoides (DANIELSKI *et al.*, 2007). FRANCESCATO e colaboradores (2013) identificaram, nos caules de *E. giganteum*, derivados do ácido cafeico, flavonoides e estilpironas. Os derivados do canferol foram os flavonoides glicosilados mais

abundantes na espécie. Além disso, quercetina-3-*O*-(cafeoil)-glicosídeo foi reportada pela primeira vez no gênero *Equisetum*.

3.1.3. Aspectos Farmacológicos

As avaliações das atividades biológicas para estas plantas foram, em sua maioria, realizadas com extratos, obtidos com diferentes solventes e métodos. Os relatos incluem: atividade antibacteriana de *Adiantum lunulatum* (NIRANJAN REDDY *et al.*, 2001) e de *Dryopteris crassirhizoma* (KWON *et al.*, 2007), atividade antioxidante, vasodilatadora e hepatoprotetora de extrato hidroalcoólico e frações de *Cyathea phalerata* (HORT, 2006; HORT *et al.*, 2008), ação citotóxica e apoptótica do extrato aquoso de *Cheilanthes farinosa* frente a células hepáticas cancerosas (RADHIKA *et al.*, 2010), e, para a mesma espécie, atividades antinociceptiva e anti-inflamatória (YONATHAN *et al.*, 2006). Para *Dryopteris erythrosora* atividade antioxidante, relacionada ao conteúdo de flavonoides, foi demonstrada (XIE *et al.*, 2015). Relatos de atividade anticâncer para algumas espécies de gêneros distintos de samambaias (GRAHAM *et al.*, 2000; CHANG *et al.*, 2010) também foram encontrados.

A atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos de quatro espécies do gênero *Adiantum*, utilizadas popularmente em doenças de pele, bronquite, doenças inflamatórias e resfriados, foi avaliada frente a 5 bactérias gram-positivas, 6 gram-negativas e 8 cepas fúngicas. As atividades mais pronunciadas foram observadas para os extratos de *Adiantum venustum*, seguida de *Adiantum capillus-veneris*, *Adiantum peruvianum* e *Adiantum caudatum*. O extrato de *Adiantum capillus-veneris* apresentou baixo valor de concentração inibitória mínima (CIM) (0,48 µg/mL) frente à *Escherichia coli*, enquanto que *Adiantum venustum* inibiu o crescimento de *Aspergillus terreus*, com CIM de 0,97 µg/mL. Os autores descrevem que essas atividades pronunciadas podem estar relacionadas ao alto conteúdo de fenólicos encontrado nesses extratos (SINGH *et al.*, 2008).

Em estudo realizado com cinco espécies de diferentes famílias, incluindo, *Acrostichum aureum* (Pteridaceae), *Asplenium nidus* (Aspleniaceae), *Blechnum orientale* (Blechnaceae), *Cibotium barometz* (Cyatheaceae) e *Dicranopteris linearis* (Gleicheniaceae), quanto à capacidade antioxidante e antibacteriana de seus extratos metanólicos, foi verificada maior capacidade sequestradora de radicais livres, pelo método de DPPH (radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil), para *B. orientale*, seguida de *D. linearis* e *C. barometz*. Além disso, *B. orientale* foi a espécie mais ativa frente aos microrganismos testados, sendo *C. barometz* e *D. linearis* ativas, em menor proporção (LAI *et al.*, 2009).

DING e colaboradores (2008) realizaram estudo para avaliar a atividade antioxidante, pelo método do DPPH, de 31 extratos de samambaias. A maioria dos extratos demonstrou potente atividade antioxidante, especialmente os extratos de *Polystichum semifertile*, com concentração inibitória média (CI₅₀) igual a 5,4 µg/mL, *Nothoperanema hendersonii* (CI₅₀: 5,9 µg/mL) e *Braomea insignis* (CI₅₀: 6,1 µg/mL). Os autores ainda inferiram que, para a maioria dos extratos com alto conteúdo de fenólicos totais, foi observada potente capacidade antioxidante.

Essa associação entre conteúdo fenólico e atividade antioxidante também foi relatada em estudo com extratos aquosos de frondes de *Pteris ensiformis*. Para esta espécie, o derivado do ácido cafeoil quínico foi o composto com maior atividade antioxidante nos métodos de DPPH (CI₅₀: 10 µM) e capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (2 mM). Derivados do ácido cafeico, hispidina e canferol também demonstraram potente atividade antioxidante pelos métodos utilizados (CHEN *et al.*, 2007).

CETOJEVIĆ-SIMIN e colaboradores (2010) investigaram a atividade antioxidante e antiproliferativa de diferentes extratos hidrometanólicos de cavalinha (*Equisetum arvense*). O extrato hidroalcoólico de hastes de *Equisetum arvense* foi capaz de reverter o déficit cognitivo em ratos idosos. As propriedades antioxidantes desse extrato já haviam sido relatadas em estudos *in vitro* realizados anteriormente (DOS SANTOS JÚNIOR *et al.*, 2005). Efeitos analgésicos e anti-inflamatórios também foram observados para essa

planta (DO MONTE *et al.*, 2004). Na revisão sobre atividade antioxidante de samambaias e licófitas, realizada por TALUKDAR e colaboradores (2011), os autores encontraram relatos desse potencial para 31 espécies de samambaias, sendo que destas, 6 pertencem ao gênero *Equisetum*.

Os compostos isolados da samambaia *Neocheiropteris palmatopedata* foram avaliados quanto às suas capacidades anticâncer, baseadas na inibição do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), produção de óxido nítrico, inibição da enzima aromatase, dentre outros. Os compostos mais ativos foram: palmatosídeos B e C, que inibiram o TNF- α , apresentando valores de CI_{50} de 15,7 e 24,1 μ M, respectivamente e multiflorina A, que inibiu a enzima aromatase, com valor de CI_{50} igual a 15,5 μ M (YANG *et al.*, 2010). Dentro do tema atividade anticâncer, o flavonoide isolado de *Thelypteris torresiana*, protoapigenona, demonstrou potente atividade frente a células de câncer ovariano (CHANG *et al.*, 2008).

Desde longa data é conhecido o efeito do consumo de *Pteridium aquilinum*, por bovinos, a qual induz carcinomas de bexiga e intestinal (EVANS, 1979; BRYAN; PAMUKCU, 1982). A substância responsável por essa atividade é o ptaquilosídeo, o qual é eliminado na urina (CARVALHO *et al.*, 2006). Foi verificada a excreção deste composto também no leite, com risco potencial para a saúde humana (ALONSO-AMELOT, 1997). Para esta espécie e seu metabólito já foram descritos efeitos genotóxicos, avaliados em células epiteliais gástricas humanas e, em modelo animal. Altas doses de *P. aquilinum* (40 mg/mL) e ptaquilosídeo (60 μ g/mL) foram capazes de diminuir, *in vitro*, a viabilidade celular, além de induzir apoptose e causar quebras nas fitas de DNA. A administração oral do extrato de *P. aquilinum* aos animais induziu mutações no gene P53 da mucosa gástrica (GOMES *et al.*, 2012).

DION e colaboradores (2015) investigaram os efeitos anti-inflamatório e antioxidante de extratos de espécies de samambaias, incluindo: *Matteuccia struthiopteris*, *Osmunda japonica*, *Matteuccia orientalis* e *P. aquilinum*, demonstrando que os 4 extratos foram capazes de diminuir a expressão gênica de interleucina 1-beta (IL1- β) e apresentaram efeitos antioxidantes, provavelmente devido aos compostos presentes:

ácidos clorogênico, cafeico, *p*-cumárico, ferúlico, além de canferol e apigenina. Neste mesmo tema, LAMICHHANE e colaboradores (2014) evidenciaram efeitos antioxidante, anti-inflamatório e anti-adipogênico para extrato bruto e frações de *Cheilanthes albomarginata*.

Outra atividade demonstrada para algumas espécies de samambaias e seus compostos é a capacidade cicatrizante, como observado nos estudos de CHANDRA e colaboradores (2015), nos quais a aplicação tópica do extrato das folhas de *Lygodium flexuosum* em feridas induzidas em ratos albinos aumentou a porcentagem de cicatrização dos tecidos e diminuiu o tempo de epitelização das áreas afetadas. Potencial cicatrizante também foi evidenciado para uma mistura de compostos galactosildiácil gliceróis obtida de *Ophioglossum vulgatum*, sendo demonstrado este efeito sobre queratinócitos, *in vitro*. O ensaio demonstrou potente aumento nos níveis de oclusão das feridas na monocamada de queratinócitos, na dose de 5 µg/mL (CLERICUZIO *et al.*, 2014).

Para a espécie *Adiantum cuneatum* (popularmente conhecida como avenca), foram realizadas avaliações das atividades analgésica e anti-inflamatória da fração não-polar e dos triterpenos isolados filiceno e filicenal. Os resultados demonstraram que a fração hexano, bem como as substâncias isoladas, exibiram potentes atividades analgésica e antiinflamatória nos modelos *in vivo*: teste de contorção e dor induzida por formalina. O filiceno apresentou inibição com valor de CI_{50} igual a 19,5 mmol/kg de peso corporal no teste de contorção, administrado pela via intraperitoneal. Este composto, na concentração de 10 mg/kg (24 mmol/kg), exibiu atividade anti-inflamatória observada no modelo da formalina. Os autores concluíram que esses resultados justificam o uso popular dessa planta no tratamento de processos inflamatórios (BRESCIANI *et al.*, 2003).

Estudos adicionais com filiceno, obtido de *Adiantum cuneatum*, demonstraram que este composto produziu efeito antinociceptivo, dose-dependente, no número de contrações abdominais induzidas por ácido acético, nas concentrações de 10, 30 e 60 mg/kg, quando administrado pela via intraperitoneal, sendo mais potente do que as substâncias de referência, acetaminofeno, diclofenaco e ácido acetilsalicílico, nas mesmas doses testadas. Este composto também produziu inibição dose-dependente da dor causada

pela capsaicina e pelo glutamato, com valores de CI_{50} iguais a 11,7 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente. Os autores demonstraram, ainda, que esta atividade antinociceptiva envolve interações diretas com os sistemas dopaminérgico, colinérgico e GABAérgico (DE SOUZA *et al.*, 2009).

Para os compostos da classe dos floroglucínóis, encontrados em algumas espécies de samambaias, são relatadas principalmente, atividades antioxidante e antidepressiva. LEE e colaboradores (2003) demonstraram a capacidade antioxidante dos rizomas de *Dryopteris crassirhizoma* e de dois derivados floroglucínóis, ácido flavaspídico PB e AB, isolados da planta. No ensaio para avaliação da lipoperoxidação, os compostos apresentaram forte atividade antioxidante (CI_{50} : 12,9 e 13,1 μ M, respectivamente), enquanto que moderado efeito foi observado nos ensaios de DPPH (CI_{50} : 71,7 e 76,3 μ M) e ânion superóxido (CI_{50} : 58,6 e 64,4 μ M). SOCOLSKY e colaboradores (2012a) evidenciaram potencial antidepressivo para o composto majoritário isolado de *Elaphoglossum crassipes*, crassipina A, bem como para o seu derivado peracetilado, através do teste de nado forçado em camundongos, após administração oral de 15 mg/kg.

Atividades frente à alvos enzimáticos e não-enzimáticos, relacionados com processos neurodegenerativos, já foram investigadas em diferentes espécies de samambaias. ROY e colaboradores (2015) demonstraram que o extrato metanólico de *Displazium esculentum* possui atividade anti-AChE e anti-NADH oxidase (CI_{50} : 272 e 265 μ g/mL, respectivamente). Ainda, frente ao radical DPPH, o extrato demonstrou atividade sequestradora (CI_{50} : 402 μ g/mL), podendo ser considerado candidato para investigações de compostos com propriedades anti-neurodegenerativas. O extrato de *Dryopteris erythrosora*, rico em flavonoides, apresentou capacidade antioxidante, frente aos radicais DPPH, ABTS [ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)] e ânion superóxido (0,36 mg/mL). Além disso, foi capaz de inibir a AChE, de maneira dose-dependente, sendo que a maior concentração testada apresentou mais de 90% de inibição enzimática (CAO *et al.*, 2013).

Estudo prévio em nosso laboratório evidenciou efeitos antioxidante, anti-inflamatório e inibitório das monoamina oxidases de extratos etanólicos de diversas

espécies de samambaias coletadas nas regiões sul e sudeste do Brasil. Quanto ao potencial antioxidante reativo total, os extratos de *Asplenium serra*, *Lastreopsis amplissima* e *Cyathea dichromatolepis* foram os mais ativos, na concentração de 10 µg/mL. Na avaliação *in vitro* da quimiotaxia de células polimorfonucleares frente ao lipopolissacarídeo de *E. coli*, *Asplenium serra* e *Didymochlaena truncatula* foram as espécies com atividade pronunciada (inibindo 94,06 e 93,41%, respectivamente, a migração das células) a 10 µg/mL, sendo que todos os extratos ensaiados apresentaram atividade superior a 60%. Quanto à inibição das monoamina oxidases, 4 extratos foram os mais ativos frente à MAO-A (*D. truncatula*, *Alsophila setosa*, *C. phalerata* e *C. delgadii*), com inibições entre 82,61 e 70,32%, a 100 µg/mL e todos inibiram com maior intensidade a MAO-A (>54%) em comparação à MAO-B (<45%) (ANDRADE *et al.*, 2014).

3.2. O Gênero *Blechnum*

Plantas do gênero *Blechnum* (Blechnaceae) são vegetais subarborescentes que apresentam grande potencial ornamental, denominadas popularmente como samambaias, sendo amplamente distribuídas em todo o estado do Rio Grande do Sul (FRANZ; SCHMITT, 2005). *Blechnum binervatum* (Poir.) C.V.Morton & Lellinger (Figura 2A) é uma espécie nativa do Brasil, com relatos de ocorrência nas regiões nordeste, sudeste e sul do país, incluída no domínio fitogeográfico da mata atlântica (DITTRICH; SALINO, 2015a). *Blechnum brasiliense* Desv. (Figura 2B) também é nativa do Brasil, encontrada no cerrado e mata atlântica, nas regiões nordeste, centro-oeste, sudeste e sul do país (DITTRICH; SALINO, 2015b). A espécie *Blechnum occidentale* L. (Figura 2C) é encontrada em diversos domínios fitogeográficos do país, como a amazônia, a caatinga, o cerrado e a mata atlântica. Há relatos da sua presença em todas as regiões do Brasil (DITTRICH; SALINO, 2015c).



Figura 2. Fotografia das espécies A) *Blechnum binervatum*; B) *B. brasiliense*; C) *B. occidentale*.

Não foram encontrados relatos na literatura sobre a composição química ou atividades biológicas da espécie *B. binervatum*. Para *B. occidentale*, NONATO e colaboradores (2009) demonstraram que extratos metanólicos das folhas desta espécie, quando administrados por via intraperitoneal e oral, produziram efeito anti-inflamatório e antinociceptivo, justificando seu uso na medicina popular, na qual a infusão desta planta é relatada para tratamento de doenças inflamatória e pulmonar, infecções urinárias e complicações hepáticas (BARROS; ANDRADE, 1997).

Alguns compostos químicos, pertencentes a diferentes classes, já foram identificados em espécies de *Blechnum* (Tabela 1). Nos estudos de HARBORNE (1966), foi demonstrada a presença de luteolinidina 5-*O*-glicosídeo em *Blechnum brasiliense* var. *corcovadense*. Além disso, seis outros glicosídeos de luteolinidina e de apigenina, bem como luteolinidina glicosídeo acetilada foram isolados de duas espécies de *Blechnum*: *B. procerum* e *B. novae-zelandicae* (CROWDEN; JARMAN, 1974; SWINNY, 2001). Há, ainda, relatos da presença de ácido rosmarínico em espécies da família Blechnaceae (samambaias) (HÄUSLER *et al.*, 1992; SZABO *et al.*, 1993). BOHM (1968) detectou, através de comparação com padrões, por cromatografia em camada delgada, a presença de ácido rosmarínico no extrato etanólico de *B. brasiliense*, a qual apresentou também, banda correspondente ao ácido clorogênico. *B. discolor*, *B. orientalis* e *B. spicant* apresentaram ácido clorogênico, sendo verificada, adicionalmente, a presença de ácido bléchnico na última espécie.

Quatro lignanas, ácido bléchnico, ácido 7-epibléchnico, ácido 8-epibléchnico e ácido brainico foram isolados de *Blechnum orientale*, sendo as estruturas dos compostos determinadas por métodos espectroscópicos e conversão química (WADA *et al.*, 1992). HINCAPIÉ e colaboradores (2011a) identificaram na fração hexano de *Blechnum chilense*, as fitoecdisonas: ecdisona, ponasterona, shidasterona e 2-deóxi-crustecdisona. Ainda, o teor de fenóis totais nas frações hexano e acetato de etila das folhas dessa planta foi avaliado pelo método de Folin Ciocalteau, obtendo-se valores iguais a 5,57 e 10,89 mmol equivalente em ácido gálico/g amostra, respectivamente (HINCAPIÉ *et al.*, 2011b).

Para *B. brasiliense* foi demonstrada capacidade de inibição do radical DPPH, tanto da fração acetato de etila, quanto do extrato bruto, com CI_{50} iguais a 1,43 mg/mL e 4,14 mg/mL, respectivamente. Esses derivados da planta apresentaram altos teores de fenóis totais, expressos em μ g equivalentes de ácido gálico/mg de amostra, cujos valores foram iguais a 23,52 para o extrato bruto e 114,7 para a fração acetato de etila (FARIAS *et al.*, 2007).

As folhas de *B. orientale* são usadas tradicionalmente no tratamento de furúnculos, abscessos e feridas, bem como, na dor de estômago e bexiga (AHMAD; HOLDSWORTH, 2003; SHIL *et al.*, 2014). Para esta espécie, já foram demonstradas potenciais atividades frente a bactérias gram-negativas, como *Proteus vulgaris* (MARIDASS; GHANTIKUMAR, 2008). XIA e colaboradores (2014) investigaram o efeito anticâncer do extrato desta espécie em células humanas de câncer de pulmão, evidenciando que o extrato contendo 19,1 mg de flavonoides/g amostra apresentou 43% de citotoxicidade frente às células cancerosas.

Nos estudos de LAI e colaboradores (2009), *Blechnum orientale* apresentou alto conteúdo total de polifenóis e potente efeito antioxidante e antibacteriano. Para as frações acetato de etila, butanol e aquosa desta espécie, também há relatos de potente atividade sequestradora de radicais livres (CI_{50} : 8,6 a 13,0 μ g/mL), além de interessante atividade frente a linhagens humanas de câncer de cólon HT-29 (CI_{50} : 27,5 a 42,8 μ g/mL). Além disso, essas três frações foram efetivas contra bactérias gram-positivas como: *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (CIM:

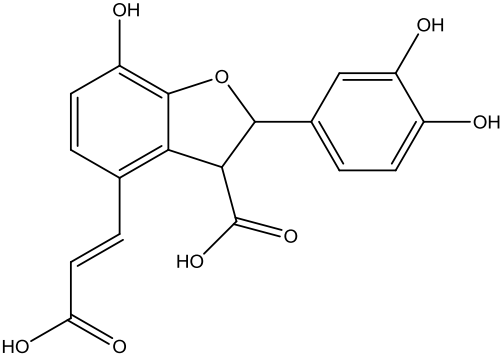
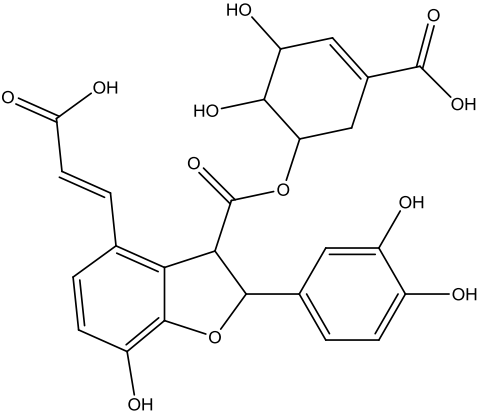
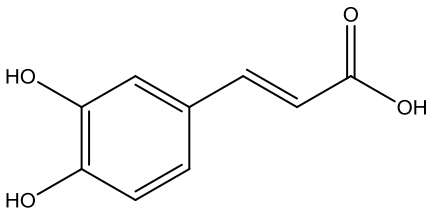
5,6 a 250 µg/mL). As análises fitoquímicas revelaram a presença de flavonoides, terpenoides e taninos nestas frações (LAI *et al.*, 2010).

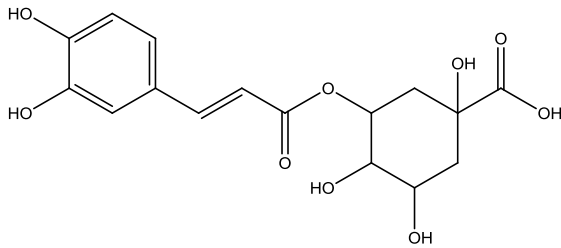
Estudos mais recentes, realizados por LAI e colaboradores (2011), demonstraram que o extrato aquoso de *Blechnum orientale* apresentou atividade cicatrizante, reduzindo significativamente a área das feridas e o tempo de reepitelização, estimulando a produção de colágeno. Esses resultados foram observados através dos estudos *in vivo*, nos quais o extrato foi administrado topicamente, na concentração de 2% nos animais do grupo tratado. Ainda, os autores relataram que esses achados foram suportados pelas avaliações histopatológicas realizadas nos locais das feridas, validando o uso desta samambaia na medicina tradicional, constituindo potente produto candidato para o tratamento de feridas dérmicas.

Atividade antimicrobiana do extrato metanólico de *Blechnum chilense* foi demonstrada nos estudos de MØLGAARD e colaboradores (2011). Foram avaliados os extratos obtidos de folhas, caules e raízes da planta, sendo observados efeitos mais pronunciados para o extrato das raízes. Esse extrato foi ativo frente à *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (quantidade inibitória mínima menor que 1 mg) e, em menor proporção frente à *Bacillus subtilis* e *Penicillium expansum*. Adicionalmente, as frações acetato de etila e hexano desta planta, mesmo em baixas concentrações (10 ppm), afetaram o ciclo de vida de *Tetranychus urticae*, causando significativa diminuição da população desse ácaro, considerado praga às plantas (HINCAPIÉ *et al.*, 2011a).

Estudo desenvolvido por HINCAPIÉ e colaboradores (2011b) demonstrou atividade antioxidante, pelo método de DPPH, para as frações metanol-água (1:1, v/v) e acetato de etila de *B. chilense*, apresentando porcentagens de inibição da formação do radical de 64,55% e 84,47%, respectivamente. O extrato metanólico desta espécie foi avaliado por FALKENBERG e colaboradores (2012), os quais evidenciaram efeito inibitório sobre a agregação plaquetária no sangue de ovelhas. Ainda, o extrato foi capaz de inibir a agregação em sangue humano, induzida por adenosina difosfato e colágeno, demonstrando o efeito anticoagulante dessa planta.

Tabela 1. Estruturas de alguns metabólitos secundários encontrados em diferentes espécies de samambaias.

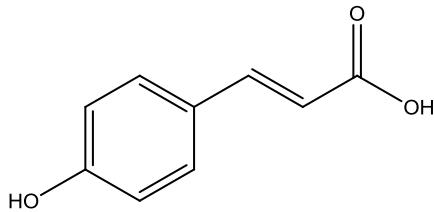
Composto / Estrutura química	Espécie(s)
 <p data-bbox="435 779 636 810">ácido bléchnico</p>	<p data-bbox="841 552 1448 621"><i>Blechnum spicant</i> (BOHM, 1968; WANG <i>et al.</i>, 2001)</p> <p data-bbox="841 640 1274 672"><i>B. orientale</i> (WADA <i>et al.</i>, 1992)</p>
 <p data-bbox="443 1276 628 1308">ácido brainico</p>	<p data-bbox="841 1039 1252 1071"><i>B. spicant</i> (WANG <i>et al.</i>, 2001)</p> <p data-bbox="841 1089 1274 1121"><i>B. orientale</i> (WADA <i>et al.</i>, 1992)</p>
 <p data-bbox="451 1619 620 1650">ácido cafeico</p>	<p data-bbox="841 1350 1448 1455"><i>Cyathea phalerata</i> (HORT, 2006; PIZZOLATTI <i>et al.</i>, 2007; ANDRADE <i>et al.</i>, 2014)</p> <p data-bbox="841 1474 1448 1579">Derivados do ácido cafeico para <i>Equisetum giganteum</i> (FRANCESCATO <i>et al.</i>, 2013) e <i>C. phalerata</i> (ANDRADE <i>et al.</i>, 2014)</p> <p data-bbox="841 1598 1448 1703"><i>Matteuccia struthiopteris</i>, <i>Osmunda japonica</i>, <i>M. orientalis</i> e <i>Pteridium aquilinum</i> (DION <i>et al.</i>, 2015)</p>



ácido clorogênico

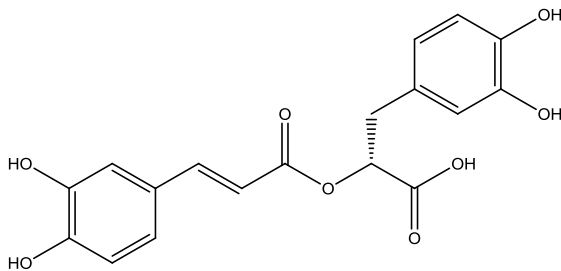
P. aquilinum, *M. struthiopteris*, *M. orientalis*,
O. japonica (DION *et al.*, 2015)

B. brasiliense, *B. discolor*, *B. orientalis* e *B. spicant* (BOHM, 1968)

ácido *p*-cumárico

C. phalerata (HORT, 2006; PIZZOLATTI *et al.*, 2007)

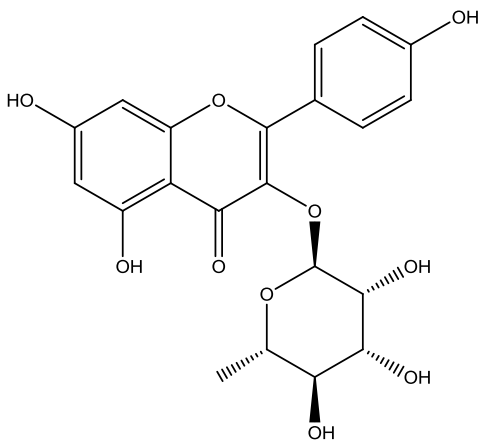
M. struthiopteris, *O. japonica*, *M. orientalis* e
P. aquilinum (DION *et al.*, 2015)



ácido rosmarínico

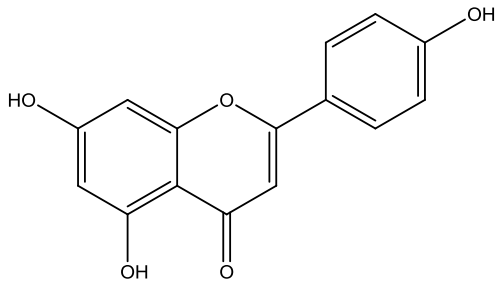
Família Blechnaceae (HÄUSLER *et al.*, 1992;
SZABO *et al.*, 1993)

B. brasiliense (BOHM, 1968)



afzelina

Neocheiropteris palmatopedata (YANG *et al.*,
2010)



apigenina

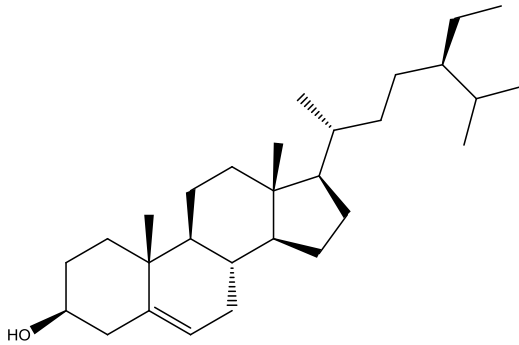
Hymenophyllum barbatum (MARKAM; WALLACE, 1980)

M. struthiopteris, *O. japonica*, *M. orientalis* e *P. aquilinum* (DION *et al.*, 2015)

Derivados glicosilados para espécies de *Asplenium* (MATSUMOTO *et al.*, 2003)

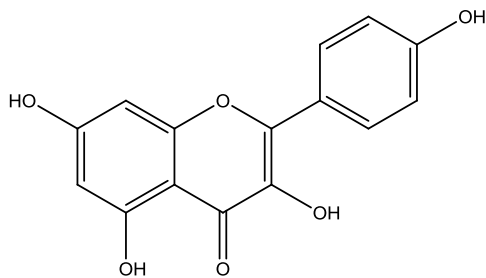
Derivados da apigenina no gênero *Equisetum* (POUNY *et al.*, 2011)

Glicosídeos de apigenina em *Blechnum procerum* e *B. novae-zelandicae* (CROWDEN; JARMAN, 1974; SWINNY, 2001)



beta-sitosterol

C. phalerata (HORT, 2006)



canferol

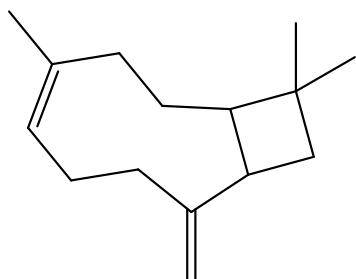
Hymenophyllum polyanthosae, *Trichomanes thysanossoma*, *T. javanicum* e *T. recurvum* (MARKAM; WALLACE, 1980)

Espécies da família Aspleniaceae (UMILKASOM; HARBORNE, 1991)

Derivados glicosilados para *Cheilanthes glauca* (PASTENE *et al.*, 2001) e *Asplenium trichomanes-ramosum* (IWASHINA *et al.*, 1995)

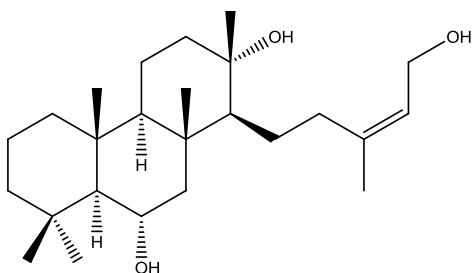
Cyathea phalerata (HORT, 2006). Derivados em *C. phalerata* (ANDRADE *et al.*, 2014)

Equisetum giganteum (FRANCESCATO *et al.*, 2013)



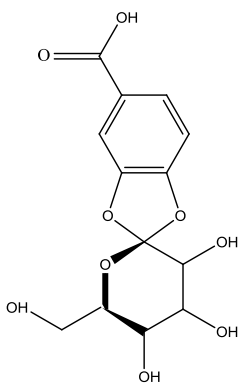
cariofileno

Anemia tomentosa var. *anthriscifolia* (PINTO *et al.*, 2009)



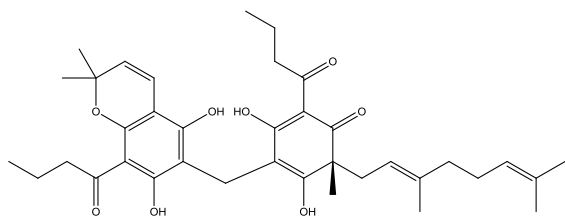
cheilantatriol

Cheilanthes farinosa (KHAN *et al.*, 1971)



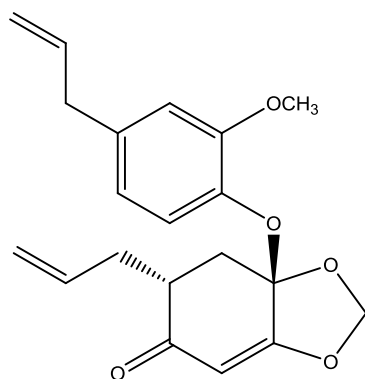
ciatenosina A

Cyathea phalerata (PIZZOLATTI *et al.*, 2007)



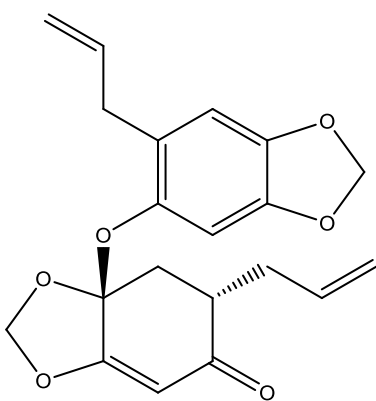
crassipina A

Elaphoglossum crassipes (SOCOLSKY *et al.*, 2012a)



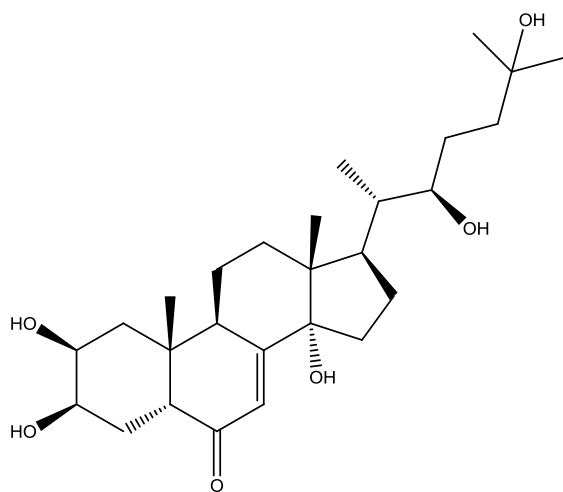
didimoclaenona A

Didymochlaena truncatula (CAO *et al.*, 2006)



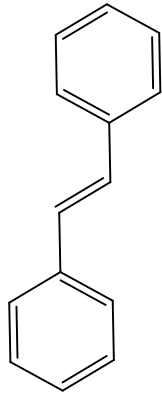
didimoclaenona B

Didymochlaena truncatula (CAO *et al.*, 2006)



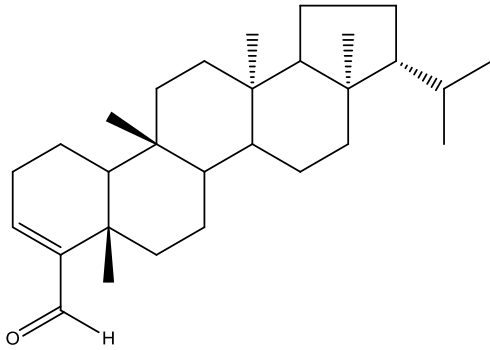
ecdisona

Blechnum chilense (HINCAPIÉ *et al.*, 2011a)



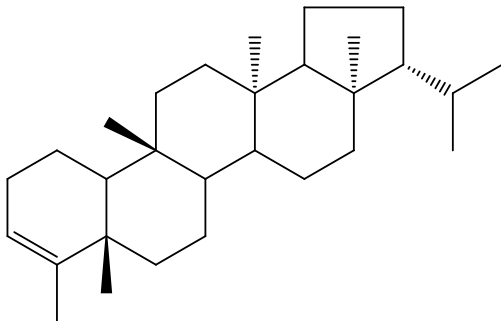
estilbeno

D. truncatula (CAO *et al.*, 2006)



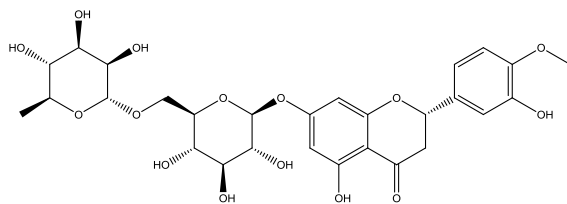
filicenal

Adiantum cuneatum (BRESCIANI *et al.*, 2003)



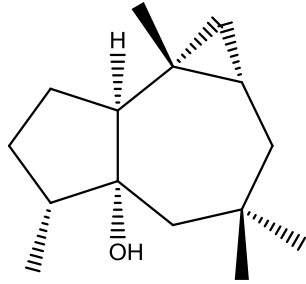
filiceno

Adiantum cuneatum (BRESCIANI *et al.*, 2003)



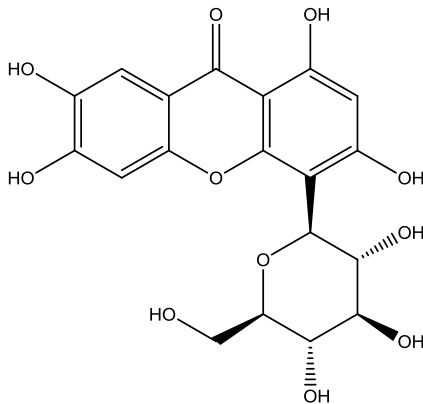
hesperidina

Asplenium gastonis (ANDRADE *et al.*, 2014)



isoafricanol

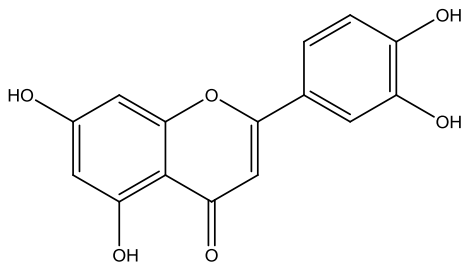
Anemia tomentosa var. *anthriscifolia* (SANTOS et al., 2006)



iso-mangiferina

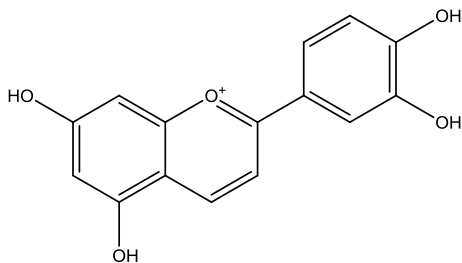
Asplenium adiantum-nigrum, *Asplenium montanum* e *Cystopteris fragilis* (SMITH; HARBORNE, 1971; IMPERATO, 1980; RICHARDSON; LORENZ-LIBURNAU, 1982; IMPERATO, 1991a; IMPERATO, 1991b;)

Espécies da família Hymenophyllaceae (MARKAM; WALLACE, 1980)



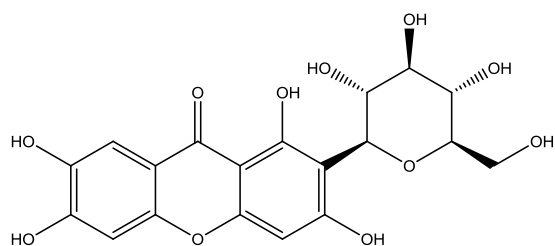
luteolina

Derivados glicosilados para espécies de *Asplenium* (MATSUMOTO et al., 2003)



luteolinidina

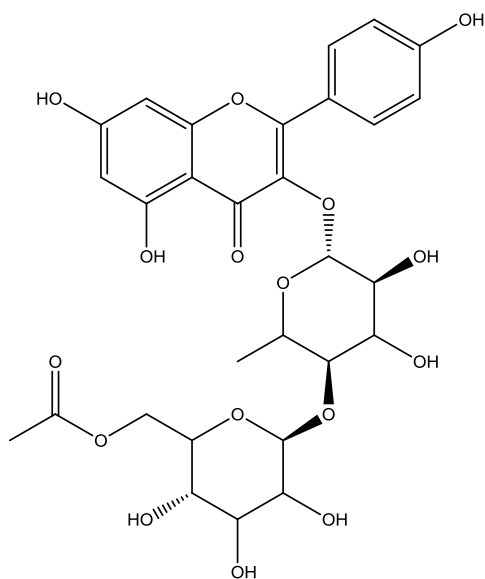
Derivados glicosilados em *Blechnum brasiliense* var. *corcovadense* (HARBORNE, 1966); *B. procerum* e *B. novae-zelandicae* (CROWDEN; JARMAN, 1974; SWINNY, 2001)



mangiferina

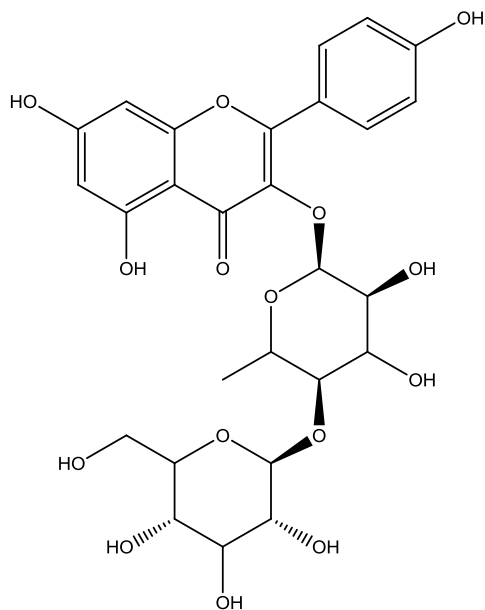
Asplenium adiantum-nigrum, *A. montanum* e *Cystopteris fragilis* (SMITH; HARBORNE, 1971; IMPERATO, 1980; RICHARDSON; LORENZ-LIBURNAU, 1982; IMPERATO, 1991a; IMPERATO, 1991b;). *A. serra* (ANDRADE *et al.*, 2014)

Espécies da família Hymenophyllaceae (MARKAM; WALLACE, 1980)



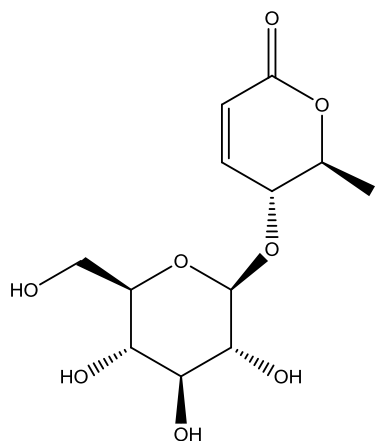
multiflorina A

Neocheiropteris palmatopedata (YANG *et al.*, 2010)



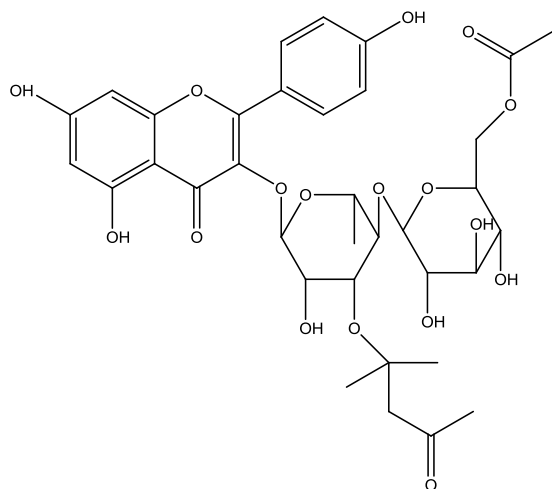
multiflorina B

Neocheiropteris palmatopedata (YANG *et al.*, 2010)



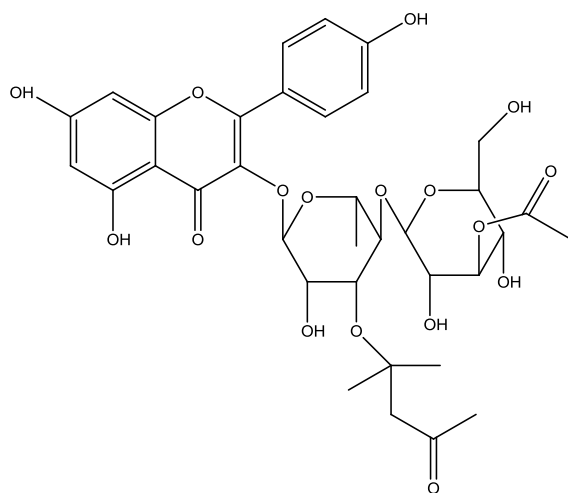
osmundalina

Angiopteris caudatifomis (YU *et al.*, 2009)



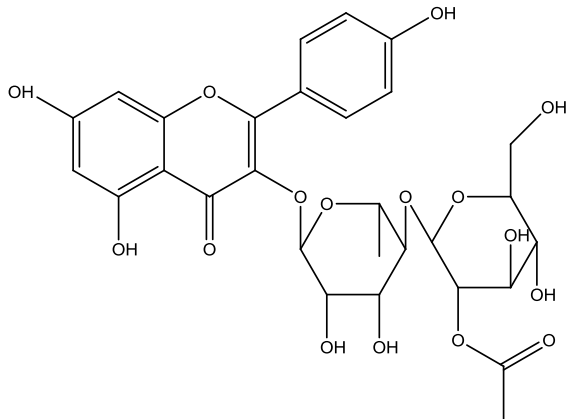
palmatosídeo A

Neocheiropteris palmatopedata (YANG *et al.*, 2010)



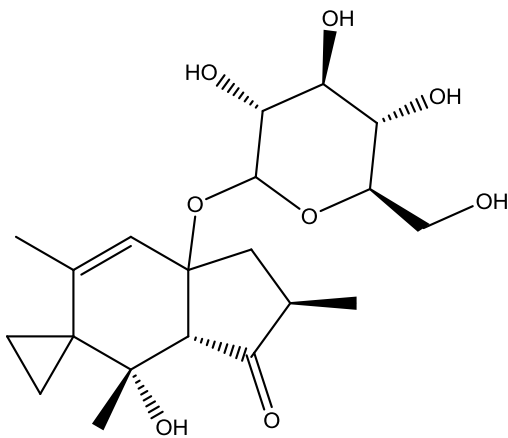
palmatosídeo B

Neocheiropteris palmatopedata
(YANG *et al.*, 2010)



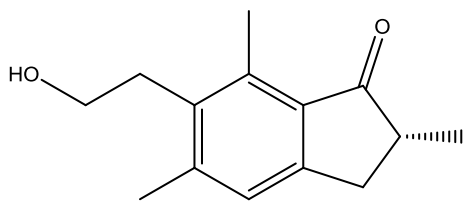
Neocheiropteris palmatopedata
(YANG *et al.*, 2010)

palmatosídeo C



Pteridium aquilinum (CARVALHO *et al.*, 2006;
GOMES *et al.*, 2012)

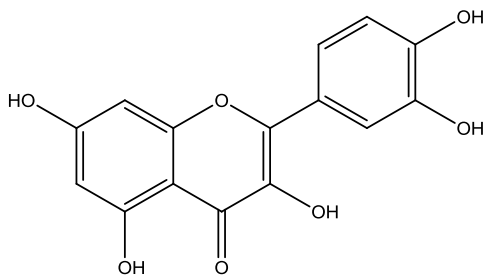
ptaquilosídeo



Pteridium aquilinum var. *latiusculum* (HIKINO
et al., 1970)

Derivados glicosilados em *P. revolutum* (CHEN
et al., 2015)

pterosina B



quercetina

Hymenophyllum barbatum (MARKAM;
WALLACE, 1980)

Espécies da família Aspleniaceae
(UMILKASOM; HARBORNE, 1991)

Derivados glicosilados em *Cheilanthes glauca*
(PASTENE *et al.*, 2001) e *Asplenium*
trichomanes-ramosum (IWASHINA *et al.*,
1995) e *A. gastonis* (ANDRADE *et al.*, 2014)

3.3. Doenças Neurodegenerativas

Doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (DA) e a doença de Parkinson (DP), são definidas pela destruição progressiva e irreversível de populações de células neuronais e estão associadas com agregados de proteínas, levando a disfunções do sistema nervoso, gerando distúrbios cognitivos, motores ou comportamentais. Esta heterogeneidade clínica é em grande parte atribuída à variabilidade patológica, que compromete de diferentes formas o SNC, uma vez que, para cada doença, existe uma vulnerabilidade seletiva de populações de células cerebrais (SAXENA; CARONI, 2011).

A DP é um distúrbio que afeta pessoas em o todo mundo, com uma taxa bruta de incidência de 4,5-19,0 por 100.000 habitantes, por ano. A grande variação nas estimativas de incidência é devida, provavelmente, a diferenças na metodologia e processo de avaliação bem como à distribuição etária da população da amostra. A demência é considerada um dos maiores desafios em saúde pública desta geração, incluindo a DA, que é a mais prevalente. Atualmente, mais de 35 milhões de pessoas no mundo possuem algum tipo de demência e, estima-se que este número dobre até 2030 e triplique até 2050, atingindo cerca de 115 milhões de pessoas (PRINCE *et al.*, 2013).

A DP é um distúrbio progressivo do movimento que ocorre principalmente na velhice. Essa doença é caracterizada por um processo degenerativo que afeta algumas regiões do cérebro, incluindo alterações na proteína neuronal pré-sináptica: α -sinucleína, levando à perda de neurônios dopaminérgicos e à degeneração precoce das terminações nervosas (STEFANIS, 2012). Essa patologia parece estar relacionada com alterações nos níveis de uma variedade de compostos nocivos, como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, prostaglandinas e citocinas pró-inflamatórias (McGEER; McGEER, 2008).

A abordagem farmacológica para o tratamento dessa doença baseia-se no controle sintomático via restituição de dopamina, principalmente através da administração de seu precursor L-DOPA [ácido (S)-2-amino-3-(3,4-di-hidróxifenil propanoico)] ou através do uso de IMAO (POEWE *et al.*, 2010; SOZIO *et al.*, 2012). Especificamente, fármacos inibidores da MAO protegem a dopamina da degradação intraneuronal. Atualmente,

outras estratégias também estão sendo consideradas para tratamento desta doença, como a utilização de bloqueadores do metabolismo da dopamina, exemplificados pelos inibidores da enzima COMT (ICOMT), efetivos em casos de flutuação motora (CONNOLLY; LANG, 2014).

A DA é caracterizada por progressiva perturbação da memória e cognição. Depósitos extracelulares do peptídeo β -amiloide, formando placas amiloides, e a presença de emaranhados neurofibrilares intracelulares são as características neuropatológicas da doença. Tanto as placas senis, quanto os emaranhados estão em áreas cerebrais associadas com o aprendizado, comportamento e memória, de forma que esses locais exibam um menor número de sinapses e maior dano neuronal, relacionados a presença dessas anormalidades, levando ao comprometimento da memória, raciocínio e coordenação motora, gerando problemas cognitivos e demência (SERRANO-POZO *et al.*, 2011).

Tratando-se de uma doença que envolve inúmeras alterações bioquímicas, várias abordagens terapêuticas foram demonstradas para tratamento da DA, destacando-se o restabelecimento dos níveis diminuídos de neurotransmissores, a neuroproteção e o combate a aspectos específicos da doença (SALOMONE *et al.*, 2011). A principal estratégia empregada no tratamento da DA visa aumentar a eficiência da transmissão colinérgica cerebral dos pacientes afetados, através do uso de inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE). Esses fármacos são aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) para o tratamento dos sintomas leves e moderados dessa doença, e incluem: donepezil, rivastigmina, galantamina e tacrina. Ensaios clínicos tem demonstrado que esses fármacos causam melhora estatisticamente significativa, porém discreta, das funções cognitivas (SMITH *et al.*, 2011). Além disso, o antagonista do receptor NMDA (N-metil-D-aspartato): memantina, também foi aprovado para tratamento de sintomas moderados e graves (MANGIALASCHE *et al.*, 2010).

3.3.1. Importância da Enzima Monoamina Oxidase

A MAO é uma enzima mitocondrial encontrada no cérebro e em regiões periféricas do organismo, sendo responsável pela desaminação oxidativa de aminas biogênicas, inativando muitas substâncias bioativas, incluindo dopamina, serotonina, norepinefrina e tiramina. Esta enzima apresenta-se como duas principais isoformas, A e B. Alguns substratos possuem maior afinidade por determinada isoforma da enzima, sendo a dopamina, a tiramina e a triptamina consideradas substrato para ambas as isoformas da enzima (YOUDIM *et al.*, 2006; HERRAIZ, 2007). Essa oxidação catalisada pela MAO resulta na produção de peróxido de hidrogênio e de aldeídos, produtos que podem provocar dano celular oxidativo (Figura 3) (FINBERG *et al.*, 2014).

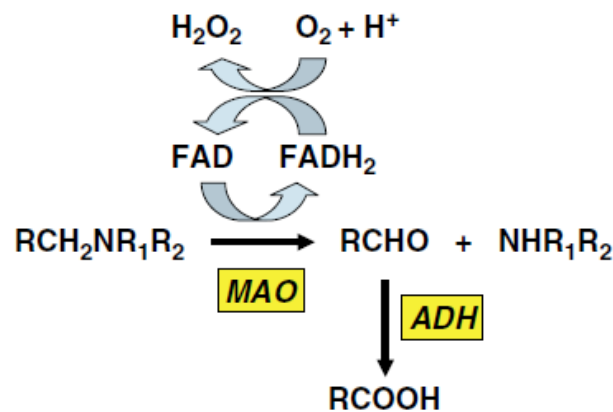


Figura 3. Esquema representativo da desaminação oxidativa de monoaminas catalisada pela MAO mitocondrial. O produto primário da reação é o aldeído que corresponde à monoamina oxidada, posteriormente oxidado pela enzima aldeído desidrogenase (ADH). O ciclo FAD-FADH₂ gera peróxido de hidrogênio (H₂O₂) que, em sistemas normais, é inativado pelas enzimas catalase e glutatona peroxidase. Reproduzido de YOUDIM; BAKHLE (2005).

A redução dos níveis de atividade da MAO acarreta no aumento das concentrações de certos neurotransmissores no cérebro, cujo declínio está intimamente ligado ao processo de envelhecimento, além de uma diminuição na produção de peróxido de

hidrogênio. Este último é um dos subprodutos da reação catalisada pela MAO, o qual pode causar aumento na peroxidação lipídica e modificações químicas em proteínas e ácidos nucleicos, resultando em processos neurodegenerativos (RADAK *et al.*, 2011; SIDDIQUE *et al.*, 2012).

MAO-A e MAO-B constituem dois alvos interessantes para o desenvolvimento de novas moléculas bioativas. Inibidores da MAO-A são empregados no tratamento de depressão e transtornos de ansiedade. Sabe-se, de longa data, que distúrbios do humor afetam uma porcentagem significativa de indivíduos portadores das DA e DP em algum ponto da evolução dessas patologias. Essa debilidade acomete de 40 a 50% no que se refere tanto aos pacientes portadores da DA como da DP (AARSLAND *et al.*, 2009; MODREGO, 2010). A depressão na DP é geralmente associada a uma redução de catecolaminas cerebrais, como a serotonina e a dopamina (LIBERT *et al.*, 2011; JÄGER *et al.*, 2013).

Enquanto IMAO-A estão associados ao tratamento da depressão, IMAO-B são utilizados para o tratamento sintomático da DP. Essa divisão é contestável, uma vez que IMAO-A seletivos e reversíveis, como a moclobemida, também podem ser empregados no tratamento da DP, por demonstrarem melhora psicomotora e sobre a memória de longo prazo (YOUUDIM; BAKHLE, 2006). Muitos dos IMAO utilizados na clínica são irreversíveis, ligando-se covalentemente à enzima e inativando-a, resultando em importantes efeitos colaterais, principalmente devido a interações com fármacos simpatomiméticos e com alimentos contendo tiramina, levando a reações hipertensivas severas. Esses inibidores podem, ainda, contribuir para diversos efeitos indesejáveis no SNC, incluindo insônia, irritabilidade e agitação (FLOCKHART, 2012). Assim, o desenvolvimento de novos IMAO tem como desafio a busca por inibidores potentes e com efeitos colaterais reduzidos ou inexistentes.

A relação entre a DA e o aumento da atividade enzimática da MAO é conhecida há muitos anos, observando-se atividade elevada da enzima nos pacientes, sendo IMAO considerados, atualmente, promissores para tratamento dessa neurodegeneração (CAI,

2014). A atividade da MAO-B, assim como a expressão aumentada de RNA mensageiro (mRNA) que codifica ambas isoformas da enzima, mostraram-se elevadas em várias áreas do cérebro desses pacientes, incluindo hipocampo e córtex cerebral (KENNEDY *et al.*, 2003). Há também dados sugerindo que inibidores da MAO-A podem melhorar a função cognitiva em pacientes com Alzheimer (CAI, 2014) e que os metabólitos neurotóxicos produzidos pela atividade da MAO-A estão presentes em níveis elevados nos neurônios cerebrais de pacientes com esta doença (BURKE *et al.*, 2001).

A atividade da MAO pode ser determinada por ensaios fluorimétricos com o emprego de substratos que, após sofrerem oxidação, produzem compostos fluorescentes, como por exemplo, kinuramina, substrato não-seletivo para MAO-A e MAO-B (VAN DIERMEN *et al.*, 2009; DOS SANTOS PASSOS *et al.*, 2013; ANDRADE *et al.*, 2014). A reação catalisada pela MAO converte kinuramina no produto fluorescente 4-hidróxiquinolina, facilmente detectado por fluorescência com $\lambda_{exc} = 315$ nm e $\lambda_{em} = 380$ nm (HARAGUCHI *et al.*, 2004).

3.3.2. Antioxidantes e Neurodegeneração

Os radicais livres, também denominados "espécies reativas", são constantemente gerados e eliminados no organismo, desempenhando papel essencial para uma variedade de processos biológicos. Quando ocorre um desbalanço entre a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a reparação da produção excessiva dos mesmos, isto causa danos oxidativos a membranas, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Ainda, evidências sugerem que a etiologia de diversas doenças, incluindo carcinogênese, doenças neurodegenerativas, hepáticas, *diabetes mellitus* e inflamação crônica, esteja intimamente ligada ao aumento intrínseco de EROs, uma condição conhecida como estresse oxidativo (DE MOURA *et al.*, 2010; VUPPALANCHI *et al.*, 2011; GRIFFITHS *et al.*, 2011; JAGANJAC *et al.*, 2013).

Esse dano mediado pelos radicais livres pode ser avaliado pelos seus metabólitos de oxidação, muitas vezes utilizados como biomarcadores desses distúrbios (AVERY, 2011; HA *et al.*, 2012; AYALA *et al.*, 2014). Além das EROs, o organismo também pode ter acúmulo de espécies reativas de nitrogênio (ERNs), sendo o óxido nítrico (NO^{\bullet}) um de seus representantes (JOMOVA *et al.*, 2012). Este radical é uma das ERNs que contribui para a neurodegeneração, uma vez que estudos revelam a possibilidade existente de que o NO^{\bullet} reaja com EROs, como o superóxido, formando intermediário mais tóxico, como o peróxinitrito (ONOO^-). Adicionalmente, NO^{\bullet} pode reagir com lipídeos de membrana, induzindo a peroxidação lipídica (GUPTA *et al.*, 2010). Produtos da peroxidação lipídica, como malondialdeído, são considerados marcadores dessas patologias (KUMAR *et al.*, 2011; AYALA *et al.*, 2014).

O cérebro é um órgão particularmente muito vulnerável à ação dos radicais livres por apresentar algumas características peculiares, tais como: neurônios do SNC são quase totalmente dependentes da reação de fosforilação oxidativa para geração de adenosina trifosfato (ATP) como fonte de energia; em cérebros de adultos, a glicose é o principal nutriente e, portanto, esse órgão apresenta alta taxa de metabolismo da glicose e eficiência respiratória; ainda, a membrana dos neurônios apresenta altas concentrações de ácidos graxos poliinsaturados que são potenciais substratos para a peroxidação por radicais hidroxila; por fim, o cérebro possui baixos níveis de defesas antioxidantes, comparado a outros órgãos, especialmente durante o envelhecimento (SUN *et al.*, 2011; TOMASI *et al.*, 2013).

Na DA, alguns estudos *in vitro* e *in vivo* evidenciaram a formação de radicais livres que se dá através dos depósitos extracelulares de peptídeo β -amiloide, que atraem e ativam as células da microglia, a qual produz radicais óxido nítrico (NO^{\bullet}). Recentes evidências sugerem que o NO^{\bullet} e seus produtos de oxidação desempenham um papel central no desencadeamento e amplificação do dano oxidativo na neurodegeneração. Adicionalmente, o peptídeo β -amiloide pode se converter a um estado radicalar. Além disso, na interação com a membrana neuronal, esse peptídeo induz a formação de

peróxidos e a peroxidação lipídica (DRECHSEL *et al.*, 2012; BUTTERFIELD *et al.*, 2013).

O estresse oxidativo associado à DP pode ser o resultado de um colapso na regulação da dopamina e do ferro. Este último, na presença de peróxido de hidrogênio, formado pelo metabolismo das aminas biogênicas, leva à formação de radicais livres, pela reação de Fenton (HAUSER; HASTINGS, 2013). Além disso, os neurônios dopaminérgicos têm um nível reduzido de glutathione intracelular (um dos compostos responsáveis pelas defesas antioxidantes do organismo), tornando-os muito mais suscetíveis a uma variedade de injúrias, incluindo o estresse oxidativo (GARRIDO *et al.*, 2011).

Diante do exposto, pode-se analisar que uma característica comum das DA e DP é a sua relação com alterações nos níveis de EROs e ERNs. Estes radicais livres são capazes de ativar cascatas bioquímicas responsáveis por provocar a neurodegeneração. Além disso, estudos demonstram que estratégias terapêuticas capazes de modular a peroxidação lipídica no início do curso da doença podem ser promissoras no retardo e prevenção de desordens neurodegenerativas (KUMAR *et al.*, 2011; REED *et al.*, 2015).

3.3.3. Compostos Multifuncionais

Considerando que as doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento, como DP e DA, são condições desencadeadas por múltiplos fatores, e que a etiologia dessas desordens é multifacetada, novas estratégias terapêuticas baseadas no desenvolvimento de compostos capazes de atuar em diferentes alvos bioquímicos e neuronais têm sido investigadas. Incluindo aquelas para tratamento do déficit cognitivo, bem como para a disfunção motora, a depressão e a neurodegeneração relacionadas às DP e DA (GELDENHUYS *et al.*, 2011; GELDENHUYS; VAN DER SCHYF, 2013).

NOVAROLI e colaboradores (2005) propuseram abordagem baseada em triagem experimental e virtual visando a descoberta de substâncias capazes de atuar em dois ou

mais alvos associados a essas doenças. Os alvos selecionados foram as enzimas AChE, MAO e COMT, a deposição de proteína β -amiloide, e o estresse oxidativo. Dentre esses alvos, três são comuns para a DP e a DA (AChE, MAO e estresse oxidativo), e outros dois são específicos para a DP (COMT) e para a DA (deposição de proteína β -amiloide). Após triagem inicial, os compostos capazes de interagir com dois ou mais alvos são selecionados para a realização de ensaios complementares, objetivando avaliar seus mecanismos de ação (Figura 4).

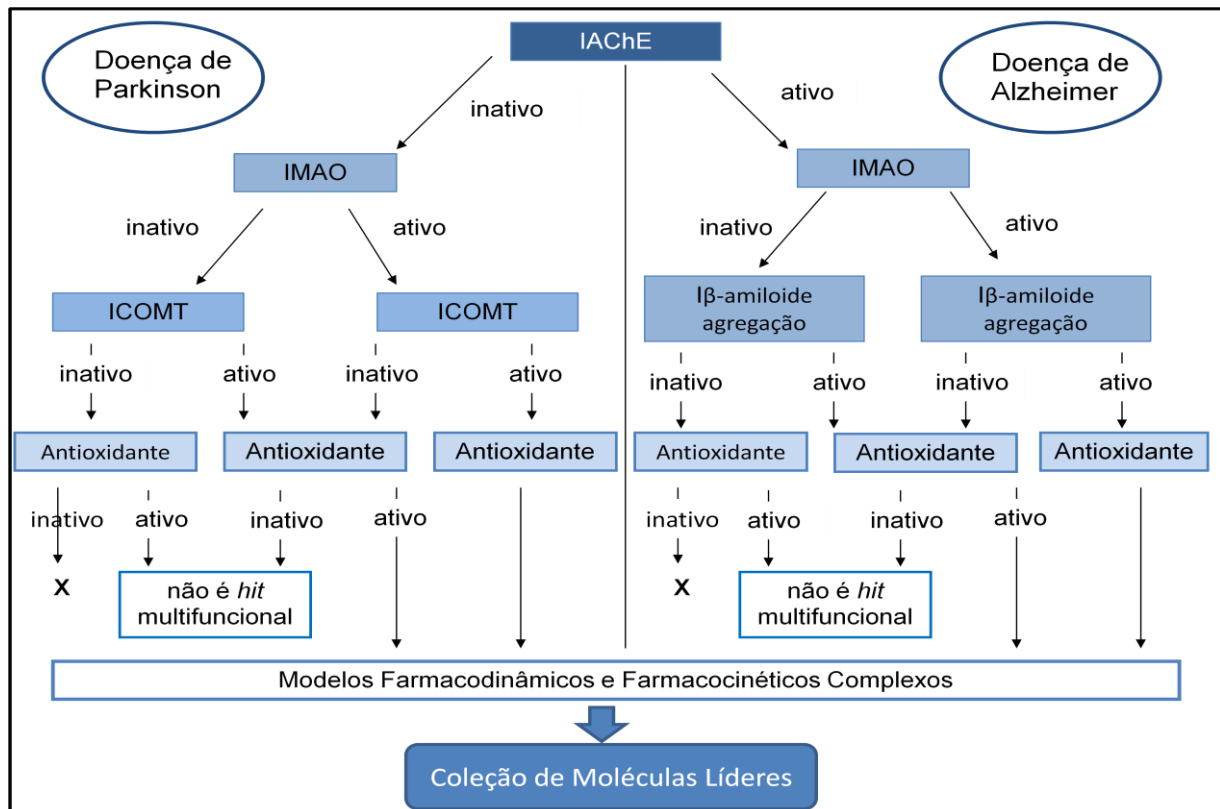


Figura 4. Abordagem proposta para triagem de compostos visando a avaliação de potenciais compostos multifuncionais de interesse para o tratamento das Doenças de Parkinson e Alzheimer. IChE (inibidores da acetilcolinesterase); IMAO (inibidores da monoamina oxidase); ICOMT (inibidores da catecol-*O*-metil-transferase); I β -amiloide agregação (inibidores da agregação da proteína β -amiloide). Esquema adaptado de NOVAROLI *et al.* (2005).

Assim, o desenvolvimento de fármacos multifuncionais, capazes de atuar em mais de um destino etiológico das doenças neurodegenerativas, pode oferecer novas

abordagens para o tratamento de muitos distúrbios, incluindo aqueles associados com declínio cognitivo (VAN DER SCHYF; GELDENHUYS, 2011). A abordagem pode ser a chave para os futuros regimes de tratamento para essas desordens, uma vez que pode reduzir a utilização concomitante de medicamentos com distintas propriedades farmacocinéticas e, desta forma, diminuir a incidência de interações medicamentosas. Além disso, fármacos que interagem simultaneamente com diferentes alvos podem fornecer maior efeito terapêutico devido a efeitos sinérgicos (BANSAL; SILAKARI, 2014).

4. PARTE I:

Atividades Biológicas de Extratos e Frações de *Blechnum*

4.1. Parte Experimental

Material Vegetal

As três espécies de *Blechnum* utilizadas neste trabalho foram coletadas em diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul, com a colaboração da botânica Dra. Maria Angélica Kieling-Rubio, e aprovação do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (Anexos), sendo o material vegetal identificado e as exsicatas depositadas no Herbário do Instituto de Biociências (ICN) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. *Blechnum binervatum* e *B. brasiliense* foram coletadas no município de Morro Reuter (29°32'17"S, 51°04'51"W), enquanto que *B. occidentale* foi coletada em Campo Bom (29°40'39"S, 51°01'97"W), no mês de setembro de 2012. As frondes das plantas coletadas foram secas à temperatura ambiente e à sombra.

Obtenção dos Extratos Metanólicos Brutos

O material vegetal seco das diferentes espécies de *Blechnum* foi reduzido com auxílio de moinho de facas e extraído, exaustivamente, com metanol por maceração (por 15 dias, renovando solvente a cada 5 dias), na proporção de 1:20 (droga:solvente). Os solventes reunidos foram evaporados sob pressão reduzida e temperatura de 40°C, obtendo-se os rendimentos de extratos descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Quantidade de material vegetal coletado e rendimentos de extratos metanólicos brutos.

Espécie	Código exsicata	Quantidade de material vegetal seco (g)	Rendimento de extrato seco (%)
<i>B. binervatum</i>	ICN 171553	710,03	13,58 (96,42 g)
<i>B. brasiliense</i>	ICN 177668	561,72	11,63 (65,33 g)
<i>B. occidentale</i>	ICN 177667	42,45	15,83 (6,72 g)

Fracionamento dos Extratos

Uma porção dos extratos secos obtidos foi dissolvida em água e submetida a fracionamento em funil de separação, sucessivamente, com solventes de polaridade crescente: hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol. Ao final do processo, os solventes foram evaporados à secura, em evaporador rotatório sob pressão reduzida, sendo a fração aquosa liofilizada (Figuras 1-3).

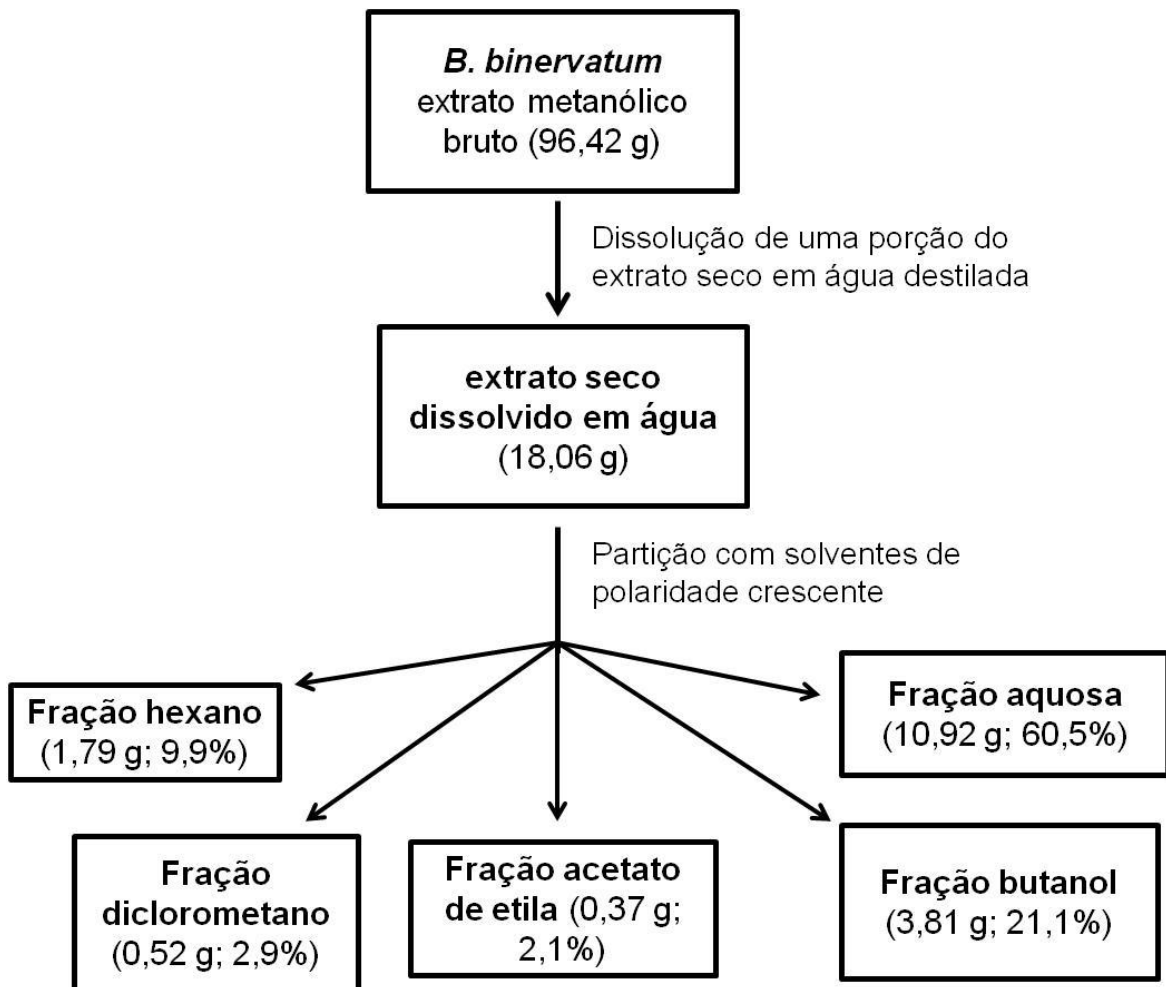


Figura 1. Esquema representativo do procedimento de fracionamento da espécie *Blechnum binervatum*.

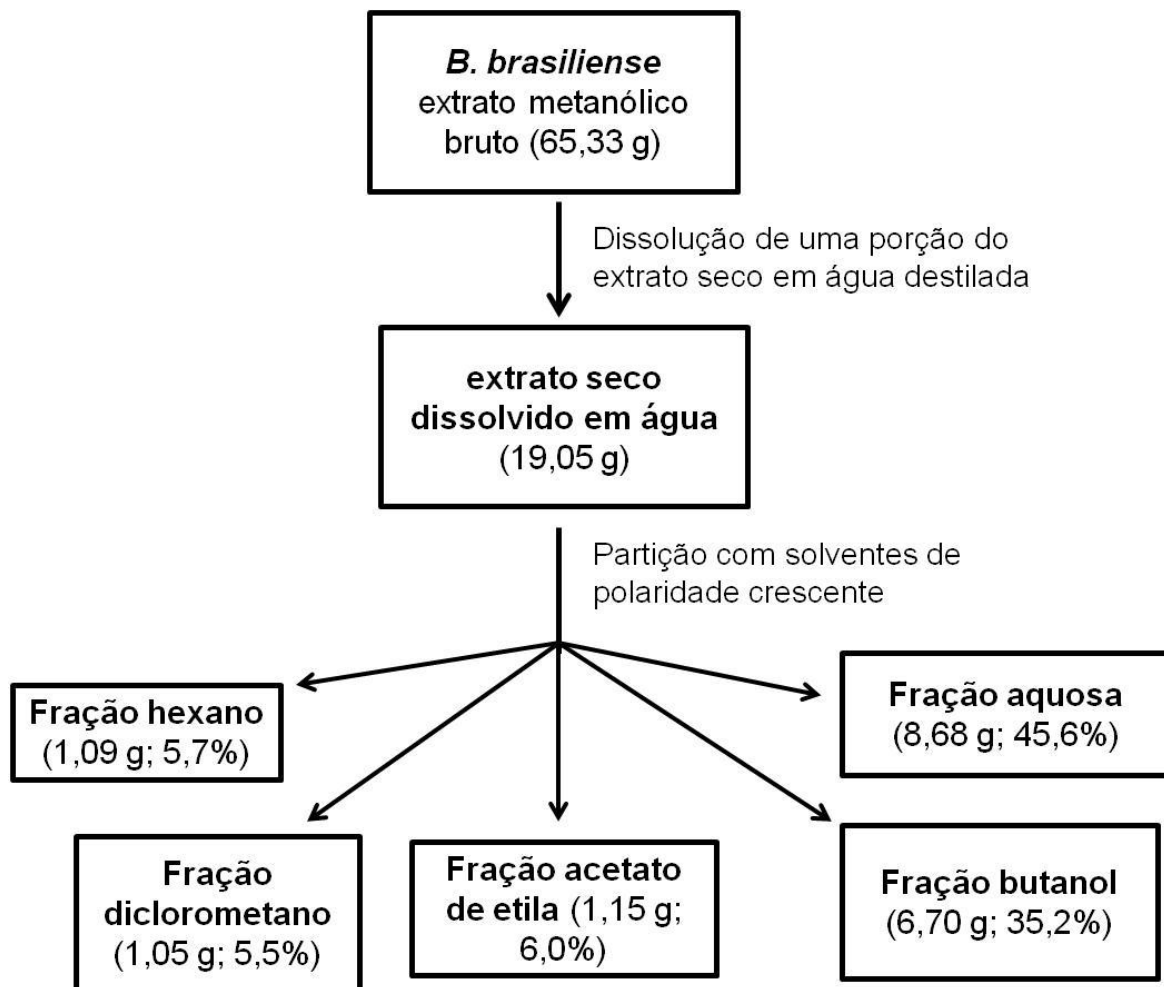


Figura 2. Esquema representativo do procedimento de fracionamento da espécie *Blechnum brasiliense*.

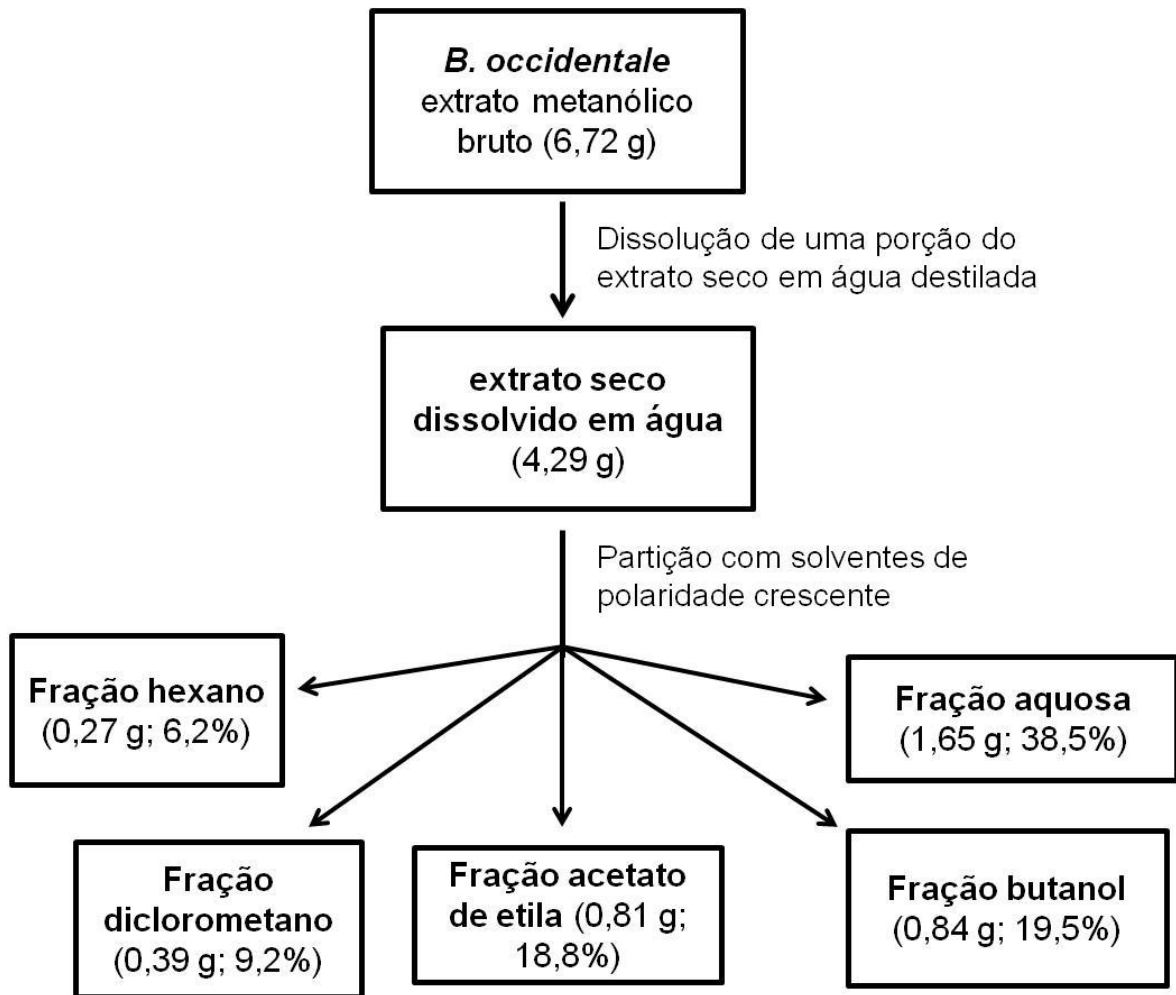


Figura 3. Esquema representativo do procedimento de fracionamento da espécie *Blechnum occidentale*.

Ensaio Antioxidantes

Estabilização do Radical Hidroxila

Os extratos brutos e as frações (1-500 µg/mL) das diferentes espécies de *Blechnum* foram diluídos em tampão fosfato e adicionados ao sistema reacional, em placa de 96 poços contendo 2-deoxirribose 50 mM, sulfato ferroso 60 µM (FeSO₄), peróxido de hidrogênio 29% (H₂O₂) e tampão fosfato (20 mM, pH 7,2). A mistura foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente. Após, foi realizada a adição de ácido fosfórico (4%) e

ácido tiobarbitúrico 1% (TBA) em hidróxido de sódio e novamente incubada em banho de água fervente, por 30 minutos. Em seguida a leitura da placa foi realizada no aparelho SpectraMax[®] (Molecular Devices, CA, USA), a 532 nm, verificando a formação e/ou inibição da formação de malondialdeído (produto de degradação da 2-deoxiribose).

Como substâncias-padrão para controle positivo do experimento, foram utilizados ácido clorogênico e ácido cafeico (LOPES *et al.*, 1999). As análises foram realizadas em triplicata e os valores de CI_{50} para as amostras e para os padrões foi calculado.

Capacidade Antioxidante Frente ao Radical Óxido Nítrico

Para avaliar o potencial sequestrador das amostras (1-500 $\mu\text{g/mL}$) frente ao radical NO^{\bullet} , as mesmas foram diluídas em tampão fosfato salino (20 mM, pH 7,2), adicionadas à solução de nitroprussiato de sódio (20 mM) em placas de 96 poços e incubadas, por 60 minutos, à temperatura ambiente. Após este período, foi adicionado o reagente de Griess [sulfanilamida (2%) e diidrocloreto de naftiletlenodiamina (0,1%)] e a placa incubada por 7 minutos, no escuro, à temperatura ambiente. Por fim, os níveis de nitritos formados foram quantificados em aparelho SpectraMax[®], a 546 nm (KUMAR *et al.*, 2005).

Os cálculos dos valores de CI_{50} para os extratos brutos, frações e padrões foram realizados, após a realização dos experimentos em triplicata, utilizando como substâncias-padrão os ácidos clorogênico e cafeico.

Ensaio para Detecção de Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Para realização desses experimentos, foram utilizados córtex e hipocampo de cérebros de ratos Wistar machos, adultos, com peso entre 180 e 220 g, com prévia aprovação de manuseio pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS (Anexos). Para tal, os animais foram sacrificados por decaptação e as estruturas cerebrais foram imediatamente retiradas e lavadas com tampão TRIS (tris(hidroximetil)aminometano) resfriado (20 mM, pH 7,4). Os tecidos foram dispostos

em homogeneizador *Potter-Elvehjem* na proporção 1:2 (tecido:tampão), para obtenção de homogeneizado celular. Após, os mesmos foram centrifugados a 7.500 rpm, por 5 minutos, sendo o sobrenadante utilizado nos experimentos.

Em tubos de vidro com tampa rosca, as amostras diluídas em água purificada (1-500 µg/mL) foram adicionadas ao sobrenadante de homogeneizado tecidual cerebral, FeSO₄ (10 mM) e ácido ascórbico (0,1 mM). Essas misturas foram incubadas a 37°C, por 60 minutos. Após, foi realizada a adição de ácido tricloroacético (28%) e TBA (2%) e incubadas novamente a 80°C, por 20 minutos. Os tubos foram, então, centrifugados a 7.500 rpm, durante 10 minutos e os sobrenadantes foram submetidos à análise em espectrofotômetro (SpectraMax[®]), em comprimento de onda igual a 532 nm (REIS *et al.*, 2012). As análises foram realizadas em triplicata e os ácidos clorogênico e cafeico foram utilizados como substâncias-padrão. Após, foram calculados os valores de CI₅₀ das amostras e dos padrões.

Inibição da Enzima MAO

Para este ensaio foram utilizadas placas de 96 poços com fundo escuro. Nos poços das microplacas foram adicionados nesta ordem: tampão fosfato salino (20 mM, pH 7,4), kinuramina (5 mM) e amostras (1-500 µg/mL) em DMSO (dimetil sulfóxido, concentração final 1%). Essa mistura foi pré-incubada a 37°C, durante 20 minutos. Após, foram adicionadas as isoformas da enzima, separadamente, sendo a MAO-A na concentração de 0,09 mg/mL e a MAO-B a 0,15 mg/mL. Essas enzimas foram adquiridas comercialmente (BD Gentest[®], EUA). Foi realizada incubação a 37°C, por 30 minutos e, ao final deste período, foi adicionado hidróxido de sódio 2M para interromper a reação. Após, realizou-se as leituras de fluorescência, no leitor de placas SpectraMax[®], com λ de excitação igual a 320 nm e λ de emissão igual a 400 nm (NOVAROLI *et al.*, 2006). Como controles positivos foram utilizados os inibidores clorgilina, na avaliação de inibição da MAO-A e pargilina, nos ensaios frente à MAO-B. Os valores de CI₅₀ das amostras e dos padrões foram calculados após as análises em triplicata.

Inibição das Enzimas AChE e BChE

Microplacas de 96 poços foram utilizadas para a avaliação da inibição das enzimas AChE e BChE (Sigma-Aldrich®, EUA) pelos extratos e frações de *Blechnum*. Nos poços das placas foram adicionados: o reagente de Ellman 10 mM (ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) ou DTNB), a solução do substrato 14 mM (sendo iodeto de acetiltiocolina na avaliação da inibição da AChE e iodeto de butiriltiocolina no ensaio frente à BChE), as amostras diluídas em DMSO 1% e a respectiva enzima a 1UI/mL. Imediatamente após a adição da enzima, as placas foram lidas no modo cinético, a 412 nm (SpectraMax®), por um período total de 6 minutos, sendo realizadas leituras a cada 30 segundos (ELLMAN *et al.*, 1961; DI GIOVANNI *et al.*, 2008).

Fisostigmina foi utilizada como controle positivo dos experimentos. Os extratos brutos e as frações das diferentes espécies de *Blechnum* (100-500 µg/mL) foram avaliados, em triplicata, frente às enzimas AChE e BChE, e calculados os valores de CI₅₀.

Avaliação da Citotoxicidade e Viabilidade Celular

Ensaio em Células Polimorfonucleares de Roedores

Neste ensaio foi realizada a quantificação de danos à membrana, determinando-se a quantidade de enzima intracelular lactato desidrogenase (LDH) liberada das células danificadas no sobrenadante da mistura. Células polimorfonucleares, obtidas de plasma de ratos Wistar machos, adultos, pesando de 180 a 220 g, na concentração final para os experimentos de $1,5 \times 10^7$ células/mL, foram utilizadas. Os animais foram previamente tratados com solução salina de glicogênio a 1% e, após 4 horas, foram sacrificados, sendo realizada a coleta de sangue através da abertura da cavidade peritoneal. Antes da abertura e coleta do material foi injetada solução de Hanks, contendo 1 UI/mL de heparina. Após sucessivas centrifugações e diluições do material, obtém-se um pellet de células

polimorfonucleares, o qual é ajustado à concentração celular final do ensaio com tampão, sendo a contagem realizada em microscópio óptico.

Nos poços das microplacas foram adicionadas as células e as amostras, diluídas em tampão Hanks. As misturas foram pré-incubadas a 37°C, durante 30 minutos. Após, foram centrifugadas a 2.000 rpm, por 5 minutos, sendo o sobrenadante adicionado de substrato da enzima e alúmen férrico. As placas foram novamente incubadas a 37°C, durante 3 minutos. Foi realizada a adição de NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e incubou-se as placas na mesma temperatura, por 5 minutos. Por fim, foi adicionada solução estabilizadora no meio reacional e feita a leitura dos poços da microplaca a 492 nm, utilizando *kit* comercial de desidrogenase láctica (Doles Reagentes, Goiás, Brasil) (SELLOUM *et al.*, 2003). Os extratos brutos e as frações das três espécies de *Blechnum* foram avaliados, em triplicata (1 mg/mL), quanto à sua influência nas células, sendo utilizado como controle positivo Triton X-100 a 1%.

Ensaio em Células-tronco Mesenquimais

Isolamento, Cultivo e Caracterização Celular

Essas etapas foram realizadas pelos responsáveis do Instituto de Pesquisa com Células-Tronco (Faculdade de Farmácia, UFRGS), nas quais as células-tronco derivadas de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED - *stem cells from human exfoliated deciduous teeth*) foram isoladas dessas estruturas (MIURA *et al.*, 2003), conforme previamente descrito (BERNARDI *et al.*, 2011), em parceria com o Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFRGS. Os responsáveis pelos pacientes assinaram termo de consentimento aprovado pelo comitê de ética da Universidade, sob CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética) número 36403514.6.0000.5347.

Para o isolamento celular, a polpa dentária fresca foi coletada a partir de dentes decíduos, em processo de reabsorção. Após a coleta, os dentes foram imersos em meio de

cultura, contendo DMEM (meio Eagle modificado por Dulbecco), HEPES 2,5 g/L, soro fetal bovino (SFB)10%, penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL. Em ambiente asséptico, as polpas dentárias foram cuidadosamente separadas do tecido dentário e, digeridas em solução 0,2% de colagenase tipo I. As células de cada dente foram semeadas em placas de cultivo de 12 poços, sendo o meio substituído após 24 horas e, subsequentemente, a cada 3 dias, permitindo o crescimento celular. As mesmas foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂, até atingirem 90% de confluência.

As culturas foram, então, tripsinizadas utilizando 0,05% de tripsina/EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e semeadas, novamente, na densidade de 5.000 células/cm². Após cultivo, as células foram caracterizadas e utilizadas nos experimentos, sendo tripsinizadas, centrifugadas e diluídas em meio contendo 90% de SFB e 10% de DMSO, obtendo-se a concentração de 10⁶ células/mL, na qual foram armazenadas. Para os ensaios, as SHED foram mantidas em DMEM, pH 7,4 suplementado com 10% de SFB, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, em atmosfera contendo 5% de CO₂ a 37°C. O meio de cultura foi substituído a cada 3-4 dias.

A caracterização das SHED foi realizada por ensaio de diferenciação e citometria de fluxo (FACS Aria III, BD®, CA), imediatamente após a retirada das células da cultura com tripsina/EDTA. Essas foram incubadas com anticorpos monoclonais específicos (CD14, CD34, CD45, CD73, CD90, CD105 e HLADR) (BD®, San Diego, CA), que foram conjugados com isotiocianato de fluoresceína ou ficoeritrina. Após 30 minutos de incubação no escuro, as células foram lavadas com tampão fosfato para remoção de excesso de anticorpo não-ligado. Controles isotípicos adequados foram utilizados, sendo excluídas as células mortas por incubação com 7-aminoactinomicina D.

Para avaliação da diferenciação celular, as células foram analisadas após período estabelecido de cultivo, quanto à sua capacidade de diferenciação em osteoblastos, condrócitos e adipócitos através de meios de indução, pelo método descrito por BERNARDI e colaboradores (2011). Após cerca de 4 semanas de tratamento das células

com os meios de diferenciação adipogênico, condrogênico e osteogênico, as células foram coradas, visualizadas por microscopia óptica e fotografadas. O meio de diferenciação adipogênico consistiu em: DMEM contendo 2,5 g/L HEPES, 10% SFB, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, dexametasona (1 µM), insulina (10 µg/mL), indometacina (50 µM), rosiglitazona (1 µM) e 3-isobutil-1-metilxantina (0,5 mM); sendo visualizado o acúmulo de gotículas de triglicerídeos intracelulares por coloração com *Oil Red O*.

O meio de diferenciação condrogênico foi composto de DMEM suplementado (descrito acima), adicionado de 10 ng/mL de FGF-β1 (fator de transformação de crescimento), 0,1 µM de dexametasona, 50 µM de ácido ascórbico 2-fosfato e 1% de ITS (insulina-transferrina-selênio). Sendo a presença de glicosaminoglicanos verificada através de coloração com *Alcian Blue*. Para diferenciação osteogênica, as células foram cultivadas em meio DMEM suplementado, contendo dexametasona (0,1 µM), ácido ascórbico 2-fosfato (50 µM) e β-glicerofosfato (15 mM). A deposição de matriz mineralizada foi observada por coloração com *Alizarin Red S*.

Tratamento Celular

Em placas de cultura de 96 poços, 7.000 células foram semeadas (7×10^3 células/poço). Após confluência, as células foram tratadas com os extratos brutos e as frações acetato de etila e diclorometano das três espécies de *Blechnum*, nas concentrações de 100, 250 e 500 µg/mL, dissolvidos em DMSO, adicionados ao meio de cultura (concentração final DMSO 2%) e incubadas por 24 horas. Como controle negativo foi utilizada solução 2% de DMSO em meio de cultura e controle positivo consistiu em Triton X-100 (1%).

Avaliação da Viabilidade Celular pelo Ensaio de MTT

A viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]), utilizando ensaio colorimétrico, conforme descrito por PARDO-ANDREU e colaboradores (2010). As SHED tratadas foram incubadas com MTT (0,25 µg/mL) por 4 horas, sendo o sobrenadante cuidadosamente removido, para adição de DMSO (200 µL) nos poços para dissolver os cristais formados. Foi realizada a medida da absorvância dos poços das placas a 570 e 630 nm, em leitor de microplacas (SpectraMax[®]), sendo os resultados calculados pela subtração dos valores das absorvâncias (570 nm - 630 nm). Os resultados foram expressos como porcentagem de redução do MTT em relação ao controle negativo (100%), após 2 experimentos independentes, em triplicata cada.

Determinação da Citotoxicidade: Ensaio de Liberação da LDH

A extensão da integridade da membrana das células foi determinada no sobrenadante das culturas, utilizando o ensaio da LDH, através de *kit* para teste comercial (Labtest Diagnostica SA, Minas Gerais, Brasil), conforme padronizado no laboratório por PRANKE e colaboradores (2014). A cultura de células-tronco foi tratada com os extratos e frações de *Blechnum*, conforme descrito acima. Ao final do período de incubação (24 horas), uma alíquota do meio de cultura (0,2 mL) foi retirada para análise da liberação da LDH, de acordo com as instruções do fabricante. Como controle negativo foram utilizadas células sem tratamento e Triton X-100 (1%) foi empregado como controle positivo, uma vez que é capaz de causar morte celular, permitindo máxima liberação da enzima. As leituras foram realizadas em equipamento 560 Labmax (Labtest Diagnóstica SA), sendo calculada a citotoxicidade de acordo com o dano à membrana celular, expresso como porcentagem de liberação intracelular de LDH em relação ao controle negativo (100%). Foram realizados experimentos independentes, em triplicata.

Análise Estatística

As análises estatísticas da avaliação da viabilidade celular e citotoxicidade foram realizadas utilizando análise de variância (ANOVA) seguida por teste de Bonferroni, pelo *software* Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., CA, EUA), para comparação dos valores obtidos. Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

Os resultados obtidos nos ensaios antioxidantes e nas avaliações de inibição enzimática foram realizados utilizando o programa: Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., CA, EUA). Os valores de CI_{50} foram obtidos após ajuste dos dados experimentais (% de inibição versus concentração de inibidor) para as curvas de regressão não-linear.

4.2. Resultados e Discussão

Estabilização do Radical Hidroxila

Os radicais hidroxila são as espécies reativas de oxigênio que mais causam danos biológicos e levam à oxidação lipídica. A mistura contendo sulfato ferroso, incubada com peróxido de hidrogênio, conduz à degradação da deoxirribose, formando cromóforo rosa que é quantificado por absorvância na região do ultravioleta (LOPES *et al.*, 1999). Os extratos brutos e frações das espécies de *Blechnum* testados foram efetivos na captura dos radicais hidroxila formados pela degradação da deoxirribose.

Avaliando os resultados obtidos (Tabela 2), foi possível demonstrar que a espécie *B. brasiliense* apresentou a maior atividade na estabilização do radical hidroxila, com menor valor de CI_{50} , tanto para o extrato bruto (CI_{50} : $112,3 \pm 2,61$ $\mu\text{g/mL}$), quanto para as frações, sendo a fração acetato de etila a mais potente (CI_{50} : $12,50 \pm 1,54$ $\mu\text{g/mL}$) dentre elas. Importantes efeitos foram observados, também, para as frações diclorometano (CI_{50} : $15,85 \pm 1,79$ $\mu\text{g/mL}$) e hexano (CI_{50} : $22,02 \pm 1,29$ $\mu\text{g/mL}$). Em geral, o mecanismo pelo qual esse radical é estabilizado ocorre pela interação de pontes de hidrogênio entre o radical e a molécula/ou moléculas presentes em uma matriz complexa (LOPES *et al.*,

1999). Na maioria dos casos, os extratos e frações mais polares demonstraram menor atividade, o que pode ser explicado por uma maior quantidade de açúcares ligados nas substâncias presentes, não apresentando, assim, hidroxilas livres para interagir com o radical e promover sua estabilização.

Tabela 2. CI_{50} obtidos para os extratos brutos e para as frações de *Blechnum*, bem como para os padrões de ácido clorogênico e cafeico, utilizados nos experimentos frente ao radical hidroxila.

Amostras	CI_{50}^* ($\mu\text{g/mL}$)		
	<i>B. binervatum</i>	<i>B. brasiliense</i>	<i>B. occidentale</i>
Extrato bruto	311,1 \pm 1,66	112,3 \pm 2,61	198,2 \pm 1,86
Fração aquosa	101,0 \pm 1,64	88,26 \pm 1,59	325,8 \pm 1,73
Fração butanol	104,8 \pm 1,71	70,23 \pm 1,68	92,27 \pm 1,38
Fração acetato	61,74 \pm 1,68	12,50 \pm 1,54	119,3 \pm 1,56
Fração diclorometano	147,7 \pm 1,55	15,85 \pm 1,79	135,0 \pm 1,30
Fração hexano	176,5 \pm 1,69	22,02 \pm 1,29	81,03 \pm 1,54
Ácido clorogênico	45,64 \pm 1,52 μM		
Ácido cafeico	63,26 \pm 1,43 μM		

*os valores foram expressos como média \pm desvio padrão (dp).

O mecanismo da ação antioxidante dos polifenóis, avaliado neste ensaio, é usualmente atribuído à sua capacidade sequestradora do radical hidroxila. Entretanto, muitos trabalhos indicam que essas substâncias não somente bloqueiam a degradação da deoxirribose pela simples estabilização desses radicais, mas atuam também como antioxidantes através da formação de complexos com ferro, formando complexos com ferro [Fe(II)], o qual não participa da reação de Fenton, desencadeadora da geração de radicais livres, através da oxidação de substratos orgânicos (Figura 4) (LOPES *et al.*, 1999; BARBUSIŃSKI, 2009).

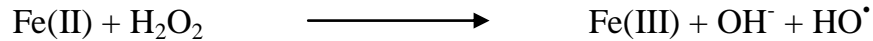


Figura 4. Reação de Fenton. Ferro (II) reage com peróxido de hidrogênio (H₂O₂), formando, dentre outros compostos, o radical hidroxila.

LAI e colaboradores (2010) avaliaram a atividade antioxidante de cinco frações (éter de petróleo, clorofórmio, acetato de etila, butanol e aquosa), obtidas do extrato bruto metanólico de *B. orientale*, através do método de DPPH. A fração que apresentou maior atividade foi a acetato de etila, com CI₅₀ igual a 8,6 µg/mL, seguida da fração butanol (CI₅₀: 10,1 µg/mL), extrato total metanólico (CI₅₀: 10,9 µg/mL) e fração aquosa (CI₅₀: 13,0 µg/mL). As frações éter de petróleo e clorofórmio foram menos ativas na estabilização desse radical. Para as frações acetato de etila e hexano, obtidas através do fracionamento do extrato metanólico bruto de *B. chilense*, os valores de inibição do DPPH foram: 85% e 74%, respectivamente, na concentração de 0,8% das frações (HINCAPIÉ *et al.*, 2011b).

Capacidade Antioxidante Frente ao Radical Óxido Nítrico

A literatura relata que o radical NO[•] é uma das espécies reativas de nitrogênio que contribui para a evolução de desordens neurodegenerativas. Esse radical é capaz de reagir com espécies reativas de oxigênio, formando intermediários ainda mais tóxicos. Adicionalmente, NO[•] pode reagir com lipídeos de membrana, induzindo a peroxidação lipídica (GUPTA *et al.*, 2010). Na DA, a ativação das células da microglia, conduz à produção exacerbada de radicais óxido nítrico (DRECHSEL *et al.*, 2012).

Frente à este radical, a fração acetato de etila obtida de *B. binervatum* demonstrou ser a mais ativa (CI₅₀: 14,00±1,39 µg/mL), seguida por esta mesma fração obtida das espécies *B. occidentale* (CI₅₀: 29,03±1,23 µg/mL) e *B. brasiliense* (CI₅₀: 55,64±1,36 µg/mL). A fração diclorometano desta espécie também apresentou resultado interessante

e similar ao da fração acetato, com valor de CI_{50} igual a $55,78 \pm 1,22 \mu\text{g/mL}$. Todos os extratos brutos e as frações aquosa e butanólica das três espécies foram considerados inativos na estabilização deste radical. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 3.

O radical óxido nítrico é uma espécie reativa com ligação mais forte entre os átomos, tornando-o relativamente mais estável, portanto, sua estabilização se torna mais dificultada em relação a radicais com somente ligações por pontes de hidrogênio. Assim, para todos os extratos e para a maioria das frações, foram observadas atividades menos pronunciadas frente a este radical, em comparação com as capacidades de estabilização do radical hidroxila. Os ácidos hidroxicinâmicos, utilizados como padrões, também foram menos ativos em comparação com os resultados para o método do radical hidroxila.

Tabela 3. Valores de CI_{50} para extratos brutos e frações de *Blechnum*, bem como para os padrões utilizados nos experimentos frente ao radical óxido nítrico.

Amostras	CI_{50}^* ($\mu\text{g/mL}$)		
	<i>B. binervatum</i>	<i>B. brasiliense</i>	<i>B. occidentale</i>
Extrato bruto	> 500	> 500	> 500
Fração aquosa	> 500	> 500	> 500
Fração butanol	> 500	> 500	> 500
Fração acetato	$14,00 \pm 1,39$	$55,64 \pm 1,36$	$29,23 \pm 1,23$
Fração diclorometano	$134,8 \pm 1,32$	$55,78 \pm 1,22$	$120,3 \pm 1,17$
Fração hexano	$151,7 \pm 1,47$	$113,9 \pm 1,23$	$256,2 \pm 1,42$
Ácido clorogênico	$159,75 \pm 1,44 \mu\text{M}$		
Ácido cafeico	$180,89 \pm 1,87 \mu\text{M}$		

*valores expressos como média \pm dp.

Ensaio para Detecção de Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

O potencial antioxidante dos extratos foi avaliado, também, pelo ensaio de TBARS, baseado na formação de malondialdeído, um subproduto da peroxidação lipídica, que é estimulada pela adição de FeSO_4 no meio reacional. Este método foi

realizado, uma vez que a literatura demonstra que estratégias terapêuticas capazes de modular a peroxidação lipídica podem ser promissoras no retardo e prevenção de desordens neurodegenerativas (REED *et al.*, 2015).

Na avaliação da capacidade dos extratos e frações de *Blechnum* em inibir a lipoperoxidação em homogenatos de estruturas cerebrais de ratos, através do método de TBARS, pode-se observar que a amostra que exibiu pronunciada atividade foi a fração acetato de etila de *B. brasiliense*, com CI_{50} igual a $10,36 \pm 1,30 \mu\text{g/mL}$. Esta mesma fração da espécie *B. binervatum* também apresentou pronunciada atividade neste método (CI_{50} : $27,55 \pm 1,41 \mu\text{g/mL}$). Esses resultados estão apresentados na Tabela 4.

A maioria dos extratos brutos e frações aquosa e butanólica demonstraram fraca atividade na lipoperoxidação, pelo método de TBARS, apenas o extrato bruto de *B. brasiliense* demonstrou moderada atividade por este método (CI_{50} : $176,1 \pm 1,19 \mu\text{g/mL}$). Os valores de CI_{50} para os ácidos clorogênico e cafeico foram iguais a: $37,54 \pm 1,25 \mu\text{M}$ e $55,88 \pm 1,22 \mu\text{M}$, respectivamente, demonstrando forte efeito inibidor da lipoperoxidação.

Tabela 4. Resultados do experimento para detecção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, expressos como valores de CI_{50} dos extratos brutos e das frações de *Blechnum*. Ácido clorogênico e cafeico foram utilizados como padrões nesta avaliação.

Amostras	CI_{50} * ($\mu\text{g/mL}$)		
	<i>B. binervatum</i>	<i>B. brasiliense</i>	<i>B. occidentale</i>
Extrato bruto	> 500	$176,1 \pm 1,19$	> 500
Fração aquosa	$448,2 \pm 2,13$	$311,6 \pm 1,45$	> 500
Fração butanol	> 500	274,5	> 500
Fração acetato	$27,55 \pm 1,41$	$10,36 \pm 1,30$	$88,16 \pm 1,15$
Fração diclorometano	$76,78 \pm 1,36$	$68,48 \pm 1,24$	$91,48 \pm 1,20$
Fração hexano	$84,99 \pm 1,44$	$56,19 \pm 1,08$	$94,84 \pm 1,22$
Ácido clorogênico	$37,54 \pm 1,25 \mu\text{M}$		
Ácido cafeico	$55,88 \pm 1,22 \mu\text{M}$		

*valores expressos como média \pm dp.

Inibição da Enzima Monoamina Oxidase

A atividade da MAO foi determinada pelo ensaio fluorimétrico proposto por NOVAROLI e colaboradores (2006), empregando kinuramina como substrato enzimático. A kinuramina, após sofrer oxidação, produz 4-hidróxiquinolina, composto fluorescente, facilmente detectado e quantificado (DOS SANTOS PASSOS *et al.*, 2013; ANDRADE *et al.*, 2014). Inibidores desta enzima são considerados moléculas importantes para o desenvolvimento de medicamentos voltados ao tratamento de doenças neurodegenerativas, atuando não somente nos alvos desencadeadores diretos destas desordens, como também em doenças psiquiátricas associadas, como a depressão (BURKE *et al.*, 2001; KENNEDY *et al.*, 2003; YODIM; BAKHLE, 2006).

De acordo com os resultados presentes na Tabela 5, pode-se observar que todas as amostras foram mais ativas frente à isoforma A da enzima MAO. As frações acetato de etila das espécies *B. binervatum*, *B. brasiliense* e *B. occidentale* apresentaram os menores valores de CI_{50} , quando comparadas às outras frações e extratos, sendo iguais à $46,03 \pm 1,10$; $28,62 \pm 1,04$ e $32,92 \pm 1,03$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A amostra que apresentou maior capacidade de inibição da MAO-A foi a fração acetato de etila de *B. brasiliense*, seguida da fração diclorometano da mesma planta (CI_{50} : $31,83 \pm 1,09$ $\mu\text{g/mL}$). Adicionalmente, o extrato bruto desta espécie demonstrou interessante poder inibitório, com CI_{50} igual a $72,68 \pm 1,09$ $\mu\text{g/mL}$.

As frações diclorometano das outras duas espécies (*B. binervatum* e *B. occidentale*) também apresentaram forte inibição da MAO-A, com CI_{50} iguais à: $61,98 \pm 1,12$ e $52,03 \pm 1,09$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Atividade inibitória moderada foi observada para as frações butanol ($80,72 \pm 1,12$ $\mu\text{g/mL}$) e hexano ($70,85 \pm 1,11$ $\mu\text{g/mL}$) de *B. occidentale*. Frente à MAO-A, o inibidor irreversível clorgilina apresentou valor de CI_{50} igual a $0,009 \pm 1,71$ μM .

Frente à MAO-B, todos extratos brutos e as frações mais polares de *B. binervatum* foram considerados inativos (inibidores fracos da enzima), apresentando valores de CI_{50}

acima de 500 $\mu\text{g/mL}$. As outras frações apresentaram CI_{50} entre 220 $\mu\text{g/mL}$ e 491 $\mu\text{g/mL}$, conforme demonstrado na Tabela 5. As amostras de *B. brasiliense* e *B. occidentale* foram moderadamente ativas na inibição da MAO-B, sendo a fração acetato de etila da primeira espécie a que apresentou menor valor de CI_{50} ($101,2 \pm 1,07 \mu\text{g/mL}$). A fração diclorometano de *B. occidentale*, apresentou valor igual a $144,4 \pm 1,04 \mu\text{g/mL}$. E o inibidor seletivo da MAO-B, pargilina, inibiu a enzima com CI_{50} de $0,207 \pm 1,12 \mu\text{M}$.

MAZZIO e colaboradores (2013) classificaram extratos brutos de plantas quanto à sua inibição da MAO-B, segundo os níveis: muito forte ($\text{CI}_{50} < 70 \mu\text{g/mL}$), forte ($\text{CI}_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$), moderadamente forte ($\text{CI}_{50} > 200 < 400 \mu\text{g/mL}$), moderado ($\text{CI}_{50} > 400 < 700 \mu\text{g/mL}$) e fraco ($\text{CI}_{50} = 700 \mu\text{g/mL}$). Neste estudo, foram avaliadas algumas samambaias, como: *Dryopteris crassirhizoma*, cujo extrato foi classificado como forte inibidor da MAO-B ($\text{CI}_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$), *Adiantum capillus* e *Equisetum hyemale*, sendo seus extratos moderadamente fortes ($\text{CI}_{50} > 200 < 400 \mu\text{g/mL}$) e *Equisetum arvense*, cujo extrato inibiu moderadamente a enzima ($\text{CI}_{50} > 400 < 700 \mu\text{g/mL}$). De acordo com esta classificação, pode-se inferir que o extrato bruto de *B. binervatum* inibiu fracamente a enzima MAO-B ($\text{CI}_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$), o extrato bruto de *B. brasiliense* foi moderadamente forte nesta inibição ($\text{CI}_{50} = 290 \mu\text{g/mL}$) e o extrato de *B. occidentale* apresentou moderada atividade frente à MAO-B ($\text{CI}_{50} = 420 \mu\text{g/mL}$).

Tabela 5. Inibição enzimática observada para os extratos e frações de *Blechnum*, frente às isoformas A e B da MAO.

Espécie	Extrato ou Fração	CI ₅₀ (µg/mL)*	
		MAO-A	MAO-B
<i>Blechnum binervatum</i>	Extrato metanólico bruto	165,2±1,10	>500
	Fração aquosa	375,5±1,13	>500
	Fração butanol	250,1±1,06	>500
	Fração acetato de etila	46,03±1,10	229,5±1,01
	Fração diclorometano	61,98±1,12	319,0±1,07
	Fração hexano	219,9±1,06	490,9±1,00
<i>B. brasiliense</i>	Extrato metanólico bruto	72,68±1,09	285,2±1,03
	Fração aquosa	212,8±1,06	491,3±1,00
	Fração butanol	205,5±1,09	>500
	Fração acetato de etila	28,62±1,04	101,2±1,07
	Fração diclorometano	31,83±1,09	215,1±1,06
	Fração hexano	94,99±1,08	234,3±1,05
<i>B. occidentale</i>	Extrato metanólico bruto	130,8±1,05	421,5±1,01
	Fração aquosa	381,8±1,03	>500
	Fração butanol	80,72±1,12	>500
	Fração acetato de etila	32,92±1,03	218,0±1,04
	Fração diclorometano	52,03±1,09	144,4±1,04
	Fração hexano	70,85±1,11	198,2±1,13
Clorgilina		0,009±1,71 µM	N.T.**
Pargilina		N.T.**	0207±1,12 µM

*os valores foram expressos como média±desvio padrão (dp). **N.T.: não-testado.

Inibição das Enzimas Acetil e Butirilcolinesterase

IACHe são amplamente utilizados no tratamento sintomático da DA, levando ao aumento nos níveis cerebrais da acetilcolina, sendo a principal estratégia empregada no tratamento desta doença (HANSEN *et al.*, 2008). Conseqüentemente, promovem

melhoras na cognição de pacientes acometidos por essa desordem neurodegenerativa. Além da AChE, a enzima BChE é também responsável pela inativação da acetilcolina em tecidos cerebrais (FRANCIS *et al.*, 1999).

Todos os extratos e frações das espécies *B. binervatum*, *B. brasiliense* e *B. occidentale* apresentaram valores de CI_{50} superiores a 300 $\mu\text{g/mL}$ na avaliação da inibição das enzimas AChE e BChE. O conhecido inibidor dessas enzimas, fisostigmina, foi utilizado como controle positivo do experimento, exibindo forte atividade inibitória, com valores de CI_{50} iguais a $0,0165 \pm 1,92$ e $0,0718 \pm 1,83$ μM , respectivamente frente à AChE e BChE. Assim, as amostras de samambaias avaliadas foram consideradas inativas frente às colinesterases.

Avaliação da Toxicidade em Células de Roedores

Nas condições utilizadas neste experimento, não foi observada toxicidade celular para as amostras avaliadas, através da determinação da liberação da LDH. Todos extratos e frações, na concentração de 1 mg/mL , demonstraram resultados semelhantes ao controle negativo (basal), indicando viabilidade da membrana das células polimorfonucleares utilizadas (Figura 5). O controle positivo, Triton X-100 (1%), demonstrou forte dano à membrana celular, com considerável toxicidade. Assim, os derivados de *Blechnum*, nas concentrações avaliadas, podem ser considerados seguros frente a células de roedores.

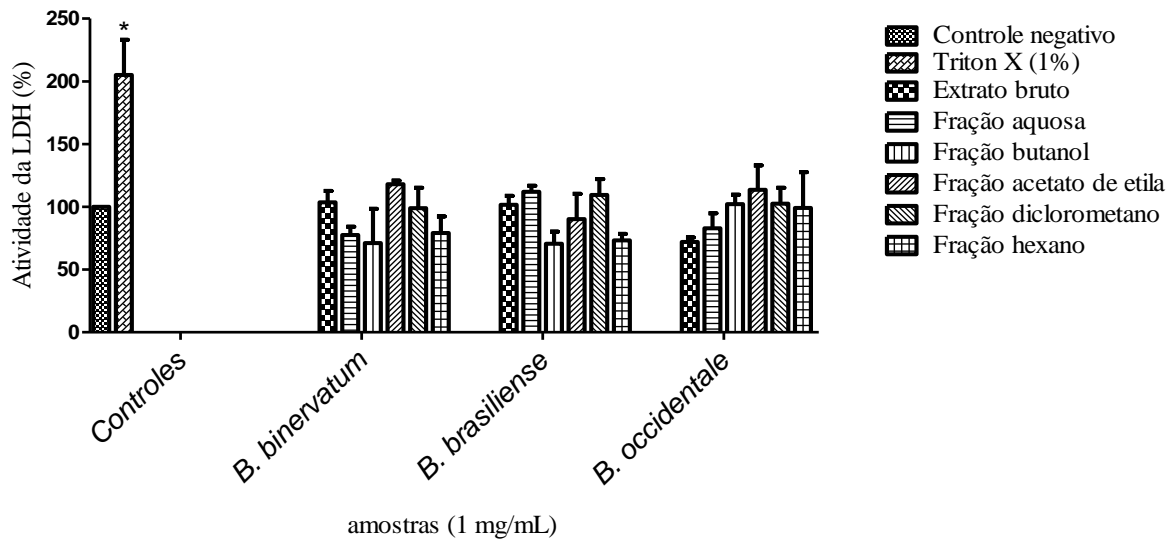


Figura 5. Atividade da LDH para avaliação da citotoxicidade das amostras. Valores iguais a 100% indicam viabilidade celular total (dados do controle negativo). Triton X-100 (1%) exibiu citotoxicidade. *indica diferenças significativas em relação ao não-tratado ($p < 0.05$).

Avaliação da Viabilidade e Citotoxicidade em Células-tronco

Caracterização e Diferenciação das Células-tronco Mesenquimais

A caracterização das células-tronco mesenquimais foi realizada conforme os critérios estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT), apresentando morfologia típica de fibroblasto. As células apresentaram-se aderentes ao plástico, quando mantidas em condições de cultura padrão, e expressaram positividade ($\geq 95\%$) para CD73 (ecto-5'-nucleotidase), CD105 (endogлина) e CD90 (Thy-1). As células não expressaram ($\leq 2\%$) os marcadores de superfície: CD34, CD45, CD14, CD11b e HLA-DR, diferenciando-se *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condrobalstos (DOMINICI *et al.*, 2006).

A diferenciação adipogênica foi demonstrada pela coloração com *Oil Red O*, apresentando cor nos vacúolos de lipídeos (Figura 6B); a diferenciação condrogênica foi

demonstrada por coloração com *Alcian blue*, indicada pela cor azul de depósitos de glicosaminoglicanos (Figura 6C); a diferenciação osteogênica foi evidenciada pela coloração com *Alizarin Red* nos depósitos de cálcio (em vermelho) (Figura 6D).

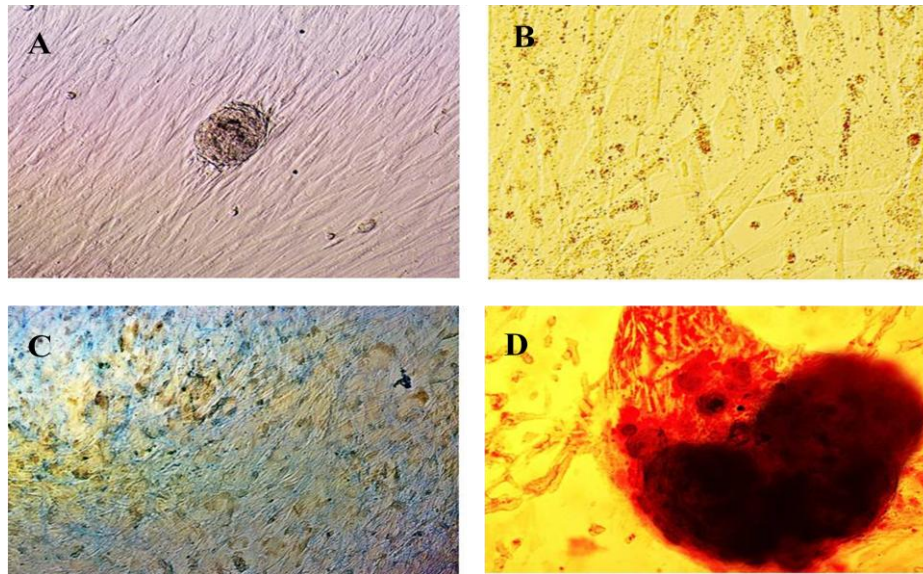


Figura 6. Potencial de diferenciação das células-tronco mesenquimais, derivadas de dentes decíduos, nas três linhagens mesodérmicas. A) Células-tronco não-diferenciadas (controle, 100x); B) Diferenciação adipogênica indicada por gotículas de gordura, coradas com *Oil Red* (400x); C) Diferenciação condrogênica demonstrada pelos glicosaminoglicanos corados com *Alcian Blue* (100x); D) Células-tronco diferenciadas em osteoblastos, evidenciadas pela matriz calcificada corada com *Alizarin Red* (100x).

Efeito dos Extratos Brutos e Frações de Blechnum na Viabilidade e Citotoxicidade de Células-tronco

O presente estudo avaliou os possíveis efeitos dos extratos brutos, bem como das frações acetato de etila e diclorometano, selecionadas devido às potenciais atividades demonstradas, sobre a viabilidade das células-tronco obtidas de dentes decíduos, através do ensaio de MTT (Figuras 7, 8A e 8B). Essas células foram utilizadas pois apresentam capacidade de diferenciação em vários tipos celulares, incluindo neurônios (YARAK; OKAMOTO, 2010), podendo fornecer indicativos da ação dessas amostras frente a

células neuronais. Os resultados demonstraram que os derivados de *Blechnum*, em concentrações variando de 100 a 500 $\mu\text{g/mL}$, não afetaram a viabilidade das células, sendo os valores comparáveis ao controle negativo ($p < 0,05$). Triton X-100 (1%) exibiu intensa morte celular ($p < 0,05$). Assim, essas amostras podem ser consideradas seguras para uso em células humanas.

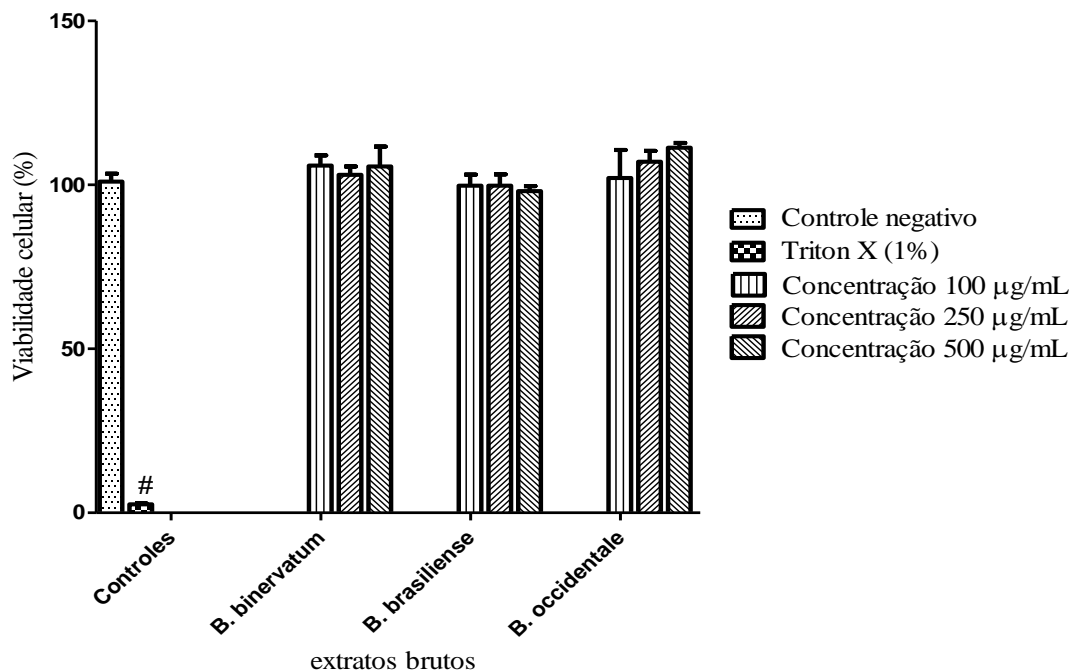


Figura 7. Efeito dos extratos brutos de *B. binervatum*, *B. brasiliense* e *B. occidentale* na viabilidade de células-tronco (ensaio de MTT). As células foram pré-cultivadas em microplacas de 96 poços (após confluência, em 200 μL de DMEM). Posteriormente, foram incubadas com os extratos, nas concentrações de 100-500 $\mu\text{g/mL}$, por 24 hs, a 37°C. A porcentagem de viabilidade para o grupo controle (não-tratado) foi igual a 100%. #indica significante redução na viabilidade celular, quando comparada ao controle negativo ($p < 0,05$).

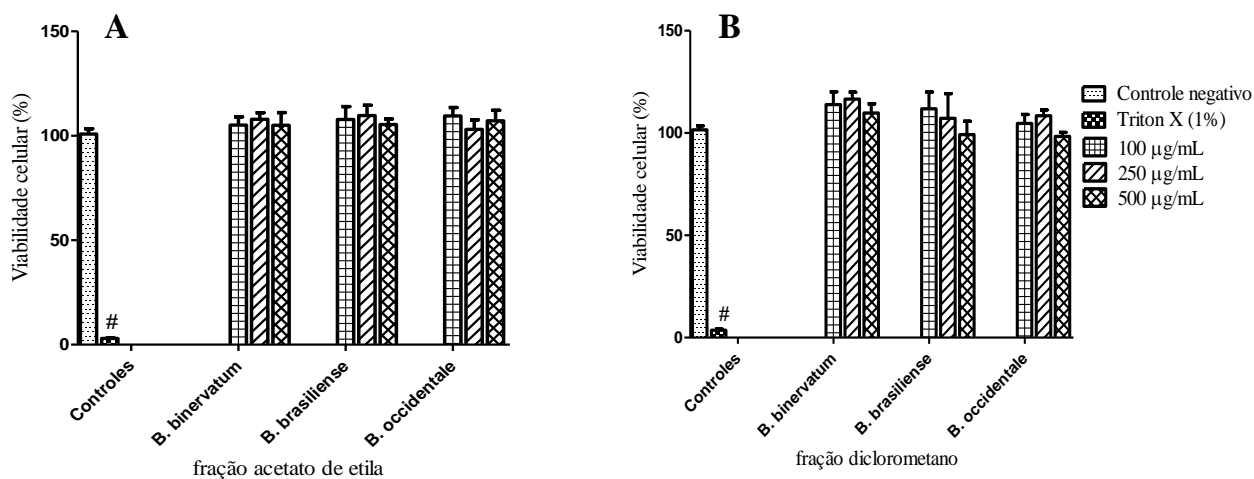


Figura 8. A) Efeito das frações acetato de etila das três espécies de *Blechnum* na viabilidade das células-tronco; B) avaliação da influência das frações diclorometano sobre as células, através do ensaio de MTT. As frações foram testadas nas concentrações de 100-500 µg/mL. A porcentagem de viabilidade para o grupo controle (não-tratado) foi igual a 100%. #indica significativa redução na viabilidade celular, comparada ao controle não-tratado ($p < 0,05$).

Corroborando os resultados do ensaio de MTT, as células tratadas com os extratos e frações de *Blechnum*, nas mesmas concentrações descritas acima, por 24 horas, demonstraram ausência de efeito citotóxico, pelo método de liberação da LDH (Figuras 9, 10A e 10B). Triton X-100 (1%) apresentou significativo aumento no extravasamento de LDH para o meio contendo as células tratadas. As amostras apresentaram perfis similares entre si, e comparáveis ao controle negativo ($p < 0,05$). Os resultados apontam que essas amostras são capazes de manter a viabilidade de células-tronco, não apresentando efeito citotóxico sobre as mesmas, nas concentrações de 100-500 µg/mL. Algumas amostras, nas concentrações mais baixas, demonstraram tendência à citoproliferação.

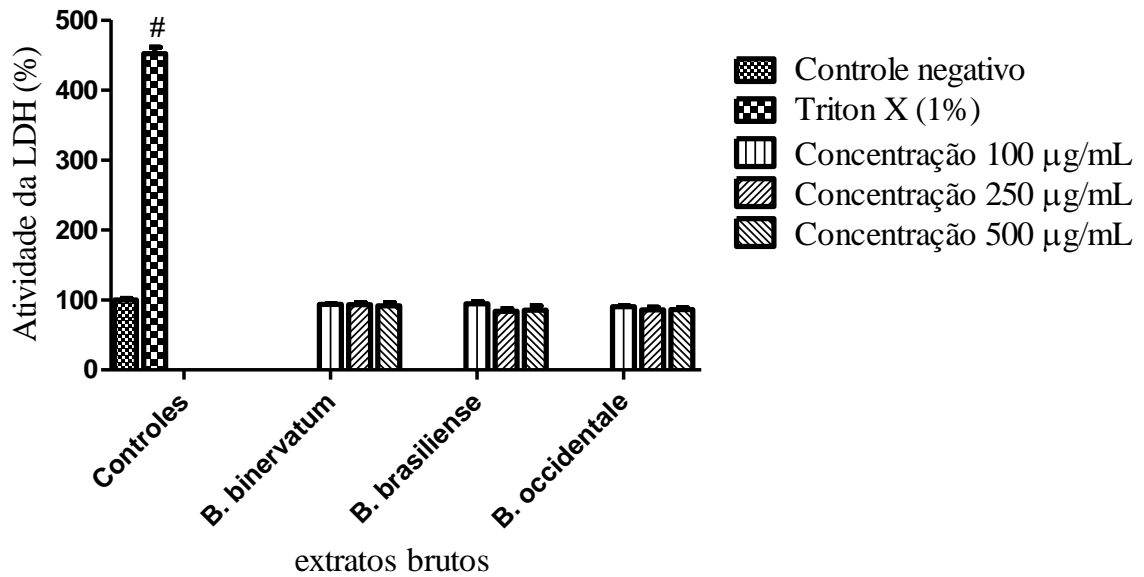


Figura 9. Avaliação dos efeitos citotóxicos dos extratos brutos de *B. binervatum*, *B. brasiliense* e *B. occidentale* sobre células-tronco (ensaio de liberação da LDH), sendo estas pré-cultivadas em microplacas de 96 poços (após confluência, em 200 µL de DMEM). As células foram incubadas com os extratos, nas concentrações de 100-500 µg/mL, por 24 hs, a 37°C, e os sobrenadantes de cada poço foram utilizados nas reações. Porcentagens acima de 100% (controle-negativo) indicam toxicidade das amostras avaliadas. #demonstra significativa toxicidade sobre as células-tronco, quando comparada ao controle não-tratado ($p < 0,05$).

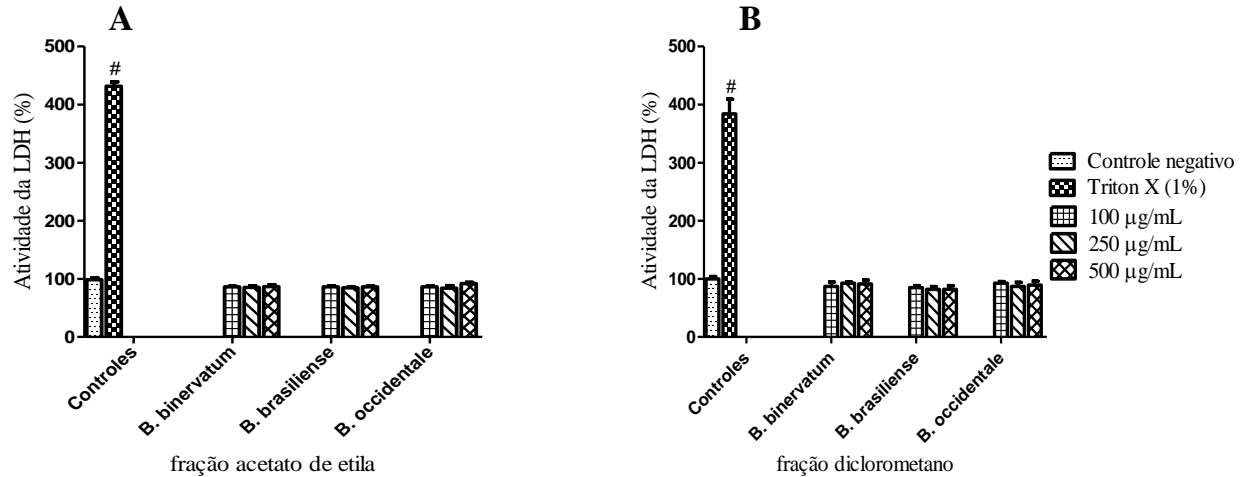


Figura 10. A) Influência das frações acetato de etila das três espécies de *Blechnum* na toxicidade sobre células-tronco; B) avaliação do efeito das frações diclorometano sobre as células, através do método de liberação da LDH. As frações foram testadas nas concentrações de 100-500 µg/mL e os sobrenadantes de cada poço reacional foram utilizados nos ensaios. Porcentagens acima de 100% (controle-negativo) indicam toxicidade e #demonstra significativa toxicidade sobre as células-tronco, comparada ao controle não-tratado ($p < 0,05$).

5. PARTE II:

Análise e Identificação Química

5.1. Materiais e Métodos

Análise Fitoquímica por CLAE-DAD-EM

Os extratos metanólicos brutos das três espécies de *Blechnum* foram avaliados quanto à sua composição química por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), acoplada a detector de arranjo de diodos (DAD) e espectrômetro de massas (EM). Essas análises foram realizadas em parceria com o Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS), da USP-Ribeirão Preto. Para tal, foram pesadas 2 mg dos extratos, às quais foi adicionado 1 mL de uma solução água ultrapura:acetonitrila (90:10) e, 1 mL de hexano. As misturas foram agitadas em vórtex e centrifugadas a 2000 rpm, por 5 minutos. Uma alíquota (500 µL) das fases polares foi tomada e, posteriormente, filtrada em membrana de PVDF (fluoreto de polivinilideno), 0,45 µm (Millipore, EUA) para as análises por CLAE-EM. Os parâmetros cromatográficos utilizados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros cromatográficos utilizados na análise por CLAE das amostras de diferentes espécies de *Blechnum*.

Parâmetro	Descrição
Cromatógrafo	Shimadzu LC-20AD
Detector	Arranjo de diodos - SPD-M20A; Shimadzu
Coluna	Phenomenex Luna C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)
Pré-coluna	Phenomenex C18, 4,0 mm x 3,0 mm, 37-55 µm
Sistema de eluição	Gradiente linear
Fase móvel	Água acidificada com ácido fórmico 0,1 % (v/v) (A) e acetonitrila acidificada com ácido fórmico 0,1% (B)
Vazão	0,8 mL/min
Temperatura	27 ± 5°C ¹
Volume de injeção	10 µL
Comprimento de onda de detecção	210-600 nm

¹Sem emprego de forno para a coluna.

A fase móvel utilizada na análise foi constituída de solventes com alto grau de pureza como água ultrapura obtida em sistema Milli-Q (Millipore, EUA), acetonitrila (grau HPLC, Tedia Company, EUA) e ácido fórmico (J.T. Baker, EUA), foi previamente filtrada através de membrana 0,45 µm (Millipore, EUA) e, degaseada durante 30 minutos em banho de ultrassom sob pressão reduzida. O sistema utilizado de gradiente linear encontra-se descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Sistema gradiente linear utilizado para análise por CLAE.

Tempo (minutos)	A (%)	B (%)
0	95	5
45	65	35
46	50	50
47	0	100
50	0	100

A eluição dos compostos foi monitorada empregando-se o aplicativo Compass DataAnalysis (Bruker Daltonics, Germany) em comprimento de onda de 320 nm. Simultaneamente às análises por CLAE-DAD, foi utilizado espectrômetro de massas, afim de obter-se maior número de informação sobre cada sinal/composto (tempo de retenção, área do pico, espectro de UV e dados de massas), tornando assim, a diferenciação e caracterização mais fidedigna. Além disso, a EM é uma técnica muito útil na elucidação estrutural de compostos fenólicos, permitindo análises em extratos brutos, sem purificação prévia dos compostos, sendo amplamente aplicada na caracterização de ácidos fenólicos (GOBBO-NETO; LOPES, 2008; CLIFFORD *et al.*, 2006).

As análises por CLAE-DAD-EM e EM/EM foram realizadas utilizando a mesma coluna cromatográfica e gradiente de eluição descritos no método analítico por CLAE. O espectrofotômetro de massas utilizado foi o amaZon SL (Bruker Daltonics, Germany), composto por fonte de ionização por *electrospray* (ESI) e analisador íon trap. Os

cromatogramas de íons total, TIC, foram obtidos na faixa de massa de m/z 50 a 900, para ambos modos de ionização, positivo e negativo. Os parâmetros do espectrômetro de massas foram mantidos em todas as análises: fluxo do gás de secagem: 5,0 L/min; temperatura de secagem do gás: 180°C; pressão do gás de nebulização: 4 bar. Para análise de EM/EM, gás hélio foi utilizado como gás de colisão, empregando amplitude de 0,6 V.

Análise Fitoquímica por CG-EM

A composição química das frações diclorometano e hexano das espécies de *Blechnum* foi avaliada utilizando cromatógrafo gasoso Shimadzu QP-2010 (Shimadzu, Japan), acoplado a detector de massas quadrupolo, utilizando coluna capilar DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) para separação dos compostos. A temperatura do forno foi mantida a 60°C por 3 min, seguida por um aumento de 5°C/min (rampa) até 300°C, temperatura na qual o sistema permaneceu por 20 minutos. Hélio foi utilizado como gás de arraste, com fluxo igual a 1,3 mL/min. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas a 240°C.

Para os espectros de massas foi utilizada ionização por impacto eletrônico a 70 eV e varredura de massas no intervalo de m/z 40 a 600 Da, sendo as temperaturas da interface e da fonte de ionização mantidas a 290°C e 250°C, respectivamente. Os índices de kóvats dos compostos foram calculados a partir da comparação dos tempos de retenção dos mesmos com uma série de hidrocarbonetos de nove a quarenta átomos de carbono (C9-C40). A quantificação dos compostos foi baseada nas áreas dos picos obtidos, cuja soma correspondeu a 100%. Foi injetado 1 μ L das amostras a 5 mg/mL, diluídas em acetato de etila.

5.2. Resultados e Discussão

Análise Fitoquímica por CLAE-DAD-EM

Visando verificar o perfil e identificar as substâncias presentes nos extratos brutos das três espécies de *Blechnum*, foi realizada análise por CLAE, acoplada à detector de DAD e EM. Nas Figuras 1, 2 e 3, estão apresentados os cromatogramas obtidos por CLAE-DAD, a 320 nm, para os extratos de *B. binervatum*, *B. brasiliense* e *B. occidentale*. É possível observar perfis distintos, porém com algumas regiões similares, quando comparadas as três espécies.

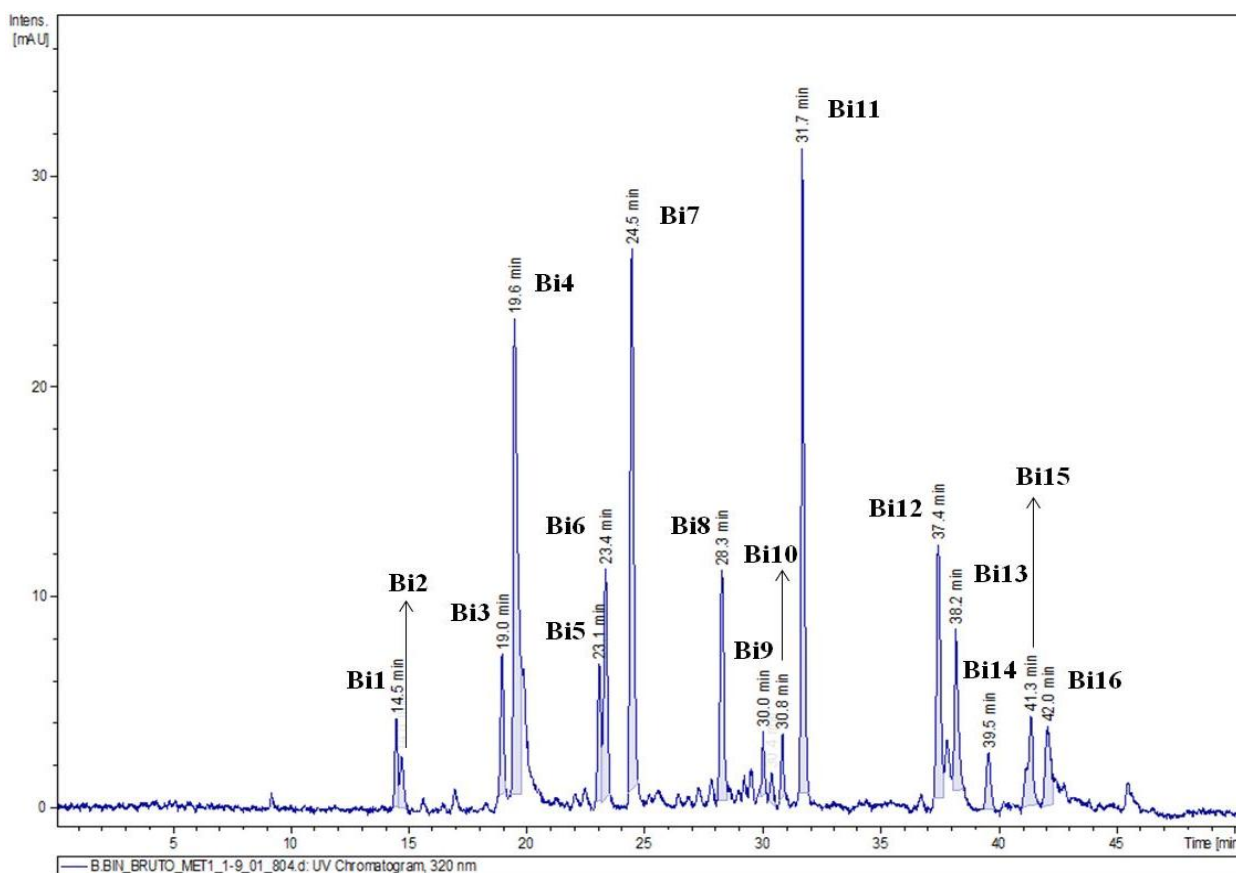


Figura 1. Cromatograma a 320 nm, obtido para o extrato bruto metanólico de *B. binervatum*, após análises por CLAE-DAD.

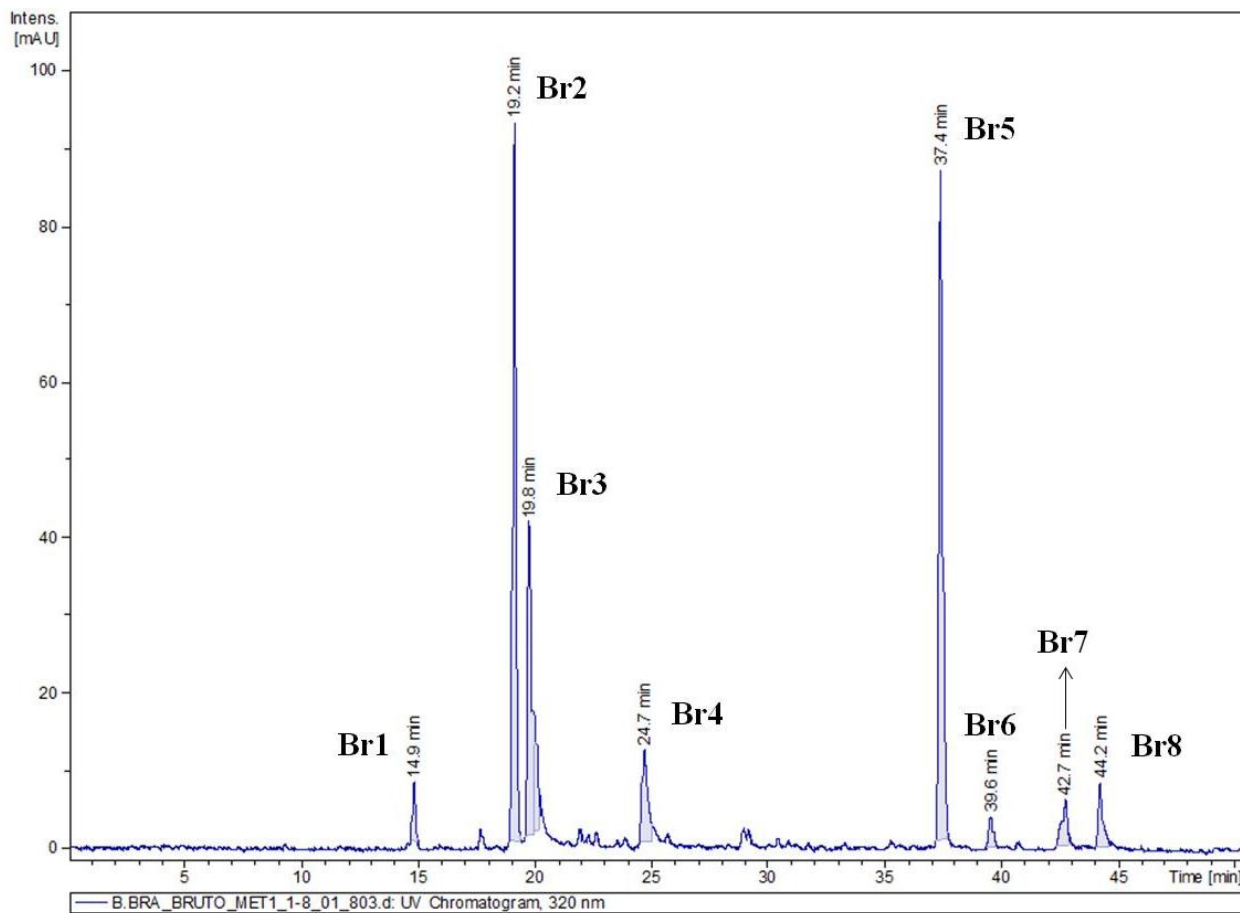


Figura 2. Cromatograma a 320 nm, obtido para o extrato bruto metanólico de *B. brasiliense*, após análises por CLAE-DAD.

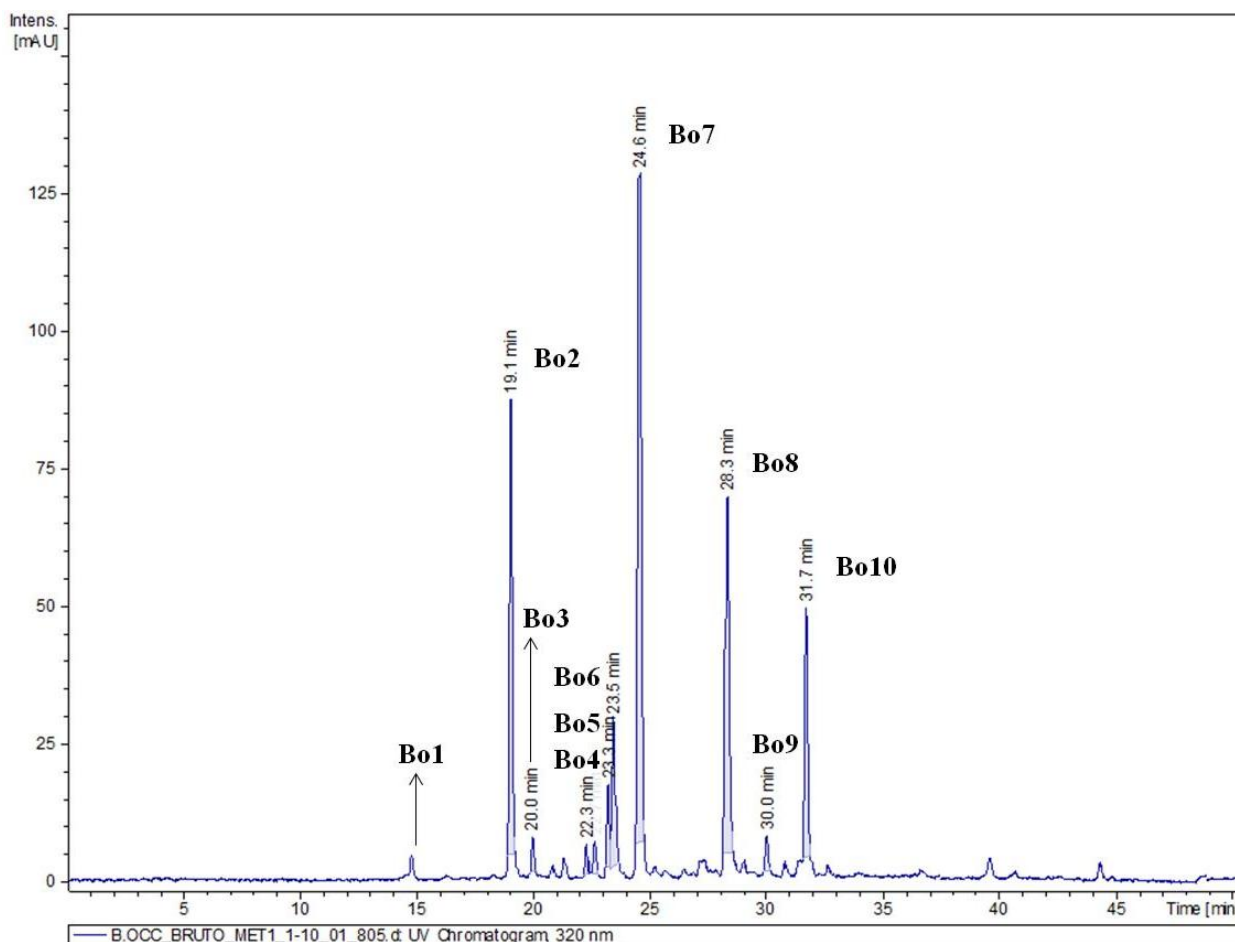


Figura 3. Cromatograma a 320 nm, obtido para o extrato bruto metanólico de *B. occidentale*, após análises por CLAE-DAD.

Com a utilização da técnica de EM foi possível a obtenção da massa molecular dos compostos, utilizando ESI, nos modos positivo e negativo, a qual fornece íons pseudomoleculares protonados e desprotonados. Após identificação do íon pseudomolecular de cada composto, o mesmo foi submetido à energia de colisão com voltagem de amplitude de 0,6 V, tanto no modo positivo, quanto no negativo ou, ainda, em somente um dos modos, dependendo da molécula em análise. Estas estratégias possibilitaram a identificação de algumas substâncias presentes nos extratos brutos de *Blechnum*, como demonstrado nas Tabelas 3, 4 e 5.

Tabela 3. Identificação dos picos cromatográficos do extrato bruto de *B. binervatum*, dados de UV, EM e EM/EM.

Pico	Composto	TR (min)	UV max (nm)	Íons negativos		Íons positivos		Referências
				EM (m/z)	EM/EM (m/z)	EM (m/z)	EM/EM (m/z)	
Bi1	Ácido cafeico glicosilado	14,5	212,301	[M-H] ⁻ 341,11	341→179 ^{pb} ,135	[M+Na] ⁺ 365,12	-----	R1
Bi2	Ácido (1 ou 3)- <i>O</i> -cafeoil quínico (6)ou(7)	14,8	215,301	[M-H] ⁻ 353,12	353→191 ^{pb} ,179,135	[M+H] ⁺ 355,13	355→353,185,163 ^{pb} , 145	R2
Bi3	Ácido 5- <i>O</i> -cafeoil quínico (9)	19,0	217,322	[M-H] ⁻ 353,12	353→191 ^{pb}	[M+H] ⁺ 355,13	355→163 ^{pb} ,145	R2
Bi4	Ácido 4- <i>O</i> -cafeoil quínico (8)	19,6*	214,327	[M-H] ⁻ 353,09	353→173 ^{pb}	[M+H] ⁺ 355,13	355→163 ^{pb}	R2
Bi5	Ácido cafeoil chiquímico (isômero)	23,1	219,325	[M-H] ⁻ 335,10	335→291,179 ^{pb} ,161,135	[M+H] ⁺ 337,12	337→319,163 ^{pb} ,145	R3
Bi6	Ácido cafeoil chiquímico (isômero)	23,4	215,327	[M-H] ⁻ 335,09	335→291,179 ^{pb} ,135	[M+H] ⁺ 337,12	337→319,181,163 ^{pb} ,145	R3
Bi7	Ácido cafeoil chiquímico (isômero)	24,5*	216,326	[M-H] ⁻ 335,09	335→179 ^{pb} ,135	[M+H] ⁺ 337,11	337→181,163 ^{pb} ,145	R3
Bi8	Ácido salvianólico F (10)	28,3*	220,303	[M-H] ⁻ 313,08	313→269 ^{pb} ,179,135	[M+H] ⁺ 315	-----	R4
Bi9	Ácido brainico (isômero) (11)	30,0	218,301	[M-H] ⁻ 513,17	513→469,339 ^{pb} ,313,295,269	[M+Na] ⁺ 537,15 [M-H ₂ O+Na] ⁺ 497,15	497→325 ^{pb}	R5
Bi10	Quercetina 3- <i>O</i> -glicosídeo (14)	30,08	253, 353	[M-H] ⁻ 463,16	463→301 ^{pb} ,241	[M+H] ⁺ 465,13	465→303 ^{pb}	R1
Bi11	Ácido brainico (isômero) (11)	31,7*	219,301	[M-H] ⁻ 513,14	513→469 ^{pb} ,340, 313,295,269	[M+Na] ⁺ 537,15 [M-H ₂ O+Na] ⁺ 497,15	497→325 ^{pb} , 297	R5
Bi12	Ácido rosmarínico (12)	37,4*	220,330	[M-H] ⁻ 359,11	359→197,179,161 ^{pb}	-----	-----	R6
Bi13	Ácido isosalvianólico A (13)	38,2	220,330	[M-H] ⁻ 493,17	493→313,295 ^{pb} ,159	-----	-----	R7
Bi14	Ni	39,5	220	[M-H] ⁻ 527,20	-----	[M+H] ⁺ 529,13	-----	
Bi15	Ácido rosmarínico sulfatado	41,3	220	[M-H] ⁻ 439,10	439→359, 259 ^{pb} ,179	-----	-----	R8
Bi16	Ni	42,0	220	[M-H] ⁻ 439,08	-----	[M+H] ⁺ 441,27	-----	

*compostos com maior intensidade (mAU) no cromatograma da amostra; ni: não identificado; TR: tempo de retenção; pb: pico base (intensidade relativa 100%). R1: Hossain *et al.*, 2010. R2: Clifford *et al.*, 2003, 2005, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ruiz *et al.*, 2013. R3: Fang *et al.*, 2002; Siqueira, 2012; Oliveira, 2013. R4: Chen *et al.*, 2011. R5: Wada *et al.*, 1992. R6: Liu *et al.*, 2007; Hossain *et al.*, 2010; Barros *et al.*, 2013. R7: Ruan *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2011; Barros, 2013. R8: Barros, 2013.

Tabela 4. Dados de UV, EM e EM/EM dos compostos presentes no extrato bruto de *B. brasiliense*, após análise por CLAE-DAD-EM.

Pico	Composto	TR (min)	UV (nm)	Íons negativos		Íons positivos		Referências
				EM (m/z)	EM/EM (m/z)	EM (m/z)	EM/EM (m/z)	
Br1	Ácido (1 ou 3)- <i>O</i> -cafeoil quínico (6)ou(7)	14,9	218,324	[M-H] ⁻ 353,10	353→191 ^{pb} , 179	[M+H] ⁺ 355,11	355→163 ^{pb}	R1
Br2	Ácido 5- <i>O</i> -cafeoil quínico (9)	19,2*	214,325	[M-H] ⁻ 353,09	353→191 ^{pb}	[M+H] ⁺ 355,12 [M+Na] ⁺ 377	355→301,163 ^{pb} ,117	R1
Br3	Ácido 4- <i>O</i> -cafeoil quínico (8)	19,8*	214,328	[M-H] ⁻ 353,14	353→173 ^{pb}	[M+H] ⁺ 355,13 [M+Na] ⁺ 377	355→163 ^{pb}	R1
Br4	Ácido cafeoil chiquímico	24,7	215,312	[M-H] ⁻ 335,13	335→179 ^{pb} ,135	[M+H] ⁺ 337,12	337→163 ^{pb}	R2
Br5	Ácido rosmarínico (12)	37,4*	219,328	[M-H] ⁻ 359,13	359→197,179,161 ^{pb}	[M+H] ⁺ 361,14 [M+Na] ⁺ 383,09	-----	R3
Br6	Ni	39,6	218	[M-H] ⁻ 509,17	509→399 ^{pb} ,355,244	[M+H] ⁺ 511,16	511→383 ^{pb}	
Br7	Ni	42,7	218	[M-H] ⁻ 343,11	343→ 161 ^{pb}	[M+Na] ⁺ 367,13	-----	
Br8	Ni	44,2	219	[M-H] ⁻ 365,14	365→229 ^{pb}	[M+H] ⁺ 367,15	367→ 205 ^{pb} ,188,163	

*compostos com maior intensidade (mAU) no cromatograma da amostra; ni: não identificado; TR: tempo de retenção; pb: pico base. R1: Clifford *et al.*, 2003, 2005, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ruiz *et al.*, 2013. R2: Fang *et al.*, 2002; Siqueira, 2012; Oliveira, 2013. R3: Liu *et al.*, 2007; Hossain *et al.*, 2010; Barros *et al.*, 2013.

Tabela 5. Identificação dos picos cromatográficos do extrato bruto de *B. occidentale*, dados de UV, EM e EM/EM.

Pico	Composto	TR (min)	UV (nm)	Íons negativos		Íons positivos		Referências
				EM (m/z)	EM/EM (m/z)	EM (m/z)	EM/EM(m/z)	
Bo1	Ácido (1 ou 3)- <i>O</i> -cafeoil quínico (6)ou(7)	14,9	215,322	[M-H] ⁻ 353,10	353→191 ^{pb} ,179	[M+H] ⁺ 355,11	355→163 ^{pb}	R1
Bo2	Ácido 5- <i>O</i> -cafeoil quínico (9)	19,1*	219,325	[M-H] ⁻ 353,10	353→191 ^{pb}	[M+H] ⁺ 355,11	355→163 ^{pb}	R1
Bo3	Ácido 4- <i>O</i> -cafeoil quínico (8)	20,0	221,325	[M-H] ⁻ 353,13	353→173 ^{pb}	[M+H] ⁺ 355,12 [M+Na] ⁺ 377,12	355→163 ^{pb}	R1
Bo4	Vicenina-2 (6,8-di-C-glicopiranosil apigenina) (15)	22,3	267,339	[M-H] ⁻ 593,22	593→575,534,503 ^{pb} , 473,353,221	[M+H] ⁺ 595,21	595→ 577 ^{pb} ,559, 457	R2
Bo5	Ácido cafeoil chiquímico (isômero)	23,3	215,326	[M-H] ⁻ 335,09	335→291,179 ^{pb} ,161,135	[M+H] ⁺ 337,11	337→ 163 ^{pb}	R3
Bo6	Ácido cafeoil chiquímico (isômero)	23,5	215,326	[M-H] ⁻ 335,08	335→317,291,247,179 ^{pb}	[M+H] ⁺ 337,11	337→ 163 ^{pb}	R3
Bo7	Ácido cafeoil chiquímico (isômero)	24,6*	215,326	[M-H] ⁻ 335,07	335→179 ^{pb} ,135	[M+H] ⁺ 337,11 [M+Na] ⁺ 359,11	337→ 163 ^{pb}	R3
Bo8	Ácido salvianólico F (10)	28,3*	220,303	[M-H] ⁻ 313,08	313→269 ^{pb} ,179,135	[M+H] ⁺ 315,10	-----	R4
Bo9	Ácido brainico (isômero) (11)	30,0	218,300	[M-H] ⁻ 513,15	513→469,339 ^{pb} ,313,295,269, 159	[M+Na] ⁺ 537,15 [M-H ₂ O+Na] ⁺ 497,15	-----	R5
Bo10	Ácido brainico (isômero) (11)	31,7*	220,301	[M-H] ⁻ 513,14	513→469 ^{pb} ,357,339,313,295, 269	[M+Na] ⁺ 537,13 [M-H ₂ O+Na] ⁺ 497,15	-----	R5

*compostos com maior intensidade (mAU) no cromatograma da amostra; ni: não identificado; TR: tempo de retenção; pb: pico base. R1: Clifford *et al.*, 2003, 2005, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ruiz *et al.*, 2013. R2: Gobbo-Neto & Lopes, 2008. R3: Fang *et al.*, 2002; Siqueira, 2012; Oliveira, 2013. R4: Chen *et al.*, 2011. R5: Wada *et al.*, 1992.

Pela primeira vez, os principais compostos fenólicos presentes nos extratos metanólicos de *Blechnum* foram identificados. Os isômeros do ácido cafeoil quínico foram encontrados nos três extratos brutos das plantas, apresentando íon pseudomolecular m/z 353 $[M-H]^-$. O pico com tempo de retenção em, aproximadamente, 14,9 minutos nos cromatogramas das amostras foi denominado, neste trabalho, como ácido (1 ou 3)-*O*-cafeoil quínico. Os isômeros: 1-*O*-cafeoil- (6) e 3-*O*-cafeoil quínico (7), não foram distinguidos pelas análises realizadas, já que seus perfis EM/EM $[M-H]^-$ são muito semelhantes e, não há dados na literatura quanto à sua separação e caracterização por CLAE-DAD (Figura 4A). Foi possível a identificação dos ácidos 4-*O*-cafeoil quínico (8) e 5-*O*-cafeoil quínico (9), com base na fragmentação dos íons, pela análise de EM/EM $[M-H]^-$ (Figuras 4B e 4C).

Compostos com o grupamento acila ligado nas posições 3-OH ou 5-OH do ácido quínico, apresentam o íon em m/z 191 $[M-H]^-$ corresponde ao pico base do espectro de EM/EM. O íon correspondente à porção ácido cafeico da molécula, em m/z 179 é mais significativo no ácido 3-*O*-cafeoil quínico, enquanto que no espectro do ácido 5-*O*-cafeoil quínico possui muito fraca intensidade (<5%) ou é indetectável. Quando o grupo acila está ligado à posição 4-OH, o íon em m/z 173 $[M-H]^-$ está presente como pico base do espectro de fragmentação, devido à perda da porção ácido cafeico e uma molécula de água (GOUVEIA *et al.*, 2013). Desta maneira, foi possível a diferenciação entre esses compostos, através dos seus espectros de massas e fragmentações.

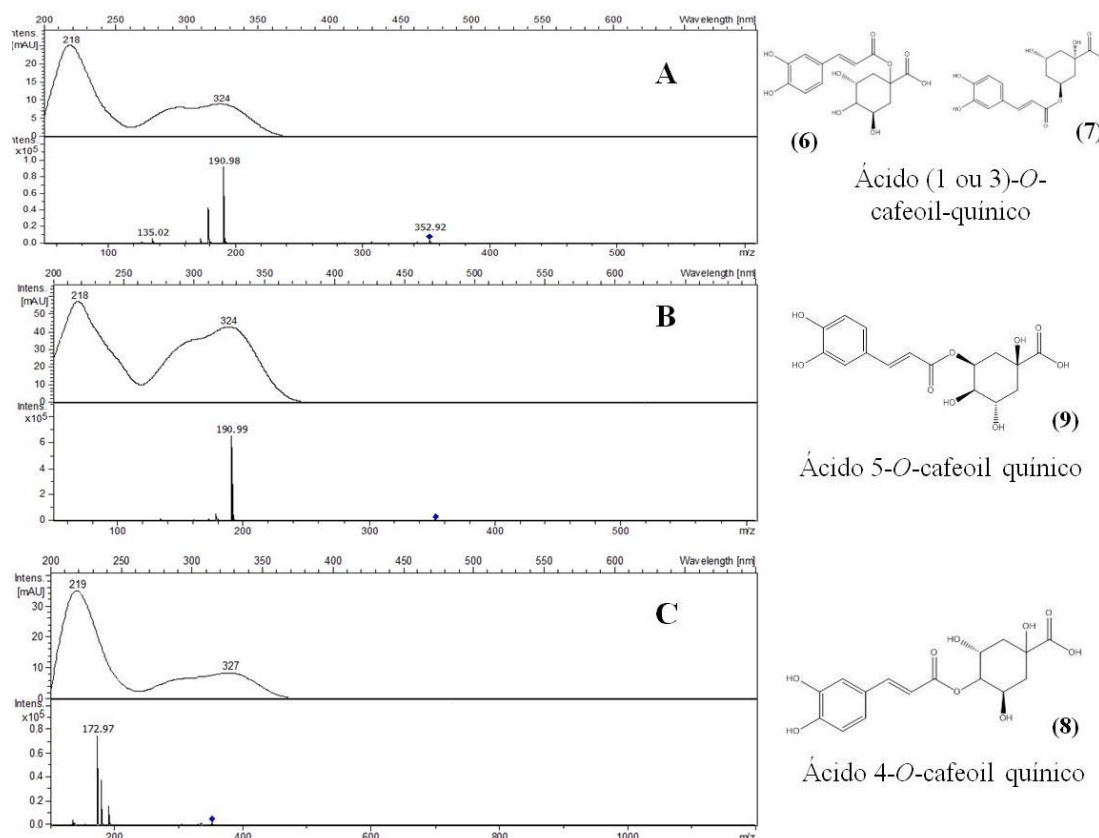


Figura 4. Espectro no ultravioleta e espectro de massas de íons produzido no modo negativo, obtidos para: A) o isômero com tempo de retenção de, aproximadamente, 14,9 minutos, denominado: ácido (1 ou 3)-*O*-cafeoil-quinico (**6** ou **7**); B) o ácido 5-*O*-cafeoil quinico (**9**); C) o ácido 4-*O*-cafeoil quinico (**8**), utilizando CLAE-DAD-EM/EM.

A denominação ácido clorogênico é dada ao grupo de compostos fenólicos caracterizado pela ligação éster entre o ácido quínico e uma ou mais moléculas de ácidos hidroxicinâmicos (ácido cafeico (**3**), ferúlico (**4**), isoferúlico e *p*-cumárico (**5**)) (OLTHOF *et al.*, 2003; KENNY *et al.*, 2015). Os mais comuns e conhecidos são os mono ésteres do ácido cafeoil quinico, principalmente o ácido **9**, um dos compostos mais abundantes, facilmente encontrado em alimentos e produtos vegetais (MANACH *et al.*, 2004; CLIFFORD *et al.*, 2006; IVANOVA *et al.*, 2010; JAISWAL *et al.*, 2010; SIQUEIRA, 2012). A presença do ácido clorogênico já foi observada em algumas espécies do gênero *Blechnum*, incluindo *B. brasiliense*, *B. discolor*, *B. orientalis* e *B. spicant* (BOHM, 1968).

Isômeros do ácido cafeoil chiquímico foram observados nos cromatogramas das três plantas, sendo abundantes em *B. binervatum* e *B.*

occidentale, para os quais não foi possível sua diferenciação, uma vez que seus espectros EM/EM [M-H]⁻ são muito semelhantes (Figura 5), apresentando como pico base o íon em *m/z* 179 (perda da porção ácido cafeico) e íon fragmento *m/z* 135, correspondente à porção ácido cafeico descarboxilada. Essas moléculas são ésteres dos ácidos cafeico (3) e chiquímico (2). Nos estudos de JAISWAL *et al.* (2011), os autores identificaram o *m/z* 335,1 [M-H]⁻ como os isômeros: ácido 3-*O*-cafeoil chiquímico, 4-*O*-cafeoil chiquímico e 5-*O*-cafeoil chiquímico, baseando-se nos resultados anteriormente obtidos, nos quais observou-se ordem de eluição entre os regioisômeros igual a: 5>4>3 (JAISWAL *et al.*, 2010). OLIVEIRA (2013) relatou a presença de dois ácidos cafeoil chiquímicos em chá mate (*Ilex paraguariensis*), com *m/z* 335 [M-H]⁻, não diferenciando seus isômeros.

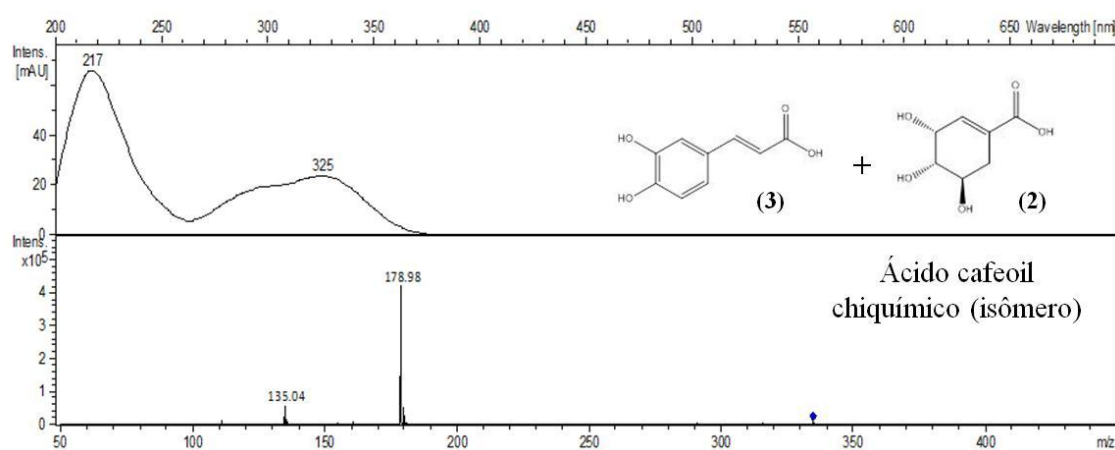


Figura 5. Espectro de ultravioleta e espectro de massas de íons produto no modo negativo, obtidos para o ácido cafeoil chiquímico (isômeros), utilizando CLAE-DAD-EM/EM.

SAITO e colaboradores (1997) isolaram o ácido 4-*O*-cafeoil chiquímico da samambaia: *Dicksonia antarctica*, além do ácido 4-*O*-*p*-cumaroil chiquímico. WANG *et al.* (2001) estudaram a composição química do extrato metanólico de *B. spicant*, relatando como principais metabólitos: ácido cafeico, 5-cafeoil chiquimato, ácido trans-bléchnico e ácido brainico. Correlacionando com as atividades biológicas, SAMBANTHAMURTHI e colaboradores (2011)

propuseram que, os quatro grupos hidroxila, presentes nas moléculas dos ácidos cafeoil chiquímicos, seriam os responsáveis pela sua atividade antioxidante.

Ácido salvianólico F (**10**) foi identificado nos extratos de *B. binervatum* e *B. occidentale*, com tempo de retenção de 28,3 minutos, em ambos os cromatogramas. O íon pseudomolecular desse composto foi igual a m/z 313,08 $[M-H]^-$ que, após fragmentação, gerou pico base em m/z 269, correspondendo à perda do grupamento carboxila desprotonado ($-CO_2$). No espectro de EM/EM (Figura 6) pode-se observar, também, íons fragmento em m/z 179 e m/z 135, obtidos após clivagem da molécula na cadeia entre os anéis aromáticos, conforme descrito por CHEN e colaboradores (2011).

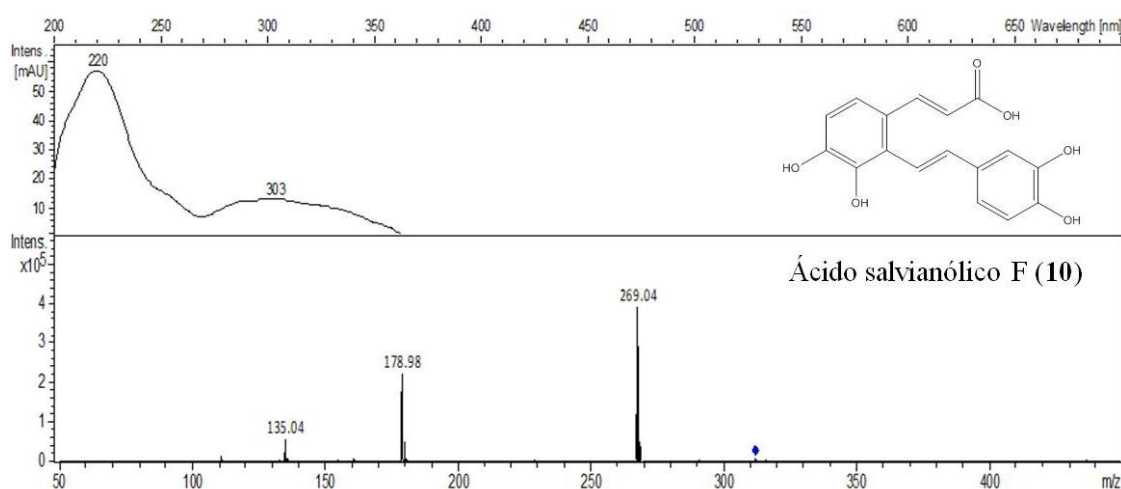


Figura 6. Espectro de ultravioleta e espectro de massas de íons produto no modo negativo, obtidos para o ácido salvianólico F (**10**), utilizando CLAE-DAD-EM/EM.

Isômeros do ácido brainico (**11**) estão presentes nos extratos de *B. binervatum* e *B. occidentale*, com tempos de retenção nos cromatogramas de 30,0 e 31,7 minutos, sendo este ácido o composto majoritário em *B. binervatum* (pico Bi11). Essa molécula apresenta massa igual a 514 g/mol, com íon pseudomolecular em m/z 513 $[M-H]^-$ (Figura 7). A fragmentação desse íon possibilitou a identificação da molécula, pela análise do pico base: m/z 469 e dos íons fragmento: m/z 357, 339, 313, 295 e 269. Esse composto já foi descrito em

duas espécies de *Blechnum*: *B. orientale* e *B. spicant* (WADA *et al.*, 1992; WANG *et al.*, 2001).

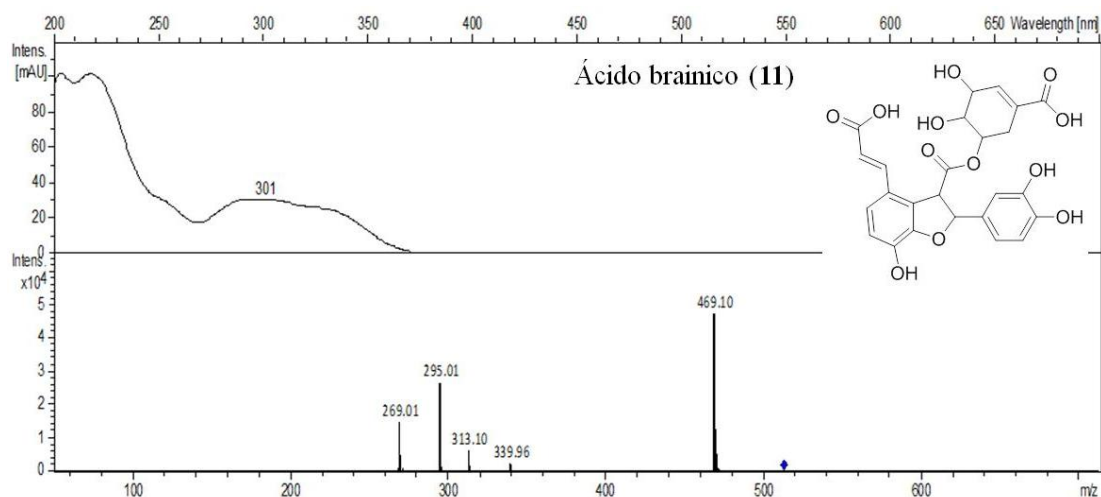


Figura 7. Espectro de ultravioleta e espectro de massas de íons-produto no modo negativo, obtidos para os isômeros do ácido brainico (11), utilizando CLAE-DAD-EM/EM.

Prospota do padrão de fragmentação para essa molécula foi realizada, uma vez que não há dados na literatura, na qual o pico base representa a perda do grupamento carboxila desprotonado ($-\text{CO}_2$). A clivagem da ligação éster entre o oxigênio e o carbono do anel resultou no íon fragmento m/z 357 que, após perdas sequenciais de dois grupamentos COO^- , gerou os íons m/z 313 e m/z 269. A clivagem da ligação éster entre o oxigênio e o carbono carbonílico gerou o íon m/z 339 que, com a perda do grupamento COO^- , resultou no íon m/z 295 (Figura 8).

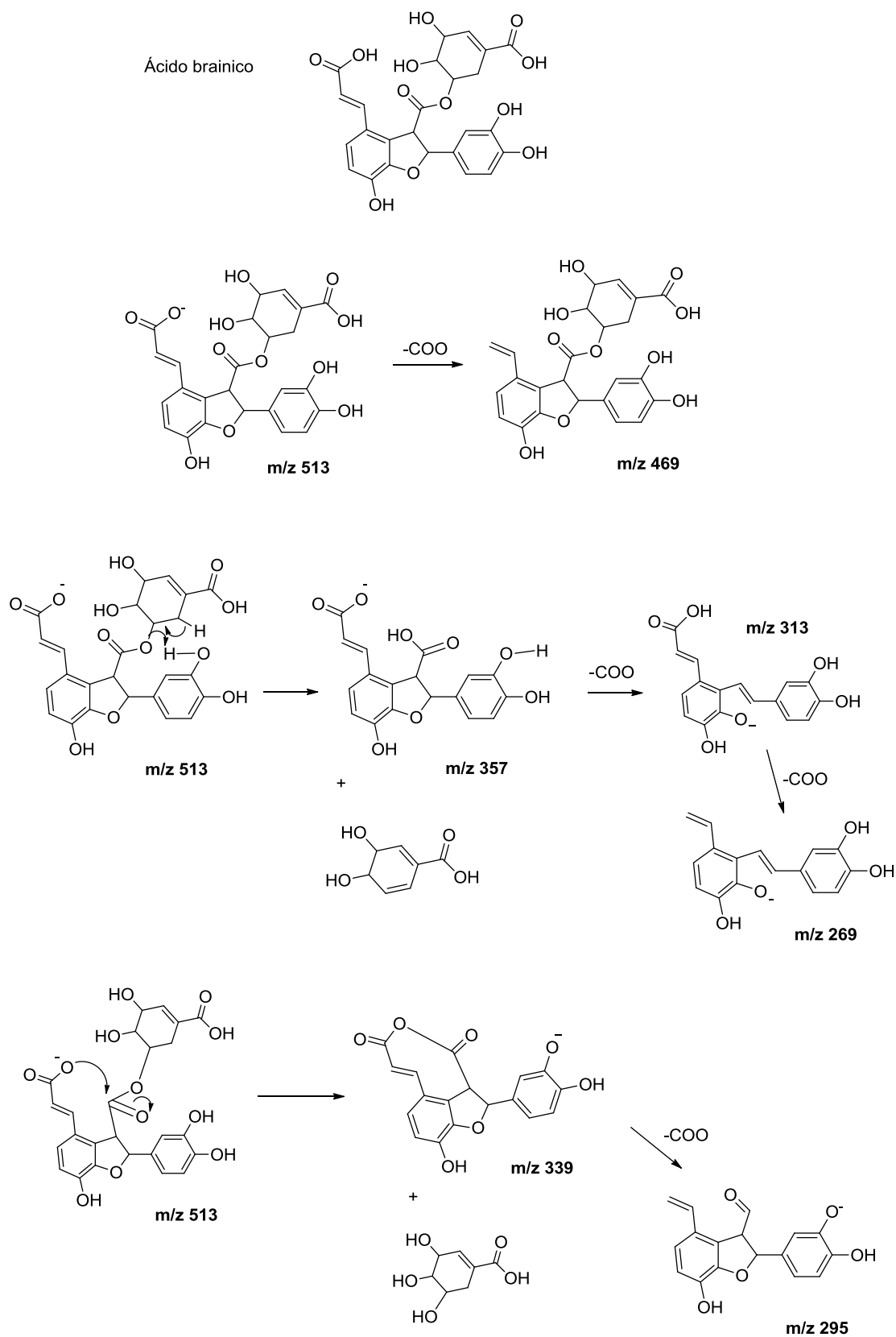


Figura 8. Proposta de padrão de fragmentação por EM, no modo negativo, atribuída para o composto ácido brainico (11).

Foi verificada a presença de ácido rosmarínico (**12**) nos extratos de *B. binervatum* e *B. brasiliense*, apresentando tempo de retenção igual a 37,4 minutos, sendo um dos constituintes majoritários no extrato de *B. brasiliense*. O composto apresenta fórmula molecular $C_{18}H_{16}O_8$ e massa de 360 g/mol. Íon pseudomolecular no modo negativo em m/z 359,08 $[M-H]^-$ foi observado, além da presença do íon m/z 719,18 $[2M-H]^-$. A fragmentação do íon pseudomolecular m/z 359,08 $[M-H]^-$ gerou íons-produto característicos: m/z 197, m/z 179 e o pico base m/z 161 (LIU *et al.*, 2007; HOSSAIN *et al.*, 2010; BARROS *et al.*, 2013) (Figura 9).

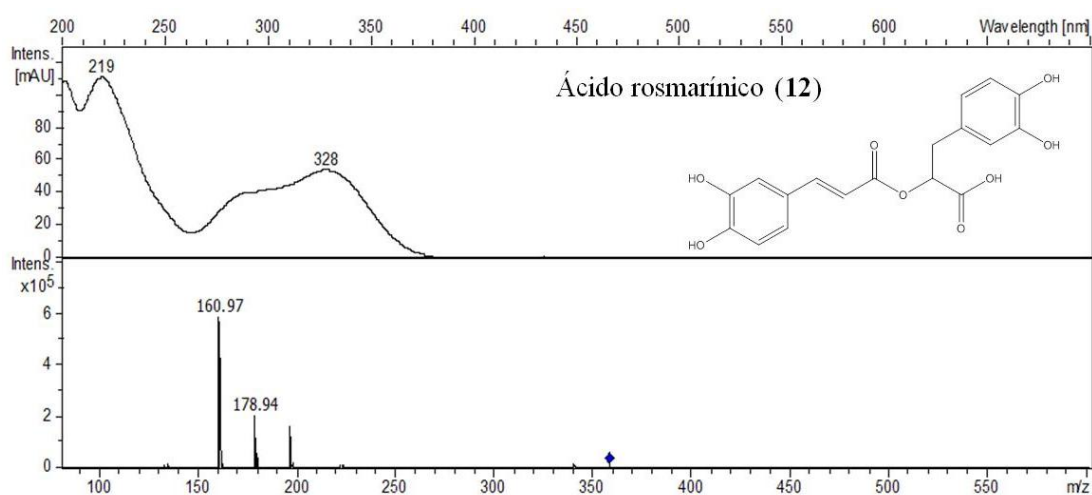


Figura 9. Espectro de ultravioleta e espectro de massas de íons produto no modo negativo, obtidos para o ácido rosmarínico (**12**), utilizando CLAE-DAD-EM/EM.

O íon m/z 197 representa a perda do grupo cafeoil $[(M-H)-(C_9H_6O_3)]^-$ e o íon m/z 179 é caracterizado como a porção ácido cafeico da molécula. O íon m/z 161 $[197-2H_2O]^-$ é intenso, pois caracteriza, tanto a perda de duas moléculas de água do íon m/z 197, como uma das porções resultantes da clivagem da ligação éster da molécula (CHEN *et al.*, 2011; BARROS *et al.*, 2013; CÁDIZ-GURREA *et al.*, 2013). A substância é caracterizada como um éster dos ácidos cafeico e 3,4-dihidróxifenil-lático, sendo encontrada principalmente em espécies das famílias Boraginaceae e Lamiaceae, mas já foi descrita em outras famílias vegetais (PETERSEN; SIMMONDS, 2003). Há relatos da presença do composto

12 em espécies da família Blechnaceae (samambaias) (HÄUSLER *et al.*, 1992; SZABO *et al.*, 1993), especialmente em *B. brasiliense* (BOHM, 1968), corroborando os achados deste trabalho. Destacamos ainda, a presença do derivado sulfatado do ácido rosmarínico no extrato de *B. binervatum*, composto raro em vegetais.

No extrato metanólico de *B. binervatum* foi identificado, ainda, o ácido isosalvianólico A (**13**), com tempo de retenção de 38,2 minutos, o qual apresentou íon pseudomolecular em m/z 493,17 $[M-H]^-$. A fragmentação desse íon gerou como pico base o íon m/z 295, caracterizado pela clivagem da ligação éster da molécula (LIU *et al.*, 2007). Os espectros de ultravioleta e de EM/EM dessa substância estão descritos na figura 10, os quais estão de acordo com os achados de RUAN e colaboradores (2012). A literatura reporta diferentes atividades biológicas para o grupo dos ácidos salvianólicos, incluindo efeitos cardioprotetor, neuroprotetor, além da capacidade antioxidante (WANG *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2014).

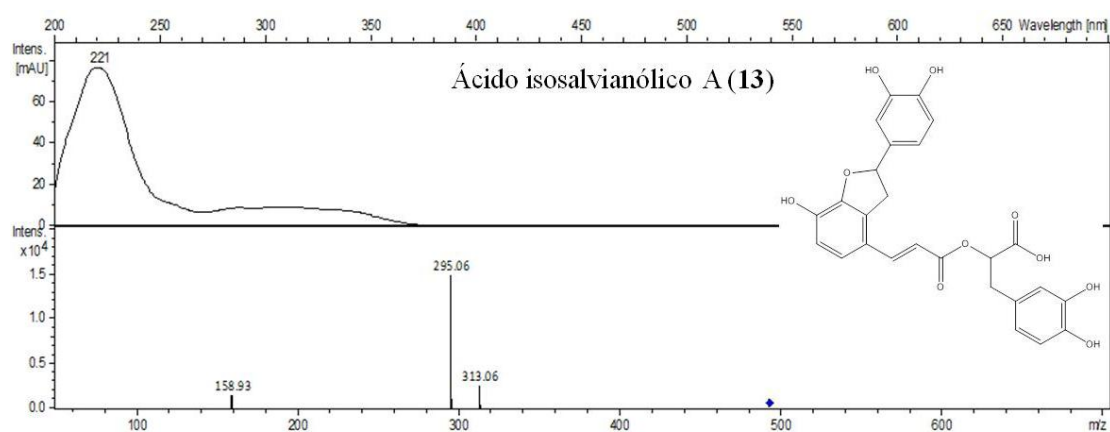


Figura 10. Espectro de ultravioleta e espectro de massas de íons produto no modo negativo, obtidos para o ácido isosalvianólico A (**13**), utilizando CLAE-DAD-EM/EM.

Flavonoides também foram encontrados, mas somente nos extratos de *B. binervatum* e *B. occidentale*. No cromatograma da primeira espécie, foi possível identificar a quercetina 3-*O*-glicosídeo (**14**) (Figura 11), cujo pico apresentou tempo de retenção igual a 30,08 minutos. Para a segunda espécie, vicenina-2

(6,8-di-*C*-glicopiranosil apigenina) (**15**) (Figura 12) foi caracterizada, eluindo em 22,3 minutos. A identificação desses compostos foi realizada através dos espectros de massas e fragmentações dos íons pseudomoleculares.

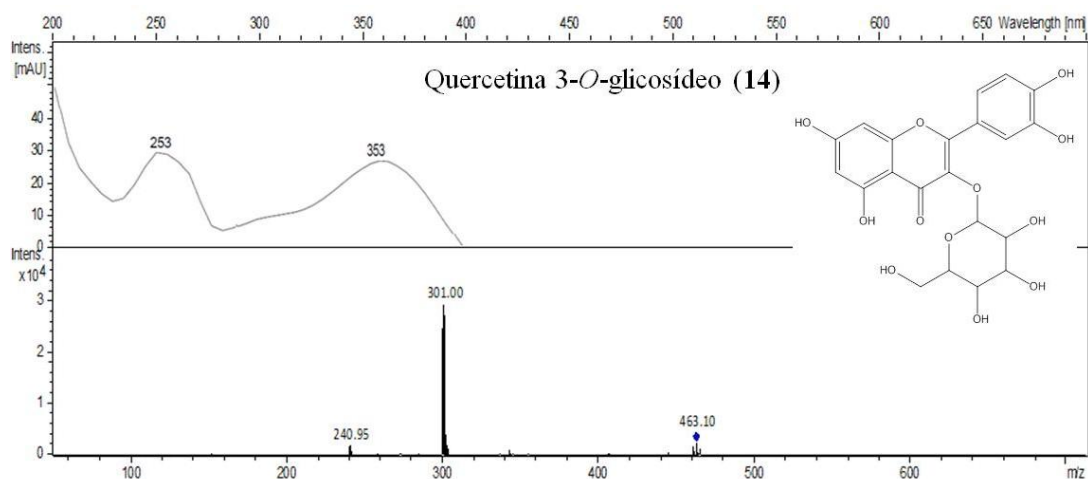


Figura 11. Espectro de ultravioleta e espectro de massas de íons produto no modo negativo, obtidos para o flavonoide: quercetina 3-*O*-glicosídeo (**14**), utilizando CLAE-DAD-EM/EM.

Para o composto (**14**), o íon pseudomolecular m/z 463,16 $[M-H]^-$ foi fragmentado, sendo o pico base observado em m/z 301, caracterizado pela perda da molécula de glicose do composto (HOSSAIN *et al.*, 2010). A fragmentação do íon pseudomolecular do composto (**15**) em m/z 593,22 $[M-H]^-$ foi característica de di-*C*-glicosilflavonas: gerando espectro com íon fragmento em m/z 575, devido à perda de molécula de água, pico base m/z 503 e outro íon fragmento m/z 473, caracterizados por rompimentos na porção açúcar: $[(M-H)-90]^-$, $[(M-H)-120]^-$, respectivamente (GOBBO-NETO; LOPES, 2008).

Derivados heterosídeos da quercetina e apigenina são amplamente distribuídos e há relatos da sua presença em diferentes espécies de samambaias (MARKAM; WALLACE, 1980; IWASHINA *et al.*, 1995; PASTENE *et al.*, 2001; FRANCESCATO *et al.*, 2013; ANDRADE *et al.*, 2014). *C*-glicosilflavonas são produtos de ocorrência menos frequente e o composto (**15**)

foi descrito anteriormente em samambaias apenas no gênero *Asplenium* (MATSUMOTO *et al.*, 2003).

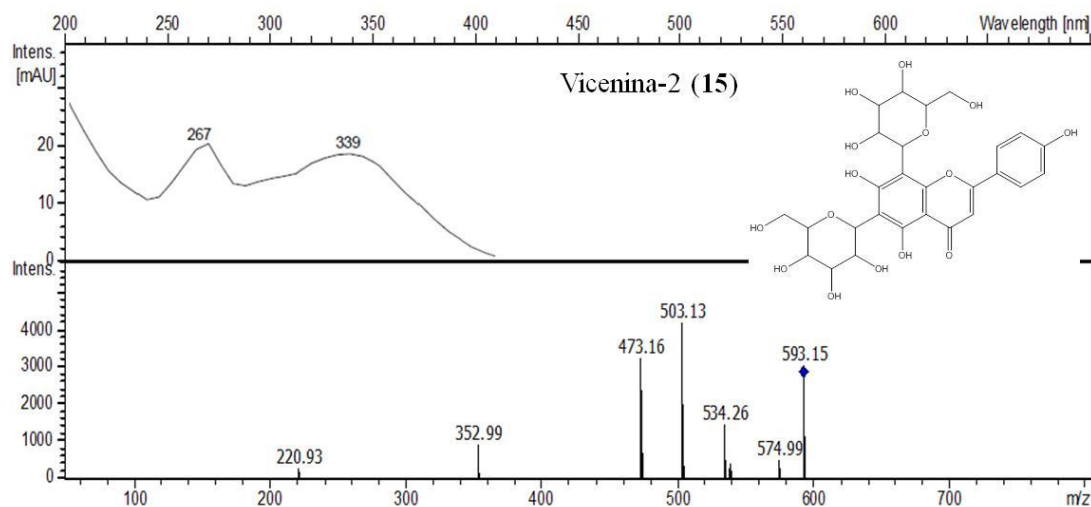


Figura 12. Espectro de ultravioleta e espectro de massas de íons produzido no modo negativo, obtidos para o flavonoide: vicenina-2 (15), utilizando CLAE-DAD-EM/EM.

Cabe ressaltar que a grande maioria das substâncias identificadas, incluindo ácidos hidroxicinâmicos nos extratos das três espécies, e flavonoides em *B. binervatum* e *B. occidentale*, não haviam sido relatadas na literatura para nenhuma espécie de *Blechnum*. Esses achados demonstram o potencial desses compostos como marcadores quali e quantitativos para espécies desse gênero de samambaias, sendo este trabalho relevante quanto a análises fitoquímicas de espécies pouco estudadas da flora brasileira.

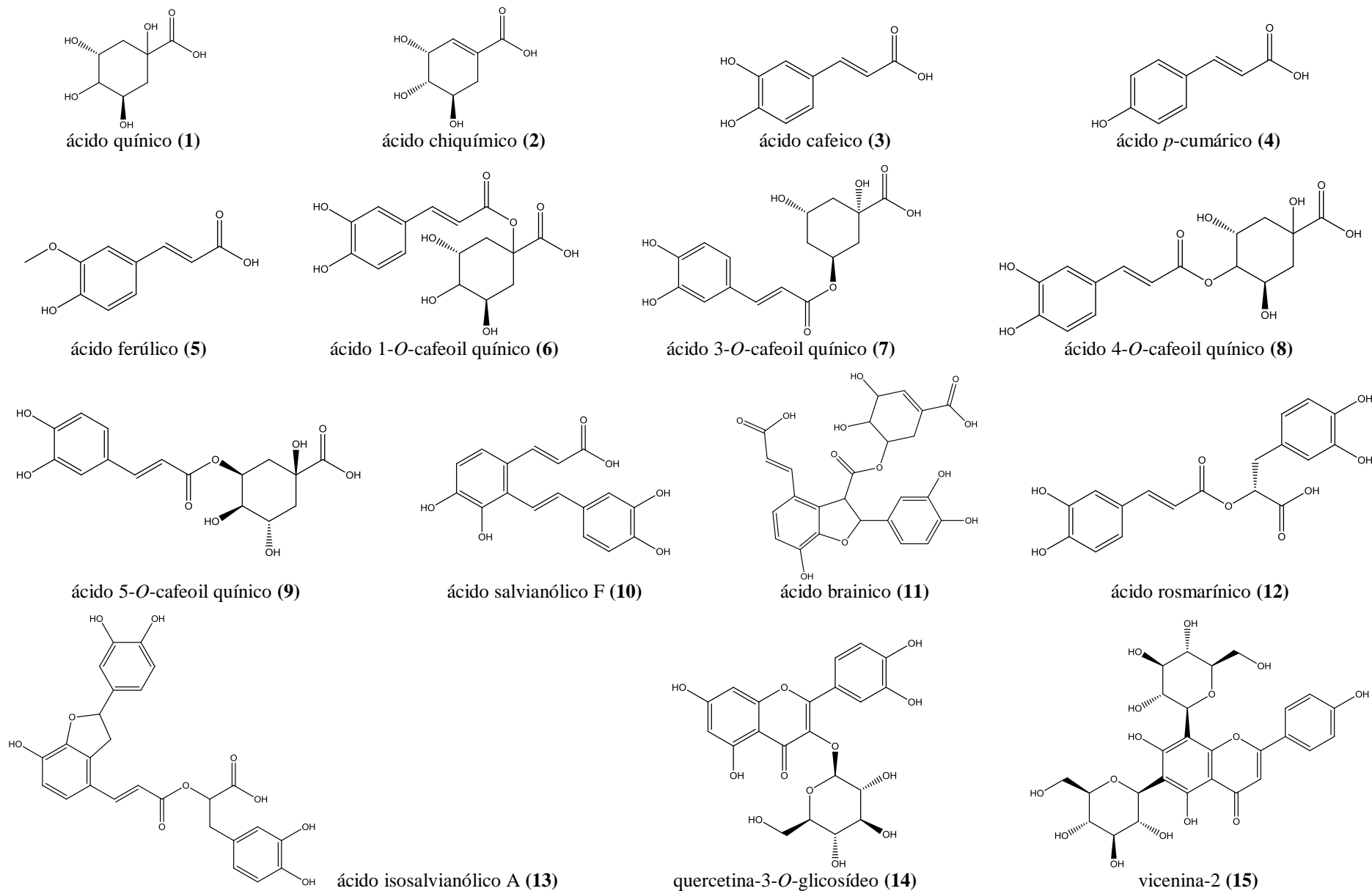


Figura 13. Estruturas químicas dos compostos: ácido quínico (1), ácido chiquímico (2), ácido cafeico (3), ácido *p*-cumárico (4), ácido ferúlico (5), ácido 1-*O*-cafeoil-quínico (6), ácido 3-*O*-cafeoil-quínico (7), ácido 4-*O*-cafeoil-quínico (8), ácido 5-*O*-cafeoil-quínico (9), ácido salvianólico F (10), ácido brainico (11), ácido rosmarínico (12), ácido isosalvianólico A (13), quercetina 3-*O*-glicosídeo (14), vicenina-2 (15).

Análise Fitoquímica por CG-EM

Os resultados da análise para identificação dos compostos voláteis presentes nas frações diclorometano e hexano das três espécies de *Blechnum* encontram-se nas Tabelas 6 e 7, respectivamente. O composto majoritário nas frações diclorometano foi o diterpeno neofitadieno (Figura 14), apresentando teor maior que 25% em todas as espécies. Também se observou abundância, variando apenas o teor entre as frações, do ácido graxo: ácido palmítico e do fitoesterol: β -sitosterol.

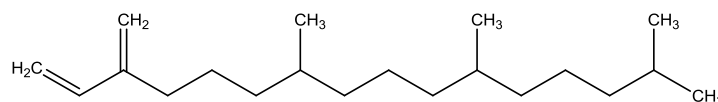


Figura 14. Estrutura química do neofitadieno, composto majoritário nas frações diclorometano de *Blechnum*.

Para *B. binervatum*, ácido palmítico e ácido linolênico representaram 20,95% e 16,67%, respectivamente, do total de compostos presentes na fração diclorometano. Esta espécie apresentou, ainda, β -sitosterol (10,57%), isofitol (6,85%) e ácido linoleico (5,70%) como compostos mais abundantes. Em *B. brasiliense* demonstrou-se prevalência de β -sitosterol (20,11%), ácido palmítico (16,00%) e isofitol (8,87%), além do neofitadieno (30,39%) citado anteriormente. Em menor quantidade, verificou-se a presença de fitol (5,13%) e ácido linolênico (3,67%), além de outros compostos, nesta espécie. Neofitadieno representou 37,36% da fração diclorometano de *B. occidentale*, seguido de ácido palmítico (13,42%), isofitol (11,29%) e β -sitosterol (9,76%). Ácido linolênico (3,97%), fitol (2,59%) e ácido linoleico (0,81%) também foram identificados nesta fração, porém em menores proporções.

As frações hexano das diferentes espécies, quando comparadas, foram mais heterogêneas quanto à sua composição. Destaca-se a abundância de

compostos hidrogenados (acima de 60%) para *B. occidentale*, com prevalência de neofitadieno (50,77%) e, em menor proporção, 1-octadecino (8,35%). Isofitol (14,57%) e ácido palmítico (4,68%) representaram 64% do teor total de compostos oxigenados nesta fração. Os compostos majoritários para a fração hexano de *B. binervatum* foram: neofitadieno (20,92%), seguido de ácido palmítico (17,02%), ácido linolênico (13,30%) e β -sitosterol (12,19%). Isofitol (5,47%) e ácido linoleico (5,52%) também foram identificados. Por fim, *B. brasiliense* apresentou muitos compostos de baixo peso molecular, facilmente volatilizáveis, para os quais não foi possível identificação. Esta espécie demonstrou prevalência de compostos oxigenados, como β -sitosterol (20,70%), ácido palmítico (11,04%), ácido hexadecanoico-metil éster (10,91%) e ácido linoleico (10,47%). Neofitadieno (11,02%) também foi identificado.

Tabela 6. Compostos voláteis identificados nas frações diclorometano das três espécies de *Blechnum*.

Componente	FM	IK ¹	IK ²	IK ³	B. bin ^{1*}	B. bra ^{2*}	B. occ ^{3*}
2-Hexadeceno	C ₁₆ H ₃₂	1830	1830	1830	1,71	0,97	1,12
Neofitadieno	C ₂₀ H ₃₈	1836	1837	1836	26,06	30,39	37,36
Ni	-	1842	1843	1842	4,56	4,03	4,13
1-Octadecino	C ₁₈ H ₃₄	1861	1861	1861	3,71	5,06	6,61
Isofitol (3,7,11,15-tetrametil-1-hexadecen-3-ol)	C ₂₀ H ₄₀ O	1879	1879	1879	6,85	8,87	11,29
Ácido hexadecanoico, metil éster	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	-	1924	1924	-	2,13	1,61
Ácido hexadecanoico (ácido palmítico)	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	1958	1959	1959	20,95	16,00	13,42
Fitol (3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol)	C ₂₀ H ₄₀ O	-	2114	2110	-	5,13	2,59
Ácido 9,12-octadecadienoico (ácido linoleico)	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	2126	-	2126	5,70	-	0,81
Ácido 9,12,15-octadecatrienoico (ácido linolênico)	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	2133	2133	2133	16,67	3,67	3,97
Ni	-	-	-	2271	-	-	0,59
Ni	-	-	-	2280	-	-	1,12
Ácido hexanodioico, bis (2-etil-hexil) éster	C ₂₂ H ₄₂ O ₄	-	-	2385	-	-	1,44
Ni	-	-	-	3058	-	-	0,51
Ni	-	3080	3080	3080	1,96	2,43	0,83
Stigmast-5-en-3-ol (β-sitosterol)	C ₂₉ H ₅₀ O	3308	3310	3306	10,57	20,11	9,76
Compostos Hidrogenados	-	-	-	-	31,48	36,42	45,09
Compostos Oxigenados	-	-	-	-	60,74	55,91	44,89
Total ni	-	-	-	-	6,52	6,46	7,18

IK: índice de kóvats. ¹: *Blechnum binervatum*; ²: *B. brasiliense*; ³: *B. occidentale*. ni: não identificado. FM: fórmula molecular. *:valores em porcentagem (%).

Tabela 7. Compostos voláteis identificados nas frações hexano das três espécies de *Blechnum*.

Componente	FM	IK ¹	IK ²	IK ³	B. bin ^{1*}	B. bra ^{2*}	B. occ ^{3*}
Ni	-	1072	1072	-	0,85	2,22	-
Ni	-	-	1076	-	-	1,67	-
Ni	-	1090	1090	-	0,73	1,60	-
Ni	-	1092	1092	-	0,70	1,61	-
Ni	-	-	1095	-	-	0,87	-
Ni	-	1098	1098	-	2,21	4,18	-
Ni	-	-	1112	-	-	2,76	-
Ni	-	-	1115	-	-	1,35	-
Ni	-	-	1120	-	-	0,91	-
2-Hexadeceno	C ₁₆ H ₃₂	1830	-	1830	1,50	-	1,39
Neofitadieno	C ₂₀ H ₃₈	1837	1837	1837	20,92	11,02	50,77
Ni	-	1843	-	1843	3,78	-	5,23
1-Octadecino	C ₁₈ H ₃₄	1861	1861	1861	2,95	1,23	8,35
Isofitol (3,7,11,15-tetrametil-1-hexadecen-3-ol)	C ₂₀ H ₄₀ O	1879	1879	1879	5,47	2,68	14,57
Ácido hexadecanoico, metil éster	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	1924	1924	1924	1,78	10,91	0,93
Ácido hexadecanoico (ácido palmítico)	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	1960	1960	1959	17,02	11,04	4,68
Ácido 9,12-octadecadienoico, metil éster	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	2090	2090	-	0,79	2,42	-
Ácido 9,12,15-octadecatrienoico, metil éster	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	-	2096	-	-	4,40	-
Fitol (3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol)	C ₂₀ H ₄₀ O	2110	-	2110	3,97	-	3,53
Ácido 9,12-octadecadienoico (ácido linoleico)	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	2127	2127	2126	5,52	10,47	0,40
Ácido 9,12,15-octadecatrienoico (ácido linolênico)	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	2134	2134	2133	13,30	4,75	1,53
Ácido 9-octadecenoico (ácido oleico)	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	2139	-	2137	1,88	-	0,45
Ni	-	2150	-	-	0,18	-	-
Ni	-	-	-	2264	-	-	1,00
Ni	-	-	-	2271	-	-	2,38

Ni	-	2280	-	-	1,00	-	-
Ácido hexanodioico, bis (2-etil-hexil) éster	C ₂₂ H ₄₂ O ₄	-	-	2385	-	-	1,10
Ni	-	2456	-	-	0,87	-	-
Ácido tetradecanoico 2,3-diacetoxi-propil éster	C ₂₁ H ₃₈ O ₆	2470	-	2468	1,13	-	0,48
Ni	-	-	-	3058	-	-	0,38
Ni	-	3080	3080	3080	1,25	1,18	0,39
Ergost-5-en-3-ol (campesterol)	C ₂₈ H ₄₈ O	-	3244	-	-	2,01	-
Stigmast-5-en-3-ol (β-sitosterol)	C ₂₉ H ₅₀ O	3307	3309	3308	12,19	20,70	2,43
Compostos Hidrogenados	-	-	-	-	25,37	12,25	60,51
Compostos Oxigenados	-	-	-	-	63,05	69,38	30,10
Total ni	-	-	-	-	11,57	18,35	9,38

IK: índice de kóvats. ¹: *Blechnum binervatum*; ²: *B. brasiliense*; ³: *B. occidentale*. ni: não identificado. FM: fórmula molecular. *:valores em porcentagem (%).

O extrato etéreo de *Blechnum spicant* foi avaliado quanto ao conteúdo de compostos orgânicos voláteis por cromatografia gasosa por FONS e colaboradores (2010). Os autores identificaram 8 compostos no extrato das frondes férteis dessa planta, sendo os componentes majoritários: 2-fenil-etanal (45%) e 1-octen-3-ol (37,5%). Para nenhuma outra espécie de *Blechnum* foram encontrados dados de análises por CG.

DE FELICIO e colaboradores (2009) demonstraram que o composto neofitadieno possui atividade antimicrobiana frente aos fungos *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, sendo ativo também como antibacteriano, antiplasmódico e anti-inflamatório. Já foi identificado em algas, como a alga vermelha, *Centroceras clavulatum*, mas também foi relatado em algumas plantas terrestres (MENDIOLA *et al.*, 2008; CARRETERO *et al.*, 2008; CHUNG *et al.*, 2010).

6. ARTIGO I.

Combining *in vitro* and *in silico* approaches to evaluate the multifunctional profile of rosmarinic acid from *Blechnum brasiliense* on neurodegeneration targets

Submetido ao periódico *Chemico-Biological Interactions*

Combining *in vitro* and *in silico* approaches to evaluate the multifunctional profile of rosmarinic acid from *Blechnum brasiliense* on neurodegeneration targets

Juliana M. M. Andrade^{a*}, Carolina dos S. Passos^b, Maria Angélica K. Rubio^c,
Jacqueline N. Mendonça^d, Norberto P. Lopes^d, Amélia T. Henriques^a

^a*Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ipiranga 2752, 90.610-000, Porto Alegre, RS; Brazil.* ^b*School of Pharmaceutical Sciences, University of Geneva, University of Lausanne, Quai Ernest-Ansermet 30, CH-1211 Geneva 4; Switzerland.* ^c*School of Application, UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9500, 91.501-970, Porto Alegre, RS; Brazil.* ^d*Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), Av. do Café s/nº, 14.040-903, Ribeirão Preto, SP, Brazil.*

*Corresponding author at: Faculty of Pharmacy, UFRGS, Brazil. +5551 3308 5258. E-mail address: juandradep@gmail.com (Juliana M. M. Andrade).

ABSTRACT

Medicinal plants are important sources of new drugs, being explored in development of alternatives to compose the therapeutic arsenal, especially related with diseases of which etiology is extremely complex. Thus, this study aimed at investigate a derivative from *Blechnum brasiliense* and its main component, rosmarinic acid (RA), on targets related with neurodegeneration, using *in vitro* and *in silico* assays. The chemical and bioguided analysis of *Blechnum brasiliense* lead to the identification and isolation of RA as majority. This compound demonstrated a multifunctional profile on targets related to neurodegeneration showing antioxidant properties and the ability to inhibit MAO-A and COMT enzymes. Antioxidant effects against the hydroxyl and nitric oxide radicals were demonstrated for a plant ethyl acetate fraction (EAF) from *B. brasiliense* and for the isolated RA (IC₅₀ of 29.4 and 140 µM for HO[•] and NO[•] inhibition, respectively). In addition, EAF and RA were also able to inhibit the lipid peroxidation (IC₅₀ = 19.6 µM for RA). RA was also able to inhibit MAO-A, MAO-B and COMT with IC₅₀ of 50.1, 184.6, and 26.7 µM, respectively. The MAO-A inhibition was demonstrated to be non-time-dependent, suggesting a reversible mechanism. Further insights on the interactions of RA with MAO-A and COMT were revealed by molecular docking studies. RA did not demonstrate cytotoxicity on PMN cells in concentrations up to 5 mM. Taken together, our results suggest that the natural product RA may consist of a template for the development of new molecules possessing antioxidant, and MAO and COMT inhibition activities aiming at combating the neurodegeneration associated with Parkinson's disease.

Keywords: Rosmarinic acid; *Blechnum brasiliense*; MAO and COMT inhibitor; Parkinson disease; multifunctional compound.

1. INTRODUCTION

Blechnum is a fern (Pteridophyta) genus widely distributed in different habitats from Brazil [1]. Phenolic acids, as chlorogenic, rosmarinic, blechnic and derivatives were identified in extracts of this genus [2,3], besides flavonoids and lignans [4,5,6]. Phytoecdysones were also isolated [7].

Pharmacological activities were described for *Blechnum* species. *B. occidentale* is used in folk medicine for treatment of inflammatory and pulmonary diseases, urinary tract infections and liver complications [8]. The anti-inflammatory effect of this plant have already been confirmed by pharmacological assays [9]. Potential antioxidant, anti-cancer, antibacterial and wound healing properties were reported to *B. orientale* [10-12]. *B. brasiliense* and *B. chilense* showed antioxidant and antimicrobial activity [13].

Rosmarinic acid (RA) (Figure 2) was primarily obtained from the *Rosmarinus officinalis* L. leaves, and has been described in several other species [14]. Biological activities have been reported for this compound, including: potent antioxidant capacity [15], anti-inflammatory [16-18], antibacterial and antifungal [19], antidepressant [20], hepatoprotective [21] and anti-tumoral [22]. The powerful antioxidant properties of RA have been associated with neuroprotection, probably due to the effects in the stabilization of oxygen and nitrogen reactive species, such as peroxynitrite and hydrogen peroxide (H₂O₂) [23,24]. Related with this effect, RA demonstrated to protect against the memory impairment induced by A β ₂₅₋₃₅ in behavioral *in vivo* tests [25].

In view of the potential activity related to nervous system dysfunctions, as cognitive, motor or behavioral impairments, this study aimed at investigate the effects of a fraction obtained from fronds of *Blechnum brasiliense* and of its main component RA, on targets related with neurodegeneration, such as antioxidant activities and the inhibition of monoamine oxidases (MAO-A and MAO-B), COMT and cholinesterases (AChE and BChE). The molecular mechanisms of RA recognition by MAO-A and COMT were also evaluated by molecular

docking in order to get some clues related to the mode of inhibition of this compound on the selected targets.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

Human MAO-A and MAO-B supersomes were acquired from BD Gentest (Woburn, MA). COMT from porcine liver, AChE from *Electrophorus electricus* (electric eel), BChE from equine serum, acetylthiocholine iodide, S-butyrylthiocholine iodide, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (Ellman's reagent), physostigmine (eserine), kynuramine dihydrobromide, pargyline hydrochloride, clorgyline hydrochloride, 2-deoxy-D-ribose, sodium nitroprusside dihydrate, sulphanilamide, N-(1-naphtyl)ethylenediamine dihydrochloride, (+)-sodium L-ascorbate, aesculetin, triton X-100, dimethyl sulfoxide (DMSO), tris(hydroxymethyl)aminomethane, acetonitrile and methanol HPLC grade were purchased from Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, USA).

Potassium phosphate salts, sodium phosphate salts, potassium chloride and sodium hydroxide came from Fluka (Buchs, Switzerland). Hexane, dichloromethane, ethyl acetate, butanol, trichloroacetic acid, hydrogen peroxide and ferrous sulfate were obtained from Synth (Diadema, SP, Brazil). Formic acid was purchased from Tedia Company (Fairfield, OH, USA), phosphoric and 2-thiobarbituric acids from Merck (Darmstadt, Germany). Lactate dehydrogenase commercial kit was purchased from Doles (Goiás, Brazil). RA was isolated from *B. brasiliense* and its identity was confirmed by HPLC/MS comparison with authentic sample. The purity of the compound was found to be more than 98%. The absorbance and fluorescent readings were performed in a SpectraMax[®] equipment (Molecular Devices, CA, USA).

2.2. Plant material

Fronds of *B. brasiliense* were collected in the South region of Brazil (Rio Grande do Sul state, 29°32'17"S, 51°04'51"W) and identified by Dr Maria Angélica Kieling-Rubio. Voucher specimens (ICN 177668) were deposited in the herbarium of the Department of Botany from the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

2.3. Extraction and isolation

The dried fronds of *B. brasiliense* (561 g) were extracted with methanol (3 x 4 L) at room temperature. The extracts were concentrated under vacuum to afford a dark green syrup (65.3 g). An aliquot of this crude extract was dissolved in water and successively fractionated with hexane, dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol. The fractions were evaporated to dryness while the aqueous fraction was lyophilized. Fractions were subjected to a bioguided assay (according to methods described below). The most active fraction was further analyzed by high-pressure liquid chromatography (HPLC), coupled with diode array detector (DAD) and mass spectrometer (MS), aiming at establishing its chemical composition and its major compounds.

Acidified ultrapure water (formic acid 0.1%, v/v) and acetonitrile (formic acid 0.1%, v/v) were used as mobile phase in linear gradient mode. After the identification of RA by comparison with reference substance, the fraction was submitted to preparative HPLC with the same eluent system (H₂O:ACN, v/v) (Supplementary data, Table S1), rate of 3 mL/min and detection at 320 nm, resulting in the isolation of RA (20.1 mg).

2.4. Antioxidant assays

2.4.1. Stabilization of hydroxyl radical

Plant ethyl acetate fraction (EAF) and isolated RA were diluted in DMSO (final concentration 1%) and phosphate buffer, to obtain final concentrations ranging from 1.0 to 500

$\mu\text{g/mL}$ of EAF and from $1.22 \mu\text{M}$ to 5 mM for RA, which were added to the reaction system in a 96-well plate, containing 2-deoxyribose, ferrous sulfate (FeSO_4) and H_2O_2 . The mixture was incubated for 15 minutes at room temperature. Phosphoric and thiobarbituric acids were added to the reaction media, followed by incubation in a water bath (100°C) for 30 minutes. The absorbance readings were performed at 532 nm , measuring the formation of malondialdehyde (degradation product from 2-deoxyribose). Chlorogenic acid (CGA) and caffeic acid (CA) were used as positive controls [26]. The experiments were performed in triplicate and the results were expressed as IC_{50} values.

2.4.2. Antioxidant capacity against nitric oxide radical

To evaluate the scavenger potential of EAF and RA on against the NO^\bullet radical, samples were added to a sodium nitroprusside solution (10 mM) in 96-well plates. Incubation was performed for 60 minutes at room temperature. The Griess reagent (sulphanilamide 1% and N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride 0.1%) was added to the reaction medium, followed by a 7 minutes incubation, performed in the darkness. The nitrite levels were measured at 546 nm [27] and the IC_{50} values were determined for experiments performed in triplicate. The positive controls were CGA and CA.

2.4.3. Detection of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

Cortex and hippocampus were removed from Wistar male rats ($180\text{-}220 \text{ g}$) to evaluate the inhibition of the lipid peroxidation in these brain structures. All procedures were in accordance with the NIH guidelines for the care and use of laboratory animals, being previously approved by the ethical committee from the host institution (CEUA, UFRGS, Porto Alegre, Brazil, protocol number 23374). The structures were washed with cold TRIS buffer, 20 mM at $\text{pH } 7.4$ (tris (hydroxymethyl) aminomethane) and homogenized to obtain cell pool. The cell pools were centrifuged at $7,500 \text{ rpm}$ for 5 min and the supernatants used in the assays.

The samples were diluted in DMSO (1%) and added to the supernatant of homogenized cortex and hippocampus. FeSO_4 (2 mM) and ascorbic acid (0.02 mM) solutions were also added to the medium and incubated at 37°C for 60 minutes. Subsequently, trichloroacetic and thiobarbituric acids were added, followed by 20 minutes incubation at 80°C. Centrifugation at 7,500 rpm for 10 minutes was taken, and the supernatants were analyzed by spectrophotometry, using a wavelength of 532 nm [28]. The analyzes were carried out in triplicate using RA concentrations ranging from 0.001 to 5 mM. The positive controls were CGA and CA. Results were expressed as IC_{50} values.

2.5. Enzymatic assays

2.5.1. AChE and BChE inhibition

The inhibitory properties of *B. brasiliense* EAF on the acetyl and butyrylcholinesterase were assessed using the Ellman's method [29] modified by Di Giovanni *et al.* [30], employing physostigmine as reference substance. For the AChE assay, the reactions were carried out in 96 well plates and the reaction medium consisted of 158 μL of Ellman's reagent (0.15 mM) (5,50-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)) in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4, 20 μL of acetylthiocholine iodide solution in demineralised water (final concentration equal to the K_m value; $K_m = 0.33$ mM) and sample diluted in DMSO (2 μL). Physostigmine was tested in concentrations ranging from 0.001 to 100 μM while the EAF concentrations ranged from 50-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

The enzymatic reaction was initiated by the addition of an AChE solution (20 μL , 1 U.I./mL). The BChE inhibition assays followed the same protocol, using equine serum BChE as enzyme (1 U.I./mL) and S-butrylthiocholine iodide as substrate. Assays were carried out at room temperature and the rate of absorbance increase at 412 nm during 6 minutes (intervals of 30 s between readings) was monitored. The inhibitory activities were expressed as percentage of inhibition, calculated relative to a control sample, in which the enzymatic

activities were assessed under same conditions, but in the absence of tested sample (considered to be 100%). Triplicate analysis were carried out, in 2 independent experiments, and samples with inhibition higher than 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were considered to be inactive.

2.5.2. MAO-A and MAO-B inhibition

Monoamine oxidase inhibition assays were carried out with a fluorescence based method (end-point reading) using kynuramine as non-selective substrate of MAO-A and MAO-B, as previously described by Novaroli *et al.* [31], with minor modifications [32]. Briefly, reactions were performed in black, flat bottom 96-well plates containing potassium phosphate buffer (158 μL), inhibitor solutions in DMSO (2 μL), 0.5 mM kynuramine solution (20 μL), using a final volume of 200 μL per well.

The isolated RA and other structurally related compounds were tested at concentrations ranging from 0.5 to 500 μM , by serial dilutions. Samples were dissolved in DMSO (at a final concentration of 1%), and then diluted in potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4). Solutions of clorgyline and pargyline (from 0.0001 to 1000 μM) were used as positive controls for MAO-A and MAO-B inhibition, respectively. DMSO (2 μL) was used as control for 100% of enzyme activity.

The assay mixtures were incubated at 37°C, and then 20 μL of diluted human recombinant MAO-A and MAO-B were added, resulting in final protein concentrations of 0.009 mg/mL and 0.015 mg/mL, respectively. Incubation was carried out at 37°C, and the reactions were stopped by adding 25 μL of a 6 M NaOH solution. Formation of the fluorescent metabolite, 4-hydroxyquinoline, was quantified in a 96-well microplate fluorescent reader at excitation/emission wavelengths of 310/400 nm. Experiments were performed in quadruplicate.

2.5.3. Time-dependent studies of MAO-A

To determine the reversibility of the inhibition of MAO-A by isolated substances, the time-dependence of RA inhibition was evaluated according to Passos *et al.* [33]. The selected phenolic acid was preincubated with human MAO-A (final protein concentration of 0.03 mg/mL) for different periods of time (0, 15, 30, 60 min) at 37°C in potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4). For this purpose, the RA concentration was equal to twofold its measured IC₅₀ values for MAO-A.

Subsequently, the reactions medium were diluted twofold by the addition of kynuramine to yield a final enzyme concentration of 0.015 mg/mL, and a RA concentration corresponding to its IC₅₀. This assay was also performed in 96-well microplates, being the final volume in each well equal to 200 µL, and the final kynuramine concentration corresponding to 50 µM. The reactions were incubated at 37°C for a further 30 min period and terminated with the addition of NaOH 6 M (25 µL). The rates of 4-hydroxyquinoline formed in the MAO-A reaction were measured and calculated as described above. All measurements were carried out in triplicate.

2.6. Inhibitory effects on COMT

The inhibitory effect on COMT was assessed by the method proposed by Kurkela *et al.* [34] and Passos *et al.* [35]. In this assay is evaluated the conversion of esculetin to scopoletin catalyzed by the enzyme. Conversion of the substrate in presence of COMT inhibitors was evaluated by fluorescence measurement at $\lambda_{\text{excitation}}$ 355 nm and $\lambda_{\text{emission}}$ 460 nm.

Esculetin (final concentration 6 µM) was incubated in 96 well microplate with COMT (2.25 U.I./mL) and RA (concentrations ranging from 15 to 500 µM) for 5 minutes at 37°C, followed by addition of S-adenosyl-L-methionine (final concentration 100 µM). The microplate was incubated for 60 minutes at 37°C, being the final volume in each well equal to 250 µL. The measures were performed in intervals of 4 minutes during the 60 minutes of incubation

and 3,5-dinitrocathecol (35 nM) was used as positive control. The IC_{50} values for COMT inhibition were determined for two independent experiments performed in triplicate.

2.7. Molecular modeling

The crystallographic structure of human MAO-A (PDB ID: 2Z5X) [36] and human soluble COMT (human S-COMT) (PDB ID: 3BWM) [37] were retrieved from the protein data bank (<http://www.wwpdb.org/>). Protein structures were prepared for structural inspection and docking in MOE by removing the crystallized water molecules and ligands, and by adding the missing hydrogen atoms. For the docking studies in human MAO-A, the structural water molecules Wat-710, Wat-718, Wat-739, Wat-746, and Wat-805 were kept in the protein structure [33,38]. The three-dimensional structures of the studied phenolic acids were constructed in MOE and their initial conformation optimized using the MMFF94x force field with R-field equation for solvation and 0.1 kcal/mol/Å² as RMS gradient cut-off. Stereochemistry for all ligands was carefully checked, and the protonation state at pH 7.4 was assigned using the Protonated 3D module of MOE [39].

The molecular docking protocol was developed using GOLD, version 5.2 (CCDC). MAO-A and COMT pockets were centered in the space occupied by the co-crystallized ligands harmine and 3,5-dinitrocatechol (DNC), respectively and delimited by an 8 Å radius. Regarding docking in MAO-A, five water molecules which occupy the space between harmine and FAD were conserved from x-ray crystallography into the MAO-A model [33,38]. Then, these water molecules were kept inside the binding site as an integral part of the protein structure during the whole computational procedure. For each ligand, 100 docking solutions were generated by using 100000 GOLD Genetic Algorithm interactions (Preset option). Docking poses were evaluated and ranked according to the Gold-Score scoring functions. Docking protocol was validated by re-docking the co-crystallized ligands harmine and DNC, in MAO-A [33] and COMT (Figure S1). The RMSD values between the docking solutions and the crystallized ligand of reference were calculated and values lower than 2.0 Å were accepted as satisfactory.

2.8. Cytotoxicity by LDH release assay (Membrane damage)

The assessment of cytotoxic effects from isolated RA on polymorphonuclear neutrophils (PMN) determined by the release of the cytosolic lactate dehydrogenase, LDH (EC1.1.1.27), as described by Andrade *et al.* [40]. PMNs (1.5×10^7 cells/mL) were obtained from the plasma of male Wistar rats (180-220 g), and incubated with 0.5 and 5 mM RA for 30 min at 37°C. The LDH activity in the supernatant was measured at 492 nm, using a commercial kit (Doles, Brazil). The assay was performed in triplicate, and Triton X (1%) was used as positive control.

2.9. Statistical analysis

Results of antioxidant and enzyme inhibition assays were analyzed using the Prism 5.0 program (GraphPad Software, Inc., CA, USA), obtaining the % of inhibition \pm standard deviation mean (S.D.) from samples. The IC_{50} values were obtained after experimental data adjustments (% inhibition vs. inhibitor concentration) for non-linear regression curves. Statistical analysis of the cytotoxic trials were performed using ANOVA followed by Bonferroni's test using the Prism 5.0 software. Significant differences were considered when $p < 0.05$.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Chemical

RA was isolated from the EAF of *B. brasiliense* by preparative HPLC and was subjected to HPLC-DAD-MS/MS for identification and purity analysis. Figures 1A-C show, respectively, the chromatogram of the active fraction, as well as the UV and mass spectra at negative mode of the peak with retention time of 37.9 minutes, characterized as rosmarinic acid.

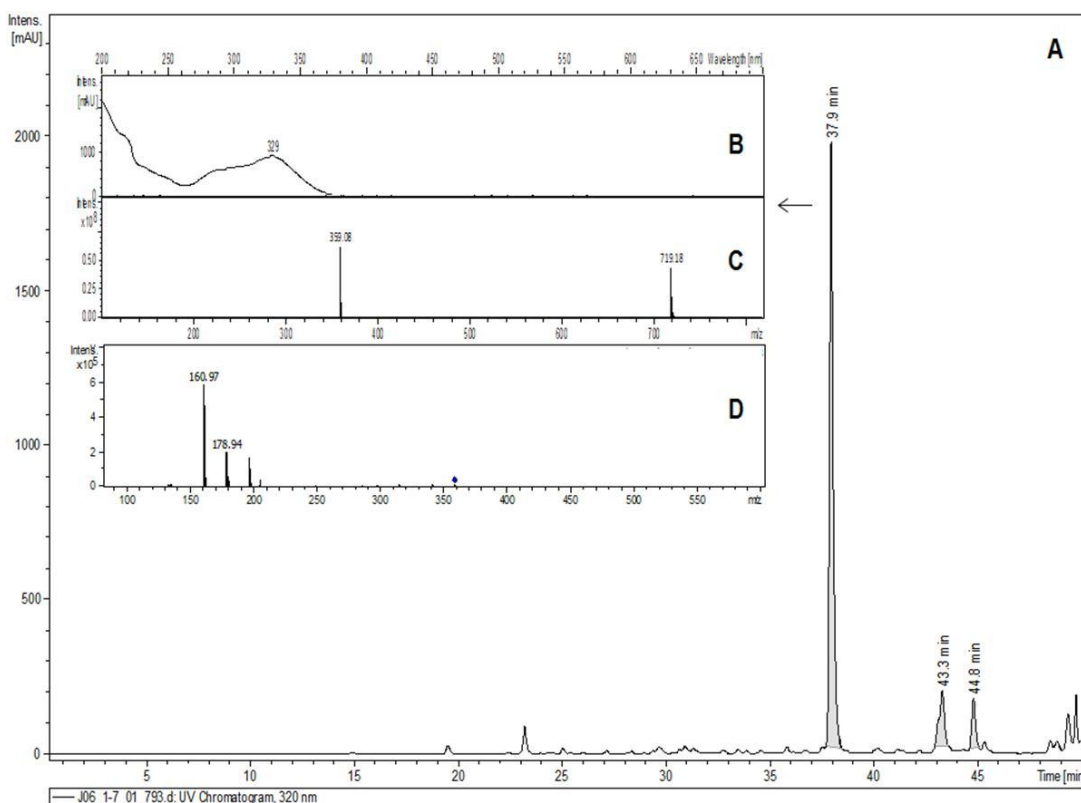


Figure 1. (A) Chromatogram of the EAF obtained from *B. brasiliense* by HPLC-DAD analysis, extracted at 320 nm; (B) ultraviolet spectra; (C) mass profile at negative mode; (D) MS/MS spectra of pseudomolecular ion at m/z 359.08 $[M-H]^-$ of rosmarinic acid (retention time: 37.9 minutes).

The negative pseudomolecular ion was at m/z 359.08 $[M-H]^-$. Moreover, it was observed the presence of a signal at m/z 719.18 $[2M-H]^-$, and the molecular weight established for the compound was 360 g/mol. The ion at m/z 359.08 $[M-H]^-$ was fragmented on MS/MS analysis, as shown in Figure 1D, in which the base ion was at m/z 160.97, and fragment ions at m/z 178.94 and m/z 197 were observed.

The ion at m/z 197 $[M-H]^-$ represents the loss of the caffeoyl group $[(M-H)-(C_9H_6O_3)]^-$ and the ion at m/z 179 is characterized as the caffeic acid moiety $(C_9H_8O_4)^-$. The loss of two water molecules from m/z 197 is represented by the ion m/z 161 $[197-2H_2O]^-$ [41-43]. After

data compilation, the molecular formula $C_{18}H_{16}O_8$ and the chemical structure of rosmarinic acid (Figure 2) were proposed and confirmed by comparison with an authentic sample.

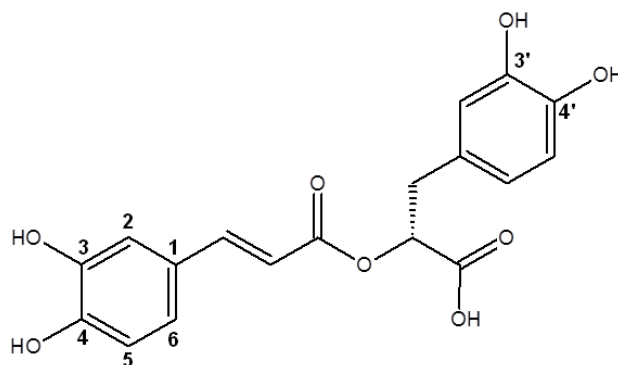


Figure 2. Molecular structure of rosmarinic acid.

3.2. Antioxidant activities of isolated RA

Several studies have already demonstrated the therapeutic potential of RA, frequently corroborating with the traditional use of the plants containing this compound. RA presents significant antioxidant and neuroprotective capacities, being able to reduce numerous human deleterious events, such as the formation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and DNA fragmentation [14,44-47].

In the present study, we demonstrated that RA stabilized the hydroxyl radical with an IC_{50} value of $29.4 \mu M$, which corresponds to $10.6 \mu g/mL$. Regarding to the antioxidant capacity against the NO^{\bullet} radical, RA showed a lower activity when compared to the stabilization of the hydroxyl radical ($IC_{50} = 140.7 \mu M$, corresponding to $50.7 \mu g/mL$). On the other hand, RA showed a higher capacity to inhibit the lipid peroxidation, with an IC_{50} value of $19.6 \mu M$, corresponding to $7.1 \mu g/mL$. The results expressed for different concentrations of RA assessed in the lipid peroxidation assay are shown in Figure 3.

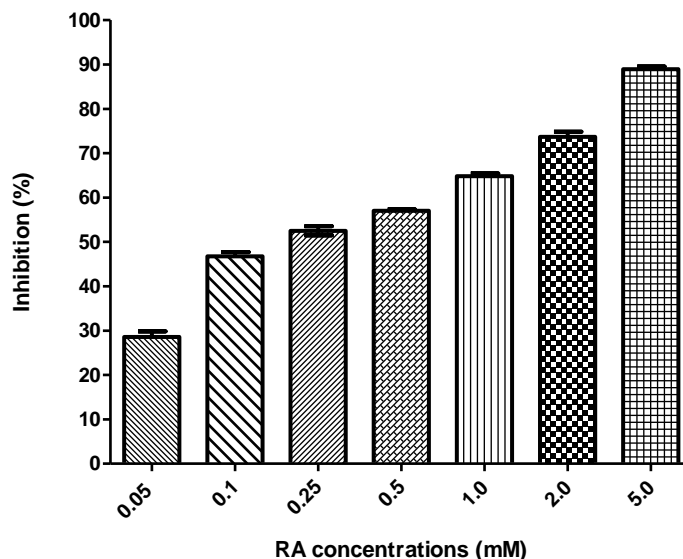


Figure 3. Inhibition of lipid peroxidation by different concentrations of RA. The three lower inactive concentrations (0.01, 0.005 and 0.001 mM) are not shown on the graph. All values of % inhibition were considered statistically different ($p < 0.05$).

The comparison of the IC_{50} values determined for the isolated compound with those retrieved for EAF (Table 1) indicates that RA seems to be the main responsible for the antioxidant activity observed for the fronds of *B. brasiliense*. The ability of a crude extract and an EAF from *B. brasiliense* to inhibit the free radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) has been previously demonstrated, with IC_{50} values of 4.1 and 1.4 mg/mL, respectively. These plant extracts showed high levels of total phenol content, being equal to 23.5 μg gallic acid equivalent/mg crude extract and 114.7 μg gallic acid equivalent/mg of ethyl acetate fraction [13].

Table 1. IC₅₀ values for the *B. brasiliense* EAF and for RA isolated compound, obtained in the employed antioxidant assays, using non-linear regression curves of % inhibition vs. inhibitor concentration.

Assay	IC ₅₀ values			
	EAF ^a	Isolated RA ^{**}	CGA RS ^{b**}	CA RS ^{c**}
Stabilization of hydroxyl radical	12.5±1.5 µg/mL	29.4±1.4 (10.6 µg/mL)	45.6±1.5	63.3±1.4
Antioxidant capacity against nitric oxide radical	55.6±1.4 µg/mL	140.7±1.3 (50.7 µg/mL)	159.7±1.4	180.9±1.8
Inhibition of lipid peroxidation (TBARS)	10.4±1.3 µg/mL	19.6±1.2 (7.1 µg/mL)	37.5±1.2	55.9±1.2

** µM.

^aEAF: ethyl acetate fraction.

^bCGA RS: chlorogenic acid reference substance.

^cCA RS: caffeic acid reference substance.

3.3. Inhibition of cholinesterases, monoamine oxidases and COMT enzymes

The *B. brasiliense* EAF was assayed for cholinesterase's inhibition (AChE and BChE), showing a slight inhibition of both enzymes, with IC₅₀ values >300 µg/mL. In view of the achieved results, the EAF was considered a weakly inhibitor and its main compound, RA, was not further evaluated. Santos [48] investigated the anticholinesterase action of RA using *in vitro* models and found a weak inhibitory action, with IC₅₀ value of 1.2 mM (432 µg/mL). Controversial results were found by Vladimir-Knežević *et al.* [49]. Despite of the authors' affirmation that RA contributes substantially to the AChE inhibitory effects observed for species belonging to Lamiaceae family, no significant correlation was found between RA content and AChE inhibitory activity at 1 mg/mL ($r=0.150$, $p=0.465$). Also, the tested concentrations of the compound were extremely high (250-1000 µg/mL).

Whereas neurodegenerative diseases are triggered by multiple factors conditions, new therapeutic strategies based on the development of compounds capable of acting in different biochemical and neuronal targets have been investigated [50,51]. Novaroli *et al.* [31] proposed an experimental and virtual screening-based approach aiming at obtaining active substances into two or more targets associated with such disorders, including AChE, MAO and COMT enzymes as well as parameters related to the oxidative stress.

Following the screening workflow proposed [31], we further addressed the enzymes MAO (MAO-A and MAO-B) and COMT, which considered as targets to combat Parkinson's disease. MAO inhibition assays were conducted by a fluorescence method based on endpoint reading, using kynuramine as nonselective substrate for MAO-A and MAO-B. RA showed to be able to inhibit human MAO-A, and in a lesser extent, MAO-B. The values of IC_{50} for RA were: $50.1 \pm 1.2 \mu\text{M}$ ($18.1 \mu\text{g/mL}$) and $184.6 \pm 3.0 \mu\text{M}$ ($66.5 \mu\text{g/mL}$), respectively, demonstrating strong capacity against MAO-A and the highest rate of selectivity for this isoform, among the tested samples (S.I. 3.7) (Table 2).

Regarding the activity against MAO-A, RA displayed maximum enzyme inhibition around 91%, at the highest concentration, exhibiting a slightly better inhibition profile in comparison to EAF (IC_{50} : $28.6 \pm 1.0 \mu\text{g/mL}$). Additionally, RA activity was compared with previous isolated product from *Blechnum* species: CGA, and other structurally related compounds, including: CA, benzyl benzoate and benzyl cinnamate. These tests revealed that RA was the most active MAO-A inhibitor, followed by CGA (IC_{50} : $79.7 \pm 1.8 \mu\text{M}$) (Table 2). All the evaluated compounds showed some degree of selectivity for MAO-A inhibition.

The inhibition of monoamine oxidase (MAO) enzyme is a useful strategy for decrease the progression of certain neurodegenerative disorders [52,53]. This mitochondrial enzyme is found in the brain and in peripheral areas of the body, and is responsible for the oxidative deamination of biogenic amines [54,55]. Such reaction results in hydrogen peroxide (H_2O_2) and aldehyde production, which can cause oxidative cell damage [56]. Also, the modulation of

lipid peroxidation may be promising in the prevention and attenuation of neurodegenerative disorders [57,58].

In order to clarify if RA behaves as a reversible or an irreversible MAO-A inhibitor, the time-dependence experiments were performed [33]. Clorgyline was employed as control for irreversible (time-dependent) inhibition, considering that it affects the enzyme activity in a time-dependent way after different preincubation times. By contrast, for reversible inhibitors, the enzyme activity remains unchanged when the compound is preincubated with the enzyme for different periods of time (0, 15, 30 and 60 min).

RA was preincubated with MAO-A at a concentration equal to twofold its measured IC_{50} , and was added of kynuramine to measure the residual enzyme activity (Figure 4). It is possible to observe that clorgyline clearly behave as time-dependent inhibitor, over the incubation time (0-60 min), and at the evaluated concentration. Regarding the tested compound, RA displayed a non-time-dependent behavior for MAO-A inhibition, suggesting a reversible mechanism of action.

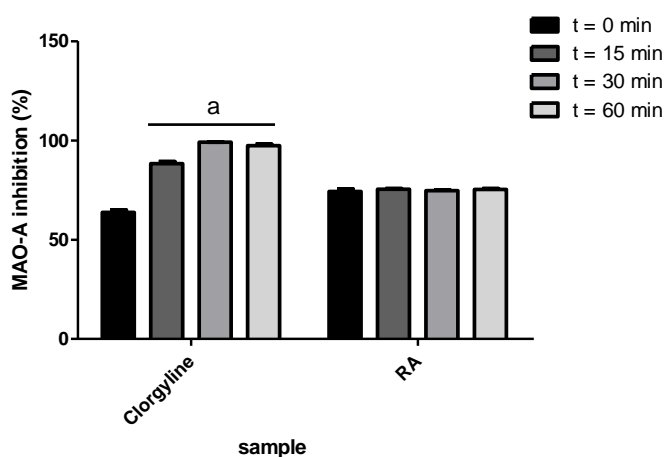


Figure 4. Time-dependent inhibition of MAO-A by RA at 0, 15, 30 and 60 min after incubation with target enzyme. Following addition of kynuramine, and consequent dilution of the inhibitor solution to its IC_{50} value, the MAO-A activity was determined. Results are expressed as mean \pm S.D. of triplicate determinations. a: significant difference from t = 0 min ($p < 0.05$).

MAO-A inhibitors can be considered to be key molecules in the development of drugs designed for the treatment of several psychiatric and neurological diseases, including neurodegenerative disorders and associated illness such as depression and anxiety [53,59]. Sasaki *et al.* [60] demonstrated, by proteomic analysis of PC12 cells treated with RA (15 μ M), a significant upregulation of tyrosine hydroxylase and pyruvate carboxylase, two major genes involved in dopaminergic, serotonergic and GABAergic pathway regulations. This polyphenol (25 μ M) protected neuronal cells against corticosterone-induced toxicity.

Also, the *Rosmarinus officinalis* ethanol extract (50 and 100 mg/kg) induced decrease in the immobility time on tail suspension test and regulated several neurotransmitters levels, being this effect related to the presence of RA and other active polyphenols. Thus, this compound can be considered an antidepressant agent. Takeda *et al.* [20] has already demonstrated the antidepressant effect of RA (2 mg/kg) and its major metabolite: CA (4 mg/kg), by a significant reduction on the duration of immobility in the forced swimming test in mice, not affecting spontaneous motor activity.

RA (2 and 4 mg/kg) also increased the number of entries in the open arms of the open field test, suggesting an anxiolytic-like activity, without affecting the short-term memory and long-term memory retention on inhibitory avoidance task, and presenting no DNA damage in brain tissue [61]. The treatment for 7 and 14 days of newborn cells of mouse hippocampus with RA (2 and 4 mg/kg), caused anti-depressant link effect by a significant increase in the number of cells (proliferation) in inverse correlation with reductions in immobility on a forced swimming test [62].

Table 2. The IC₅₀ values for the inhibition of MAO-A, MAO-B, AChE, BChE and COMT by *Blechnum* phenolic acids and standard substances.

	IC ₅₀ μM						
	MW (g/mol) ^a	MAO-A	MAO-B	S.I. ^b	AChE	BChE	COMT
RA	360.31	50.1±1.2	184.6±3.0	3.7	N.T.	N.T.	26.7±1.8
CGA	354.31	79.7±1.8	191.4±1.2	2.4	N.T.	N.T.	40.5±1.3
CA	180.16	138.5±1.1	247.7±1.2	1.8	N.T.	N.T.	89.9±1.2
Benzyl cinnamate	238.28	130.6±1.7	236.8±1.0	1.8	N.T.	N.T.	N.T.
Benzyl benzoate	212.24	123.0±1.9	225.1±1.0	1.8	N.T.	N.T.	N.T.
Clorgyline	272.17	0.009±1.7	N.T.	-	N.T.	N.T.	N.T.
Pargyline	159.23	N.T.	0.207±1.1	-	N.T.	N.T.	N.T.
Physostigmine	275.35	N.T.	N.T.	-	0.0165 ±1.9	0.0718 ±1.8	N.T.
DNC	200.11	N.T.	N.T.	-	N.T.	N.T.	0.035±1.2

N.T.: not tested.

^aMolecular weight.

^bThe selectivity indexes (S.I.) correspond to ΔIC_{50} : IC₅₀ MAO-B / IC₅₀ MAO-A.

The COMT is an enzyme involved in the inactivation of catechols and catecholamines, including neurotransmitters such as dopamine, epinephrine and norepinephrine. This enzyme is related to various human disorders, such as: PD, depression, bipolar disorders, attention deficit and hyperactivity, schizophrenia, hypertension, heart failure and other diseases [63-68].

In our study, we evaluate the capacity of RA, CGA and CA to inhibit porcine COMT *in vitro*. Results showed RA as the most active COMT inhibitor (IC_{50} : $26.65 \pm 1.8 \mu\text{M}$), followed by CGA (IC_{50} : $40.45 \pm 1.3 \mu\text{M}$) and CA (IC_{50} : $89.92 \pm 1.2 \mu\text{M}$). These findings can be correlate with few catechol groups present in the molecule, which are capable to interact with COMT. Thus, our results support the hypothesis of RA as an inhibitor of catecholamines degradation via COMT. Kim and Krause [69] have already described the compounds: epigallocatechin gallate, quercetin, harmine, rutin, CA, CGA, RA, or any combination thereof, as COMT inhibitors.

Regarding the RA metabolism, urine of rats have shown, by spectroscopic and chemical data, seven metabolites identified as: trans-caffeic acid 4-O-sulfate, trans-*m*-coumaric acid 3-O-sulfate, transferulic acid 4-O-sulfate, trans-caffeic acid, *m*-hydroxyphenylpropionic acid, trans-*m*-coumaric acid and unchanged RA. It was proposed a cleavage of ester bonds, selective *para*-dehydroxylation, methylation, and sulfate-conjugation [70].

The orally administered RA (50 mg/kg) in rats allowed the detection of RA, methyl-RA and *m*-coumaric acid in plasma. Also, these compounds added of CA and ferulic acid were found in urine, being predominantly as glucuronide or sulfate. One possible pathway proposed involves absorption from the digestive tract, formation of a glucuronide conjugate catalyzed by UDP-glucuronosyltransferase and subsequent methylation of this conjugate by COMT in the liver [71].

These authors also evaluated the absorption, metabolism and urinary excretion of RA in healthy humans, after a single intake of *Perilla frutescens* extract, containing 200 mg RA, showing that this compound is methylated via COMT enzyme. Based on these results, authors hypothesize a scheme for human RA metabolism, involving microbial esterase mainly in the digestive tract hydrolyzing the ester linkages in RA. The resulting CA and coumaric acids are then absorbed, conjugated and methylated in tissues such as the digestive tract and liver, yielding a variety of metabolites such as glucuronidated or sulfated conjugates [72].

Considering the structure-activity relationships of hydroxycinnamic acids and their antioxidant properties, two important structural features make them interesting scaffolds: the presence of hydroxy functions on the benzene ring, which can produce a phenoxy radical intermediate that may terminate the free radical chain reaction [73], and the unsaturated side chain which could be ascribed to the participation of the double bond in stabilization of the phenoxy radicals via increased electron delocalization [74].

The presence of *ortho*-dihydroxy phenyl group (catechol moiety) is of significant importance to the antioxidant activity. Most reports indicated that the presence of an unsaturated bond on the side chain of these acids is vital to their activity. Also, antioxidant activity seems to be largely influenced by the number of hydroxy groups present on the aromatic ring [75]. Thus, the methylated products formed by RA and COMT interaction probably will be less active than RA, due to the decreased number of phenolic hydroxyl groups and absence of the catechol system, especially important for the antioxidant activity of these derivatives.

According to our results, RA showed strong antioxidant activity, at least in two of proposed assays (IC_{50} : 29.43 and 19.63 μ M against hydroxyl and lipid peroxidation, respectively). RA was also active against MAO (IC_{50} : 50.1 and 184.6 μ M for MAO-A and MAO-B inhibitions) and COMT enzymes (IC_{50} 26.6 μ M), considered specific for Parkinson's disease treatment. Taken together the results allow us to carry out studies of molecular interactions between the substance and enzymes. These studies have been proposed in order to analyze which types of bond are involved in the interactions that, in case of MAO-A, a reversible mechanism of inhibition by RA was suggested, as found in time-dependent studies.

3.4. Molecular docking

RA and CGA were selected for molecular docking in the MAO-A active site aiming at gaining further insights into their binding modes. Molecular docking indicated that the 3,4-

dihydroxycinnamic acid moieties of both RA and CGA bind to the active pocket of human MAO-A with the same orientation, facing the lipophilic pocket formed by V93, L97, F108, A111, F208, C323, and I325 [36,38].

For RA, the -OH substituent at the *para* position (4-OH) donates a hydrogen bond to the carbonyl oxygen of G110 while the -OH substituent at the *meta* position (3-OH) accepts a hydrogen bond from the amide backbone of V210. The 3-(3,4-dihydroxyphenyl)lactic acid moiety faces the FAD co-factor. The -OH at *para* position (4'-OH) is within hydrogen bond distance from the -OH group of Y444 side chain. Hydrophobic contacts between RA and Y69, L97, V210, Q215, I325, I335, F352, and Y407 also contribute for stabilizing the binding (Figure 5). Concerning CGA, the -OH substituent at the *para* position (4-OH) donates a hydrogen bond to the carbonyl oxygen of A111. The quinic acid moiety of CGA faces the FAD co-factor, making a hydrogen bond with Wat-718. Hydrophobic interactions with L97, V210, I325, I335, and L337 also contribute to the binding of CGA in MAO-A.

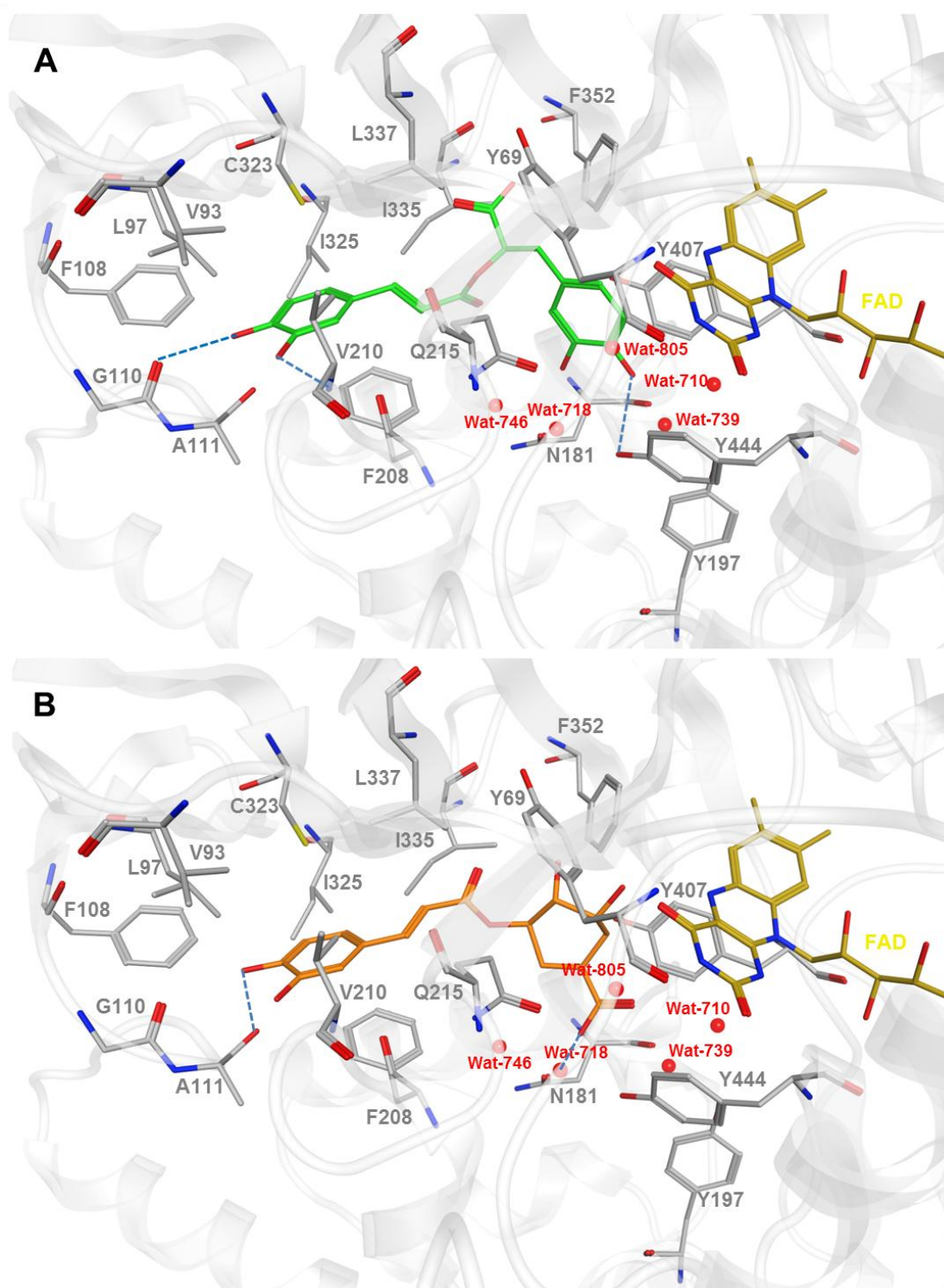


Figure 5. Molecular docking results of RA (ChemPLP score 75.4) and CGA (ChemPLP score 61.9) in the MAO-A (PDB ID: 2Z5X) active site. MAO-A is represented in grey and FAD in yellow. Water molecules are shown as red spheres and hydrogen bonds as blue dashed lines. (A) Docking of RA (carbon atoms shown in green) in MAO-A. (B) Docking of CGA (carbon atoms shown in orange) in MAO-A. The co-crystallized ligand harmine was re-docked into the the MAO-A active site in order to validate the docking methodology. The RMSD value between the co-crystallized harmine and the best ranked docking solution was 0.5 Å. The ChemPLP score was 79.3.

It is known that catechol-containing polyphenols are good substrates for COMT-mediated methylation [71,72,76-81]. The methylation of these dietary catechols produces S-adenosyl-L-homocysteine (SAH), which is by itself a strong noncompetitive inhibitor of the COMT mediated O-methylation [78]. Moreover, the dietary catechol epigallocatechin gallate was demonstrated to be a non-competitive COMT inhibitor behaving as a poor substrate for methylation by this enzyme considering its imperfect geometry for coordination with Mg^{2+} [82].

Then, based on (i) the data reported in the literature describing the interactions between plant derived catechols and mammalian COMTs, and (ii) our experimental results showing the inhibition of porcine COMT by RA, CGA, and CA, docking calculations were performed in order to understand the interactions between COMT and these three phenolic acids. A crystal structure of human S-COMT bound with SAM and 3,5-dinitrocatechol (DNC) was selected for these studies (PDB ID: 3BWM, resolution 1.98 Å) [37], since that no crystallographic structure of porcine COMT is available on PDB. Sequence alignment in MOE shown that porcine S-COMT (UniprotKB ID: Q99028) presents 82 and 92% of sequence identity and similarity, respectively, in comparison with human S-COMT (UniprotKB ID: P21964) (data not shown).

Despite the higher levels of identity and similarity, important differences can be observed in the catechol interacting sites of these two proteins. Porcine S-COMT presents an arginine residue replacing the gatekeeper W38 of human S-COMT. This latter enzyme presents, as catechol-binding site, a shallow pocket containing M40, L198, Y200, and gatekeeper residues W38 and P174, which form van der Waals contacts with DNC and hold the substrate in the correct orientation for methylation. Thus, the replacement observed in porcine S-COMT, cited above, can affect the interactions between the enzyme binding site and tested substrate, especially knowing that the aromatic ring of W38 seems also be important for these interactions [83].

Rutherford *et al.* [37] demonstrated that two charge substitutions on the outer lip of the catechol binding site (R201 and E202 in humans to M201 and K202 in rats), while not involved

residues that interact directly with the substrate, could affect V_{max} , as well as, substrate binding and release. Thus, similar observations are expected in case of porcine S-COMT enzyme, in which human R201 and E202 residues are replaced by serine and glutamine, respectively.

According to expected, RA, CGA, and CA were able to bind COMT in the site occupied by the inhibitor DNC and by the catechol substrates (Figures 6 and 7). The catechol groups present in the 3,4-dihydroxycinnamic acid moieties of RA, CGA, and CA, as well as, the catechol group belonging to the 3-(3,4-dihydroxyphenyl)lactic acid moiety of RA can coordinate with the Mg^{2+} ion in the catalytic site of human COMT. Considering the presence of two catechol groups in RA, and the possibility of two different binding modes, a cluster analysis, together with the visual inspection of the 100 docking solutions, was performed in order to better understand the binding. Results of these inspections indicated that the 3,4-dihydroxycinnamic acid moiety of RA faces to the Mg^{2+} ion in the catalytic pocket of COMT on 59% of the docking solutions. Then, considering the retrieved percentage, this binding orientation was selected for further structural analyzes.

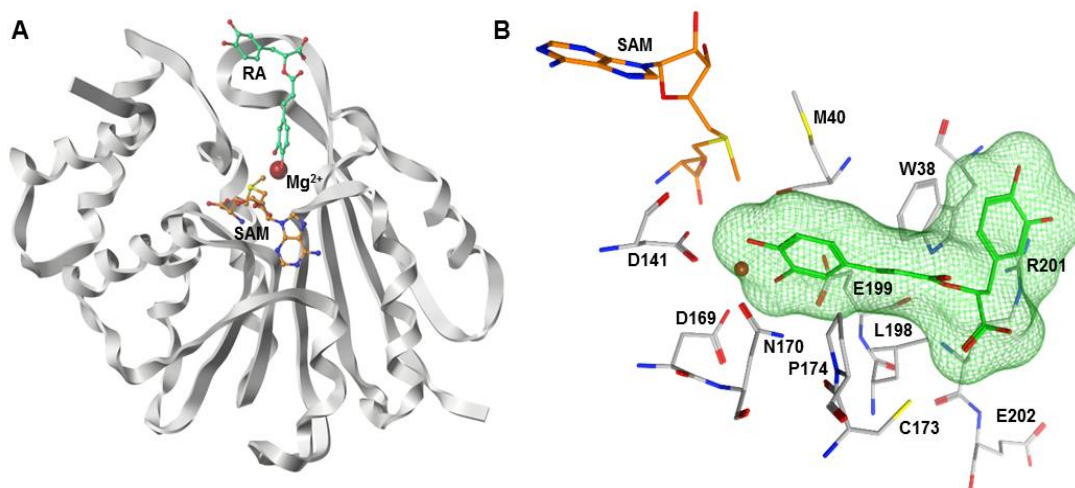


Figure 6. Docking of RA in human S-COMT (grey, PDB ID: 3BWB). **(A)** Ribbon diagram of human S-COMT showing the binding of RA (green) in the site occupied by the co-crystallized ligand DNC. In 59% of the 100 docking solutions, the catechol belonging to the 3,4-dihydroxycinnamic acid moiety of RA coordinates with the Mg^{2+} ion (brown sphere). **(B)** The best ranking RA solution in the most populated cluster (ChemPLP score: 77.8) is shown in green with a transparent molecular surface. Amino acids residues in the catalytic site of human S-COMT are shown as grey sticks. RA accepts a hydrogen bond from the -SH group of C173 side chain. In addition, hydrophobic contacts with W38, M40, P174, and L198 also contribute to stabilize the protein-ligand interactions.

Besides its coordination with Mg^{2+} , RA, CGA, and CA can also make hydrophobic interactions with W38, M40, P174 and L198. For RA, the carboxyl group of the 3-(3,4-dihydroxyphenyl)lactic acid moiety can accept a hydrogen bond from the -SH side chain of C173. Regarding CGA, salt bridges can be formed between the carboxyl group of the quinic acid moiety and the guanidine side chain of R201. ChemPLP scores of 77.8, 76.2, and 58.7 were retrieved for the best ranking solutions RA, CGA, and CA, respectively. Taken together, the structural analysis of the docking outputs and the trends afforded by the ChemPLP scores approach the experimental data observed on porcine COMT, indicating that RA and CGA present a better profile for COMT inhibition than CA.

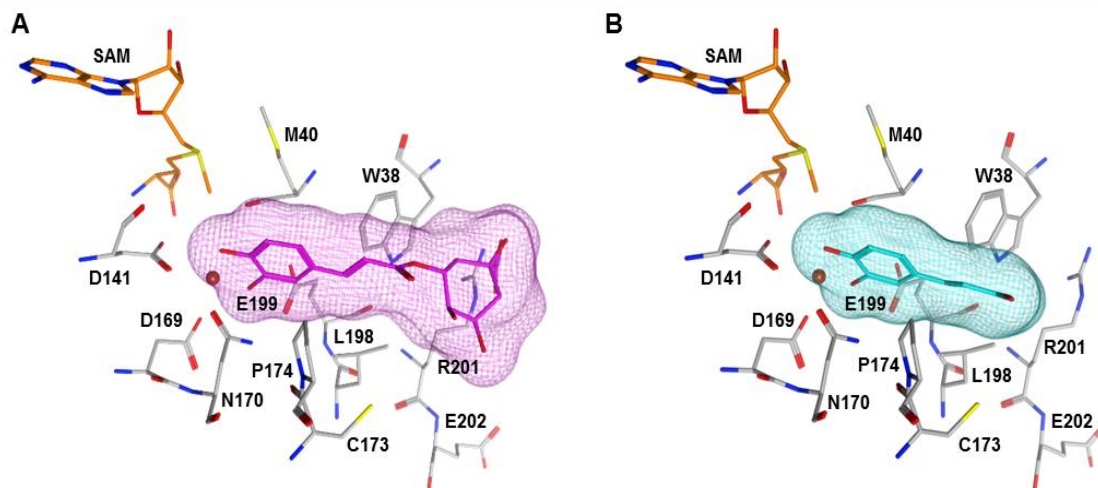


Figure 7. Docking of CGA and CA in human S-COMT (grey, PDB ID: 3BWB). The catechol groups of CGA and CA bind in the pocket occupied by DNC in the co-crystal 3BWM, coordinating with the Mg^{2+} ion (brown sphere). **(A)** The best ranking CGA solution (ChemPLP score: 76.2) is shown in magenta with a transparent molecular surface. The carbonyl group of the quinic acid moiety of CGA makes salt bridges with the guanidine side chain of R201. Hydrophobic contacts between CGA and W38, M40, P174, and L198 are also observed. **(B)** The best ranking CA solution (ChemPLP score: 58.7) is shown in cyan with a transparent molecular surface. CA contacts W38, M40, P174, and L198 through hydrophobic interactions.

3.5. Cytotoxic effects of RA in PMN cells

The results obtained in the LDH release determination showed that RA, at both concentrations tested (0.5 and 5 mM), was not able to induce PMN cells membrane damage, with no cytotoxic effects observed in these normal cells. These findings were similar to those of negative control (untreated cells) and were statistically different ($p < 0.05$) from the positive control (Triton X 1%), which showed intense damage to the cells membrane (Figure 8).

The non-cytotoxic effects of RA has already been demonstrated by Parnham and Kesselring studies [84]. The authors showed that RA, after intravenous administration in mice, is rapidly eliminated from the blood circulation and present a very low toxicity, with a median lethal dose (LD_{50}) of 561 mg/kg. Also, the cytotoxic investigation of RA and other polyphenols

(CA, CGA, (+)-catechin, 6-gingerol and eugenol) on rat thymocytes (normal cells) demonstrated that they were not toxic to cells, at 100 μM , for 24 hrs [85]. At concentrations of less than 100 μM , RA was reported to exert anticarcinogenic effects on cancer cells and therefore, can be considered of lower cytotoxicity to normal cells [86,87].

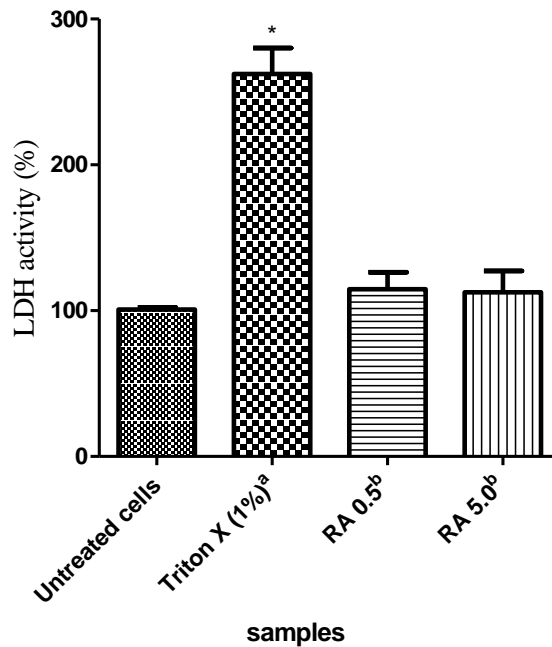


Figure 8. Effects of RA on rat PMN cells, evaluated by the LDH leakage assay. PMN cells (1.5×10^7 cells/mL) were preincubated with RA for 30 min, at 37°C. Then, the supernatant of each sample was removed to the reactions of LDH release method. Data are expressed as the mean \pm S.D. of triplicate experiments. The percentage of LDH activity in untreated group (negative control) was determined as 100%. *indicates cytotoxic effects, compared to the untreated cells ($p < 0.05$). ^aTriton X at concentration of 1%, used as positive control. ^bRosmarinic acid.

The already mentioned antioxidant capacity of RA, is largely responsible for cytoprotective effects of the substance [88]. It has been demonstrated that this compound is able to revert cellular injury induced by H_2O_2 , due to the antioxidant and antiapoptotic

activities, in different cell types, including rats neuroblastoma cell line N2A, human dopaminergic cells lineage (SH-SY5Y) and A172 astrocytes cells [13,89-91].

4. CONCLUSIONS

RA showed strong antioxidant activity, characterized by oxygen and nitrogen free radicals stabilization, and inhibition of lipid peroxidation. The compound shown activity on targets related to neurodegenerative diseases, namely the MAO-A and COMT enzymes. Time-dependent inhibition studies on MAO-A, strongly suggested that RA acts as a reversible inhibitor of this target. Cytotoxicity studies on PMN cells indicated that RA do not induce damage to cell membranes, in concentrations higher than those displaying the antioxidant profile and enzyme inhibition effects. Molecular docking contributed to understand the binding mode and the main interactions involved in the RA, CGA, and CA recognition by MAO-A and COMT enzymes. In addition, insights regarding the different potencies for MAO-A and COMT inhibition displayed by these compounds were retrieved. Taken together, these data can contribute to the rational design of new multifunctional derivatives possessing the 3,4-dihydroxycinnamic acid scaffold.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the Brazilian agencies (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) for their financial support and PhD scholarship.

5. REFERENCES

- [1] J. Prado, L. Sylvestre, Samambaias e Licófitas in Lista de Espécies da Flora do Brasil., Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2015. Available at: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB128483>>. Accessed in: 14 april 2015.
- [2] R.K. CROWDEN, S.J. JARMAN, 3-Deoxyanthocyanins from the fern *Blechnum procerum*., *Phytochemistry* 13 (1974) 1947-1948.
- [3] E.E. Swinny, A novel acetylated 3-deoxyanthocyanidin laminaribioside from the fern *Blechnum novae-zelandiae*, *Z Naturforsch C* 56 (2001) 177-180.
- [4] B.A. Bohm, Phenolic compounds in ferns - III. An examination of some ferns for caffeic acid derivatives, *Phytochemistry* 7 (1968) 1825-1830.
- [5] H. Wada, T. Kido, N. Tanaka, T. Murakami, Y. Saiki, C.M. Chen, Chemical and chemotaxonomical studies of ferns. Characteristic lignans of Blechnaceous ferns, *Chemical Pharm Bull* 40 (1992) 2099-2101.
- [6] J.B. Harborne, Comparative biochemistry of flavonoids-II. 3-Desoxyanthocyanins and their systematic distribution in ferns and gesnerads, *Phytochemistry* 5 (1966) 589-600.
- [7] C.A. Hincapié, Z.I. Monsalve, K. Parada, C. Lamilla, J. Alarcón, C.L. Cépedes, Mite growth regulatory activity of *Blechnum chilense* (Kaulf.) Mett, *Planta Medica* 77 (2011a) 1257-1272.
- [8] I.C.L. Barros, L.H.C. Andrade, Pteridófitas medicinais (samambaias, avencas e plantas afins). Pernambuco, Recife, 1997.
- [9] F.R. Nonato, T.A. Barros, A.M. Lucchese, C.E. Oliveira, R.R. dos Santos, M.B. Soares, C.F. Villarreal, Antiinflammatory and antinociceptive activities of *Blechnum occidentale* L. extract, *J Ethnopharmacol* 125 (2009) 102-107.
- [10] H.Y. Lai, Y.Y. Lim, S.P. Tan, Antioxidative, tyrosinase inhibiting and antibacterial activities of leaf extracts from medicinal ferns, *Biosci Biotechnol Biochem* 73 (2009) 1362-1366.
- [11] H.Y. Lai, Y.Y. Lim, K.H. Kim, *Blechnum orientale* Linn - a fern with potential as antioxidant, anticancer and antibacterial agent, *BMC Complement Altern Med* 10 (2010) 15.
- [12] H.Y. Lai, Y.Y. Lim, K.H. Kim, Potential dermal wound healing agent in *Blechnum orientale* Linn, *BMC Complement Altern Med* 11 (2011) 62.
- [13] C.C. Farias, M.O. Chagas, V.F.L. Bonani, E. Simionatto, S.C. Hess, M.T.L.P. Peres, Avaliação da atividade antioxidante e determinação do teor de fenóis totais em extratos de quatro espécies de pteridófitas de MS, Sociedade Brasileira de Química São Paulo, Brasil, 2007.
- [14] M. Petersen, M.S. Simmonds, Rosmarinic acid, *Phytochemistry* 62 (2003) 121-125.
- [15] M. Koşar, F. Göger, K.H. Can Başer, *In vitro* antioxidant properties and phenolic composition of *Salvia virgata* Jacq. from Turkey, *J Agric Food Chem* 56 (2008) 2369-2374.
- [16] N. Osakabe, H. Takano, C. Sanbongi, A. Yasuda, R. Yanagisawa, K. Inoue, T. Yoshikawa, Anti-inflammatory and anti-allergic effect of rosmarinic acid (RA); inhibition of seasonal allergic rhinoconjunctivitis (SAR) and its mechanism, *Biofactors* 21 (2004) 127-131.
- [17] W.L. Jiang, X.G. Chen, G.W. Qu, X.D. Yue, H.B. Zhu, J.W. Tian, F.H. Fu, Rosmarinic acid protects against experimental sepsis by inhibiting proinflammatory factor release and ameliorating hemodynamics, *Shock* 32 (2009) 608-613.
- [18] U.D. Santos, Avaliação do potencial antinociceptivo e antiinflamatório do ácido rosmarínico, Master Dissertation, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 2013, pp. 110.
- [19] O.P. Salin, L.L. Pohjala, P. Saikku, H.J. Vuorela, M. Leinonen, P.M. Vuorela, Effects of coadministration of natural polyphenols with doxycycline or calcium modulators on acute *Chlamydia pneumoniae* infection *in vitro*, *J Antibiot (Tokyo)* 64 (2011) 747-752.
- [20] H. Takeda, M. Tsuji, M. Inazu, T. Egashira, T. Matsumiya, Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice, *Eur J Pharmacol* 449 (2002) 261-267.

- [21] S.Y. Yang, C.O. Hong, G.P. Lee, C.T. Kim, K.W. Lee, The hepatoprotection of caffeic acid and rosmarinic acid, major compounds of *Perilla frutescens*, against t-BHP-induced oxidative liver damage, *Food Chem Toxicol* 55 (2013) 92-99.
- [22] D.L. McKay, J.B. Blumberg, A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.), *Phytother Res* 20 (2006) 619-633.
- [23] H.R. Choi, J.S. Choi, Y.N. Han, S.J. Bae, H.Y. Chung, Peroxynitrite scavenging activity of herb extracts, *Phytother Res* 16 (2002) 364-367.
- [24] S. Qiao, W. Li, R. Tsubouchi, M. Haneda, K. Murakami, F. Takeuchi, Y. Nisimoto, M. Yoshino, Rosmarinic acid inhibits the formation of reactive oxygen and nitrogen species in RAW264.7 macrophages, *Free Radic Res* 39 (2005) 995-1003.
- [25] T. Alkam, A. Nitta, H. Mizoguchi, A. Itoh, T. Nabeshima, A natural scavenger of peroxynitrites, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by $\alpha\beta(25-35)$, *Behav Brain Res* 180 (2007) 139-145.
- [26] G.K. Lopes, H.M. Schulman, M. Hermes-Lima, Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions, *Biochim Biophys Acta* 1472 (1999) 142-152.
- [27] R.S. Kumar, T. Sivakumar, R.S. Sunderam, M. Gupta, U.K. Mazumdar, P. Gomathi, Y. Rajeshwar, S. Saravanan, M.S. Kumar, K. Muruges, K.A. Kumar, Antioxidant and antimicrobial activities of *Bauhinia racemosa* L. stem bark, *Braz J Med Biol Res* 38 (2005) 1015-1024.
- [28] F.S. Reis, A. Martins, L. Barros, I.C. Ferreira, Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: a comparative study between *in vivo* and *in vitro* samples, *Food Chem Toxicol* 50 (2012) 1201-1207.
- [29] G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres, R.M. Feather-Stone, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem Pharmacol* 7 (1961) 88-95.
- [30] S. Di Giovanni, A. Borloz, A. Urbain, A. Marston, K. Hostettmann, P.A. Carrupt, M. Reist, *In vitro* screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: thin layer chromatography versus microplate methods, *Eur J Pharm Sci* 33 (2008) 109-119.
- [31] L. Novaroli, A. Daina, F. Bertolini, S. Di Giovanni, J. Bravo, M. Reist, P.A. Carrupt, Identification of novel multifunctional compounds for the treatment of some aging related neurodegenerative diseases, *Chimia* 59 (2005) 315-320.
- [32] C. Dos Santos Passos, T.C. Soldi, R. Torres Abib, M. Anders Apel, C. Simões-Pires, L. Marcourt, C. Gottfried, A.T. Henriques, Monoamine oxidase inhibition by monoterpene indole alkaloids and fractions obtained from *Psychotria suterella* and *Psychotria laciniata*, *J Enzyme Inhib Med Chem* 28 (2013) 611-618.
- [33] C.S. Passos, C.A. Simões-Pires, A. Nurisso, T.C. Soldi, L. Kato, C.M. de Oliveira, E.O. de Faria, L. Marcourt, C. Gottfried, P.A. Carrupt, A.T. Henriques, Indole alkaloids of *Psychotria* as multifunctional cholinesterases and monoamine oxidases inhibitors, *Phytochemistry* 86 (2013) 8-20.
- [34] M. Kurkela, A. Siiskonen, M. Finel, P. Tammela, J. Taskinen, P. Vuorela, Microplate screening assay to identify inhibitors of human catechol-O-methyltransferase, *Anal Biochem* 331 (2004) 198-200.
- [35] C.S. Passos, L.C. Klein-Junior, J.M.M. Andrade, C. Matté, A.T. Henriques, The catechol-O-methyltransferase inhibitory potential of *Z-vallesiachotamine* by *in silico* and *in vitro* approaches, *Braz J Phcog* (2015) *in press*.
- [36] S.Y. Son, J. Ma, Y. Kondou, M. Yoshimura, E. Yamashita, T. Tsukihara, Structure of human monoamine oxidase A at 2.2-Å resolution: the control of opening the entry for substrates/inhibitors, *Proc Natl Acad Sci USA* 105 (2008) 5739-5744.
- [37] K. Rutherford, I. Le Trong, R.E. Stenkamp, W.W. Parson, Crystal structures of human 108V and 108M catechol O-methyltransferase, *J Mol Biol* 380 (2008) 120-130.

- [38] J. Reniers, S. Robert, R. Frederick, B. Masereel, S. Vincent, J. Wouters, Synthesis and evaluation of β -carboline derivatives as potential monoamine oxidase inhibitors, *Bioorg Med Chem* 19 (2011) 134-144.
- [39] P. Labute, Protonate 3D: assignment of ionization states and hydrogen coordinates to macromolecular structures, *Proteins* 75 (2009) 187-205.
- [40] J.M.M. Andrade, C.S. Passos, R.R. Dresch, M.A. Kieling-Rubio, P.R.H. Moreno, A.T. Henriques, Chemical analysis, antioxidant, antichemotactic and monoamine oxidase inhibition effects of some pteridophytes from Brazil, *Phcog Mag* 10 (2014) S100-S109.
- [41] H. Chen, Q. Zhang, X. Wang, J. Yang, Q. Wang, Qualitative analysis and simultaneous quantification of phenolic compounds in the aerial parts of *Salvia miltiorrhiza* by HPLC-DAD and ESI/MS⁽ⁿ⁾, *Phytochem Anal* 22 (2011) 247-257.
- [42] L. Barros, M. Dueñas, M.I. Dias, M.J. Sousa, C. Santos-Buelga, I.C. Ferreira, Phenolic profiles of cultivated, *in vitro* cultured and commercial samples of *Melissa officinalis* L. infusions, *Food Chem* 136 (2013) 1-8.
- [43] M.L. Cádiz-Gurrea, S. Fernández-Arroyo, J. Joven, A. Segura-Carretero, Comprehensive characterization by UHPLC-ESI-Q-TOF-MS from an *Eryngium bourgatii* extract and their antioxidant and anti-inflammatory activities, *Food Res Int* 50 (2013) 197-204.
- [44] A.A. Izzo, F. Capasso, Herbal medicines to treat Alzheimer's disease, *Trends Pharmacol Sci* 28 (2007) 47-48.
- [45] L. Gu, Wu, T., Wang, Z., TLC bioautography-guided isolation of antioxidants from fruit of *Perilla frutescens* var. *acuta*, *LWT-Food Sci Technol* 1 (2008) 1-6.
- [46] H.F. Ji, H.Y. Zhang, Multipotent natural agents to combat Alzheimer's disease. Functional spectrum and structural features, *Acta Pharmacol Sin* 29 (2008) 143-151.
- [47] B. Tepe, Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia virgata* (Jacq), *Salvia staminea* (Montbret & Aucher ex Benth) and *Salvia verbenaca* (L.) from Turkey, *Bioresour Technol* 99 (2008) 1584-1588.
- [48] S.I.P. Santos, Estudos de actividade inibidora de acetilcolinesterase e actividade antioxidante por derivados de colina de ácidos cafeico, cinâmico e rosmarínico. *Metabolismo in vitro* destes compostos. Master Dissertation. Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2009, pp. 70.
- [49] S. Vladimir-Knežević, B. Blažeković, M. Kindl, J. Vladić, A.D. Lower-Nedza, A.H. Brantner, Acetylcholinesterase inhibitory, antioxidant and phytochemical properties of selected medicinal plants of the Lamiaceae family, *Molecules* 19 (2014) 767-782.
- [50] M.B. Youdim, J.J. Buccafusco, Multi-functional drugs for various CNS targets in the treatment of neurodegenerative disorders, *Trends Pharmacol Sci* 26 (2005) 27-35.
- [51] W.J. Geldenhuys, M.B. Youdim, R.T. Carroll, C.J. Van der Schyf, The emergence of designed multiple ligands for neurodegenerative disorders, *Prog Neurobiol* 94 (2011) 347-359.
- [52] B.P. Kennedy, M.G. Ziegler, M. Alford, L.A. Hansen, L.J. Thal, E. Masliah, Early and persistent alterations in prefrontal cortex MAO A and B in Alzheimer's disease, *J Neural Transm* 110 (2003) 789-801.
- [53] M.B. Youdim, Y.S. Bakhle, Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness, *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1 (2006) S287-296.
- [54] M.B. Youdim, M. Fridkin, H. Zheng, Bifunctional drug derivatives of MAO-B inhibitor rasagiline and iron chelator VK-28 as a more effective approach to treatment of brain ageing and ageing neurodegenerative diseases, *Mech Ageing Dev* 126 (2005) 317-326.
- [55] T. Herraiz, Identification and occurrence of beta-carboline alkaloids in raisins and inhibition of monoamine oxidase (MAO), *J Agric Food Chem* 55 (2007) 8534-8540.
- [56] G. Cohen, R. Farooqui, N. Kesler, Parkinson disease: a new link between monoamine oxidase and mitochondrial electron flow, *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (1997) 4890-4894.
- [57] C.J. Van der Schyf, W.J. Geldenhuys, M.B. Youdim, Multifunctional drugs with different CNS targets for neuropsychiatric disorders, *J Neurochem* 99 (2006) 1033-1048.

- [58] A.S. Kumar, S.A. Saif, P. Oothuman, M.I.A. Mustafa, Lipid peroxidation in chronic cerebral hypoperfusion-induced neurodegeneration in rats, *Int Med J Malaysia* 10 (2011) 3-6.
- [59] J.S. Goldberg, C.E. Bell, D.A. Pollard, Revisiting the monoamine hypothesis of depression: a new perspective, *Perspect Medicin Chem* 6 (2014) 1-8.
- [60] K. Sasaki, A. El Omri, S. Kondo, J. Han, H. Isoda, *Rosmarinus officinalis* polyphenols produce anti-depressant like effect through monoaminergic and cholinergic functions modulation, *Behav Brain Res* 238 (2013) 86-94.
- [61] P. Pereira, D. Tysca, P. Oliveira, L.F. da Silva Brum, J.N. Picada, P. Ardenghi, Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid, *Pharmacol Res* 52 (2005) 199-203.
- [62] N. Ito, T. Yabe, Y. Gamo, T. Nagai, T. Oikawa, H. Yamada, T. Hanawa, Rosmarinic acid from *Perillae* Herba produces an antidepressant-like effect in mice through cell proliferation in the hippocampus, *Biol Pharm Bull* 31 (2008) 1376-1380.
- [63] M.J. Bonifácio, P.N. Palma, L. Almeida, P. Soares-da-Silva, Catechol-O-methyltransferase and its inhibitors in Parkinson's disease, *CNS Drug Rev* 13 (2007) 352-379.
- [64] T. Tom, J.L. Cummings, Depression in Parkinson's disease. Pharmacological characteristics and treatment, *Drugs Aging* 12 (1998) 55-74.
- [65] S. Shifman, M. Bronstein, M. Sternfeld, A. Pisanté, A. Weizman, I. Reznik, B. Spivak, N. Grisaru, L. Karp, R. Schiffer, M. Kotler, R.D. Strous, M. Swartz-Vanetik, H.Y. Knobler, E. Shinar, B. Yakir, N.B. Zak, A. Darvasi, COMT: a common susceptibility gene in bipolar disorder and schizophrenia, *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 128B (2004) 61-64.
- [66] D.K. Cheuk, V. Wong, Meta-analysis of association between a catechol-O-methyltransferase gene polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder, *Behav Genet* 36 (2006) 651-659.
- [67] K.E. Lewandowski, Relationship of catechol-O-methyltransferase to schizophrenia and its correlates: evidence for associations and complex interactions, *Harv Rev Psychiatry* 15 (2007) 233-244.
- [68] M.C. Houston, The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular disease, hypertension, coronary heart disease, and myocardial infarction, *Altern Ther Health Med* 13 (2007) S128-133.
- [69] K.S. Kim, B.J. Krause, Increasing bioavailability of ncoumaroyldopamine through coadministration with a catecholomehtyltransferase (COMT) inhibitor, USA Patent, US 20140107050 A1, 2014.
- [70] T. Nakazawa, K. Ohsawa, Metabolism of rosmarinic acid in rats, *J Nat Prod* 61 (1998) 993-996.
- [71] S. Baba, N. Osakabe, M. Natsume, J. Terao, Orally administered rosmarinic acid is present as the conjugated and/or methylated forms in plasma, and is degraded and metabolized to conjugated forms of caffeic acid, ferulic acid and *m*-coumaric acid, *Life Sci* 75 (2004) 165-178.
- [72] S. Baba, N. Osakabe, M. Natsume, A. Yasuda, Y. Muto, K. Hiyoshi, H. Takano, T. Yoshikawa, J. Terao, Absorption, metabolism, degradation and urinary excretion of rosmarinic acid after intake of *Perilla frutescens* extract in humans, *Eur J Nutr* 44 (2005) 1-9.
- [73] E. Barone, V. Calabrese, C. Mancuso, Ferulic acid and its therapeutic potential as a hormetin for age-related diseases, *Biogerontology* 10 (2009) 97-108.
- [74] S.Z. Dziedzic, B.J.F. Hudson, Phenolic acids and related compounds as antioxidants for edible oils, *Food Chemistry* 14 (1984) 45-51.
- [75] N. Razzaghi-Asl, J. Garrido, H. Khazraei, F. Borges, O. Firuzi, Antioxidant properties of hydroxycinnamic acids: a review of structure- activity relationships, *Curr Med Chem* 20 (2013) 4436-4450.
- [76] B.T. Zhu, E.L. Ezell, J.G. Liehr, Catechol-O-methyltransferase-catalyzed rapid O-methylation of mutagenic flavonoids. Metabolic inactivation as a possible reason for their lack of carcinogenicity *in vivo*, *J Biol Chem* 269 (1994) 292-299.

- [77] B.T. Zhu, J.G. Liehr, Inhibition of catechol O-methyltransferase-catalyzed O-methylation of 2- and 4-hydroxyestradiol by quercetin. Possible role in estradiol-induced tumorigenesis, *J Biol Chem* 271 (1996) 1357-1363.
- [78] B.T. Zhu, U.K. Patel, M.X. Cai, A.H. Conney, O-Methylation of tea polyphenols catalyzed by human placental cytosolic catechol-O-methyltransferase, *Drug Metab Dispos* 28 (2000) 1024-1030.
- [79] J.P. Spencer, H. Schroeter, A.J. Crossthwaite, G. Kuhnle, R.J. Williams, C. Rice-Evans, Contrasting influences of glucuronidation and O-methylation of epicatechin on hydrogen peroxide-induced cell death in neurons and fibroblasts, *Free Radic Biol Med* 31 (2001) 1139-1146.
- [80] B.T. Zhu, U.K. Patel, M.X. Cai, A.J. Lee, A.H. Conney, Rapid conversion of tea catechins to monomethylated products by rat liver cytosolic catechol-O-methyltransferase, *Xenobiotica* 31 (2001) 879-890.
- [81] B.T. Zhu, P. Wang, M. Nagai, Y. Wen, H.W. Bai, Inhibition of human catechol-O-methyltransferase (COMT)-mediated O-methylation of catechol estrogens by major polyphenolic components present in coffee, *J Steroid Biochem Mol Biol* 113 (2009) 65-74.
- [82] B.T. Zhu, J.Y. Shim, M. Nagai, H.W. Bai, Molecular modelling study of the mechanism of high-potency inhibition of human catechol-O-methyltransferase by (-)-epigallocatechin-3-O-gallate, *Xenobiotica* 38 (2008) 130-146.
- [83] P. Lautala, I. Ulmanen, J. Taskinen, Molecular mechanisms controlling the rate and specificity of catechol O-methylation by human soluble catechol O-methyltransferase, *Mol Pharmacol* 59 (2001) 393-402.
- [84] M.J. Parnham, Kesselring, K., Rosmarinic acid, *Drugs Future* 10 (1985) 756-757.
- [85] A. Fujimoto, Y. Sakanashi, H. Matsui, T. Oyama, Y. Nishimura, T. Masuda, Y. Oyama, Cytometric analysis of cytotoxicity of polyphenols and related phenolics to rat thymocytes: potent cytotoxicity of resveratrol to normal cells, *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 104 (2009) 455-462.
- [86] K.A. Scheckel, S.C. Degner, D.F. Romagnolo, Rosmarinic acid antagonizes activator protein-1-dependent activation of cyclooxygenase-2 expression in human cancer and nonmalignant cell lines, *J Nutr* 138 (2008) 2098-2105.
- [87] N. Osakabe, A. Yasuda, M. Natsume, T. Yoshikawa, Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: anticarcinogenic effect of *Perilla frutescens* extract in the murine two-stage skin model, *Carcinogenesis* 25 (2004) 549-557.
- [88] I. Chkhikvishvili, T. Sanikidze, N. Gogia, T. Mchedlishvili, M. Enukidze, M. Machavariani, Y. Vinokur, V. Rodov, Rosmarinic acid-rich extracts of summer savory (*Satureja hortensis* L.) protect Jurkat T cells against oxidative stress, *Oxid Med Cell Longev* 2013 (2013) 456253.
- [89] H.J. Lee, H.S. Cho, E. Park, S. Kim, S.Y. Lee, C.S. Kim, d.K. Kim, S.J. Kim, H.S. Chun, Rosmarinic acid protects human dopaminergic neuronal cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis, *Toxicology* 250 (2008) 109-115.
- [90] P. Costa, B. Sarmiento, S. Gonçalves, A. Romano, Protective effects of *Lavandula viridis* L'Hér extracts and rosmarinic acid against H₂O₂-induced oxidative damage in A172 human astrocyte cell line, *Ind Crops Prod* 50 (2013) 361-365.
- [91] H. Ghaffari, M. Venkataramana, B.J. Ghassam, S.C. Nayaka, A. Nataraju, N.P. Geetha, H.S. Prakash, Rosmarinic acid mediated neuroprotective effects against H₂O₂-induced neuronal cell damage in N2A cells. *Life Sci* 113 (2014) 7-13.

Supplementary Material**Table S1.** Linear gradient system employed in HPLC analysis.

Time (minutes)	A* (%)	B* (%)
0	95	5
45	65	35
46	50	50
47	0	100
50	0	100

*Eluent A was constituted by ultrapure water (acidified with 0.1% formic acid in analytical HPLC) and B was composed by acetonitrile (acidified in analytical HPLC).

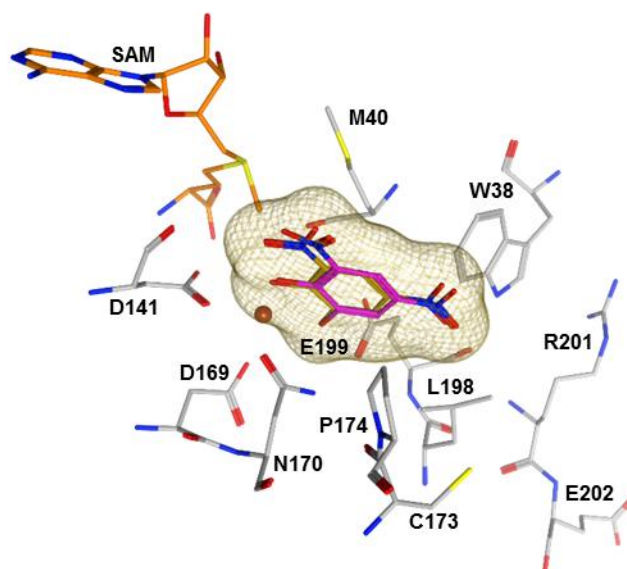


Figure S1. Re-docking of co-crystallized 3,5-dinitrocatechol (DNC) in the human S-COMT (grey, PDB ID: 3BWM). The co-crystallized DNC is shown in magenta and the best ranking docking solution obtained for DNC is shown in yellow with a transparent molecular surface (ChemPLP score: 72.5, RMSD 0.6 Å).

7. ARTIGO II.

Stem cells applied to primary toxicity and peroxide damage prevention testing of rosmarinic and cryptochlorogenic acid isolated from ferns

A ser submetido ao periódico *Journal of Pharmacy and Pharmacology*

**Stem cells applied to primary toxicity and peroxide damage prevention
testing of rosmarinic and cryptochlorogenic acid isolated from ferns**

Andrade, J.M.M.^{a*}; Lopes, D.V.^a; Pereira, D.P.^b; Maurmann, N.^{b,c}; Henriques, A.T.^a;
Pranke, P.^{b,c,d}

^aLaboratory of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ipiranga 2752, 90.610-000, Porto Alegre, RS; ^bHematology and Stem Cell Laboratory, Faculty of Pharmacy, UFRGS; ^cPost-graduate Program in Physiology, UFRGS, Avenida Sarmiento Leite, 500/sala PPG Fisiologia, 90.050-170, Porto Alegre, RS; ^dStem Cell Research Institute, Rua dos Andradas, 1464/133, 90.020-010, Porto Alegre, RS, Brazil.

*Corresponding author at: Laboratory of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, UFRGS, Brazil.+5551 3308 5258. E-mail address: juandradep@gmail.com (J.M.M. Andrade).

Word count: 6,306.

Figure count:10.

ABSTRACT

Aims: The aims of this study were the evaluation of two plant metabolites rosmarinic (RA) and cryptochlorogenic acid (CGA) isolated from extract of *Blechnum binervatum* on cell viability and toxicity. The protective effect on cellular damage was also assessed since the two phenol are commonly found in many herbal medicines and food products. Their cell effects can be implied in safe medicinal and food uses.

Main methods: MTT and LDH methods were employed, using stem cells from the pulp of deciduous exfoliated teeth. RA and CGA were evaluated at concentrations ranging from 100 to 500 μM . The negative effect of hydrogen peroxide (H_2O_2) (200-2200 μM) on stem cell viability and the capacity of RA and CGA (10-100 μM) as protective agents against cell damage induced by this reactive species were also evaluated. Fluorescent microscopy was employed to photograph and register the treated and untreated cells.

Key findings: At all tested concentrations, RA and CGA demonstrated cell viability and no cytotoxic effects on the stem cells. RA also induced cell viability and reduction of cytotoxicity. H_2O_2 (1,400 μM) induced >50% of cytotoxicity, and both compounds were capable of preventing H_2O_2 damage, even at lowest concentration. At 100 μM , on H_2O_2 presence, total cell viability was observed, also in the microscope images.

Significance: These findings contribute to the continued research into natural substances with potential for protecting cells against oxidative injury, especially stem cells, considering that RA and CGA are useful in the regeneration of damaged cells, as neurons, in neurodegenerative disorders.

Keywords: Rosmarinic acid; Cryptochlorogenic acid; Stem cells; Cell viability and toxicity; Hydrogen peroxide damage; Neurodegeneration.

Chemical compounds studied in this article:

Rosmarinic acid (PubChem CID: 5281792); Cryptochlorogenic acid (PubChem CID: 9798666).

Introduction

Medicinal plants are one of the most important sources of new drugs, which are extensively investigated by both *in vitro* and *in vivo* tests, in order to explore their potential activities. Among the plant metabolites, phenols emerge with powerful antioxidant properties [1]. A representative group of species that contains these compounds are the pteridophytes, with approximately 13,600 species, mainly found in tropical and subtropical areas [2]. *Blechnum binervatum* is a fern belonging to this group of plants, which is a native Brazilian species [3].

In this chemical group, chlorogenic acids, including neo and cryptochlorogenic acid (CGA) (1), ubiquitous polyphenols, formed by an ester bond between caffeic and quinic acid [4], present free radical-scavenging activities *in vitro* [5], also decrease lipid peroxidation [6], among other important activities [7-13]. Similarly, rosmarinic acid (RA) (2) is characterized as an ester of caffeic and 3,4-dihydroxyphenyl lactic acid [14]. Several biological activities are also assigned to RA, including antioxidant and anti-neurodegenerative properties [15-18]. These phenolic compounds are commonly found in many herbal medicines and food products, thus the evaluation of their toxicity and cell effects is relevant considering rational and safe medicinal and food uses of plants containing them, including those from *Blechnum* genus. Among the described activities of RA and CGA, neuroprotection can be highlighted, because there is an increasingly high incidence of central nervous system-related diseases, mainly due to increased life expectancy and higher stress levels [19].

Neurodegeneration is characterized by a group of diseases that primarily affect the older generation, impacting on the life and health of millions of people [20]. Thus, compounds that possess neuroprotective characteristics have been explored in the search for new pharmacologically active entities. In this scope, antioxidants were the first drugs to be studied in an effort to retard the neurodegenerative progress, such as occurs in Alzheimer's and Parkinson's diseases [21], since altered levels of oxygen and nitrogen reactive species were

demonstrated in these disorders. Furthermore, therapeutic strategies capable of modulating lipid peroxidation may be valuable to retard and prevent neurodegenerative disorders [22,23].

Specifically in Parkinson's disease, a breakdown regulation of dopamine and iron can result in increased oxidative stress, since the reaction of iron and hydrogen peroxide (formed by the biogenic amines metabolism) leads to the formation of free radicals, by the Fenton reaction [24]. Also, dopaminergic neurons have reduced levels of intracellular antioxidant defenses, being more susceptible to a range of injuries, including oxidative stress [25]. In this context, the search for chemical entities in Brazilian biodiversity species, which show protective potential, preventing the death of neuronal or undifferentiated cell lines by free radical species, represents a valuable contribution for drug development in terms of improving the therapeutic arsenal.

Allied to the pharmacological potential of some substances, are its possible adverse effects, including toxic events. A compound should be evaluated pre-clinically for its potential toxicity as a way of predicting potential acute and chronic adverse effects on reproduction or even on neurological development, before initiating other tracking phases, including clinical trials. Thus, simple and reproducible techniques become necessary which can aid in finding potential toxic effects of new chemical entities, as for example, in the use of stem cells *in vitro* models.

The ability to differentiate into many cell types and the high proliferative capacity make the mesenchymal stem cells an attractive source for use in research, including tissue engineering and investigative studies [26,27]. Besides these contributions, the use of mesenchymal stem cells is extremely relevant in toxicology studies, for example, human cells are probably more sensitive for predicting toxicity in comparison with animal cells and they also contribute towards the reduction in the number of animals used in tests [28]. Therefore, the purpose of this study was the isolation of RA and CGA from *Blechnum binervatum* fronds, a native fern from Brazil, the investigation of cell viability and cytotoxicity of these natural products, through *in vitro* models using stem cells and, finally, evaluation of the possible

inhibition effects of these compounds in terms of cellular damage caused by hydrogen peroxide.

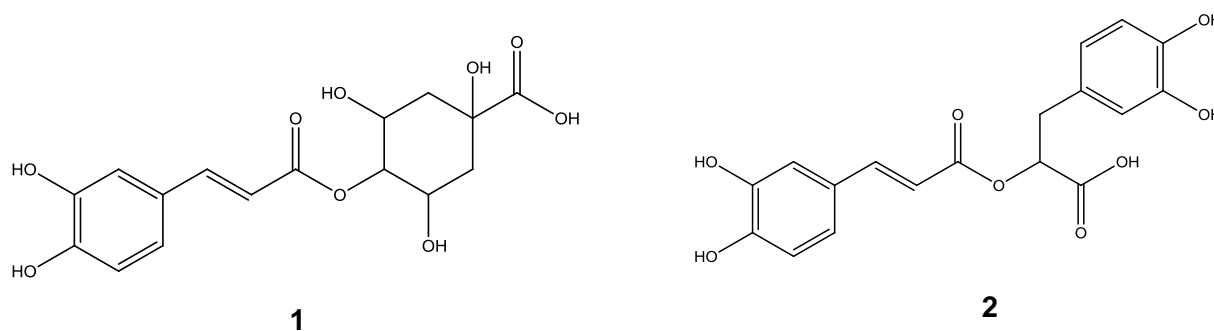


Figure 1. Chemical structures of the phenolic acids isolated from *Blechnum* extract: cryptochlorogenic acid (**1**) and rosmarinic acid (**2**).

Materials and methods

Materials

RA and CGA were isolated from *Blechnum binervatum* L. and their structures were confirmed after isolation and comparison with reference substances. The purity of the compounds was found to be more than 98%, using high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis. Acetonitrile HPLC grade and dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, Mo, USA), methanol HPLC grade was obtained from Tedia Company (USA) and formic acid from J.T. Baker (USA).

To culture experiments *in vitro*, the products used were Inactivated Fetal Bovine Serum (FBS) (Cultilab, SP, Brazil), Rh - TGF- β -1 (ImmunoTools). The following reagents were purchased from Sigma-Aldrich: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) - low glucose, penicillin and streptomycin, trypsin-EDTA solution 10x, dexamethasone, L-ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrate (ASAP), ITS Liquid Media Supplement (100x), insulin from bovine pancreas, indomethacin minimum, rosiglitazone and β -glycerophosphate disodium salt hydrate. The dyes (Alcian Blue 8GXG, Oil Red O and Alizarin Red S) and the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were also purchased from Sigma-Aldrich. The antibodies for flow cytometry analysis were obtained from BD (Becton

Dickinson, San Diego, CA). LDH Liquiform Ref.: 86-1/100 was obtained from Labtest Diagnóstica SA. Hydrogen peroxide was purchased from F. Maia (Brazil).

Plant material

Fronds of *B. binervatum* (Blechnaceae) were collected from South Brazil (Rio Grande do Sul state, 29°32'17"S, 51°04'51"W; ICN 171553). The material was identified by Dr. Maria Angélica Kieling-Rubio (UFRGS, RS, Brazil) and the voucher specimens were deposited in the herbarium of Botany Department from Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Plant extraction and isolation

The dried fronds of *B. binervatum* (710 g) were extracted with methanol (3 x 4 L) at room temperature. Following this, the solvent was removed under vacuum evaporation, resulting in a dark green syrup (96.4 g). A portion of the soft extract was dissolved in a mixture of ultrapure water:acetonitrile (95:5) and was extracted with hexane in order to remove non-polar constituents. The aqueous phase was then removed and filtered on polyvinylidene fluoride membrane, 0.45 µm (Millipore, USA) for high pressure liquid chromatography (HPLC), coupled with diode array detector (DAD) and electrospray ionization mass spectroscopy (ESI/MS) analysis, with the aim of establishing the fingerprint of this plant extract.

Acidified ultrapure water (formic acid 0.1%, v/v) and acetonitrile (formic acid 0.1%, v/v) was used as the mobile phase in linear gradient mode. After identification of RA and CGA by comparison with reference substances, the sample was submitted to preparative HPLC with the same gradient system (H₂O:ACN, v/v) (Table S1), rate of 3 mL/min and detection at 320 nm, leading to the isolation of known compounds CGA (**1**, 3.9 mg) and RA (**2**, 2.7 mg).

Cell isolation, maintenance and characterization

The cells [stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED)] were isolated from exfoliated human deciduous teeth [29] as described previously [30]. The samples of the deciduous teeth were obtained in partnership with the Post-Graduate Program of Pediatric Dentistry from the Federal University of Rio Grande do Sul. Patients' guardians signed a consent form approved by the ethics committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, number CAAE 36403514.6.0000.5347. The fresh dental pulp was harvested from deciduous teeth in resorption. Immediately after collection, the teeth were immersed in MSC culture medium, consisting of DMEM, 2.5 g/L HEPES, 10% FBS, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. The dental pulp was carefully separated from the tooth tissue in a laminar flow and digested in a 0.2% solution of collagenase type I. The cells from each tooth were seeded onto one well of a 12 well plate. The medium was replaced after 24 hs in order to isolate adherent cells and was refreshed once every 3 days to allow further growth; the cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ until they reached 90% confluence. After reaching confluence, the cells were detached with trypsin-EDTA 0.05% solution, and re-seeded at a density of 5,000 cells/cm² until they reached the 3rd passage, when they were cryopreserved for further use in the experiments. To achieve this, the MSCs were detached with trypsin-EDTA 0.05% solution, centrifuged and re-suspended in cryopreservation medium (90% FBS and 10% DMSO) at a concentration of 10⁶ cells/mL. The MSCs were maintained under -20°C for approximately 1h and then under -80°C for at least 24 hs. The MSCs were then stored in nitrogen prior to their use in the experiments. At the moment of their use, the MSCs were thawed and expanded until they reached the 7th passage for characterization and use in the experiments described below. After reaching approximately 90% confluence, the culture was trypsinized, using 0.05% Trypsin/EDTA.

The MSCs were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), pH 7.4 supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin in a water-saturated atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. The culture

medium was changed every three or four days and the cells were sub-cultured at approximately 90% confluence using 0.05% Trypsin/EDTA.

Immunophenotypic profile

The characterization of the mesenchymal stem cells was performed by differentiation assay and flow cytometry. The immunophenotypic profile was performed immediately after cell dissociation with Trypsin/EDTA and posterior incubation with specific monoclonal antibodies. The cells were counted, re-suspended in PBS buffer at 10^6 cells/mL and incubated with the human antibodies. The following antibodies were used: CD14, CD34, CD45, CD73, CD90, CD105 and HLADR. The antibodies were conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) or phycoerythrin (PE). After 30 minutes incubation in the dark, the cells were washed with PBS 1x to remove unbound antibody excess. Appropriate isotype controls were used and exclusion of dead cells was performed by incubation with 7-aminoactinomycin D (7AAD). The analyses were performed on flow cytometer FACSAria III (Becton Dickinson) and analyzed by FACSDiva software, version 6.0.

Cell differentiation *in vitro*

The cells were analyzed between the fifth and tenth passage of the cell culture for their capacity to differentiate into osteoblasts, chondrocytes and adipocytes through induction medium, previously described by BERNARDI *et al.* [30], with minor modifications. After approximately four weeks of cell treatment with the adipogenic, chondrogenic and osteogenic differentiation media, as described below, the cultures were stained and visualized under optical microscopy and photographed.

Adipogenic differentiation

The cells were cultivated in DMEM, 2.5 g/L HEPES, 10% FBS, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin, dexamethasone (1 µM), insulin (10 µg/mL), indomethacin (50 µM), rosiglitazone (1 µM) and 3-isobutyl-1-methylxanthine (0.5 mM). After approximately five

weeks, the accumulation of intracellular triglyceride droplets was visualized by staining with Oil Red O.

Chondrogenic differentiation

The inducing medium consisted of DMEM supplemented with 2.5 g/L HEPES, 10% FBS, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin, 10 ng/mL TGF-β1, 0.1 µM dexamethasone, 50 µM solution of ascorbic acid 2-phosphate (ASAP) and 1x of ITS 100x. After morphological changes in approximately five weeks, the chondrogenesis was made apparent by Alcian Blue staining.

Osteogenic differentiation

The MSCs were cultivated for 3-4 weeks in a supplemented medium DMEM containing fetal bovine serum (10%), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin, dexamethasone (0.1 µM), ascorbic acid 2-phosphate (50 µM) and β-glycerophosphate (15 mM). The deposition of mineralized matrix was observed by Alizarin Red S staining.

Cell treatment

Between the fifth and tenth passage, 7,000 cells were seeded in 96-well culture plates (7×10^3 cells/well). After confluence, the cells were treated with isolated RA and CGA at 100, 250 or 500 µM, dissolved in DMSO (2%) of the culture medium or vehicle (2% v/v DMSO) in DMEM for 24 hs. DNA damage was induced and estimated by the incubation of the stem cells with hydrogen peroxide (H₂O₂) (200; 400; 600; 800; 1,000; 1,200; 1,400; 1,600; 1,800; 2,000 or 2,200 µM) for 24 hs. Evaluation was made of the negative effect of H₂O₂ on cell viability and the possible capacity of RA and CGA (10, 50 or 100 µM) as protecting agents against the cell damage induced by this reactive oxygen species (ROS).

Measurement of cell viability by MTT assay

Cell viability was evaluated by the reduction of MTT, a colorimetric assay with the procedure adapted from PARDO-ANDREU *et al.* [31]. The MSCs were treated with H₂O₂ in the presence of RA or CGA for 24 hs at 37°C at concentrations of 10, 100 and 250 µM. After 1 day, the cells were incubated with 0.25 µg/mL MTT; four hours later, the supernatant was carefully removed and dimethylsulfoxide (DMSO, 200 µL) was added per well to dissolve the crystals formed. Absorbance was measured at 570 nm and 630 nm in the apparatus (SpectraMax[®] 250, Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA), with the results being calculated by the absorbance label subtraction (570 nm-630 nm). The results were expressed as percentages of MTT reduction relative to the absorbance of the control cells (100%).

Determination of cytotoxicity: Lactate dehydrogenase (LDH) release assay

Measurement of cell membrane integrity was determined in the culture supernatant using lactate dehydrogenase (LDH) delivery assay with a commercial test kit. The stem cell culture was treated with the RA and CGA as described above. At the end of the incubation period (1 day), one aliquot of the medium (0.2 mL) was removed for extracellular LDH release analysis, according the manufacturer's instructions. As the negative control, the cells cultivated on the wells were used and, as the positive control, the cells which were treated with Triton X-100, 1% (v/v) for 20 minutes were used. Triton X-100 causes cell death, leading to maximal LDH release. Measurement was performed with 560 Labmax equipment (Labtest Diagnóstica SA). The cytotoxicity, corresponding to the damage of the cell membrane, was evaluated by the percentage of intracellular enzyme LDH released into the medium relative to the LDH of the control cells (100%).

Observation of intra-cellular morphology

The stem cells cultivated in 96-well culture plate and treated, as described above, were washed with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4). Following this, the cells were fixed for 30 min with paraformaldehyde solution 4% in PBS. The stem cells were permeabilized with Triton X and stained with 50 µg/mL rhodamine conjugated phalloidin (40 minutes), washed with PBS and the cell nuclei were stained with 0.5 µg/mL of 4,6-diamidino-2-phenylindole, DAPI (1 minute). Photographs representing the different samples were obtained by fluorescence microscopy (Nikon Ti Eclipse microscope). The cell nuclei were stained blue using DAPI and the cytoplasm were stained red-orange using rhodamine/phalloidin actin.

Statistical analysis

The results were expressed as the mean \pm standard deviation (SD) from two independent experiments and evaluated using two-way ANOVA, followed by Bonferroni's test. Significant differences were established at $p < 0.05$. Data analyses were performed using Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., CA, USA).

Results

Chemistry

After being dissolved in an aqueous mixture and defatted with hexane, the methanol extract of *B. binervatum* fronds was analyzed by HPLC-DAD-ESI/MS, resulting in the identification of the phenolic compounds: CGA (**1**) and RA (**2**) (Figure 2). Our work first reported the identification and isolation of these phenolic acids in the plant. The identification was based on the comparison of retention time, ultraviolet profile (UV) and the obtained MS spectra with reference substances. The sample was also subjected to a preparative HPLC to yield these two isolated components, which were tested on MTT and LDH assays; the results are described below.

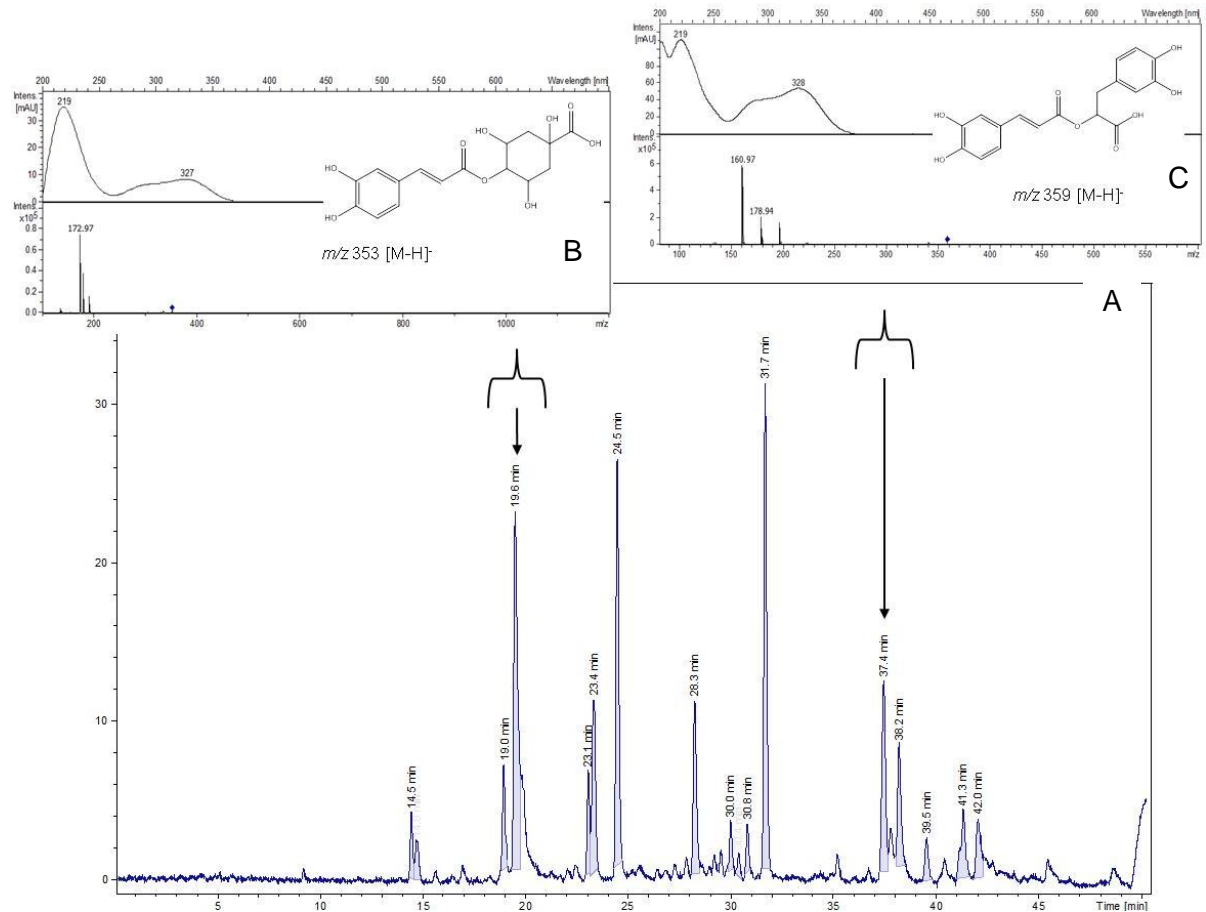


Figure 2. Fingerprint of *B. binervatum* extract by HPLC-DAD analysis (A). Ultraviolet profile (UV_{max}: 218; 324 nm) and MS/MS spectrum of pseudomolecular ion m/z 353 [M-H]⁻ from CGA (B). UV profile (UV_{max}: 219; 328 nm) and MS/MS spectrum of m/z 359 [M-H]⁻ from RA, considering its molecular weight: 360 g/mol (C).

Characterization of mesenchymal stem cells

The International Society for Cellular Therapy (ISCT) standard criteria is to foster a more uniform characterization of mesenchymal stem cells (MSCs): the cells must be plastic-adherent when maintained in standard culture conditions; MSCs must express positivity (≥95%) to CD105 (endoglin), CD73 (ecto-5'-nucleotidase) and CD90 (Thy1), while negatively expressing (≤2%) CD34, CD45, CD14 or CD11b and HLA-DR surface molecules. The MSCs must also differentiate into osteoblasts, adipocytes and chondroblasts *in vitro* [32].

In this study, the cells from human exfoliated deciduous teeth were isolated, cultured and characterized successfully as MSCs, according to DOMINICI *et al.* [32] and BERNARDI *et*

al. [30]. The cells showed typical MSC morphology and plastic adherence characteristics (Figure 3A). In the center of figure 3A it is possible to observe a colony of MSCs. The cells differentiate into the three analyzed mesodermal cell lineages. Chondrogenic differentiation was demonstrated by staining with Alcian blue, indicated by the blue staining of glycosaminoglycan deposits (Figure 3B). Osteogenic differentiation was demonstrated by staining with Alizarin Red, the calcium deposits being indicated by red (Figure 3C). Adipogenic differentiation was demonstrated by staining with Oil Red O to show the lipid vacuoles (Figure 3D).

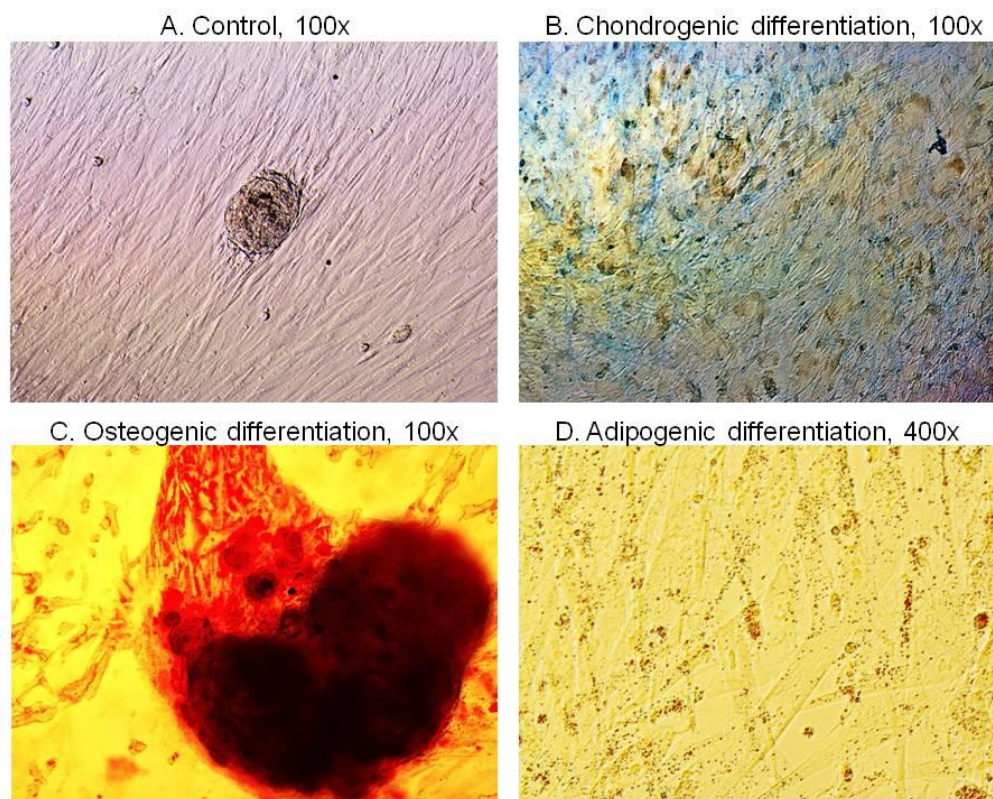


Figure 3. Trilineage mesenchymal differentiation potential of MSCs. A) Morphological appearance of undifferentiated MSCs (Control). B) Chondrogenic differentiation demonstrated by glycosaminoglycans stained with Alcian Blue. C) Osteogenic differentiation evidenced by calcified matrix stained with alizarin red. D) Adipogenic differentiation indicated by droplets of fat, highlighted by Oil Red.

The flow cytometry demonstrated a typical pattern for MSCs surface markers, positively expressing CD73 (100%), CD90 (99.5%) and CD105 (97.8%), while negatively expressing CD14, CD34, CD45 and HLA-DR (0%).

Effects of CGA and RA on stem cell viability and cytotoxicity

The possible influence on viability and membrane integrity caused by CGA and RA in stem cells were evaluated, based on MTT and LDH assays, respectively (Fig. 4A and 4B). The results in figure 4A show that, at concentrations ranging from 100 to 500 μM , CGA did not affect cell viability, the values being between 107 and 111%, compared to the control 100% ($p < 0.05$). No statistically significant differences were observed among the concentrations of CGA; the triton X (1%) exhibits stem cell death. On the other hand, a significant difference was verified for RA at 100-500 μM , compared to the untreated cells. The values ranging from 119 to 121% indicate the possibility of stem cell proliferation, with no differences among RA tested concentrations ($p < 0.05$).

Parallel with the results of the MTT test, the cells treated with CGA at concentrations of 100-500 μM for 24 hs demonstrated no cytotoxic effects in LDH leakage (values ranging from 93 to 97%) (Fig. 4B). Triton X (1%) presented a significant increase in LDH leakage in the medium containing treated cells. RA, at 250 and 500 μM , showed similar results to those found for CGA, with values (95-97%) comparable to the control ($p < 0.05$). The concentration of 100 μM exhibited signals of cell proliferation, with lower LDH leakage, supporting cytoprotective effect. These findings suggest that the CGA and RA are capable of maintaining stem cell viability; no cytotoxic effects at concentrations of 100-500 μM were observed. The cell proliferation induced by RA in the three concentrations tested by MTT assay and the cytotoxicity decrease at 100 μM by LDH leakage should be highlighted. Considering the absence of toxicity at lower doses, it was decided to use: 10, 50 and 100 μM of CGA and RA for subsequent experiments.

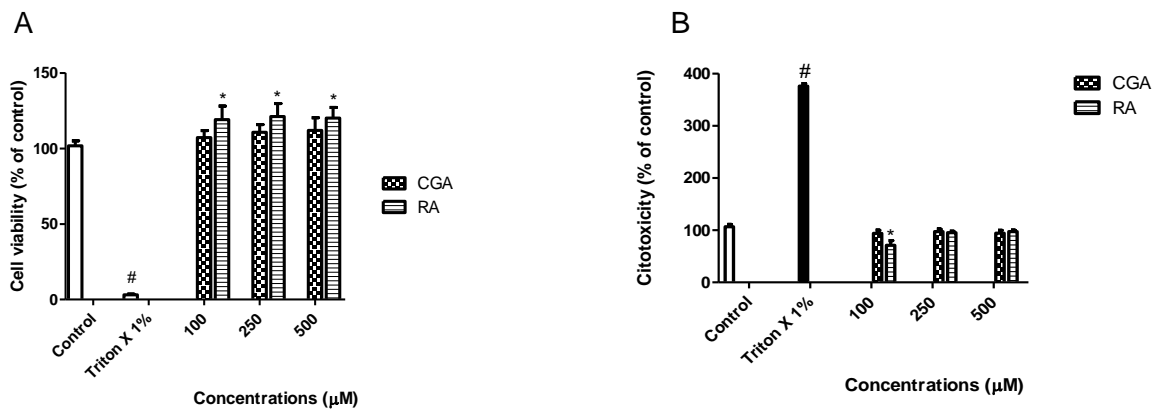


Figure 4. Effects of CGA and RA on cell viability (MTT test) (A) and cytotoxicity (LDH leakage) (B). For these tests, stem cells were pre-cultivated in 96-well microplates (after confluence in 200 µL of DMEM). The cells were then incubated with CGA and RA, at concentrations of 100-500 µM, for 24 hs, at 37°C. For the LDH leakage assay, the supernatant of each well was used in the reactions. Data are expressed as the mean \pm standard deviation of two independent experiments. The percentage of cell viability and cytotoxicity in the control group was treated as 100%. (#) indicates no viability and cytotoxicity related to the control values ($p < 0.05$) and (*) indicates greater viability and lower cytotoxicity compared to the control ($p < 0.05$) (two-way ANOVA with Bonferroni's post test).

Influence of H₂O₂ on stem cell growth

In order to establish the extension of hydrogen peroxide toxicity and the correct doses to select for following studies, the H₂O₂ damage, in concentrations ranging from 200 to 2,200 µM, related to cell viability was analyzed. The potential induction of cytotoxicity, by assessing stem cell membrane integrity, was also analyzed. The figure 5A shows that 1,000 µM and lower doses of H₂O₂ had no effects on stem cell viability in 24 hs, in comparison to the control ($p < 0.05$). On the other hand, reduction of cell viability was observed at 1,200 µM, decreasing to approximately 40% of the control value at 1,400 µM, and being below 10% at higher doses (1,600-2,200 µM). Similar results were found with regard to H₂O₂-induced cytotoxicity by the LDH method (Figure 5B), in which slight damage was observed at 1,200 µM and significant damage ($p < 0.05$) at higher concentrations (1,400 to 2,200 µM).

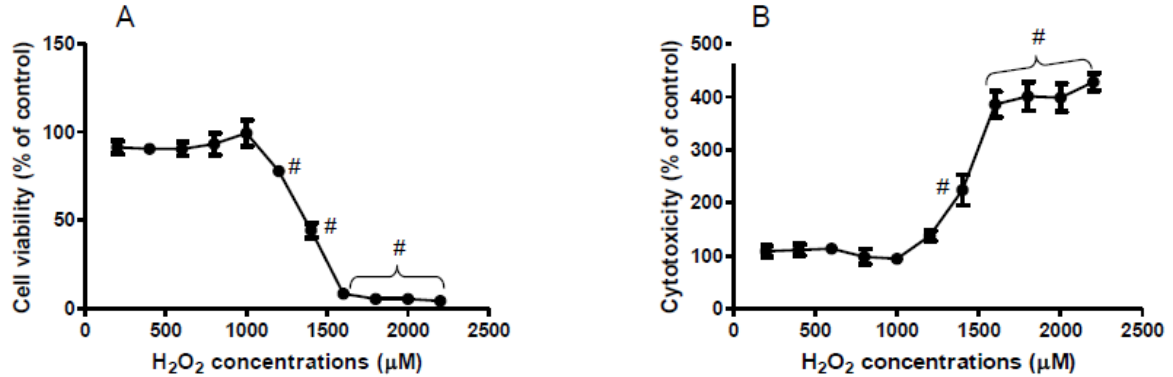


Figure 5. Effects of H₂O₂ on cell viability by MTT assay (A) and induction of cytotoxicity by LDH leakage (B). The stem cells were treated with hydrogen peroxide (200-2200 μM) for 24 hs, at 37°C. Curves of cell death, promoted by H₂O₂ could be observed. Data is expressed as percent of values in untreated control cultures and is represented as means ± S.D. for the two experiments. (#) $p < 0.05$ compared to the control.

The effect of H₂O₂ on the stem cells can also be observed in the assessed nuclear densities changes using DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) staining. A significant proportion of H₂O₂-mediated cell damage was observed, based on the absence of viable cells (not colored) by photomicrographs (Figure 6A), probably due to detachment of cells by death, at 1,200 μM and higher concentrations, in a dose-dependent manner. The hallmarks of cell damage were not revealed in the untreated control cells (Figures 6A, 6B and 6C). Thus, the H₂O₂ concentration of 1,400 μM was selected to assess the possible effect of phenolic acids, isolated from *B. binervatum*, in attenuating/preventing cell damage induced by this reactive oxygen species.

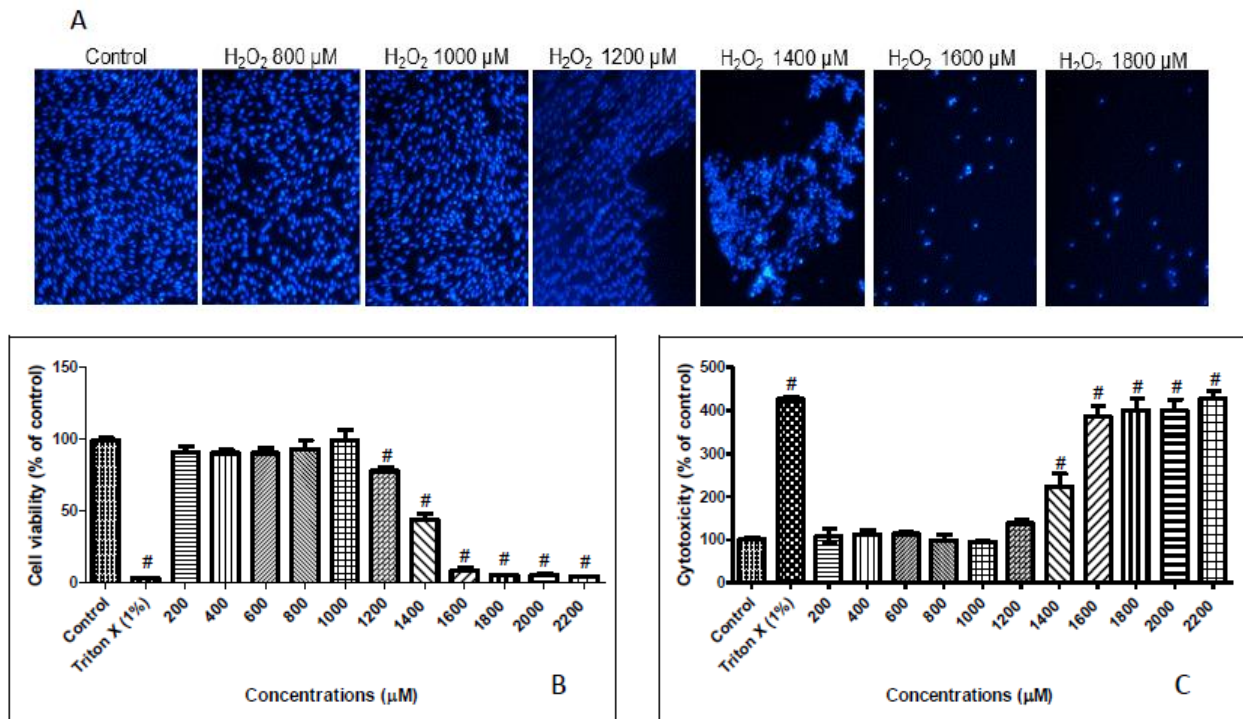


Figure 6. A) Cell nuclei of stem cells treated with different concentrations of hydrogen peroxide (800-1,800 μM), compared with untreated cells (control), observed by representative fluorescence photomicrographs (DAPI colored). B) Effects of H₂O₂ on cell viability (MTT test), at 11 different concentrations, was measured and expressed as percentage values related to the untreated cells result. C) Results of cytotoxicity (LDH assay) induced by H₂O₂ at the cited concentrations. Data are expressed as percent of values related to control and are represented as means ± S.D. (#) $p < 0.05$ compared to the control.

RA and CGA prevent H₂O₂-induced cell death in stem cells

Stem cells were treated with different amounts of CGA and RA from *B. binervatum* (10 to 100 μM) for 24 hs, in the presence and absence of H₂O₂ (1400 μM). Cell viability was evaluated by MTT assay, with the aim of accessing the capacity of these phenolic acids to inhibit or reverse the damaging effects caused by H₂O₂. Figure 7 shows that cell viability was significantly suppressed in the H₂O₂-treated group (1,400 μM) ($p < 0.05$), with evidenced absence of approximately half the viable cells in the nuclei staining with DAPI (Figure 7A). Treatments with CGA at 10, 50 and 100 μM, without H₂O₂ in the medium, were capable of maintaining cell viability, with values compared to the control ($p < 0.05$) (Figure 7B). In addition, a trend for cell proliferation was demonstrated at the highest concentration of CGA (100 μM), the values being

statistically similar to the control and significantly different from the lower concentrations ($p < 0.05$).

The CGA 10 and 50 μM treatments, in the presence of H_2O_2 , partially reversed growth suppression, with values of cell viability statistically different from H_2O_2 1,400 μM ; these concentrations of CGA were also statistically different from the control ($p < 0.05$). On the other hand, CGA at 100 μM was able to completely revert cellular damage caused by H_2O_2 , with the viability values being similar to the control ($p > 0.05$). Fluorescence microscope images of untreated/treated stem cells (CGA 100 μM) corroborate with the results found in the cell viability graphs (Figure 7).

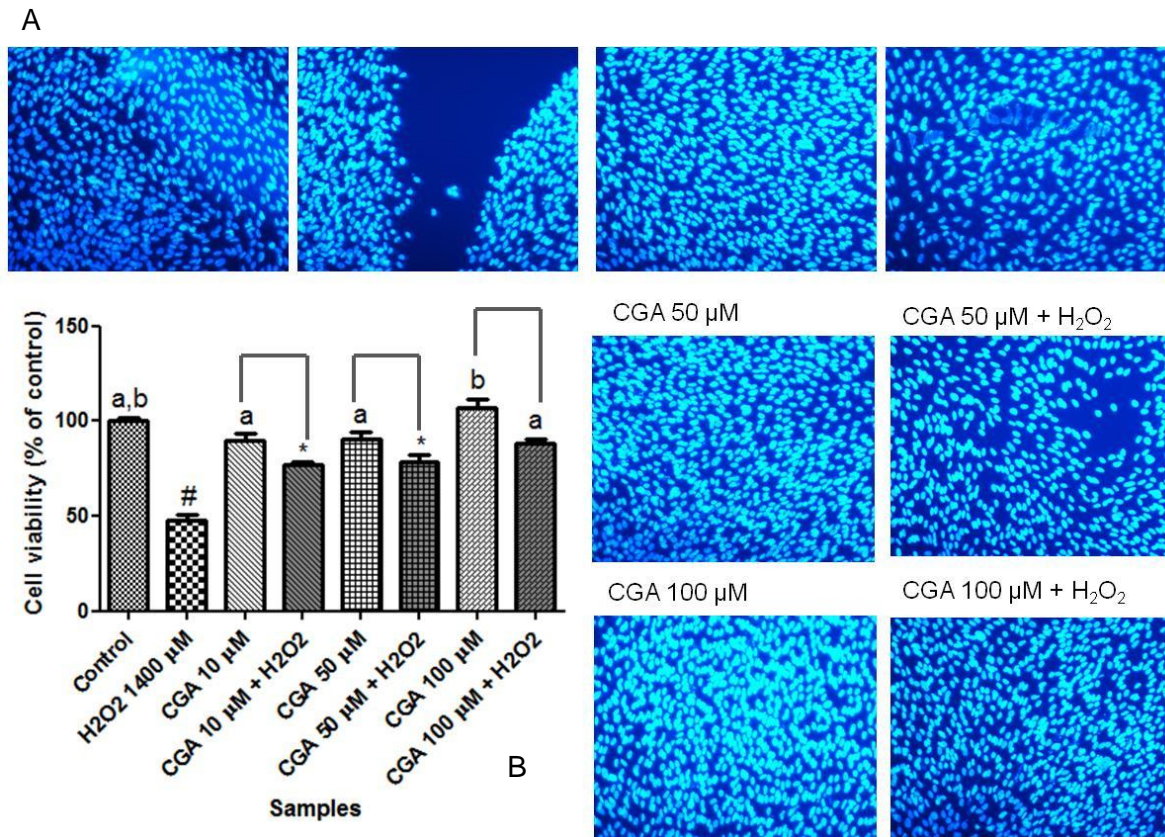


Figure 7. Effects of CGA from *B. binervatum* on H_2O_2 -induced cell damage. Stem cells were treated with CGA at 10, 50 and 100 μM in the absence or presence of 1400 μM H_2O_2 . The cells were also treated with H_2O_2 1,400 μM . Fluorescence microscope images of stem cell nuclei (Nikon Ti Eclipse, DAPI colored) treated with different concentrations of CGA, in the presence or absence of H_2O_2 (A) and viability of the cells (B). Data is expressed as percent of values in untreated control cultures and is represented as means \pm S.D. for the two experiments.

(#) lower viability compared to the control. (a,b) comparable to the control values and (*) different from control and H₂O₂ values ($p < 0.05$).

The results shown in figure 8 demonstrate that H₂O₂ induced cell death in more than 50% of the treated stem cells. RA 10 and 50 μ M, in the absence of H₂O₂, presented cell viability in comparison with the control. At 100 μ M, this phenolic acid was able to promote cell proliferation because the percentage of viable cells, after the MTT method, was higher than that found for the control ($p < 0.05$). In the nuclear images (Figure 8A) (DAPI stained), RA (100 μ M) clearly demonstrated a higher number of viable cells, when compared to the control. In the presence of H₂O₂, the results were similar to those obtained for CGA, in which the lower doses partially reversed the H₂O₂ damage and the concentration of 100 μ M completely inhibited H₂O₂ cell growth suppression, increasing the MTT reduction activity by around 98%, in relation to the control group. Thus, it was concluded that CGA and RA are possible effective agents for protection against damage by H₂O₂ and viability of stem cells.

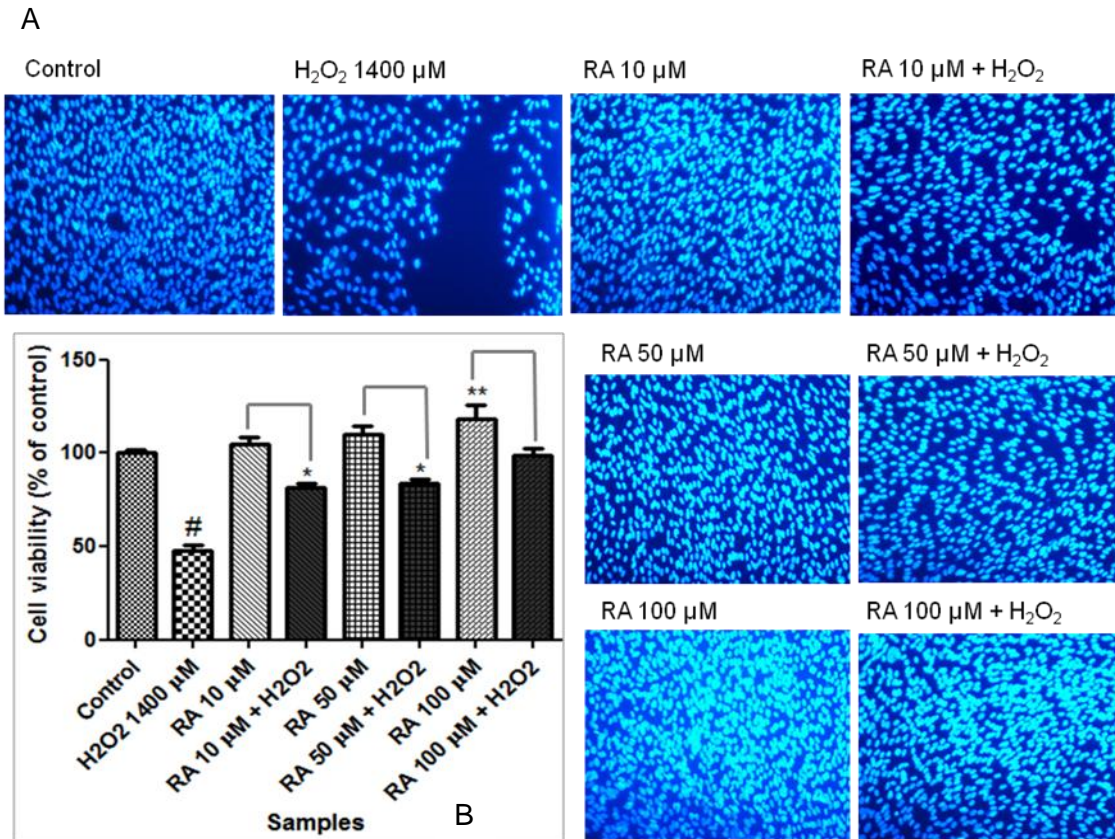


Figure 8. Stem cells were treated with RA at 10, 50 and 100 μM concentration in the absence or presence of 1,400 μM H_2O_2 . Fluorescence microscope images of stem cell nuclei (DAPI colored) were taken (A) and the effects of RA from *B. binervatum* on cell viability, by MTT assay, with/without H_2O_2 were calculated (B). Data is expressed as percent of values in untreated control cultures and is represented as means \pm S.D. for the two experiments. (#) cytotoxic compared to the control, (*) different from control and from H_2O_2 values and (**) indicates cell proliferation ($p < 0.05$).

The pictures taken after nuclei and cytoskeleton staining of treated and untreated stem cells, as well as their digital overlap, are shown in figure 9. Through these images it was possible to visualize similarities of cell viability between the untreated control group and the phenolic acids groups (100 μM), in the presence of H_2O_2 (1,400 μM). Thus, RA and CGA were able to inhibit the damage caused by H_2O_2 , at a concentration 14x lower than that of the reactive oxygen species.

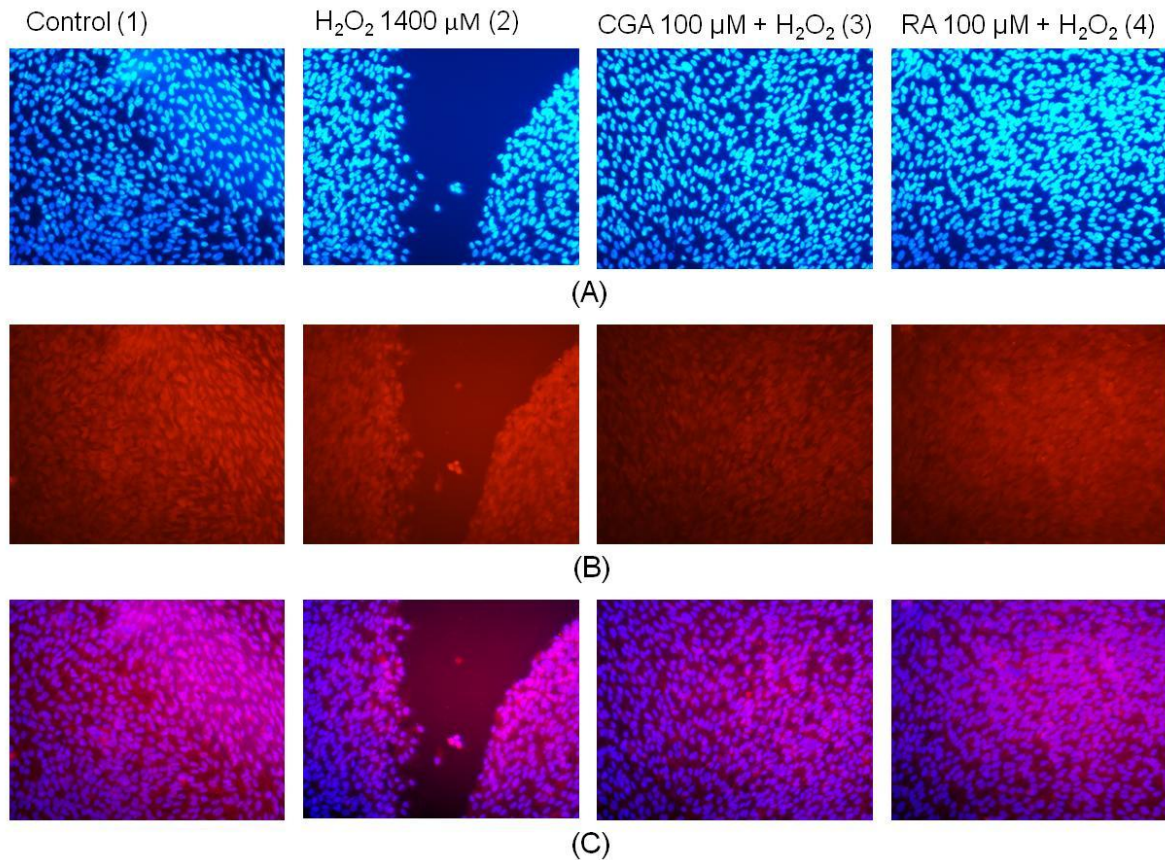


Figure 9. Fluorescence microscope cell pictures, obtained for untreated and treated stem cells, using H_2O_2 at 1,400 μM , CGA and RA at 100 μM added of H_2O_2 . The images were taken by fluorescence microscope (Nikon Ti Eclipse). Nuclei cells were blue stained with DAPI (A) and labeling of cytoskeleton, in red color, was performed with phalloidin (B). The digital overlay of DAPI and phalloidin images of human mesenchymal stem cells was obtained (C).

Cell viability (MTT assay) from CGA and RA, at 100 μM , with and without H_2O_2 , can be observed in figure 10. The H_2O_2 (1,400 μM) showed suppression of growth and death in more than 50% of the treated stem cells. RA presented better responses when compared to the CGA, at the same concentrations. In the absence of H_2O_2 , RA showed cell viability values greater than 100%, compared to untreated control. Stem cells treated with phenolic acids, in presence of H_2O_2 , exhibited lower viability values, compared with the same samples without H_2O_2 .

Moreover, at the highest dose (100 μM), both acids were able to completely reverse the cell damage caused by H_2O_2 , with values compared to untreated cells (99 and 88%, respectively for RA and CGA) ($p < 0.05$). The trend towards cellular proliferation, observed for CGA at the

highest dose (103%, compared to untreated cells), was 13% lower than the clearly induced proliferation demonstrated for RA (119%). CGA at 100 μM , in the absence of H_2O_2 , showed cell viability values comparable to the RA at the same concentration, this latter value, however, being in the presence of H_2O_2 . Thus, RA was more effective than CGA in the inhibition of H_2O_2 -induced cell damage, also maintaining cell viability in low doses and increasing the stem cell number at the highest concentration (Figure 10).

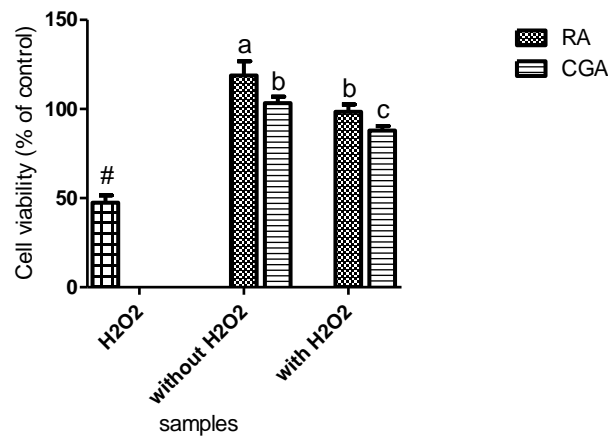


Figure 10. CGA and RA effects, at 100 μM , in presence and absence of H_2O_2 . The H_2O_2 (1400 μM)-induced cell death is also shown. Data is expressed as percent values related to untreated control cultures (100%) and it is represented as means \pm S.D. (#) indicates significant differences compared to negative control group. Different letters indicate significant differences between sample means ($p < 0.05$).

Discussion

The stem cells isolated from dental tissue share characteristics common to other populations of mesenchymal stem cells and offer valuable therapeutic potential in the central nervous system [64,65]. The MSCs present auto-renewal capacity and can be differentiated into multiple type organ-specific cells, including neurons [66]. Thus, the evidenced protective effect of phenolic acids on stem cells is significant, considering that these cells are useful in the regeneration of damaged cells, such as neurons, induced in neurodegenerative processes.

Polyphenols have already been reported in fern species. They belong to the botanical group of pteridophytes, characterized as a large group of vascular plants, which are widely distributed around the world. For these species, previous chemical investigations revealed the major presence of phenolic acids and flavonoid glycoside derivatives [33-37]. In addition, other secondary metabolites, such as terpenes, have also been reported [38].

Compounds **1** and **2**, which derive from hydroxycinnamic acid, were previously described in Blechnaceae species [39-41], although for *B. binervatum*, these components have been reported for the first time in this study. Both phenolic derivatives are caffeic acid esters, CGA being a natural chemical compound found in plant products and food [42-46], which is formed by caffeic and quinic acids. RA is an ester of caffeic acid with 3,4-dihydroxyphenyl lactic acid, which is also found in a variety of plants [47].

In this work, we isolate and evaluate the cytotoxic effects of phenolic acid by MTT assay, also the viability of stem cells after incubation with RA and CGA. The MTT assay uses the conversion of a water soluble tetrazolium salt into insoluble purple formazan crystals, by cleavage of the tetrazolium ring by succinate dehydrogenase, making the detection of mitochondrial activity in viable cells possible. LDH assay measures the quantity of released lactate dehydrogenase enzyme, an indicator of cell membrane integrity [48,49].

Regarding the inhibition effect of RA and CGA on H₂O₂-induced cell damage, KIM *et al.* [50] have already reported that CGA inhibited the H₂O₂-induced apoptotic death in primary cortical neurons by the up regulation of the anti-apoptotic genes *Bcl-2* and *Bcl-XL*, as well as through the blockage of caspase-3 cleavage promoted by H₂O₂, an important regulator of neuronal apoptosis.

NAKAJIMA *et al.* [6] reported that CGA increased cellular protection against oxidative stress (neurotoxicity) induced by L-buthionine-(S,R)-sulfoximine to deplete glutathione in combination with glutamate to inhibit cystine uptake, in cultures of retinal ganglion cells. In

addition, the authors revealed a reduction in the lipid peroxidation in mouse brain homogenates, treated with CGA. In another study, H₂O₂-induced nuclear condensation and DNA fragmentation in PC12 cells were strongly inhibited by pre-treatment with CGA. A neuroprotection against H₂O₂-induced oxidative stress was observed, with less production of reactive oxygen species in the CGA-treated cells [7].

COSTA *et al.* [51] demonstrated the potential of RA against H₂O₂-induced oxidative damage in A172 human astrocyte cell line (75x10³ cells/well). The protective effect of RA was measured by MTT assay for 24 hr at 37°C, using H₂O₂ at 600 µM and the phenolic acid at 30 µg/mL. Cell viability was reduced to 35% after 24 hs of exposure to 600 µM H₂O₂, compared to the untreated cells. The RA showed a great neuroprotective effect, improving the survival rate to 98%. GHAFFARI *et al.* [52] showed that RA suppressed the H₂O₂ (100 µM)-induced cytotoxicity in N2A mouse neuroblastoma cell line (5x10⁴) at the concentration of 50 µM, almost neutralizing (98%, compared to the control) the cell death caused by H₂O₂ in these cells. The exposure of cells to this phenolic acid alone, at high concentrations (250 µM), demonstrated moderate toxic effects.

This latter study demonstrated that the exposure of cells to 100 µM H₂O₂ reduced cell viability to half that of the control group (54%) [52]. This H₂O₂ concentration is around 10x lower than that used in this study and it is capable of reducing the viability of approximately 50% of the control. This occurs because of some stem cell characteristics, such as their high proliferation capacity. In addition, adult stem cells are able to establish the replacement of cells which have died or are activated and proliferate intensely when required for damaged tissue regeneration [53]. Thus, due to regenerative characteristics and easier adaptation to medium stress of stem cells, in this study a higher dose of H₂O₂ was required in comparison to other studies using non-stem cells.

RA also inhibited the ciguatoxin-induced damage on neuroblastoma cells by the MTT assay, at 121 µg/mL. There was a significant increase in terms of cell viability in the RA treated group in comparison with the control. However, cytotoxic effects were visible at 607 µg/mL, regardless of the presence of ciguatoxin. In complement to the MTT assay, the neutral red and LDH assays were employed and, in both methods, the concentration of RA required to significantly inhibit the cytotoxicity caused by ciguatoxin was 121 µg/mL [54]. The results from LEE *et al.* [15] study demonstrated neuroprotection of RA in SH-SY5Y cells; the compound was able to attenuate apoptotic cell death and also stimulate the heme oxygenase-1, an inducible enzyme in response to oxidative stress.

The central nervous system consumes high amounts of total oxygen, which is required for metabolic activities. High concentrations of polyunsaturated fatty acids and transition metals are also observed, and lower levels of endogenous antioxidant enzymes in neuronal cells makes them particularly susceptible to oxidative processes [24,55]. This latter may be implicated in the etiology and progression of many neurodegenerative disorders, such as schizophrenia, Parkinson's disease and Alzheimer's disease [56-60].

Even some molecules, like H₂O₂, are not free radicals; they are reported to generate free radicals through various chemical reactions in many cases, as with the Fenton reaction [61,62]. Hydrogen peroxide readily penetrates into cells and generates highly reactive hydroxyl radicals that can attack components, such as lipids, proteins and DNA, leading to cell oxidative damage [63]. Thus, the finding of substances which are able to inhibit free radicals and their precursor-cellular insults is extremely helpful, especially in cases where this oxidative damage is associated with the development of neurodegenerative diseases.

Conclusions

In the present investigation, we first report the identification and isolation of RA and CGA on *B. binervatum*. The high tolerance of stem cells against different concentrations of these compounds (100-500 μM) was observed, both by MTT and LDH assays. Also, the cytotoxic effect of H_2O_2 , as well as, the protective activity of CGA and RA were demonstrated, being findings further supported by staining specific cellular structures. The viability assay revealed that stem cells treated with CGA and RA (100 μM) were similar to the untreated control cells, even after exposure to H_2O_2 (1,400 μM), at a dose-dependent manner.

Treatment with RA prevented H_2O_2 -induced damage to stem cells and, in the absence of H_2O_2 , this compound was able to induce proliferation, increasing the number of viable cells. Therefore, CGA and particularly RA are shown to be potent candidates that could be studied for their therapeutic capacity and development as a preventive alternative for several human diseases, especially those related to the neurodegenerative process, the onset of which is related to oxidative damage caused by free radicals and their forerunners.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the Brazilian agencies (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and the Stem Cell Research Institute for their financial support and PhD scholarships. NM is thankful to the Fapergs/CAPES for the DOCFIX postdoctoral fellowship.

Conflict of Interest Statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- [1] Y. Cai, Q. Luo, M. Sun, H. Corke, Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer, *Life Sci* 74 (2004) 2157-2184.
- [2] R.C. Moran, Diversity, biogeography and floristics, in: T.A. Ranker, Haufler, C.H. (Ed.), *Biology and evolution of ferns and lycophytes.* , Cambridge University Press, Cambridge, 2008, pp. 417-461.
- [3] V.A.O. Dittrich, Salino, A., Blechnaceae, in: *Lista de Espécies da Flora do Brasil.* , Jardim Botânico do Rio de Janeiro., Rio de Janeiro, 2014.
- [4] M.N. Clifford, Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden., *J. Sci. Food Agric.* 79 (1999) 362-372.
- [5] Y. Kono, K. Kobayashi, S. Tagawa, K. Adachi, A. Ueda, Y. Sawa, H. Shibata, Antioxidant activity of polyphenolics in diets. Rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen, *Biochim Biophys Acta* 1335 (1997) 335-342.
- [6] Y. Nakajima, M. Shimazawa, S. Mishima, H. Hara, Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions, *Life Sci* 80 (2007) 370-377.
- [7] E.S. Cho, Y.J. Jang, M.K. Hwang, N.J. Kang, K.W. Lee, H.J. Lee, Attenuation of oxidative neuronal cell death by coffee phenolic phytochemicals, *Mutat Res* 661 (2009) 18-24.
- [8] J. Han, Y. Miyamae, H. Shigemori, H. Isoda, Neuroprotective effect of 3,5-di-O-caffeoylquinic acid on SH-SY5Y cells and senescence-accelerated-prone mice 8 through the up-regulation of phosphoglycerate kinase-1, *Neuroscience* 169 (2010) 1039-1045.
- [9] S.H. Kwon, H.K. Lee, J.A. Kim, S.I. Hong, H.C. Kim, T.H. Jo, Y.I. Park, C.K. Lee, Y.B. Kim, S.Y. Lee, C.G. Jang, Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice, *Eur J Pharmacol* 649 (2010) 210-217.
- [10] V. Cropley, R. Croft, B. Silber, C. Neale, A. Scholey, C. Stough, J. Schmitt, Does coffee enriched with chlorogenic acids improve mood and cognition after acute administration in healthy elderly? A pilot study, *Psychopharmacology (Berl)* 219 (2012) 737-749.
- [11] T. Namba, T. Matsuse, [A historical study of coffee in Japanese and Asian countries: focusing the medicinal uses in Asian traditional medicines], *Yakushigaku Zasshi* 37 (2002) 65-75.
- [12] A. Mubarak, C.P. Bondonno, A.H. Liu, M.J. Considine, L. Rich, E. Mas, K.D. Croft, J.M. Hodgson, Acute effects of chlorogenic acid on nitric oxide status, endothelial function, and blood pressure in healthy volunteers: a randomized trial, *J Agric Food Chem* 60

- (2012) 9130-9136.
- [13] L. Ho, M. Varghese, J. Wang, W. Zhao, F. Chen, L.A. Knable, M. Ferruzzi, G.M. Pasinetti, Dietary supplementation with decaffeinated green coffee improves diet-induced insulin resistance and brain energy metabolism in mice, *Nutr Neurosci* 15 (2012) 37-45.
- [14] M.L. Scarpati, Oriente, G., Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal rosmarinus off.). *Ric. Sci.* 28 (1958) 2329-2333.
- [15] H.J. Lee, H.S. Cho, E. Park, S. Kim, S.Y. Lee, C.S. Kim, d.K. Kim, S.J. Kim, H.S. Chun, Rosmarinic acid protects human dopaminergic neuronal cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis, *Toxicology* 250 (2008) 109-115.
- [16] D.L. McKay, J.B. Blumberg, A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.), *Phytother Res* 20 (2006) 619-633.
- [17] N. Erkan, Ayranci, G., Ayranci, E., Antioxidant activities of rosmariny extract, black seed essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. , *Food Chemistry* 110 (2008) 76-82.
- [18] S.S. Huang, R.L. Zheng, Rosmarinic acid inhibits angiogenesis and its mechanism of action in vitro, *Cancer Lett* 239 (2006) 271-280.
- [19] A.S. Torrão, C.C. Café-Mendes, C.C. Real, M.S. Hernandez, A.F. Ferreira, T.O. Santos, G.P. Chaves-Kirsten, C.H. Mazucanti, E.S. Ferro, C. Scavone, L.R. Britto, Different approaches, one target: understanding cellular mechanisms of Parkinson's and Alzheimer's diseases, *Rev Bras Psiquiatr* 34 Suppl 2 (2012) S194-205.
- [20] A. Abbott, Dementia: a problem for our age, *Nature* 475 (2011) S2-4.
- [21] A.H. Schapira, C.W. Olanow, Neuroprotection in Parkinson disease: mysteries, myths, and misconceptions, *JAMA* 291 (2004) 358-364.
- [22] C.J. Van der Schyf, W.J. Geldenhuys, M.B. Youdim, Multifunctional drugs with different CNS targets for neuropsychiatric disorders, *J Neurochem* 99 (2006) 1033-1048.
- [23] A.S. Kumar, Saif, S.A., Oothuman, P., Mustafa, M.I.A., Lipid peroxidation in chronic cerebral hypoperfusion-induced neurodegeneration in rats. , *Int. Med. J. Malaysia.* 10 (2011) 3-6.
- [24] K.J. Barnham, C.L. Masters, A.I. Bush, Neurodegenerative diseases and oxidative stress, *Nat Rev Drug Discov* 3 (2004) 205-214.
- [25] M. Garrido, Y. Tereshchenko, Z. Zhevtsova, G. Taschenberger, M. Bähr, S. Kügler, Glutathione depletion and overproduction both initiate degeneration of nigral dopaminergic neurons, *Acta Neuropathol* 121 (2011) 475-485.
- [26] G. Giordano, G. La Monaca, S. Annibali, A. Cicconetti, L. Ottolenghi, Stem cells from oral niches: a review, *Ann Stomatol (Roma)* 2 (2011) 3-8.
- [27] M.M. Kanafi, R. Pal, P.K. Gupta, Phenotypic and functional comparison of optimum culture conditions for upscaling of dental pulp stem cells, *Cell Biol Int* 37 (2013) 126-136.
- [28] A.M. Aguiar, Zych, J., Reus, T., Kuligovski, C., Moraes, E., Abud, A.P., Krieger, M.A., Goldberg, S., Correa, A., Stimamiglio, M.A., Dallagiovanna, B., Células-tronco adultas humanas para ensaios de citotoxicidade: uma alternativa aos ensaios animais. , in: S.A.C.e. Tecnológico., (Ed.), Rio de Janeiro, 2013.
- [29] M. Miura, S. Gronthos, M. Zhao, B. Lu, L.W. Fisher, P.G. Robey, S. Shi, SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 5807-

5812.

- [30] L. Bernardi, S.B. Luisi, R. Fernandes, T.P. Dalberto, L. Valentim, J.A. Bogo Chies, A.C. Medeiros Fossati, P. Pranke, The isolation of stem cells from human deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption, *J Endod* 37 (2011) 973-979.
- [31] G.L. Pardo Andreu, N. Maurmann, G.K. Reolon, C.B. de Farias, G. Schwartzmann, R. Delgado, R. Roesler, Mangiferin, a naturally occurring glucoxilxanthone improves long-term object recognition memory in rats, *Eur J Pharmacol* 635 (2010) 124-128.
- [32] M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop, E. Horwitz, Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy* 8 (2006) 315-317.
- [33] T. Iwashina, Matsumoto, S., Nishida, M., Nakaïke, T., New and rare flavonol glycosides from *Asplenium trichomanes-ramosum* as stable chemotaxonomic markers. , *Biochem. Syst. Ecol.* 23 (1995) 283-290.
- [34] I.M.C. Brighente, Dias, M., Verdi, L.G., Pizzolatti, M.G., Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species. , *Pharm. Biol.* 45 (2007) 156-161.
- [35] F.A. Imperato, New flavonoid, quercetin 3-O-(X"-acetyl-X"-cinnamoyl-glucoside) and a new fern constituent, quercetin 3-O-(glucosyl rhamnoside) from *Dryopteris villarii*. , *Am. Fern J.* 97 (2007) 124-126.
- [36] W. Fang, J.L. Ruan, Z. Wang, Y.L. Cai, [Studies on chemical constituents of *Arachniodes rhomboidea*], *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 33 (2008) 649-650.
- [37] L.H. Cazarolli, P. Folador, M.G. Pizzolatti, F.R. Mena Barreto Silva, Signaling pathways of kaempferol-3-neohesperidoside in glycogen synthesis in rat soleus muscle, *Biochimie* 91 (2009) 843-849.
- [38] B. Li, J.F. Zhu, Z.J. Zou, Y.Q. Yin, Z.B. Shen, [Studies on the chemical constituents of *Dryopteris fragrans*], *Zhong Yao Cai* 32 (2009) 1232-1233.
- [39] B.A. Bohm, Phenolic compounds in ferns - III. An examination of some ferns for caffeic acid derivatives. , *Phytochemistry* 7 (1968) 1825-1830.
- [40] E. Häusler, Petersen, M., Alfermann, A.W., Rosmarinsäure in *Blechnum*-Spezies., in: H.P. Haschke, Schnarrenberger, C., (Ed.), *Botanikertagung*. , Akademie Verlag, Berlin, 1992, pp. 507.
- [41] E. Szabo, Petersen, M., Alfermann, A.W., Occurrence of rosmarinic acid in *Blechnum* species., *Planta Med* 59 (2003).
- [42] M.N. Clifford, Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. , *J. Sci. Food Agric.* 80 (2000) 1033-1043.
- [43] M.R. Olthof, P.C. Hollman, M.B. Katan, Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans, *J Nutr* 131 (2001) 66-71.
- [44] K.L. Johnston, M.N. Clifford, L.M. Morgan, Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine, *Am J Clin Nutr* 78 (2003) 728-733.
- [45] C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, L. Jiménez, Polyphenols: food sources and bioavailability, *Am J Clin Nutr* 79 (2004) 727-747.
- [46] J.V. Hidgon, Frei, B., Coffee and health: A review of recent human research. , *Crit. Rev.*

- Food Sci. Nutr. 46 (2006) 101-123.
- [47] M. Petersen, M.S. Simmonds, Rosmarinic acid, *Phytochemistry* 62 (2003) 121-125.
- [48] G. Fotakis, J.A. Timbrell, In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride, *Toxicol Lett* 160 (2006) 171-177.
- [49] J. van Meerloo, G.J. Kaspers, J. Cloos, Cell sensitivity assays: the MTT assay, *Methods Mol Biol* 731 (2011) 237-245.
- [50] J. Kim, S. Lee, J. Shim, H.W. Kim, Y.J. Jang, H. Yang, J. Park, S.H. Choi, J.H. Yoon, K.W. Lee, H.J. Lee, Caffeinated coffee, decaffeinated coffee, and the phenolic phytochemical chlorogenic acid up-regulate NQO1 expression and prevent H₂O₂-induced apoptosis in primary cortical neurons, *Neurochem Int* 60 (2012) 466-474.
- [51] P. Costa, Sarmiento, B., Gonçalves, S., Romano, A., Protective effects of *Lavandula viridis* L'Hér extracts and rosmarinic acid against H₂O₂-induced oxidative damage in A172 human astrocyte cell line. , *Ind. Crops Prod.* 50 (2013) 361-365.
- [52] H. Ghaffari, M. Venkataramana, B. Jalali Ghassam, S. Chandra Nayaka, A. Nataraju, N.P. Geetha, H.S. Prakash, Rosmarinic acid mediated neuroprotective effects against H₂O₂-induced neuronal cell damage in N2A cells, *Life Sci* 113 (2014) 7-13.
- [53] E.A. Alves, Guimarães, A.C.R., Cultivo celular, in: E.M. Molinaro, Caputo, L.F.G., Amendoeira, M.R.R., (Ed.), *Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde.*, EPSJV; IOC, Rio de Janeiro, 2010, pp. 290.
- [54] F. Rossi, V. Jullian, R. Pawlowicz, S. Kumar-Roiné, M. Haddad, H.T. Darius, N. Gaertner-Mazouni, M. Chinain, D. Laurent, Protective effect of *Heliotropium foertherianum* (Boraginaceae) folk remedy and its active compound, rosmarinic acid, against a Pacific ciguatoxin, *J Ethnopharmacol* 143 (2012) 33-40.
- [55] B. Halliwell, Reactive oxygen species and the central nervous system, *J Neurochem* 59 (1992) 1609-1623.
- [56] G. Perry, A.D. Cash, M.A. Smith, Alzheimer Disease and Oxidative Stress, *J Biomed Biotechnol* 2 (2002) 120-123.
- [57] P. Jenner, Oxidative stress in Parkinson's disease, *Ann Neurol* 53 Suppl 3 (2003) S26-36; discussion S36-28.
- [58] M. Bošković, T. Vovk, B. Kores Plesničar, I. Grabnar, Oxidative stress in schizophrenia, *Curr Neuropharmacol* 9 (2011) 301-312.
- [59] O. Hwang, Role of oxidative stress in Parkinson's disease, *Exp Neurobiol* 22 (2013) 11-17.
- [60] Y. Zhao, B. Zhao, Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease, *Oxid Med Cell Longev* 2013 (2013) 316523.
- [61] Y. Gilgun-Sherki, E. Melamed, D. Offen, Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier, *Neuropharmacology* 40 (2001) 959-975.
- [62] J. Prousek, Fenton chemistry in biology and medicine. , *Pure Appl. Chem* 79 (2007) 2325-2338.
- [63] N.A. Denisova, I. Cantuti-Castelvetri, W.N. Hassan, K.E. Paulson, J.A. Joseph, Role of membrane lipids in regulation of vulnerability to oxidative stress in PC12 cells: implication

- for aging, *Free Radic Biol Med* 30 (2001) 671-678.
- [64] M. La Noce, F. Paino, A. Spina, P. Naddeo, R. Montella, V. Desiderio, A. De Rosa, G. Papaccio, V. Tirino, L. Laino, Dental pulp stem cells: state of the art and suggestions for a true translation of research into therapy, *J Dent* 42 (2014) 761-768.
- [65] J. Liu, F. Yu, Y. Sun, B. Jiang, W. Zhang, J. Yang, G.T. Xu, A. Liang, S. Liu, Concise reviews: Characteristics and potential applications of human dental tissue-derived mesenchymal stem cells, *Stem Cells* 33 (2015) 627-638.
- [66] S. Yarak, Okamoto, O.K., Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas., *Anais Brasileiros de Dermatologia* 85 (2010) 647-656.

Supplementary Material**Table S1.** Linear gradient system employed in HPLC analysis.

Time (minutes)	A* (%)	B* (%)
0	95	5
45	65	35
46	50	50
47	0	100
50	0	100

*Eluent A was composed of ultrapure water (acidified with 0.1% formic acid in analytical HPLC) and B was composed of acetonitrile (acidified in analytical HPLC).

8. DISCUSSÃO GERAL

Evidências acumuladas sugerem que a etiopatogenia de doenças neurodegenerativas é extremamente complexa, com uma variedade de alvos terapêuticos potenciais presentes em diversas vias bioquímicas deletérias. Assim, para essas doenças, é pouco provável que a cascata etiopatológica que culmina na iniciação e progressão das desordens será atenuada por drogas que atuem sobre uma única via ou alvo relacionado. A busca de compostos multi-ligantes inovadores pode oferecer resultados mais promissores no tratamento dessas patologias, explorando novos paradigmas que procuram combinar potenciadores cognitivos e reabilitadores neurológicos (VAN DER SCHYF; GELDENHUYS, 2011).

Crescente número de estudos com plantas medicinais estão sendo desenvolvidos, devido à capacidade dessas espécies de produzir moléculas com atividade terapêutica, utilizadas para diversos fins medicinais (SOUTO-MAIOR *et al.*, 2011). Muitas atividades biológicas atribuídas às plantas foram comprovadas, tanto por sinergismo de compostos presentes em seus derivados, quanto por avaliação das substâncias isoladas dos vegetais. Dentre essas propriedades destaca-se a atuação no SNC, apresentando alternativas para o tratamento e/ou prevenção de transtornos psicossociais como ansiedade e depressão e de desordens neurodegenerativas (FAUSTINO *et al.*, 2010; ALMEIDA *et al.*, 2012; LOPES *et al.*, 2012).

Considerando a imensa biodiversidade brasileira, a busca por compostos multi-ativos a partir de plantas da flora nativa é um ponto-chave no planejamento de novas entidades farmacologicamente ativas e uma alternativa viável para a pesquisa de produtos naturais. PASSOS e colaboradores (2013) avaliaram a capacidade de 13 alcaloides isolados de espécies de *Psychotria* do Brasil, quanto à sua interação com múltiplos alvos relacionados a doenças neurodegenerativas, incluindo as enzimas AChE, BChE, MAO-A e MAO-B, através de modelos *in vitro* e computacionais. Os compostos mais ativos, incluindo prunifoleína, 14-oxoprunifoleína, angustina e valesiacotamina, foram capazes de atuar nos alvos testados, com CI_{50} em escala micromolar, apresentando diferentes mecanismos de inibição e modos de ligação às enzimas.

Polifenóis de origem vegetal já foram estudados quanto às suas atividades multifuncionais, atuando como quelantes de ferro, sequestradores de radicais livres, agentes anti-inflamatórios e neuroprotetores (GIACALONE *et al.*, 2011; CHOI *et al.*, 2012; MYTHRI; BHARATH, 2012). Um exemplo é a epigallocatequina-3-galato, constituinte majoritário do extrato de chá verde, a qual desempenha papel importante na prevenção da neurodegeneração em uma variedade de modelos celulares e animais (MANDEL *et al.*, 2005). Seus efeitos são mediados através de múltiplas vias, como demonstrado em recentes estudos *in vitro* e *in vivo*, sendo capaz de induzir significativa redução nos níveis de proteína β -amiloide e seus depósitos, quelar ferro livre intracelular e proteger células neuronais frente à apoptose induzida por H_2O_2 (HARVEY *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2015).

O destacado papel da química de produtos naturais nos processos inovadores para descoberta de fármacos é evidenciado, claramente, na nova geração de estratégias focadas na química e biologia. Métodos utilizando ferramentas computacionais estão integrados ao descobrimento e planejamento de novas entidades químicas com potencial terapêutico, aliando estudos *in silico* a ensaios, principalmente, *in vitro* capazes de gerar informações preliminares, guias para identificação de metabólitos-alvo. Neste tema, destaca-se o crescimento da aplicação de métodos teóricos para representar ou mimetizar o comportamento e interação de moléculas e alvos terapêuticos (SLIWOSKI *et al.*, 2014).

A triagem virtual de compostos tornou-se uma tecnologia padrão nos modernos estudos para desenvolvimento de novos fármacos. Para o estudo das interações entre ligantes e macromoléculas, como enzimas, DNA e receptores proteicos, o método *in silico* mais utilizado é o de *docking* molecular. Este método consiste basicamente na predição do modo de ligação de uma pequena molécula ligante (inibidor ou substrato) na região de ligação (sítio ativo) de um alvo molecular, além da quantificação da afinidade de ligação entre o receptor e o ligante (SEELIGER; GROOT, 2010).

Devido às potencialidades dos temas explorados, nosso grupo de pesquisa tem desenvolvido projetos no âmbito da investigação de produtos naturais ativos frente a alvos

relacionados a doenças neurodegenerativas, bem como estudo da biodiversidade brasileira, incluindo a prospecção fitoquímica de samambaias. Neste sentido, o presente trabalho objetivou a identificação e isolamento do(s) composto(s) extraído(s) de três espécies de samambaias: *Blechnum binervatum*, *B. brasiliense* e *B. occidentale*, coletadas na região sul do Brasil, com potenciais atividades biológicas associadas à etiologia de doenças neurodegenerativas, através de estudos *in vitro* e *in silico*, na busca de substâncias multifuncionais, conforme proposta adaptada de NOVAROLI e colaboradores (2005).

Os extratos brutos, obtidos por maceração em metanol das frondes secas das plantas, foram evaporados e uma porção dissolvida em água sendo, posteriormente, submetida à partição em solventes com diferentes polaridades (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol), fornecendo frações enriquecidas. Tanto os extratos brutos, quanto às frações foram avaliados quanto às suas atividades antioxidantes, bem como atividades de inibição sobre as enzimas colinesterases e MAO, além de ensaios de toxicidade e viabilidade celular.

Para a avaliação da capacidade antioxidante de produtos naturais, a literatura relata diversos métodos, incluindo o ensaio de peroxidação lipídica, potencial antioxidante total (TRAP), capacidade redutora de ferro, métodos colorimétricos e fotométricos utilizando β -caroteno, ABTS e DPPH. Métodos para avaliação da capacidade estabilizadora dos radicais hidroxila, peroxila, óxido nítrico também são utilizados, dentre outros (MAGALHÃES *et al.*, 2008; LIU, 2010; NIKI, 2010; OZYUREK *et al.*, 2012). Essas metodologias possuem um objetivo comum, consistindo na avaliação da habilidade desses produtos em reduzir radicais livres, promovendo sua estabilização.

Neste trabalho foram avaliadas a capacidade sequestradora de espécies reativas de oxigênio (hidroxila) e nitrogênio (óxido nítrico), bem como a inibição da lipoperoxidação. Frente aos radicais hidroxila, a fração mais ativa na sua estabilização foi a acetato de etila de *B. brasiliense*, com CI_{50} igual a 12,5 $\mu\text{g/mL}$, seguida das frações diclorometano e hexano da mesma planta. O extrato bruto de *B. brasiliense* apresentou maior estabilização

do radical, quando comparado ao derivado das outras espécies. No ensaio frente ao óxido nítrico, as frações acetato de etila de *B. binervatum*, *B. occidentale* e *B. brasiliense* exibiram maior potencial de estabilização do radical, nesta ordem. Em geral, as amostras avaliadas apresentaram atividades menos pronunciadas frente à esta espécie reativa de nitrogênio. Nos experimentos de TBARS, método para avaliação da capacidade de amostras inibirem a lipoperoxidação em homogonatos de cérebros de ratos, novamente, as frações acetato de etila de *B. brasiliense* e *B. binervatum* exibiram pronunciadas propriedades (CI₅₀: 10,36 e 27,55 µg/mL, respectivamente).

Considerando que a MAO é uma das enzimas-chave no desenvolvimento de novos alvos para combate a neuropatologias, este estudo avaliou também, a atividade dos extratos e frações de samambaias frente a esta enzima, em modelo *in vitro*. Todas as amostras foram mais ativas frente à MAO-A. Em geral, as frações acetato de etila exibiram maior potencial de inibição, comparadas às outras amostras, sendo *B. brasiliense* mais ativa (CI₅₀: 28,62 µg/mL). As frações diclorometano das três espécies também exibiram forte inibição, assim como o extrato bruto de *B. brasiliense*. Frente à MAO-B, os valores de CI₅₀ ficaram entre 101 e >500 µg/mL, sendo o menor valor obtido para a fração acetato de etila de *B. brasiliense*. Frente às enzimas AChE e BChE, todos extratos brutos e frações apresentaram CI₅₀>300 µg/mL, sendo considerados inativos na inibição das colinesterases.

Ensaio de liberação da enzima LDH foi realizado utilizando células polimorfonucleares de roedores, sendo os extratos e frações avaliados na concentração de 1 mg/mL, dose mais alta empregada nos ensaios *in vitro* acima mencionados. Essa metodologia avalia possíveis danos à membrana das células, causado pelas amostras adicionadas ao meio. Ausência de toxicidade foi observada, não sendo observados danos à membrana das células, sendo os resultados comparáveis ao controle negativo (sem tratamento).

Nosso trabalho também objetivou avaliar a toxicidade sobre células-tronco humanas provenientes de dentes decíduos esfoliados, possibilitando a obtenção de células

com mínimo dano invasivo ao doador, uma vez que os dentes são descartados após o processo natural de substituição (MIURA *et al.*, 2003). A capacidade de diferenciação em vários tipos celulares e a alta capacidade proliferativa tornam essas células fonte atrativa para utilização em pesquisas na área de engenharia tecidual e investigativa (GIORDANO *et al.*, 2011, KANAFI *et al.*, 2013). Aliado a esses fatores, o uso de SHED é de extrema relevância em estudos de toxicologia, por exemplo, já que possibilita a utilização de modelo com células humanas, possivelmente mais sensível para predição de toxicidade, e contribui para a redução no número de animais utilizados nos testes (AGUIAR *et al.*, 2013).

Após caracterização das células, conforme critérios do ISCT, foram avaliados os extratos brutos e frações diclorometano e acetato de etila, uma vez que estas últimas apresentaram melhores resultados nos ensaios antioxidantes e de inibição enzimática, quanto ao seu potencial tóxico sobre as células-tronco. O ensaio de MTT realizado avalia a conversão do sal de tetrazólio solúvel em cristais de formazana insolúveis, detectando a atividade mitocondrial da enzima succinato desidrogenase em células viáveis (VAN MEERLOO *et al.*, 2011). Através dessa metodologia observou-se que, nas concentrações de 100 a 500 µg/mL, as amostras não afetaram a viabilidade das células, sendo os resultados comparáveis ao controle não-tratado. Ainda, corroborando o observado, após avaliação pelo método de LDH, ausência de efeitos tóxicos foi demonstrada sobre células-tronco. Algumas amostras, nas concentrações mais baixas, exibiram tendência à proliferação celular.

Assim, os resultados dos ensaios biológicos demonstraram o potencial dessas espécies de samambaias, especialmente a fração acetato de etila de *B. brasiliense*, a qual apresentou os menores valores de CI_{50} nos testes e ausência de citotoxicidade, frente à enzimas e alvos relacionados a DP, uma vez que todas amostras foram inativas frente às colinesterases. A literatura reporta atividades antioxidante e antimicrobiana para *B. brasiliense* e, atividades anti-inflamatória e antinociceptiva para *B. occidentale*. Contudo, a prospecção fitoquímica dessas espécies ainda não havia sido realizada até o momento.

Neste trabalho foi realizada a análise química por CLAE-DAD-EM dos extratos brutos das três espécies de *Blechnum*, bem como análises por CG-EM foram empregadas para identificação dos compostos presentes nas frações diclorometano e hexano das samambaias.

Pelas técnicas hifenadas empregadas, observou-se que os perfis dos extratos brutos das plantas foram distintos, apesar de apresentarem algumas regiões similares entre si. *B. binervatum* demonstrou extrato mais complexo, com 16 picos detectados, seguida de *B. occidentale* com 10 picos verificados no cromatograma. Para *B. brasiliense*, 8 picos foram detectados. A maioria dos compostos identificados pertence ao grupo dos ácidos hidroxicinâmicos sendo caracterizados, também, dois flavonoides glicosilados. Este é o primeiro relato de análise química das espécies *B. binervatum* e *B. occidentale*. Algumas das moléculas identificadas já haviam sido relatadas em espécies do gênero e para outras, sua caracterização é inédita em *Blechnum*.

Isômeros dos ácidos cafeoil quínico, também denominados ácidos clorogênicos, e cafeoil chiquímico foram identificados nas três espécies de *Blechnum*, variando as suas proporções entre os extratos. O ácido 4-*O*-cafeoil quínico apresentou-se mais abundante em *B. binervatum*, enquanto que o isômero 5-*O*-cafeoil quínico foi um dos majoritários em *B. brasiliense* e *B. occidentale*. Isômeros do ácido cafeoil chiquímico também foram caracterizados nos extratos das três espécies, sendo componente majoritário de *B. occidentale* e um dos mais abundantes de *B. binervatum*.

Ácido salvianólico F foi identificado nos cromatogramas das espécies *B. binervatum* e *B. occidentale*, e ácido isosalvianólico A foi caracterizado apenas em *B. binervatum*, bem como, ácido cafeico glicosilado e ácido rosmarínico sulfatado. Isômeros do ácido brainico foram verificados em *B. binervatum* e *B. occidentale*, sendo um desses isômeros o composto majoritário do extrato de *B. binervatum*, para o qual foi proposta a fragmentação por EM/EM a partir do íon pseudomolecular negativo (m/z 513), uma vez que não há dados na literatura quanto à sua identificação por espectrometria de massas. O ácido rosmarínico foi caracterizado em *B. binervatum* e *B. brasiliense*, sendo abundante

nesta última espécie. Além dos ácidos hidroxicinâmicos, quercetina 3-*O*-glicosídeo foi identificada no extrato de *B. binervatum* e vicenina-2 (derivado C-glicosilado da apigenina) no extrato de *B. occidentale*. Essa multiplicidade de polifenóis incentivou a identificação de bioatividades uma vez que este grupo apresenta grande potencial farmacológico.

As análises por CG-EM possibilitaram a caracterização química das frações diclorometano e hexano das espécies investigadas neste estudo, as quais também apresentaram interessantes atividades antioxidantes e inibição enzimática. O composto majoritário das três frações diclorometano o diterpeno neofitadieno (26,06-37,36%), seguido do ácido palmítico (13,42-20,95%) e β -sitosterol (9,76-20,11%). Essas frações também apresentaram ácido linolênico e isofitol, além de outros compostos em menor proporção. Foi observada maior quantidade de compostos oxigenados nas frações diclorometano de *B. binervatum* e *B. brasiliense*. Já para *B. occidentale*, as proporções entre compostos oxigenados e hidrogenados foram similares.

As frações hexano demonstraram-se mais complexas em relação às primeiras, sendo o neoftadieno composto majoritário em *B. occidentale* (50,77%) e *B. binervatum* (20,92%). Para *B. brasiliense*, β -sitosterol foi o componente majoritário da fração hexano (20,70%), seguido de ácido palmítico, neoftadieno, ácido linoleico e outras substâncias em menor proporção. Compostos hidrogenados corresponderam a 60,51% da composição da fração hexano de *B. occidentale*, que apresentou, além do composto majoritário, isofitol, 1-octadecino, ácido palmítico, dentre outros em sua composição. Para *B. binervatum* e *B. brasiliense*, compostos oxigenados perfizeram 63,05 e 69,38%, respectivamente, das frações hexano. *B. binervatum* apresentou ainda, ácido palmítico, ácido linolênico e β -sitosterol, além dos compostos em menor proporção.

A partir dos resultados das avaliações biológicas e químicas dos extratos e frações de espécies de *Blechnum*, por isolamento bioguiado foi isolada a substância caracterizada como ácido rosmarínico da fração acetato de etila de *B. brasiliense*. Para confirmação das potencialidades detectadas preliminarmente, este composto foi avaliado frente aos alvos

selecionados, uma vez que a fração de origem demonstrou as mais promissoras atividades antioxidantes e inibição enzimática. O isolamento do composto foi realizado por CLAE preparativa e identificado por CLAE-DAD-EM/EM. A estrutura foi confirmada pela comparação com substância de referência. O ácido rosmarínico demonstrou potencial multifuncional, apresentando atividades antioxidantes e habilidade de inibir, principalmente, as enzimas MAO-A e COMT.

Frente aos radicais livres ensaiados, o composto foi capaz de estabilizá-los, com valores de CI_{50} iguais a 29,4 e 140 μM , respectivamente para radicais hidroxila e óxido nítrico. A lipoperoxidação foi fortemente inibida pelo ácido rosmarínico (CI_{50} : 19,6 μM). Quanto à atividade sobre enzimas envolvidas nos processos neurodegenerativos, o composto foi capaz de atuar sobre MAO-A (CI_{50} : 50,1 μM) e MAO-B (CI_{50} : 184,6 μM), sendo mais seletivo e ativo frente à primeira isoforma da enzima (índice de seletividade: 3,7); ainda, inibiu de maneira pronunciada a COMT (CI_{50} : 26,7 μM). No estudo tempo-dependente realizado, o ácido rosmarínico demonstrou inibição da MAO-A não-dependente do tempo de incubação, sugerindo mecanismo reversível de inibição, no qual a enzima permanece inalterada nos diferentes tempos do estudo. O composto não demonstrou toxicidade frente às células de roedores, nas concentrações de 0,5 e 5 mM, sendo os resultados comparáveis ao controle não-tratado.

A comparação dos valores de CI_{50} da substância isolada e da fração acetato de etila de *B. brasiliense* demonstra que o ácido rosmarínico é mais ativo isoladamente, sendo o responsável pelas atividades observadas para a fração da qual foi obtido. Ainda, em relação aos outros compostos ensaiados, observa-se que o ácido rosmarínico é o mais ativo nos modelos utilizados neste trabalho. Assim, o composto pode ser considerado produto natural modelo de moléculas que atuem em mais de um alvo relacionado à neurodegeneração evidenciada na DP.

Para compreensão dos modos de ligação do composto aos sítios ativos das enzimas-alvo, foram estudadas as interações entre o ácido rosmarínico, MAO-A e COMT, através dos experimentos de *docking* molecular. Primeiramente, frente à MAO-A,

observou-se que a hidroxila na posição *para* (4-OH) do anel da porção ácido cafeico (Figura 1) doa ligação de hidrogênio para o oxigênio carbonílico do resíduo glicina (G110), enquanto que a hidroxila na posição *meta* (3-OH) aceita ligação de hidrogênio do grupamento amida da valina (V210). A hidroxila na posição *para* do anel da porção ácido 3,4-dihidróxi fenil lático (4'-OH) realiza ligação de hidrogênio com a hidroxila da tirosina (Y444). Além disso, interações hidrofóbicas com resíduos tirosina, leucina, valina, glutamina, isoleucina e fenilalanina (Y69, L97, V210, Q215, I325, I335, F352 e Y407) contribuem para a estabilização da ligação proteína-ligante.

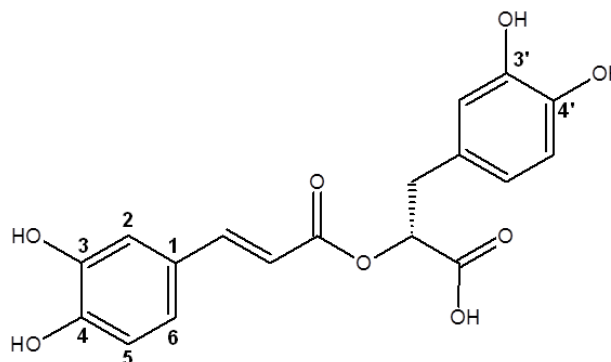


Figura 1. Estrutura do ácido rosmarínico isolado de *B. brasiliense* com indicação numérica dos átomos cujos ligantes realizam interações com enzimas-chave do processo neurodegenerativo.

O ácido clorogênico também foi ensaiado quanto às suas interações com a MAO-A, sendo observado que a hidroxila na posição *para* do anel da porção ácido cafeico doa ligação de hidrogênio para o oxigênio carbonílico da alanina (A111). A hidroxila da porção ácido quínico realiza ligações de hidrogênio com molécula de água presente no sítio ativo da enzima (Wat-718). Por fim, interações hidrofóbicas com resíduos leucina, valina e isoleucina também contribuem para a interação do composto com a MAO-A (L97, V210, I325, I335 e L337).

Estrutura cristalográfica da COMT humana, ligada à *S*-adenosil-metionina e 3,5-dinitrocatecol, foi selecionada para os estudos de *docking* dos ácidos rosmarínico, clorogênico e cafeico, sendo estes compostos capazes de se ligarem ao sítio da COMT

ocupado pelo dinitrocatecol. O grupamento catecol da porção ácido 3,4-dihidroxicinâmico dessas moléculas, bem como o catecol da porção ácido 3,4-dihidróxi fenil láctico do ácido rosmarínico são capazes de coordenarem-se com o íon magnésio (Mg^{+2}) no sítio ativo da enzima. O ácido rosmarínico aceita ligação de hidrogênio do grupo -SH do resíduo cisteína da enzima (C173). Além disso, interações hidrofóbicas com triptofano, metionina, prolina e leucina (W38, M40, P174 e L178) ajudam na estabilização da interação proteína-ligante. Já o ácido clorogênico realiza ligações entre o grupo carboxila da porção ácido quínico e a guanidina do resíduo arginina (R201). Esses ácidos hidroxicinâmicos apresentaram melhores perfis para a inibição da COMT comparados ao ácido cafeico.

De acordo com os resultados dos métodos *in vitro* e *in silico* empregados neste trabalho, foi possível evidenciar o potencial do ácido rosmarínico como candidato multifuncional para tratamento da DP. Este composto apresenta significativa atividade antioxidante e propriedades neuroprotetoras já relatadas, sendo capaz de reduzir inúmeros eventos deletérios para o SNC, como a formação de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica, toxicidade induzida por agentes danosos e fragmentação do DNA (PETERSEN; SIMMONDS, 2003; IZZO; CAPASSO, 2007; GU *et al.*, 2009; JI; ZHANG, 2008; TEPE, 2008; SASAKI *et al.*, 2013). Possui, ainda, capacidade antidepressiva (TAKEDA *et al.*, 2002; ITO *et al.*, 2008) e ansiolítica (PEREIRA *et al.*, 2005).

Este ácido fenólico foi capaz de inibir, de modo seletivo, a enzima MAO-A. Inibidores desta isoforma da MAO podem ser considerados moléculas-chave no desenvolvimento de fármacos para tratamento de diversas desordens psiquiátricas e neurológicas, incluindo doenças neurodegenerativas e enfermidades associadas, como a depressão e a ansiedade (YOU DIM; BAKHLE, 2006; GOLDBERG *et al.*, 2014). Cabe ressaltar, ainda, o papel importante da COMT, enzima envolvida na inativação de catecóis e catecolaminas, incluindo a dopamina, epinefrina e norepinefrina, relacionada a várias patologias, como a depressão, DP, esquizofrenia transtornos bipolares e hiperatividade,

dentre outras (TOM; CUMMINGS, 1998; SHIFMAN *et al.*, 2004; CHEUK; WONG, 2006; BONIFÁCIO *et al.*, 2007; LEWANDOWSKI, 2007). Assim, os resultados deste trabalho suportam a hipótese do ácido rosmarínico como inibidor da degradação das catecolaminas, via atividade sobre a MAO e a COMT.

Candidatos com potenciais atividades biológicas devem ser avaliados quanto à sua toxicidade, a fim de possibilitar o desenvolvimento de fármacos com uso racional e seguro. Assim, o presente trabalho realizou o isolamento dos ácidos rosmarínico e clorogênico de extrato das frondes de *B. binervatum*, avaliando-os quanto aos seus efeitos citotóxicos e capacidade de manutenção da viabilidade de células-tronco obtidas de dentes decíduos humanos, através dos ensaios de MTT e LDH, nas concentrações de 100 a 500 μM . Os ácidos hidroxicinâmicos foram identificados por CLAE-DAD-EM/EM, pela comparação dos seus perfis com os de substâncias de referência e isolados por CLAE-UV preparativa.

O isolamento celular ocorreu após tratamento da polpa de dentes decíduos em meios de cultura específicos. As células isoladas foram cultivadas a 37°C, em atmosfera úmida (CO₂ 5%), até atingirem 90% de confluência. A caracterização das mesmas se deu segundo critérios do ISCT, observando-se aderência ao plástico, morfologia característica de células-tronco mesenquimais e capacidade de diferenciação em osteoblastos, condroblastos e adipócitos. Nas concentrações avaliadas, ambos os ácidos hidroxicinâmicos demonstraram viabilidade celular e nenhum efeito tóxico foi observado nas células-tronco ensaiadas. O ácido rosmarínico foi capaz, ainda, de induzir proliferação celular na concentração de 100 μM pelo ensaio de LDH e, em todas as concentrações, pelo método de MTT.

Considerando que a desaminação oxidativa de aminas biogênicas catalisada pela MAO resulta na produção de H₂O₂ e de aldeídos, produtos que podem provocar danos celulares (FINBERG *et al.*, 2014), foi proposta a avaliação da capacidade citoprotetora dos ácidos rosmarínico e clorogênico sobre danos induzidos pela espécie reativa de oxigênio (H₂O₂), em células-tronco. Primeiramente, H₂O₂ foi ensaiado nas concentrações

de 200 a 2200 μM para estabelecimento da concentração indutora de danos celulares, observando-se que a 1400 μM , o agente induziu >50% de citotoxicidade, sendo verificada redução significativa de células viáveis nas fotografias de microscopia por fluorescência. A partir desses resultados, foram realizados os experimentos de MTT, nos quais as células-tronco foram incubadas, por 24 horas, com meio de cultura (controle não-tratado), com H_2O_2 1400 μM (controle de dano) e com os ácidos hidroxicinâmicos (10-100 μM) na presença e ausência de H_2O_2 (1400 μM).

Os ácidos hidroxicinâmicos foram capazes de prevenir o dano celular provocado por H_2O_2 , inclusive nas menores concentrações avaliadas. A 100 μM , na presença de H_2O_2 , foi observada total viabilidade celular, sendo os resultados comparáveis ao controle não-tratado e corroborados pelas imagens de microscopia, nas quais núcleo e citoplasma celulares foram corados e visualizados. O ácido rosmarínico apresentou melhores respostas quando comparado ao ácido clorogênico, sendo mais efetivo na inibição dos danos induzidos por H_2O_2 , uma vez que os resultados para o ácido clorogênico a 100 μM , na ausência de H_2O_2 foram comparáveis aos do ácido rosmarínico na mesma concentração, porém na presença de H_2O_2 .

Assim, esses compostos naturais demonstraram potente proteção celular contra injúria oxidativa, sendo considerados úteis na manutenção da viabilidade de células submetidas a danos causados por agentes tóxicos, sobretudo devido às suas potenciais propriedades antioxidantes, estabilizando moléculas altamente reativas e prejudiciais ao organismo. O uso de células-tronco em estudos *in vitro* é de grande valia, uma vez que essas são capazes de se diferenciarem em inúmeros tipos celulares, incluindo neurônios (YARAK; OKAMOTO, 2010). A manutenção da sua viabilidade, especialmente na presença de agentes danosos, pode fornecer indicativos da ação protetora de compostos frente a células neuronais.

Alguns autores relataram o efeito do ácido clorogênico na inibição da morte neuronal por apoptose, induzida pelo H_2O_2 (KIM *et al.*, 2012), bem como sua capacidade protetora celular contra neurotoxicidade induzida por estresse oxidativo e redução da

lipoperoxidação em estruturas cerebrais (NAKAJIMA *et al.*, 2007). Este composto também foi capaz de reduzir a fragmentação do DNA promovida pelo H₂O₂, evidenciando-se menor proporção de espécies reativas de oxigênio nas células tratadas com ácido clorogênico (CHO *et al.*, 2009).

Para o ácido rosmarínico, significativa atividade antioxidante já foi relatada (GU *et al.*, 2009), sendo esta responsável pelos efeitos citoprotetores da substância (CHKHIKVISHVILI *et al.*, 2013). O composto foi capaz de reverter a injúria celular induzida pelo H₂O₂, devido às suas atividades antiapoptótica e antioxidante (GAO *et al.*, 2005), bem como demonstrou capacidade protetora frente a este agente danoso, em linhagem de células dopaminérgicas humanas (SH-SY5Y), em células humanas de astrócitos A172 e em linhagem celular N2A de neuroblastoma de ratos, impedindo a morte dessas células (LEE *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2013; GHAFARI *et al.*, 2014).

A DP é caracterizada pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos da região da substância negra do cérebro, sendo que alguns dos neurônios remanescentes contêm inclusões filamentosas, conhecidas como corpos de Lewy. Estudos demonstraram que o ácido rosmarínico possui capacidade antifibrillogênica bem como potencial antioxidante, sendo capaz de reduzir a formação dos agregados que dão origem aos corpos de Lewy (ONO; YAMADA, 2006). DU e colaboradores (2010) investigaram o efeito protetor do ácido rosmarínico sobre danos causados por 1-metil-4-fenilpiridina (MPP⁺) em células dopaminérgicas. O tratamento com MPP⁺ reduziu a viabilidade das células e o conteúdo de dopamina, bem como causou alterações morfológicas apoptóticas. O pré-tratamento com a substância reparou a disfunção mitocondrial e a apoptose celular induzida por MPP⁺.

Ainda, o ácido rosmarínico apresentou efeito neuroprotetor, avaliado através de modelo *in vivo* de DP, induzida por 6-hidróxi-dopamina (6-OHDA) em ratos, atuando em neurônios dopaminérgicos, através das propriedades antioxidante e antiapoptótica, indicando seu potencial no tratamento dessa desordem neurodegenerativa (REN *et al.*, 2009). Adicionalmente, estudo mais recentes revelou que a neuroreparação induzida pela

substância, neste mesmo modelo *in vivo*, resulta da restauração dos níveis de dopamina e de neurônios imunorreativos após tratamento com 6-OHDA (WANG *et al.*, 2012).

Os efeitos neuroprotetores evidenciados foram, na maioria dos estudos, associados ao potencial antioxidante dos compostos estudados. Para os ácidos hidroxicinâmicos, a pronunciada capacidade antioxidante está relacionada à sua estrutura química, na qual duas características são importantes: 1) a presença do grupamento hidroxila no anel aromático, que pode produzir um intermediário fenóxi radicalar, o qual termina a reação em cadeia de radicais livres (GRAF, 1992; BARONE *et al.*, 2009) e 2) a cadeia lateral insaturada, cuja ligação dupla atua na estabilização dos radicais fenoxila, via aumento do deslocamento de elétrons (RAZZAGHI-ASL *et al.*, 2013). A presença do grupo catecol também é de significativa importância para a atividade antioxidante (WU *et al.*, 2007).

Em resumo, os resultados obtidos indicam que os derivados das espécies *Blechnum* apresentam atividade antioxidante e inibitória sobre as MAOs, sendo que a fração acetato de etila de *B. brasiliense* demonstrou melhores efeitos. Os estudos químicos forneceram informações sobre a constituição dos extratos brutos e frações não-polares de *Blechnum*, possibilitando a comparação entre as amostras e a identificação de compostos inéditos para este gênero. O isolamento do ácido rosmarínico da fração mais ativa foi realizado para avaliação desse composto sobre os alvos selecionados neste estudo.

Os achados evidenciaram a capacidade da substância em estabilizar radicais livres, inibir lipoperoxidação e as enzimas MAO-A e COMT, através de modelos *in vitro*. Frente à MAO-A, observou-se efeito não dependente do tempo de incubação, sugerindo modo reversível de inibição enzimática. Foi possível, ainda, a compreensão das interações entre a molécula e as enzimas, pelos estudos *in silico*. A capacidade citoprotetora do ácido rosmarínico e do ácido clorogênico, isolados de *B. binervatum*, também foi evidenciada, sendo ambos capazes de inibir danos oxidativos causados pelo H₂O₂ em células-tronco, apresentando melhores resultados para o ácido rosmarínico. Esses achados demonstram o potencial das espécies de samambaias estudadas, como fontes de moléculas-chave para o

desenvolvimento de opções multifuncionais alternativas para a terapêutica de doenças neurodegenerativas, particularmente, da doença de Parkinson.

9. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho ressaltam a importância dos estudos com espécies de samambaias, especialmente do gênero *Blechnum*, para as quais poucos relatos são descritos na literatura. Destaca-se a utilização de metodologias químico-biológicas associadas, as quais permitiram o fracionamento bioguiado dos extratos de *Blechnum*. Essa abordagem contribuiu para a obtenção do ácido rosmarínico, composto com pronunciadas atividades, *in vitro* e *in silico*, sobre múltiplos alvos enzimáticos e não-enzimáticos relacionados a doenças neurodegenerativas. Ausência de efeitos tóxicos foi apresentada para esta substância, nas doses avaliadas, através de modelos em células animais e células-tronco humanas. Adicionalmente, prevenção de danos celulares induzidos por agente oxidante foi observada. Outros ácidos hidróxicinâmicos, bem como flavonoides, puderam ser identificados nas espécies investigadas neste estudo. Esses achados apontam para as potencialidades dessas samambaias como fontes de produtos bioativos multifuncionais, contribuindo para o planejamento de novos fármacos para compor as opções terapêuticas, particularmente, para tratamento da doença de Parkinson.

10. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos levam às seguintes perspectivas de continuação deste trabalho:

- Avaliação dos compostos presentes nessas espécies de samambaias: ácido salvianólico F e ácido brainico nos alvos selecionados, objetivando quantificar sua capacidade nesses ensaios;
- Avaliação da concentração de aminas biogênicas, como dopamina, serotonina e noradrenalina, em cérebros de animais tratados e não-tratados com ácido rosmarínico;
- Realização de estudos *in vivo*, através de modelos alternativos, avaliando a toxicidade do ácido rosmarínico, bem como, investigando os níveis de inibição da MAO e neuroproteção deste composto frente a agentes tóxicos, desencadeadores de sintomas da DP (MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina ou 6-OHDA);
- Avaliação da capacidade anti-inflamatória do ácido rosmarínico, utilizando modelos alternativos, incluindo investigação do mecanismo envolvido e quantificação de mediadores pró-inflamatórios, uma vez que o componente inflamatório está envolvido no desencadeamento das doenças neurodegenerativas;
- Investigação, através de modelo *in silico*, da capacidade do ácido rosmarínico atravessar a barreira hematoencefálica, sendo os resultados avaliados no desenvolvimento de formulações, destinadas à vetorização do composto para o alvo terapêutico, e/ou para facilitar sua administração e garantir estabilidade.

11. REFERÊNCIAS

AARSLAND, D.; MARSH, L.; SCHRAG, A. Neuropsychiatric symptoms in Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 24, n. 15, p. 2175-186, 2009.

ABBOTT, A. Dementia: A problem for our age. **Nature**, v. 475, p. S2-S4, 2011.

AGUIAR, A. M.; ZYCH, J.; REUS, T.; KULIGOVSKI, C.; MORAES, E.; ABUD, A. P.; KRIEGER, M. A.; GOLDBERG, S.; CORREA, A.; STIMAMIGLIO, M. A.; DALLAGIOVANNA, B. **Células-tronco adultas humanas para ensaios de citotoxicidade: uma alternativa aos ensaios animais**. Seminário Anual Científico e Tecnológico. Fundação Osvaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2013.

AHMAD, F.; HOLDSWORTH, D. K. Medicinal plants of Sabah, east Malaysia - Part I. **Pharmaceutical Biology**, v. 41, p. 340-346, 2003.

ALMEIDA, A. A. C.; COSTA, J. P.; CARVALHO, R. B. F.; SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M. Evaluation of acute toxicity of a natural compound (+)-limonene epoxide and its anxiolytic-like action. **Brain Research**, v. 1448, p. 56-62, 2012.

ALONSO-AMELOT, M. E. The link between bracken fern and stomach cancer: milk. **Nutrition**, v. 13, n. 7-8, p. 694-696, 1997.

ALONSO-AMELOT, M. E. Helecho macho, salud animal y salud humana. **Revista de la Facultad de Agronomía**, v. 16, p. 528-547, 1999.

ANDRADE, J. M. M.; PASSOS, C. DOS S.; DRESCH, R. R.; KIELING- RUBIO, M. A.; MORENO, P. R. H.; HENRIQUES, A. T. Chemical analysis, antioxidant, antichemotactic and monoamine oxidase inhibition effects of some pteridophytes from Brazil. **Pharmacognosy Magazine**, v. 10, n. 37, p. S100-S109, 2014.

ARAI, Y.; HATTORI, T.; HAMAGUCHI, N.; MASUDA, K.; TAKANO, A.; SHIOJIMA, K. Fern constituents: dryocrassy formate, sitostanyl formate and 12 α -hydroxyfern-9(11)-ene from *Cyathea podophylla*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 11, p. 1311-1313, 2003.

AVERY, S. V. Molecular targets of oxidative stress. **Biochemical Journal**, v. 434, n. 2, p. 201-210, 2011.

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, ID 360438, 2014.

BANSAL, Y.; SILAKARI, O. Multifunctional compounds: Smart molecules for multifactorial diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 76, p. 31-42, 2014.

BARBUSIŃSKI, K. Fenton reaction - controversy concerning the chemistry. **Ecological Chemistry and Engineering**, v. 16, n. 3, p. 347-358, 2009.

BARONE, E.; CALABRESE, V.; MANCUSO, C. Ferulic acid and its therapeutic potential as a hormetin for age-related diseases. **Biogerontology**, v. 10, n. 2, p. 97-108, 2009.

BARROS, I. C. L.; ANDRADE, L. H. C. **Pteridófitas medicinais (samambaias, avencas e plantas afins)**. Pernambuco: Editora Universitária, Universidade Federal de Recife, 1997. 214 p.

BARROS, L.; DUEÑAS, M.; DIAS, M. I.; SOUSA, M. J.; SANTOS-BUELGA, C.; FERREIRA, I. C. Phenolic profiles of cultivated, *in vitro* cultured and commercial samples of *Melissa officinalis* L. infusions. **Food Chemistry**, v. 136, n. 1, p. 1-8, 2013.

BERNARDI, L.; LUISI, S. B.; FERNANDES, R.; DALBERTO, T. P.; VALENTIM, L.; BOGO CHIES, J. A.; MEDEIROS FOSSATI, A. C.; PRANKE, P. The isolation of stem cells from human deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption. **Journal of Endodontics**, v. 37, p. 973-979, 2011.

BOHM, B. A. Phenolic compounds in ferns - III. An examination of some ferns for caffeic acid derivatives. **Phytochemistry**, v. 7, p. 1825-1830, 1968.

BONIFÁCIO, M. J.; PALMA, P. N.; ALMEIDA, L.; SOARES-DA-SILVA, P. Catechol-Omethyltransferase and its inhibitors in Parkinson's disease. **CNS Drug Reviews**, v. 13, p. 352-379, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Programa nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Série C. Projetos, Programas e Relatórios. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica**. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

BRESCIANI, L. F. V.; PRIEBE, J. P.; YUNES, R. A.; DAL MAGRO, J.; DELLE MONACHE, F.; DE CAMPOS, F.; DE SOUZA, M. M.; CECHINEL, V. Pharmacological and phytochemical evaluation of *Adiantum cuneatum* growing in Brazil. **Zeitschrift Fur Naturforschung C, A Journal of Biosciences**, v. 58, n. 3-4, p. 191-194, 2003.

BRIGHENTE, I. M. C.; DIAS, M.; VERDI, L. G.; PIZZOLATTI, M. G. Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species. **Pharmaceutical Biology**, v. 45, n. 2, p. 156-161, 2007.

BRODRIBB, T. J.; FIELD, T. S.; JORDAN, G. J. Leaf maximum photosynthetic rate and venation are linked by hydraulics. **Plant Physiology**, v. 144, n. 4, 1890-1898, 2007.

BRYAN, G. T.; PAMUKCU, A. M. Sources of carcinogens and mutagens in edible plants: production of urinary bladder and intestinal tumors by bracken fern (*Pteridium aquilinum*). In: STICH, H. F. **Carcinogens and mutagens in the environment**. Boca Raton: CRC Press, 1982. pp. 75-82.

BURKE, W. J.; LI, S. W.; ZAHM, D. S.; MACARTHUR, H.; KOLO, L. L.; WESTFALL, T. C.; ANWAR, M.; GLICKSTEIN, S. B.; RUGGERIO, D. A. Catecholamine monoamine oxidase a metabolite in adrenergic neurons is cytotoxic *in vivo*. **Brain Research**, v. 891, n. 1-2, p. 218-227, 2001.

BUTTERFIELD, D. A.; SWOMLEY, A. M.; SULTANA, R. Amyloid β -peptide (1–42)-induced oxidative stress in Alzheimer disease: Importance in disease pathogenesis and progression. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 19, n. 8, p. 823-835, 2013.

CÁDIZ-GURREA, M. L.; FERNÁNDEZ-ARROYO, S.; JOVEN, J.; SEGURA-CARRETERO, A. Comprehensive characterization by UHPLC-ESI-Q-TOF-MS from an *Eryngium bourgatii* extract and their antioxidant and anti-inflammatory activities. **Food Research International**, v. 50, n. 1, p. 197-204, 2013.

CAI, Z. Monoamine oxidase inhibitors: Promising therapeutic agents for Alzheimer's disease (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 9, p. 1533-1541, 2014.

CAO, S.; RADWAN, M. M.; NORRIS, A.; MILLER, J. S.; RATOVOSON, F.; MAMISOA, A.; ANDRIANTSIFERANA, R.; RASAMISON, V. E.; RAKOTONANDRASANA, S.; KINGSTON, D. G. I. Cytotoxic and other compounds from *Didymochlaena truncatula* from the Madagascar Rain Forest. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 2, p. 284-286, 2006.

CAO, J.; XIA, X.; CHEN, X.; XIAO, J.; WANG, Q. Characterization of flavonoids from *Dryopteris erythrosora* and evaluation of their antioxidant, anticancer and acetylcholinesterase inhibition activities. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 242-250, 2013.

CARRETERO, M. E.; LÓPEZ-PÉREZ, J. L.; ABAD, M. J.; BERMEJO, P.; TILLET, S.; ISRAEL, A.; NOGUERA, P. B. Preliminary study of the anti-inflammatory activity of hexane extract and fractions from *Bursera simaruba* (Linneo) Sarg. (Burseraceae) leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 11, 2008.

CARVALHO, T.; PINTO, C.; PELETEIRO, M. C. Urinary bladder lesions in bovine enzootic haematuria. **Journal of Comparative Pathology**, v. 134, n. 4, p. 336-346, 2006.

CAZAROLLI, L. H.; FOLADOR, P.; PIZZOLATTI, M. G.; SILVA, F. R. M. B. Signaling pathways of kaempferol-3-neohesperidoside in glycogen synthesis in rat soleus muscle. **Biochimie**, v. 91, n. 7, p. 843-849, 2009.

CETOJEVIĆ-SIMIN, D. D.; CANADANOVIĆ-BRUNET, J. M.; BOGDANOVIĆ, G. M.; DJILAS, S. M.; CETKOVIĆ, G. S.; TUMBAS, V. T.; STOJILJKOVIĆ, B. T. Antioxidative and antiproliferative activities of different horsetail (*Equisetum arvense* L.) extracts. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 2, p. 452-459, 2010.

CHANDRA, P.; YADAV, E.; MANI, M.; GHOSH, A. K.; SACHAN, N. Protective effect of *Lygodium flexuosum* (family: Lygodiaceae) against excision, incision and dead space wounds models in experimental rats. **Toxicology and Industrial Health**, v. 31, n. 3, p. 274-280, 2015.

CHANG, H. L.; SU, J. H.; YEH, Y. T.; LEE, Y. C.; CHEN, H. M.; WUA, Y. C.; YUAN, S. S. F. Protoapigenone, a novel flavonoid, inhibits ovarian cancer cell growth *in vitro* and *in vivo*. **Cancer Letters**, v. 267, n. 1, p. 85-95, 2008.

CHANG, S. H.; BAE, J. H.; HONG, D. P.; CHOI, K. D.; KIM, S. C.; HER, E.; KIM, S. H.; KANG, C. D. *Dryopteris crassirhizoma* has anti-cancer effects through both extrinsic and intrinsic apoptotic pathways and G0/G1 phase arrest in human prostate cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 2, p. 248-254, 2010.

CHEN, Y. H.; CHANG, F. R.; LIN, Y. J.; WANG, L.; CHEN, J. F.; WUA, Y. C.; WUB, M. J. Identification of phenolic antioxidants from Sword Brake fern (*Pteris ensiformis* Burm.). **Food Chemistry**, v. 105, n. 1, p. 48-56, 2007.

CHEN, H.; ZHANG, Q.; WANG, X.; YANG, J.; WANG, Q. Qualitative analysis and simultaneous quantification of phenolic compounds in the aerial parts of *Salvia miltiorrhiza* by HPLCDAD and ESI/MSⁿ. **Phytochemical Analysis**, v. 22, p. 247-257, 2011.

CHEN, C-Y.; CHIU, F-Y.; LIN, Y.; HUANG, W-J.; HSIEH, P-S.; HSU, F-S. Chemical constituents analysis and antidiabetic activity validation of four fern species from Taiwan. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 2497-2516, 2015.

CHEUK, D. K.; WONG, V. Meta-analysis of association between a catechol-Omethyltransferase gene polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder. **Behavior Genetics**, v. 36, p. 651-659, 2006.

CHKHIKVISHVILI, I.; SANIKIDZE, T.; GOGIA, N.; MCHEDLISHVILI, T.; ENUKIDZE, M.; MACHAVARIANI, M.; VINOKUR, Y.; RODOV, V. Rosmarinic acid-

rich extracts of summer savory (*Satureja hortensis* L.) protect jurkat T cells against oxidative stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, p. 456253, 2013.

CHO, E. S.; JANG, Y. J.; HWANG, M. K.; KANG, N. J.; LEE, K. W.; LEE, H. J. Attenuation of oxidative neuronal cell death by coffee phenolic phytochemicals. **Mutation Research**, v. 661, p. 18-24, 2009.

CHOI, D-Y.; LEE, Y-J.; HONGA, J. T.; LEE, H-J. Antioxidant properties of natural polyphenols and their therapeutic potentials for Alzheimer's disease. **Brain Research Bulletin**, v. 87, n. 2-3, p. 144-153, 2012.

CHUNG, I-M.; SEO, S-H.; KANG, E-Y.; PARK, W-H.; PARK, S-D.; MOON, H-I. Antiplasmodial activity of isolated compounds from *Carpesium divaricatum*. **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 451-453, 2010.

CLERICUZIO, M.; BURLANDO, B.; GANDINI, G.; TINELLO, S.; RANZATO, E.; MARTINOTTI, S.; CORNARA, L. Keratinocyte wound healing activity of galactoglycerolipids from the fern *Ophioglossum vulgatum* L. **Journal of Natural Medicines**, v. 68, p. 31-37, 2014.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, n.7, p. 1033-1043, 2000.

CLIFFORD, M. N.; JOHNSTON, K. L.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2900-2911, 2003.

CLIFFORD, M. N.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSⁿ. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 3821-3832, 2005.

CLIFFORD, M. N.; ZHENG, W.; KUHNERT, N. Profiling the chlorogenic acids of Aster by HPLC-MSⁿ. **Phytochemical Analysis**, v. 17, p. 384-393, 2006.

CLIFFORD, M. N.; KIRKPATRICK, J.; KUHNERT, N.; ROOZENDAAL, H.; SALGADO, P.R. LC-MSⁿ analysis of the cis isomers of chlorogenic acids. **Food Chemistry**, v. 106, p. 379-385, 2008.

CONNOLLY, B. S.; LANG, A. E. Pharmacological treatment of Parkinson disease. A review. **The Journal of the American Medical Association - JAMA**, v. 311, n. 16, p. 1670-1683, 2014.

COSTA, P.; SARMENTO, B.; GONÇALVES, S.; ROMANO, A. Protective effects of *Lavandula viridis* L'Hér extracts and rosmarinic acid against H₂O₂-induced oxidative

damage in A172 human astrocyte cell line. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 361-365, 2013.

CROWDEN, R. K.; JARMAN, S. J. 3-Deoxyanthocyanins from the fern *Blechnum procerum*. **Phytochemistry**, v. 13, p. 1947-1948, 1974.

DANIELSKI, L.; MICHIELIN, E. M. Z.; FERREIRA, S. R. S. Horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin and supercritical CO₂: Experimental solubility and empirical data correlation. **Journal of Food Engineering**, v. 78, n. 3, p. 1054-1059, 2007.

DE FELICIO, R.; DE ALBUQUERQUE, S.; YOUNG, M. C. M.; YOKOYA, N. S.; DEBONSI, H. M. Trypanocidal, leishmanicidal and antifungal potential from marine red alga *Bostrychia tenella* J. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, p. 763-769, 2010.

DE MOURA M. B.; DOS SANTOS, L. S.; HOUTEN, B. V. Mitochondrial Dysfunction in Neurodegenerative Diseases and Cancer. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 51, p. 391-405, 2010.

DE SOUZA, M. M.; PEREIRA, M. A.; ARDENGHI, J. V.; MORA, T. C.; BRESCIANI, L. F.; YUNES, R. A.; DELLE MONACHE, F.; CECHINEL-FILHO V. Filicene obtained from *Adiantum cuneatum* interacts with the cholinergic, dopaminergic, glutamatergic, GABAergic, and tachykinergic systems to exert antinociceptive effect in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 93, n. 1, p. 40-46, 2009.

DI GIOVANNI, S.; BORLOZ, A.; URBAIN, A.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.; CARRUPT, P. A.; REIST, M. *In vitro* screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors; thin layer chromatography versus microplate methods. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 33, p. 109-119, 2008.

DING, Z. T.; FANG, Y. S.; TAI, Z. G.; YANG, M. H.; XU, Y. Q.; LI, F.; CAO, Q. E. Phenolic content and radical scavenging capacity of 31 species of ferns. **Fitoterapia**, v. 79, n. 7-8, p. 581-583, 2008.

DION, C.; HAUG, C.; GUAN, H.; RIPOLL, C.; SPITELLER, P.; COUSSAERT, A.; BOULET, E.; SCHMIDT, D.; WEI, J.; ZHOU, Y.; LAMOTTKE, K. Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidative potential of four fern species from China intended for use as food supplements. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 4, p. 597-603, 2015.

DITTMANN, K.; RIESE, U.; HAMBURGER, M. HPLC-based bioactivity profiling of plant extracts: a kinetic assay for the identification of monoamine oxidase A inhibitors using human recombinant monoamine oxidase A. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2885-2891, 2004.

DITTRICH, V. A. O.; SALINO, A. **Blechnaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB90790>>. Acesso em: 14 jun. 2015a.

DITTRICH, V. A. O.; SALINO, A. **Blechnaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB90794>>. Acesso em: 14 jun. 2015b.

DITTRICH, V. A. O.; SALINO, A. **Blechnaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB90822>>. Acesso em: 14 jun. 2015c.

DO MONTE, F. H. M.; DOS SANTOS JR, J. G.; RUSSI, M.; LANZIOTTI, V. M. N. B.; LEAL, L. K. A. M.; CUNHA, G. M. A. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of the hydroalcoholic extract of stems from *Equisetum arvense* L. in mice. **Pharmacological Research**, v. 49, n. 3, p. 239-243, 2004.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, p. 315-317, 2006.

DOS SANTOS JÚNIOR, J. G.; DO MONTE, F. H. M.; BLANCO, M. M.; LANZIOTTI, V. M. N. B.; MAIA, F. D.; LEAL, L. K. A. Cognitive enhancement in aged rats after chronic administration of *Equisetum arvense* L. with demonstrated antioxidant properties *in vitro*. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 81, n. 3, p. 593-600, 2005.

DOS SANTOS PASSOS, C.; SOLDI, T. C.; ABIB, R. T.; APEL, M. A.; SIMÕES-PIRES, C.; MARCOURT, L.; GOTTFRIED, C.; HENRIQUES, A. T. Monoamine oxidase inhibition by monoterpene indole alkaloids and fractions obtained from *Psychotria suterella* and *Psychotria laciniata*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 28, p. 611-618, 2013.

DRECHSEL, D. A.; ESTÉVEZ, A. G.; BARBEITO, L.; BECKMAN, J. S. Nitric oxide-mediated oxidative damage and the progressive demise of motor neurons in ALS. **Neurotoxicity Research**, v. 22, p. 251-264, 2012.

DU, T.; LI, L.; SONG, N.; XIE, J.; JIANG, H. Rosmarinic acid antagonized 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)-induced neurotoxicity in MES23.5 dopaminergic cells. **International Journal of Toxicology**, v. 29, n. 6, p. 625-633, 2010.

ECONOMIDES, C.; ADAM, K. P. Lipophilic flavonoids from the fern *Woodsia scopulina*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 3, p. 859-862, 1998.

ELLMAN, G. L., COURTNEY, D., ANDRES, V., FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

EVANS, I. A. Bracken carcinogenicity. **Research in Veterinary Science**, v. 26, p. 339-348, 1979.

FALKENBERG, S. S.; TARNOW, I.; GUZMAN, A.; MØLGAARD, P.; SIMONSEN, H. T. Mapuche herbal medicine inhibits blood platelet aggregation. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, ID 647620, 2012.

FANG, N.; YU, S.; PRIOR, R. L. LC/MS/MS characterization of phenolic constituents in dried plums. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3579-3585, 2002.

FANG, W.; RUAN, J. L.; WANG, Z.; CAI, Y. L. Studies on chemical constituents of *Arachniodes rhomboidea*. **China Journal of Chinese Materia Medica**, v. 33, n. 6, p. 649-650, 2008.

FARIAS, C. C.; CHAGAS, M. O.; BONANI, V. F. L.; SIMIONATTO, E.; HESS, S. C.; PERES, M. T. L. P. **Avaliação da atividade antioxidante e determinação do teor de fenóis totais em extratos de quatro espécies de pteridófitas de MS**. In: 30^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, São Paulo. Sociedade Brasileira de Química (SBQ), São Paulo, 2007.

FAUSTINO, T. T.; ALMEIDA, R. B.; ANDREATINI, R. Plantas medicinais no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada: uma revisão dos estudos clínicos controlados. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 32, n. 4, p. 429-436, 2010.

FINBERG, J. P. M. Update on the pharmacology of selective inhibitors of MAO-A and MAO-B: Focus on modulation of CNS monoamine neurotransmitter release. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 143, p. 133-152, 2014.

FLOCKHART, D. A. Dietary restrictions and drug interactions with monoamine oxidase inhibitors: an update. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 73, p. S17-S24, 2012.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. **Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar**. Disponível em: <http://www.multiciencia.unicamp.br/art04_7.htm> Acesso em: 21 mai. 2014.

FOLLMER, C. Fármacos multifuncionais: Monoamina oxidase e α -sinucleína como alvos terapêuticos na doença de Parkinson. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 306-313, 2013.

FONS, F.; FROISSARD, D.; BESSIÉRE, J-M.; BUATOIS, B.; RAPIOR, S. Biodiversity of volatile organic compounds from five French ferns. **Natural Product Communications**, v. 5, n. 10, p. 1655-1658, 2010.

FRAGA, L. L. **Diversidade e aspectos ecológicos de epífitos vasculares sem sementes: uma contribuição para a conservação da floresta ombrófila mista**. Novo Hamburgo, FEEVALE, 2007. 65 f. Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental) - Programa de Pós-Graduação em Gestão Tecnológica: Qualidade Ambiental, FEEVALE, Novo Hamburgo, 2007.

FRANCESCATO, L. N.; DEBENEDETTI, S. L.; SCHWANZ, T. G.; BASSANI, V. L.; HENRIQUES, A. T. Identification of phenolic compounds in *Equisetum giganteum* by LC-ESI-MS/MS and a new approach to total flavonoid quantification. **Talanta**, v. 15, p. 192-203, 2013.

FRANCIS, P. T.; PALMER, A. M.; SNAPE, M.; WILCOCK, G. K. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 66, n. 2, p. 137-147, 1999.

FRANZ, I.; SCHMITT, E. J. L. *Blechnum brasiliense* Desv. (Pteridophyta, Blechnaceae): estrutura populacional e desenvolvimento da fase esporofítica. **Pesquisas em Botânica**, v. 56, p. 173-184, 2005.

GAO, L. P.; WEI, H. L.; ZHAO, H. S.; XIAO, S. Y.; ZHENG, R. L. Antiapoptotic and antioxidant effects of rosmarinic acid in astrocytes. **Pharmazie**, v. 60, n. 1, p. 62-65, 2005.

GARRIDO, M.; TERESHCHENKO, Y.; ZHEVTSOVA, Z.; TASCHEBERGER, G.; BÄHR, M.; KÜGLER, S. Glutathione depletion and overproduction both initiate degeneration of nigral dopaminergic neurons. **Acta Neuropathologica**, v. 121, p. 475-485, 2011.

GELDENHUYS, W. J.; YODIM, M. B. H.; CAROLL, R. T.; VAN DER SCHY, C. J. The emergence of designed multiple ligands for neurodegenerative diseases. **Progress in Neurobiology**, v. 94, p. 347-359, 2011.

GELDENHUYS, W. J.; VAN DER SCHY, C. J. Designing drugs with multi-target activity: the next step in the treatment of neurodegenerative disorders. **Expert Opinion in Drug Discovery**, v. 8, n. 2, p. 115-129, 2013.

GHAFFARI, H.; VENKATARAMANA, M.; GHASSAM, B. J.; NAYAKA, C. S.; NATARAJUC, A.; GEETHA, N. P.; PRAKASHA, H. S. Rosmarinic acid mediated neuroprotective effects against H₂O₂-induced neuronal cell damage in N2A cells. **Life Sciences**, v. 113, p. 7-13, 2014.

GIACALONE, M.; DI SACCO, F.; TRAUPE, I.; TOPINI, R.; FORFORI, F.; GIUNTA, F. Antioxidant and neuroprotective properties of blueberry polyphenols: a critical review. **Nutritional Neuroscience**, v. 14, n. 3, p. 119-125, 2011.

GIORDANO, G.; LA MONACA, G.; ANNIBALI, S.; CICCONETTI, A.; OTTOLENGHI, L. Stem cells from oral niches: a review. **Annali di Stomatologia**, v. 2, n. 1-2, p. 3-8, 2011.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Online identification of chlorogenic acids, sesquiterpene lactones, and flavonoids in the Brazilian *Arnica lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) leaves by HPLC-DAD-MS and HPLC-DAD-MS/MS and a validated HPLC-DAD method for their simultaneous analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 1193-1204, 2008.

GOMES, J.; MAGALHÃES, A.; MICHEL, V.; AMADO, I. F.; ARANHA, P.; OVESEN, R. G.; HANSEN, H. C. B.; GÄRTNER, F.; REIS, C. A.; TOUATI, E. *Pteridium aquilinum* and its ptaquiloside toxin induce DNA damage response in gastric epithelial cells, a link with gastric carcinogenesis. **Toxicological Sciences**, v. 126, n. 1, p. 60-71, 2012.

GOUVEIA, S.; GONÇALVES, J.; CASTILHO, P. C. Characterization of phenolic compounds and antioxidant activity of ethanolic extracts from flowers of *Andryala glandulosa* ssp. *varia* (Lowe ex DC.) R.Fern., an endemic species of Macaronesia region. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 573-582, 2013.

GRAF, E. Antioxidant potential of ferulic acid. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 13, n. 4, p. 435-48, 1992.

GRAHAM, J. G.; QUINN, M. L.; FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. Plants used against cancer – an extension of the work of Jonathan Hartwell. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 347-377, 2000.

GRIFFITHS, H. R.; DUNSTON, C. R.; BENNETT, S. J.; GRANT, M. M.; PHILLIPS, D. C.; KITAS, G. D. Free radicals and redox signaling in T-cells during inflammation and aging. **Biochemical Society Transactions**, v. 39, p. 1273-1278, 2011.

GU, L.; WU, T.; WANG, Z. TLC bioautography-guided isolation of antioxidants from fruit of *Perilla frutescens* var. *acuta*. **LWT-Food Science and Technology**, v. 42, p. 131-136, 2009.

GUPTA, S. P.; PATEL, S.; YADAV, S.; SINGH, A. K.; SINGH, S.; SINGH, M. P. Involvement of nitric oxide in maneb- and paraquat-induced Parkinson's disease phenotype in mouse: is there any link with lipid peroxidation? **Neurochemical Research**, v. 35, p. 1206-1213, 2010.

HA, C. Y.; KIM, J. Y.; PAIK, J. K.; KIM, O. Y.; PAIK, Y-H.; LEE, E. J.; LEE, J. H. The association of specific metabolites of lipid metabolism with markers of oxidative stress, inflammation and arterial stiffness in men with newly diagnosed type 2 diabetes. **Clinical Endocrinology**, v. 76, n. 5, p. 674-682, 2012.

HANSEN, R. A.; GARTLEHNER, G.; WEBB, A. P.; MORGAN, L. C.; MOORE, C. G.; JONAS, D. E. Efficacy and safety of donepezil, galanthamine and rivastigmine for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta analysis. **Journal of Clinical Interventions in Aging**, v. 3, p. 211-225, 2008.

HARAGUCHI, H.; TANAKA, Y.; KABBASH, A.; FUJIOKA, T.; ISHIZU, T.; YAGI, A. Monoamine oxidase inhibitors from *Gentiana lutea*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2255-2260, 2004.

HARBORNE, J. B. Comparative biochemistry of flavonoids-II. 3-Desoxyanthocyanins and their systematic distribution in ferns and gesnerads. **Phytochemistry**, v. 5, p. 589-600, 1966.

HARVEY, B. S.; MUSGRAVE, I. F.; OHLSSON, K. S.; FRANSSON, A.; SMID, S. D. The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits amyloid- β evoked fibril formation and neuronal cell death *in vitro*. **Food Chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1729-1736, 2011.

HAUSER, D. N.; HASTINGS, T. G. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease and monogenic parkinsonism. **Neurobiology of Disease**, v. 51, p. 35-42, 2013.

HÄUSLER, E.; PETERSEN, M.; ALFERMANN, A. W. Rosmarinsäure in *Blechnum*-Spezies. In: HASCHKE, H. P., SCHNARRENBERGER, C. (eds.). **Botanikertagung**. Akademie Verlag: Berlin, 1992, p. 507.

HERRAIZ, T. Identification and occurrence of beta-carboline alkaloids in raisins and inhibition of monoamine oxidase (MAO). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 35, p. 8534-8540, 2007.

HIDGON, J. V.; FREI, B. Coffee and health: A review of recent human research. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, p. 101-123, 2006.

HIKINO, H.; TAKAHASHI, T.; ARIHARA, S.; TAKEMOTO, T. Structure of pteroside B, glycoside of *Pteridium aquilinum* var *latiusculum*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 18, p. 1488-1489, 1970.

HINCAPIÉ, C. A.; MONSALVE, Z. I.; PARADA, K.; LAMILLA, C.; ALARCÓN, J.; CÉPEDES, C. L. Mite growth regulatory activity of *Blechnum chilense* (Kaulf.) Mett. **Planta Medica**, v. 77, n. 12, p. 1257-1272, 2011a.

HINCAPIÉ, C. A.; MONSALVE, Z.; SEIGLER, Z. S.; ALARCÓN, J.; CESPEDES, C. L. Antioxidant activity of *Blechnum chilense* (Kaulf.) Mett., *Curcuma domestica* Valetton and *Tagetes verticillata* Lag. & Rodriguez. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 10, n. 4, p. 315-324, 2011b.

HORT, M. A. **Estudo das atividades vasodilatadora e antioxidante de *Cyathea phalerata* Mart. (Cyatheaceae)**. Florianópolis: UFSC, 2006. 114 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

HORT, M. A.; DALBÓ, S.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G.; PEDROSA, R. C.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Cyathea phalerata* Mart. (Cyatheaceae). **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 103, n. 1, p. 17-24, 2008.

HOSSAIN, M. B.; RAI, D. K.; BRUNTON, N. P.; MARTIN-DIANA, A. B.; BARRY-RYAN, C. Characterization of phenolic composition in Lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 10576-10581, 2010.

HUBBELL, S. P. **The United Neutral Theory of Biodiversity and Biogeography**. Princeton: Princeton University Press, 2001.

IMPERATO, F. A new flavonoid, quercetin 3-*O*-(*X*"-acetyl-*X*"-cinnamoyl-glucoside) and a new fern constituent, quercetin 3-*O*-(glucosylrhamnoside) from *Dryopteris villarii*. **American Fern Journal**, v. 97, p. 124-126, 2007.

IMPERATO, F. A xanthone-*O*-glycoside from *Asplenium adiantum-nigrum*. **Phytochemistry**, v. 19, n. 9, p. 2030-2031, 1980.

IMPERATO, F. A new xanthone from the fern *Cystopteris fragilis*. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 2, p. 603-605, 1991a.

IMPERATO, F. Xanthone 2,4-di-*C*-glycosides from *Asplenium adiantum-nigrum*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 11, p. 3839-3840, 1991b.

ITO, N.; YABE, T.; GAMO, Y.; NAGAI, T.; OIKAWA, T.; YAMADA, H.; HANAWA, T. Rosmarinic acid from *Perillae Herba* produces an antidepressant-like effect in mice through cell proliferation in the hippocampus. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 7, p. 1376-80, 2008.

IVANOVA, A.; MIHKOVA, B.; KOSTOVA, I.; EVCTATIEVA, L. Bioactive chemical constituents from *Smilax excelsea*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 46, n. 2, p. 295-296, 2010.

IWASHINA, T.; MATSUMOTO, S.; NISHIDA, M.; NAKAIKE, T. New and rare flavonol glycosides from *Asplenium trichomanes-ramosum* as stable chemotaxonomic markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 23, n. 3, p. 283-290, 1995.

IZZO, A. A.,CAPASSO, F. Herbal medicines to treat Alzheimer's disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.28, n.2, p.47-48. 2007.

JAGANJAC, M.; TIROSH, O.; COHEN, G.; SASSON, S.; ZARKOVIC, N. Reactive aldehydes – second messengers of free radicals in diabetes mellitus. **Free radical research**, v. 47, n. S1, p. 39-48, 2013.

JÄGER, A. K.; GAUGUIN, B.; ANDERSEN, J.; ADSERSEN, A.; GUDIENSEN, L. Screening of plants used in Danish folk medicine to treat depression and anxiety for affinity to the serotonin transporter and inhibition of MAO-A. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 3, p. 822-825, 2013.

JAISSWAL, R.; SOVDAT, T.; VIVAN, F.; KUHNERT, N. Profiling and characterization by LC-MSⁿ of the chlorogenic acids and hydroxycinnamoylshikimate esters in mate (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 5471-5484, 2010.

JAISSWAL, R.; DESHPANDE, S.; KUHNERT, N. Profiling the chlorogenic acids of *Rudbeckia hirta*, *Helianthus tuberosus*, *Carlina acaulis* and *Symphotrichum novae-angliae* leaves by LC-MSn. **Phytochemical Analysis**, v. 22, p. 432-441, 2011.

JI, H. F.,ZHANG, H. Y. Multipotent natural agents to combat Alzheimer's disease. Functional spectrum and structural features. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.29, n.2, p.143-151. 2008.

JOLY, C. A.; HADDAD, C. F. B.; VERDADE, L. M.; DE OLIVEIRA, M. C.; BOLZANI, V. S.; BERLINCK, R. G. S. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. **Revista USP**, n. 89, p. 114-133, 2011.

JOMOVA, K.; BAROS, S.; VALKO, M. Redox active metal-induced oxidative stress in biological systems. **Transition Metal Chemistry**, v. 37, n. 2, p. 127-134, 2012.

KANAFI, M. M.; PAL, R.; GUPTA, P. K. Phenotypic and functional comparison of optimum culture conditions for upscaling of dental pulp stem cells. **Cell Biology International**, v. 37, n. 2, p. 126-36, 2013.

KANG, H. J.; KIM, H. S.; JEON, I. H.; MOK, J. Y.; HAN, K. S.; JANG, S. Effects of antioxidant and blood flow improvement of grape leaf extract and resveratrol from *Vitis rotundifolia*. **Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition**, v. 42, n. 11, p.1736-1743, 2013.

KENNEDY, B. P.; ZIEGLER, M. G.; ALFORD, M.; HANSEN, L. A.; THAL, L. J.; MASLIAH, E. Early and persistent alterations in prefrontal cortex MAO-A and MAO-B in Alzheimer's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 110, n. 7, p. 789-801, 2003.

KENNY, O.; SMYTH, T. J.; HEWAGE, C. M.; BRUNTON, N. P. Quantitative UPLC-MS/MS analysis of chlorogenic acid derivatives in antioxidant fractionates from dandelion (*Taraxacum officinale*) root. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 50, n. 3, p. 766-773, 2015.

KHAN, H.; ZAMAN, A.; CHETTY, G. L.; GUPTA, A. S.; DEV, S. Cheilanthatriol - a new fundamental type in sesterterpenes. **Tetrahedron Letters**, v. 12, n. 46, p. 4443-4446, 1971.

KIM, J.; LEE, S.; SHIM, J.; KIM, H. W.; JANG, Y. J.; YANG, H.; PARK, J.; CHOI, S. H.; YOON, J. H.; LEE, K. W.; LEE, H. J. Caffeinated coffee, decaffeinated coffee, and the phenolic phytochemical chlorogenic acid up-regulate NQO1 expression and prevent H₂O₂-induced apoptosis in primary cortical neurons. **Neurochemistry International**, v. 60, p. 466-474, 2012.

KONRATH, E.L. **Química e atividades antioxidante e anticolinesterásica de espécies da família Lycopodiaceae**. Porto Alegre: UFRGS, 2011, 212 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

KRAMER, K.U.; GREEN, P.S. **The families and genera of vascular plants. Pteridophytes and gymnosperms**. 1 ed. Berlin: Springer-Verlag, 1990.

KUMAR, R. S.; SIVAKUMAR, T.; SUNDERAM, R. S.; GUPTA, M.; MAZUMDAR, U. K.; GOMATHI, P.; RAJESHWAR, Y.; SARAVANAN, S.; KUMAR, M. S.; MURUGESH, K.; KUMAR, K. A. Antioxidant and antimicrobial activities of *Bauhinia racemosa* L. stem bark. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 1015-1024, 2005.

KUMAR, A. S.; SAIF, S. A.; OOTHUMAN, P.; MUSTAFA, M. I. A. Lipid peroxidation in chronic cerebral hypoperfusion-induced neurodegeneration in rats. **The International Medical Journal Malaysia**, v. 10, n. 2, p. 3-6, 2011.

KWON, D-Y.; KANG, O. H.; CHOI, J-G.; LEE, Y-S.; OH, Y-C.; CHAE, H-S.; LEE, G-H.; PARK, P-S.; KIM, Y-C.; SOHN, D-H.; PARK, H.; LEE, J. H. Antibacterial effect of *Dryopteris crassirhizoma* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Fitoterapia**, v. 78, p. 430-433, 2007.

LAI, H. Y.; LIM, Y. Y.; TAN, S. P. Antioxidative, tyrosinase inhibiting and antibacterial activities of leaf extracts from medicinal ferns. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 73, n. 6, p. 1362-1366, 2009.

LAI, H. Y.; LIM, Y. Y.; KIM, K. H. *Blechnum orientale* Linn - a fern with potential as antioxidant, anticancer and antibacterial agent. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 30, p. 10-15, 2010.

LAI, W. Y.; LIM, Y. Y.; KIM, K. H. Potential dermal wound healing agent in *Blechnum orientale* Linn. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, p. 62, 2011.

LAMICHHANE, R.; KIM, S-G.; POUDEL, A.; SHARMA, D.; LEE, K-H.; JUNG, H-J. Evaluation of *in vitro* and *in vivo* biological activities of *Cheilanthes albomarginata* Clarke. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 342-353, 2014.

LEE, S. M.; NA, M. K.; AN, R. B.; MIN, B. S.; LEE, H. K. Antioxidant activity of two phloroglucinol derivatives from *Dryopteris crassirhizoma*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 9, p. 1354-1356, 2003.

LEE, H. J.; CHO, H. S.; PARK, E.; KIM, S.; LEE, S. Y.; KIM, C. S.; KIM, D. K.; KIM, S. J.; CHUN, H. S. Rosmarinic acid protects human dopaminergic neuronal cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis. **Toxicology**, v. 250, p. 109-115, 2008.

LEWANDOWSKI, K. E. Relationship of catechol-*O*-methyltransferase to schizophrenia and its correlates: evidence for associations and complex interactions. **Harvard Review of Psychiatry**, v. 15, p. 233-244, 2007.

LI, B.; ZHU, J. F.; ZOU, Z. J.; YIN, Y. Q.; SHEN, Z. B. Studies on the chemical constituents of *Dryopteris fragrans*. **Journal of Chinese Medicinal Materials**, v. 32, n. 8, p. 1232-1233, 2009.

LI, X.; JANKOVIC, J.; LE, W. Iron chelation and neuroprotection in neurodegenerative diseases. **Journal of Neural Transmission**, v. 118, p. 473-477, 2011.

LIBERT, S.; POINTER, K.; BELL, E. L.; DAS, A.; COHEN, D. E.; ASARA, J. M.; KAPUR, K.; BERGMANN, S.; PREISIG, M.; OTOWA, T.; KENDLER, K. S.; CHEN, X.; HETTEMA, J. M.; VAN DEN OORD, E. J.; RUBIO, J. P.; GUARENTE, L. SIRT1 activates MAO-A in the brain to mediate anxiety and exploratory drive. **Cell**, v. 147, n. 7, p. 1459-1472, 2011.

LISTA DE ESPÉCIES DA FLORA DO BRASIL. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 21 mai. 2015.

LIU, A-H.; GUO, H.; YE, M.; LIN, Y-H.; SUN, J-H.; XU, M.; GUO, D-A. Detection, characterization and identification of phenolic acids in Danshen using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1161, p. 170-182, 2007.

LIU, Z. Q. Chemical methods to evaluate antioxidant ability. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 10, p. 5675-5691, 2010.

LOPES, G. K. B.; SCHULMAN, H. M.; HERMES-LIMA, M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1472, p. 142-152, 1999.

LOPES, A. A.; PEREIRA, F. A.; QUEIROZ, M. G.; PITOMBEIRA, M. V.; LEAL, L. K. A. M.; VIANA, G. S. B. Avaliação da administração crônica de *Mucuna pruriens* sobre parâmetros bioquímicos e hematológicos e de seus efeitos neuroprotetores, em modelo de Doença de Parkinson. **Revista Fitos**, v. 7, n. 1, p. 37-43, 2012.

MAGALHÃES, L. M.; REIS, S.; LIMA, J. L. F. C. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, n. 1, p. 1-19, 2008.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727-747, 2004.

MANDEL, S. A.; AVRAMOVICH-TIROSH, Y.; REZNICHENKO, L.; ZHENG, H.; WEINREB, O.; AMIT, T.; YODIM, M. B. Multifunctional activities of green tea catechins in neuroprotection. Modulation of cell survival genes, iron-dependent oxidative stress and PKC signaling pathway. **Neurosignals**, v. 14, p. 46-60, 2005.

MANGIALASCHE, F.; SOLOMON, A.; WINBLAD, B.; MECOCCHI, P.; KIVIPELTO, M. Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. **Lancet Neurology**, v. 9, p. 702-716, 2010.

MARIDASS, M.; GHANTIKUMAR, S. Antibacterial activity of leaves of *Blechnum orientale* L. **Pharmacologyonline Newsletter**, v. 3, p. 58-60, 2008.

MARKHAM, K. R.; WALLACE, J. W. C-glycosylxanthone and flavonoid variation within the filmy-ferns (Hymenophyllaceae). **Phytochemistry**, v. 19, p. 415-420, 1980.

MATSUMOTO, S.; IWASHINA, T.; KITAJIMA, J.; MITSUTA, S. Evidence by flavonoid markers of four natural hybrids among *Asplenium normale* and related species (Aspleniaceae) in Japan. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 51-58, 2003.

MAZZIO, E.; DEIAB, S.; PARK, K.; SOLIMAN, K. F. A. High throughput screening to identify natural human monoamine oxidase B inhibitors. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 6, p. 818-828, 2013.

McGEER, P. L.; McGEER, E. G. Glial reactions in Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 23, n. 4, p. 474-483, 2008.

MEHLTRETER, K.; WALKER, L. R.; SHARPE, J. M. **Fern ecology**. Cambridge: Cambridge University Press, 2010.

MENDIOLA, J. A.; SANTOYO, S.; CIFUENTES, A.; REGLERO, G.; IBÁÑEZ, E.; SEÑORÁNS, F. J. Antimicrobial activity of sub- and supercritical CO₂ extracts of the green alga *Dunaliella salina*. **Journal of Food Protection**, v. 71, p. 2138, 2008.

MILIUS, S. Tough frills: ferns' wimp stage aces survival test. **Science News**, v. 172, n. 20, p. 307, 2007.

MIURA, M.; GRONTHOS, S.; ZHAO, M.; LU, B.; FISHER, L. W.; ROBEY, P. G.; SHI, S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 100, p. 5807-5812, 2003.

MODREGO, P. J. Depression in Alzheimer's disease. Pathophysiology, diagnosis, and treatment. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 21, n. 4, 2010.

MØLGAARD, P.; HOLLER, J. G.; ASAR, B.; LIBERNA, I.; ROSENBÆK, L. B.; JEBJERG, C. P.; JØRGENSEN, L.; LAURITZEN, J.; GUZMAN, A.; ADSERSEN, A.; SIMONSEN, H. T. Antimicrobial evaluation of Huilliche plant medicine used to treat wounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, p. 219-227, 2011.

MORAN, R. C. Diversity, biogeography and floristics. In: RANKER, T. A.; HAUFLE, C. H (eds.). **Biology and evolution of ferns and lycophytes**. Cambridge University Press: Cambridge, 2008, pp. 417-461.

MYTHRI, R. B.; BHARATH, M. M. S. Curcumin: A potential neuroprotective agent in Parkinson's disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 1, p. 91-99, 2012.

NAKAJIMA, Y.; SHIMAZAWA, M.; MISHIMA, S.; HARA, H. Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions. **Life Sciences**, v. 80, p. 370-377, 2007.

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, p. 503-515, 2010.

NIRANJAN REDDY, V. L.; RAVIKANTH, V.; PRABHAKAR RAO, T.; DIWAN, P. V.; VENKATESWARLU Y. A new triterpenoid from the fern *Adiantum lunulatum* and evaluation of antibacterial activity. **Phytochemistry**, v. 56, p. 173-175, 2001.

NONATO, F. R.; BARROS, T. A. A.; LUCCHESI, A. M.; OLIVEIRA, C. E. C.; SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P.; VILLARREAL, C. F. Antiinflammatory and antinociceptive activities of *Blechnum occidentale* L. extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, p. 102-107, 2009.

NOVAROLI, L.; DAINA, A.; BERTOLINI, F.; DI GIOVANNI, S.; BRAVO, J.; REIST M.; CARRUPT, P. A. Identification of novel multifunctional compounds for the treatment of some aging related neurodegenerative diseases. **Chimia**, v. 59, n. 6, p. 315-320, 2005.

NOVAROLI, L.; DAINA, A.; FAVRE, E.; BRAVO, J.; CAROTTI, A.; LEONETTI, F.; CATTO, M.; CARRUPT, P. A.; REIST, M. Impact of species-dependent differences on screening, design, and development of MAO-B inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 6264-6272, 2006.

NUÑEZ, P. N.; DO ESPIRITO SANTO, A. T.; SCOPEL, R.; ANZOLIN, J. G. P.; VILLARREAL, M. L.; HENRIQUES, A. T.; CASSEL, E.; TAKETA, A. T. C.; VON POSER, G. L.; VARGAS, R. M. F. A new approach in extracting active acylphloroglucinol derivatives from *Dryopteris wallichiana* and *Elaphoglossum erinaceum*. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 101, p. 222-230, 2015.

OLIVEIRA, D. M. **Estudo da biodisponibilidade de compostos fenólicos do chá mate (*Ilex paraguariensis*)**. São Paulo: USP, 2013. 139 f. Tese (Doutorado em Nutrição) - Departamento de Nutrição, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

OLTHOF, M. R.; HOLLMAN, P. C. H.; BUIJSMAN, M. N. C. P.; VAN AMELSVOORT, J. M. M.; KATAN, M. B. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. **Journal of Nutrition**, v. 133, n. 6, p. 1806-1814, 2003.

ONO, K.; YAMADA, M. Antioxidant compounds have potent anti-fibrillogenic and fibril-destabilizing effects for α -synuclein fibrils *in vitro*. **Journal of Neurochemistry**, v. 97, p. 105-115, 2006.

OZYUREK, M.; GUNGOR, N.; BAKI, S.; GUCLU, K.; APAK, R. Development of a silver nanoparticle-based method for the antioxidant capacity measurement of polyphenols. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 18, p. 8052-8059, 2012.

PAGE, C. N. Ecological strategies in fern evolution: a neopteridological overview. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 119, p. 1-33, 2002.

PARDO ANDREU, G. L.; MAURMANN, N.; REOLON, G. K.; DE FARIAS, C. B.; SCHWARTSMANN, G.; DELGADO, R.; ROESLER, R. Mangiferin, a naturally occurring glucoxilxanthone improves long-term object recognition memory in rats, **European Journal of Pharmacology**, v. 635, p. 124-128, 2010.

PASSOS, C. DOS S.; SIMÕES-PIRES, C. A.; NURISSO, A.; SOLDI, T. C.; KATO, L.; DE OLIVEIRA, C. M. A.; DE FARIA, E. O.; MARCOURT, L.; GOTTFRIED, C.; CARRUPT, P.-A.; HENRIQUES, A. T. Indole alkaloids of *Psychotria* as multifunctional

cholinesterases and monoamine oxidases inhibitors. **Phytochemistry**, v. 86, p. 8-20, 2013.

PASTENE, E. R.; WILKOMIRSKY, T.; BOCAZ, G.; HAVEL, J.; PERIC, I.; VEGA, M.; GONZALEZ, M.; ALDERETE, J. Use of NMR spectroscopy and MALDI-TOF MS in the structure elucidation of antioxidant flavonoids from the Chilean *Cheilanthes glauca* (Cav.) Mett. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química**, v. 46, n. 4, p. 449-457, 2001.

PEREIRA, P.; TYSCA, D.; OLIVEIRA, P.; DA SILVA BRUM, L. F.; PICADA, J. N.; ARDENGHI, P. Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid. **Pharmacology Research**, v. 52, n. 3, p. 199-203, 2005.

PETERSEN, M.; SIMMONDS, M. S. J. Molecules of interest - Rosmarinic acid. **Phytochemistry**, v. 62, n. 2, p. 121-125. 2003.

PINTO, S. C.; LEITÃO, G. G.; OLIVEIRA, D. R.; BIZZO, H. R.; RAMOS, D. F.; COELHO, T. S.; SILVA, P. E. A.; LOURENÇO, M. C. S.; LEITÃO, S. G. Chemical composition and antimycobacterial activity of the essential oil from *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia*. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 12, p. 1675-1678, 2009.

PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; BORTOLUZZI, A. J.; SCHRIPSEMA, J.; VERDI, L. G. Cyathenosin A, a spiropyranosyl derivative of protocatechuic acid from *Cyathea phalerata*. **Phytochemistry**, v. 68, n. 9, p. 1327-1330, 2007.

POEWE, W.; ANTONINI, A.; ZIJLMANS, J. C.; BURKHARD, P. R.; VINGERHOETS, F. Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: an old drug still going strong. **Journal of Clinical Interventions in Aging**, v. 7, n. 5, p. 229-238, 2010.

POUNY, I.; ETIÉVANT, C.; MARCOURT, L.; HUC-DUMAS, I.; BATUT, M.; GIRARD, F.; WRIGHT, M.; MASSIOT, G. Protoflavonoids from ferns impair centrosomal integrity of tumor cells. **Planta Medica**, v. 77, n. 5, p. 461-466, 2011.

PRADO, J.; SYLVESTRE, L. **Samambaias e Licófitas in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB12848>>. Acesso em: 20 mai. 2015.

PRANKE, O.; KUMAR, S.; RAJA, B. **Cytotoxic effect of cobaiba oil in stem cells**. In: ISSCR 12th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research, 2014, Vancouver, Canada. Late Breaking Poster Abstracts. p. 13-14, 2014.

PRINCE, M.; PRINA, M.; GUERCHET, M. **World Alzheimer Report 2013. Journey of caring. An analysis of long-term care for dementia**. Alzheimer's Disease International (ADI). Disponível em: <<http://www.alz.co.uk/research/world-report-2013>>. Acesso em: 16 mai. 2013.

PRYER, K. M.; SCHNEIDER, H.; SMITH, A. R.; CRANFILL, R.; WOLF, P. G.; HUNT, J. S.; SIPES, S. D. Horsetails and ferns are monophyletic group and the closest living relatives to seed plants. **Nature**, n. 409, p. 618-622, 2001.

RADAK, Z.; ZHAO, Z.; GOTO, S.; KOLTAI, E. Age-associated neurodegeneration and oxidative damage to lipids, proteins and DNA. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 32, p. 305-315, 2011.

RADHIKA, N. K.; SREEJITH, P. S.; ASHA, V. V. Cytotoxic and apoptotic activity of *Cheilanthes farinosa* (Forsk.) Kaulf. against human hepatoma, Hep3B cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 1, p. 166-171, 2010.

RAZZAGHI-ASL, N.; GARRIDO, J.; KHAZRAEI, H.; BORGES, F.; FIRUZI, O. Antioxidant properties of hydroxycinnamic acids: a review of structure- activity relationships. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 36, p. 4436-50, 2013.

REED, T. T.; SELLERS, Z. P.; BUTTERFIELD, D. A. Lipid peroxidation in age-related neurodegenerative disorders. In: SPICKETT, C. M.; FORMAN, H. J. (eds.). **Lipid oxidation in health and disease**. Taylor and Francis Publishers: Boca Raton, Florida, 2015, pp. 329-361.

REIS, F. S.; MARTINS, A.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. R. F. Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: A comparative study between *in vivo* and *in vitro* samples. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1201-1207, 2012.

REN, P.; JIANG, H.; LI, R.; WANG, J.; SONG, N.; XU, H-M.; XIE, J-X. Rosmarinic acid inhibits 6-OHDA-induced neurotoxicity by anti-oxidation in MES23.5 cells. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 39, p. 220-225, 2009.

RICHARDSON, P. M.; LORENZ-LIBURNAU, E. C-glycosylxanthones in the *Asplenium adiantum-nigrum* complex. **American Fern Journal**, v. 72, n. 4, p. 103-105, 1982.

ROBINSON, R. C. Steps to more effective bracken management. **Aspects of Applied Biology**, v. 82, p. 143-155, 2007.

ROTH, B. L.; SHEFFLER, D. J.; KROEZE, W. K. Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. **Nature Review in Drug Discovery**, v. 3, n. 4, p. 353-359, 2004.

ROTHFELS, C. J.; SUNDUE, M. A.; KUO, LI-Y.; LARSSON, A.; KATO, M.; SCHUETTPELZ, E.; PRYER, K. M. A revised family-level classification for eupolypod II ferns (Polypodiidae: Polypodiales). **Taxonomy**, v. 61, p. 515-533, 2012.

ROY, S.; DUTTA, S.; CHAUDHURI, T. K. *In vitro* assessment of anticholinesterase and NADH oxidase inhibitory activities of an edible fern, *Diplazium esculentum*. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 26, n. 4, p. 395-401, 2015.

RUAN, M.; LI, Y.; LI, X.; LUO, J.; KONG, L. Qualitative and quantitative analysis of the major constituents in Chinese medicinal preparation Guan-Xin-Ning injection by HPLC–DAD–ESI-MSⁿ. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 59, p. 184-189, 2012.

RUIZ, A.; MARDONES, C.; VERGARA, C.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I.; VON BAER, D.; HINRICHSEN, P.; RODRIGUEZ, R.; ARRIBILLAGA, D.; DOMINGUEZ, E. Analysis of hydroxycinnamic acids derivatives in calafate (*Berberis microphylla* G. Forst) berries by liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1281, p. 38-45, 2013.

SAITO, T.; YAMANE, H.; MUROFUSHI, N.; TAKAHASHI, N.; PHINNEY, B. O. 4-*O*-Caffeoylshikimic and 4-*O*-(*p*-Coumaroyl)shikimic acids from the dwarf tree fern, *Dicksonia antarctica*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 8, n. 61, p. 1397-1398, 1997.

SALINO, A. **Estudos taxonômicos da família Thelypteridaceae (Polypodiopsida) no estado de São Paulo, Brasil**. Campinas: UNICAMP, 2000. 297 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

SALOMONE, S.; CARACI, F.; LEGGIO, G. M.; FEDOTOVA, J.; DRAGO, F. New pharmacological strategies for treatment of Alzheimer's disease: focus on disease modifying drugs. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 73, n. 4, p. 504-517, 2011.

SAMBANTHAMURTHI, R.; TAN, Y.; SUNDRAM, K.; ABEYWARDENA, M.; SAMBANDAN, T. G.; RHA, C.; SINSKEY, A. J.; SUBRAMANIAM, K.; LEOW, S-S.; HAYES, K. C.; WAHID, M. B. Oil palm vegetation liquor: a new source of phenolic bioactives. **British Journal of Nutrition, Malaysia**, v. 106, p. 1655-1663, 2011.

SANTOS, A. C. C.; WINDISCH, P. G. Análise da pteridoflora da área de proteção ambiental do morro da borússia (Osório-RS). **Instituto Anchieta de Pesquisas de São Leopoldo**, v. 59, p. 237-252, 2008.

SANTOS, M. G.; ROCHA, L. M.; CARVALHO, E. S.; KELECOM, A. Isoafricanol, um sesquiterpeno incomum encontrado na pteridófito *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 4, p. 71-75, 2006.

SANTOS, M. G.; KELECOM, A.; DE PAIVA, S. R.; DE MORAES, M. G.; ROCHA, L.; GARRETT, R. Phytochemical studies in pteridophytes growing in Brazil: a review. **Americas Journal of Plant Science and Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 113-125, 2010.

SANTOS, R. L.; GUIMARAES, G. P.; NOBRE, M. S. C.; PORTELA, A. S. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 4, p. 486-491, 2011.

SASAKI, K.; EL OMRI, A.; KONDO, S.; HAN, J.; ISODA, H. *Rosmarinus officinalis* polyphenols produce anti-depressant like effect through monoaminergic and cholinergic functions modulation. **Behavioural Brain Research**, v. 238, p. 86-94, 2013.

SAXENA, S.; CARONI, P. Selective neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases: from stressor thresholds to degeneration. **Neuron - Cell**, v. 71, n. 1, p. 35-48, 2011.

SCHAPIRA, A. H. V.; OLANOW, C. W. Neuroprotection in Parkinson disease. **Journal of the American Medical Association**, v. 291, n. 3, p. 358-364, 2004.

SEELIGER, D.; GROOT, B. L. Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 24, p. 417-422, 2010.

SELA, V. R.; HATTANDA, I.; ALBRECHT, C. M.; DE ALMEIDA, C. B.; OBICI, S.; CORTEZ, D. A.; AUDI E. A. Effect of xanthone from *Kielmeyera coriacea* stems on serotonergic neurons of the median raphe nucleus. **Phytomedicine**, v. 17, n. 3-4, p. 274-278, 2010.

SELLOUM, L.; BOURICHE, H.; TIGRINE, C.; BOUDOUKHA, C. Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 54, p. 313-318, 2003.

SERRANO-POZO, A.; FROSCHE, M. P.; MASLIAH, E.; HYMAN, B. T. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 1, n. 1, a006189, 2011.

SHARPE, J. M.; JERNSTEDT, J. J. Tropic responses controlling leaf orientation in the fern *Danaea wendlandii* (Marattiaceae). **American Journal of Botany**, v. 77, n. 8, p. 1050-1059, 1990.

SHIFMAN, S.; BRONSTEIN, M.; STERNFELD, M.; PISANTÉ, A.; WEIZMAN, A.; REZNIK, I.; SPIVAK, B.; GRISARU, N.; KARP, L.; SCHIFFER, R.; KOTLER, M.; STROUS, R. D.; SWARTZ-VANETIK, M.; KNOBLER, H. Y.; SHINAR, E.; YAKIR, B.; ZAK, N. B.; DARVASI, A. COMT: a common susceptibility gene in bipolar disorder

and schizophrenia. **American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics**, v. 128B, p. 61-64, 2004.

SHIL, S.; CHOUDHURY, M. D.; DAS, S. Indigenous knowledge of medicinal plants used by the Reang tribe of Tripura state of India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 152, p. 135-141, 2014.

SIDDIQUE, Y. H.; ARA, G.; AFZA, M. Estimation of lipid peroxidation induced by hydrogen peroxide in cultured human lymphocytes. **Dose-Response**, v. 10, p. 1-10, 2012.

SILVA, R. E. **Aspectos éticos, legais e tendências no desenvolvimento de ensaios clínicos no Brasil**. Brasília, UNB, 2014. 131 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2014.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2010. 1102 p.

SINGH, M.; SINGH, N.; KHARE, P. B.; RAWAT, A. K. S. Antimicrobial activity of some important *Adiantum* species used traditionally in indigenous systems of medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, n. 2, p. 327-329, 2008.

SIQUEIRA, A. C. A. **Caracterização e obtenção de compostos fenólicos presentes no efluente do processamento da casca de coco verde**. Fortaleza: UFC, 2012. 64 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

SLIWOSKI, G.; KOTHIWALE, S.; MEILER, J.; LOWE, E. W. J. Computational methods in drug discovery. **Pharmacological Reviews**, v. 66, p. 334-395, 2014.

SMITH, A. R.; PRYER, K. M.; SCHUETTPELZ, E.; KORALL, P.; SCHNEIDER, H.; WOLF, P. G. A classification for extant ferns. **Taxonomy**, v. 55, p. 705-731, 2006.

SMITH, A. R.; PRYER, K.M.; SCHUETTPELZ, E.; KORALL, P.; SCHNEIDER, H.; WOLF, P.G. Fern classification. In: RANKER, T. A.; HAUFLER, C. H. (eds.). **Biology and evolution of ferns and lycophytes**. Cambridge University Press: Cambridge, 2008, pp. 417-467.

SMITH, A.; KOBAYASHI, K.; CHAPPELL, N.; HOXSEY, D. The controversial promises of cholinesterases inhibitors for Alzheimer's disease and related dementias: a qualitative study of careagiver's experiences. **Journal of Aging Studies**, v. 25, p. 397-406, 2011.

SMITH, B. L.; LAUREN, D. R.; PRAKASH, A. S. Bracken Fern (Pteridium): Toxicity in animal and human health, p. 76-85. In:_____. **Bracken Fern: Toxicity, biology and control**. International Bracken Group Conference, 1999. p.76-85.

SMITH, D. M; HARBORNE, B. Xanthones in the Appalachian *Asplenium* complex. **Phytochemistry**, v. 10, n. 9, p. 2117-2119, 1971.

SOCOLSKY, C.; BORKOSKY, S. A.; ASAKAWA, Y.; BARDÓN, A. Molluscicidal phloroglucinols from the fern *Elaphoglossum piloselloides*. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 4, p. 787-790, 2009.

SOCOLSKY, C.; ARENA, M. E.; ASAKAWA, Y.; BARDÓN A. Antibacterial prenylated acylphloroglucinols from the fern *Elaphoglossum yungense*. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 11, p. 1751-1755, 2010.

SOCOLSKY, C.; RATES, S. M. K.; STEIN, A. C.; ASAKAWA, Y.; BARDÓN, A. Acylphloroglucinols from *Elaphoglossum crassipes*: antidepressantlike activity of crassin A. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 1007-1017, 2012a.

SOCOLSKY, C.; DOMÍNGUEZ, L.; ASAKAWA, Y.; BARDÓN, A. Unusual terpenylated acylphloroglucinols from *Dryopteris wallichiana*. **Phytochemistry**, v. 80, p. 115-122, 2012b.

SOUSA, F. C. F.; MELO, C. T. V.; CITÓ, M. C. O.; FÉLIX, F. H. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; BARBOSA, J. M.; VIANA, G. S. B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. 4, p. 642-654, 2008.

SOUTO-MAIOR, F. N.; DE CARVALHO F. L.; DE MORAIS, L. C. S. L.; NETTO S. M.; DE SOUSA D. P.; ALMEIDA R. N. Anxiolytic-like effects of inhaled linalool oxide in experimental mouse anxiety models. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 100, n. 2, p. 259-63, 2011.

SOZIO, P.; CERASA, L. S.; ABBADESSA, A.; DI STEFANO, A. Designing prodrugs for the treatment of Parkinson's disease. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 7, n. 5, p. 385-406, 2012.

STEFANIS, L. α -Synuclein in Parkinson's disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicines**, v. 2, n. 2, a009399, 2012.

STEFFENS, C.; WINDISCH, P. G. Diversidade e formas de vida de pteridófitas no Morro da Harmonia em Teutônia-RS, Brasil. **Instituto Anchieta de Pesquisas Botânicas**, v. 58, p. 375-382, 2007.

SUN, A. Y.; WANG, Q.; SIMONYI, A.; SUN, G. Y. Botanical phenolics and neurodegeneration. In: BENZIE, I. F. F.; WACHTEL-GALOR, S. (eds). **Herbal medicine: Biomolecular and clinical aspects**. 2 ed. CRC Press: Boca Raton, Florida, 2011, cap. 15.

SWINNY, E. E. A novel acetylated 3-deoxyanthocyanidin laminaribioside from the fern *Blechnum novae-zelandiae*. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 56, p. 177-180, 2001.

SZABO, E.; PETERSEN, M.; ALFERMANN, A. W. Occurrence of rosmarinic acid in *Blechnum* species. **Planta Medica**, v. 59, n. 7, p. A651, 1993.

SZLISZKA, E.; KROL, W. Polyphenols isolated from propolis augment TRAIL-induced apoptosis in cancer cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, ID 731940, 2013.

TAKEDA, H.; TSUJI, M.; INAZU, M.; EGASHIRA, T.; MATSUMIYA, T. Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 449, p. 261-267, 2002.

TALUKDAR, A.; TARAFDAR, R. G.; CHOUDHURY, M. D.; NATH, D.; CHOUDHURY, S. A review on pteridophyte antioxidants and their potential role in discovery of new drugs. **Biological and Environmental Sciences**, v. 7, n. 1, p. 151-155, 2011.

TEPE, B. Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia virgata* (Jacq), *Salvia staminea* (Montbret & Aucher ex Benth) and *Salvia verbenaca* (L.) from Turkey. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 1584-1588, 2008.

TOM, T.; CUMMINGS, J. L. Depression in Parkinson's disease. Pharmacological characteristics and treatment. **Drugs and Aging**, v. 12, p. 55-74, 1998.

TOMASI, D.; WANG, G-J.; VOLKOW, N. D. Energetic cost of brain functional connectivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 110, n. 33, p. 13642-13647, 2013.

TORRÃO, A. S.; CAFÉ-MENDES, C. C.; REAL, C. C.; HERNANDES, M. S.; FERREIRA, A. F. B.; SANTOS, T. O.; CHAVES-KIRSTEN, G. P.; MAZUCANTI, C. H. Y.; FERRO, E. S.; SCAVONE, C.; BRITTO, L. R. G. Abordagens diferentes, um único objetivo: compreender os mecanismos celulares das doenças de Parkinson e de Alzheimer. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 34, n. 2, p. S194-S218, 2012.

TU, C.; MA, L. Q. Effects of arsenic on concentration and distribution of nutrients in the fronds of the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. **Environmental Pollution**, v. 135, n. 2, p. 330-340, 2005.

- UMIKALSOM, Y.; HARBORNE, J. B. Flavonoid distribution in Asplenoid ferns. **Pertanika**, v. 14, n. 3, p. 297-300, 1991.
- UNGUR, N.; KULCITXKI, V. Occurrence, biological activity and synthesis of cheilanthane sesterterpenoids. **Tetrahedron**, v. 65, n. 19, p. 3815-3828, 2009.
- VAN DER SCHYF, C. J.; GELDENHUYS, W. J. Monoamine oxidase and their inhibitors multimodal drugs and their future for Alzheimer's and Parkinson's disease. **International Review of Neurobiology**, v. 100, p. 107-125, 2011.
- VAN DIERMEN, D.; MARSTON, A.; BRAVO, J.; REIST, M.; CARRUPT, P. A. Monoamine oxidase inhibition by *Rhodiola rosea* L. roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, p. 397-401, 2009.
- VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G. J.; CLOOS, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. **Methods in Molecular Biology**, v. 731, p. 237-245, 2011.
- VILLAS BOAS, G. K.; GADELHA, C. A. G. Oportunidades na indústria de medicamentos e a lógica do desenvolvimento local baseado nos biomas brasileiros: bases para a discussão de uma política nacional. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23, n. 6, p. 1463-1471, 2007.
- VUPPALANCHI, R.; JULURI, R.; BELL, L. N.; GHABRIL, M.; KAMENDULIS, L.; KLAUNIG, J. E.; SAXENA, R.; AGARWAL, D.; JOHNSON, M. S.; CHALASANI, N. Oxidative stress in chronic liver disease: relationship between peripheral and hepatic measurements. **American Journal of Medical Sciences**, v. 342, n. 4, p. 314-317, 2011.
- XIA, X.; CAO, J.; ZHENG, Y.; WANG, Q.; XIAO, J. Flavonoid concentrations and bioactivity of flavonoid extracts from 19 species of ferns from China. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 91-98, 2014.
- XIE, Y.; ZHENG, Y.; DAI, X.; WANG, Q.; CAO, J.; XIAO, J. Seasonal dynamics of total flavonoid contents and antioxidant activity of *Dryopteris erythrosora*. **Food Chemistry**, v. 186, p. 113-118, 2015.
- XU, Q.; KANTHASAMY, A.; REDDY, M. (-)-Epigallocatechin-3-gallate protects against TNF alpha and hydrogen peroxide induced apoptosis in a cell culture model of Parkinson's disease. **The FASEB Journal**, v. 29, n. 1, p. 922-929, 2015.
- WADA, H.; KIDO, T.; TANAKA, N.; MURAKAMI, T.; SAIKI, Y.; CHEN, C. M. Chemical and chemotaxonomical studies of ferns. Characteristic lignans of Blechnaceous ferns. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, n. 8, p. 2099-2101, 1992.
- WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis - A thin layer chromatography atlas**. 2 ed. Berlin: Springer, 1996, 226 p.

WALLACE, J. W. Chemosystematic implications of flavonoids and C-glycosylxanthones in “ferns”. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 17, n. 2, p. 145-153, 1989.

WANG, C-Z.; DAVIN, L. B.; LEWIS, N. G. Stereoselective phenolic coupling in *Blechnum spicant*: formation of 8–2A linked (-)-cis-blechnic, (-)-trans-blechnic and (-)-brainic acids. **Chemical Communications**, p. 113-114, 2001.

WANG, J.; XU, H.; JIANG, H.; DU, X.; SUN, P.; XIE, J. Neurorescue effect of rosmarinic acid on 6-hydroxydopamine-lesioned nigral dopamine neurons in rat model of Parkinson's disease. **Journal of Molecular Neurosciences**, v. 47, p. 113-119, 2012.

WANG, S.; ZHANG, W.; PANG, X.; LI, L.; HE, G.; YANG, X.; FANG, L.; ZHANG, J.; DU, G. EETs mediate cardioprotection of salvianolic acids through MAPK signaling pathway. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 3, n. 1, p. 25-31, 2013.

WEINREB, O.; AMIT, T.; BAR-AM, O.; YOUDIM, M. B. H. Ladostigil: a novel multimodal neuroprotective drug with cholinesterase and brain-selective monoamine oxidase inhibitory activities for Alzheimer's disease treatment. **Current Drug Targets**, v. 13, n. 4, p. 483-494, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **International Clinical Trials Registry Platform - ICTRP**. Disponível em: <<http://apps.who.int/trialsearch/default.aspx/>>. Acesso em: 28 jun. 2015.

WU, W-M.; LU, L.; LONG, Y.; WANG, T.; LIU, L.; CHEN, Q.; WANG, R. Free radical scavenging and antioxidative activities of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and its related compounds in solution and membranes: A structure-activity insight. **Food Chemistry**, v. 105, n. 1, p. 107-115, 2007.

YANG, J. H.; KONDRATYUK, T. P.; MARLER, L. E.; QIU, X.; CHOI, Y.; CAO, H.; YU, R.; STURDY, M.; PEGAN, S.; LIU, Y.; WANG, L. Q.; MESECAR, A. D.; VAN BREEMEN, R. B.; PEZZUTO, J. M.; FONG, H. H. S.; CHEN, Y. G.; ZHANG, H. J. Isolation and evaluation of kaempferol glycosides from the fern *Neocheiropteris palmatopedata*. **Phytochemistry**, v. 71, n. 5-6, p. 641-647, 2010.

YARAK, S.; OKAMOTO, O. K. Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, p. 647-656, 2010.

YONATHAN, M.; ASRES, K.; ASSEFA, A.; BUCAR, F. *In vivo* anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Cheilanthes farinosa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 3, p. 462-470, 2006.

YOU DIM, M. B. H. Why do we need multifunctional neuroprotective and neurorestorative drugs for Parkinson's and Alzheimer's disorders? **Rambam Maimonides Medical Journal**, v. 1, n. 2, p. 1-18, 2010.

YOU DIM, M. B. H.; BAKHLE, Y. S. Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. S287-S296, 2006.

YOU DIM, M. B. H.; FRIDKIN, M.; ZHENG, H. Bifunctional drug derivatives of MAO-B inhibitor rasagiline and iron chelator VK-28 as a more effective approach to treatment of brain ageing and ageing neurodegenerative diseases. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 126, n. 2, p. 317-326, 2005.

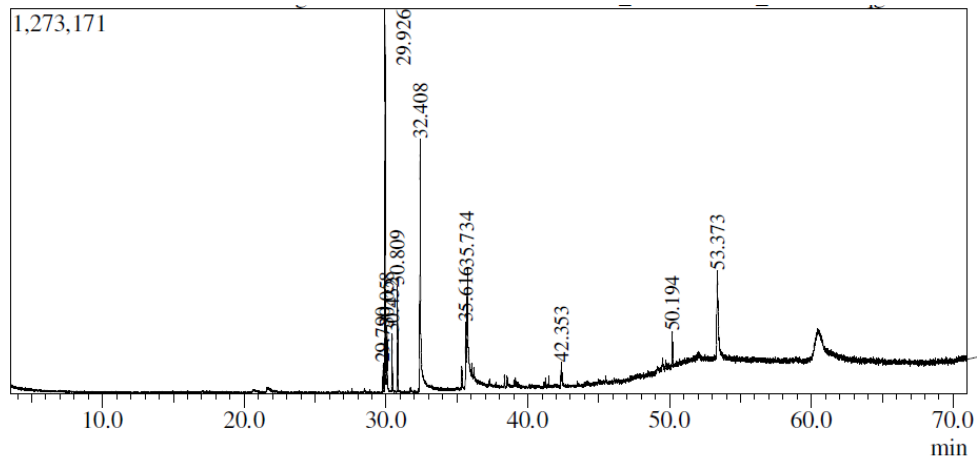
YU, Y. M.; YANG, J. S.; PENG, C. J.; CAER, V.; CONG, P. Z.; ZOU, Z. M.; LU, Y.; YANG, S. Y.; GU, Y. C. Lactones from *Angiopteris caudatifomis*. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 5, p. 921-924, 2009.

ZHANG, H.; LIU, Y-Y.; JIANG, Q.; LI, K-R.; ZHAO, Y-X.; CAO, C.; YAO, J. Salvianolic acid A protects RPE cells against oxidative stress through activation of Nrf2/HO-1 signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 69, p. 219-228, 2014.

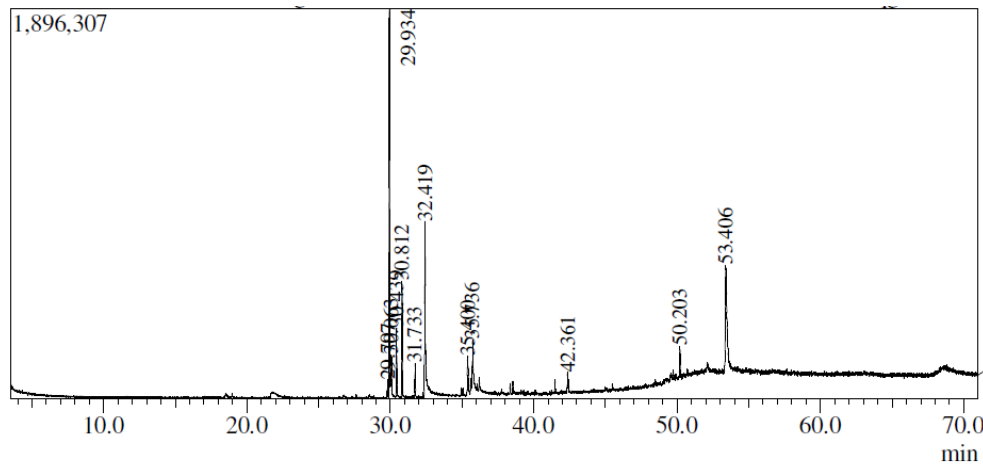
ZHOU, J.; QU, X-D.; LI, Z-Y.; JI, W.; LIU, Q.; MA, Y-H.; HE, J-J. Salvianolic acid B attenuates toxin-induced neuronal damage via Nrf2-dependent glial cells-mediated protective activity in Parkinson's disease models. **Plos One**, v. 9, n. 7, p. e101668, 2014.

ANEXOS

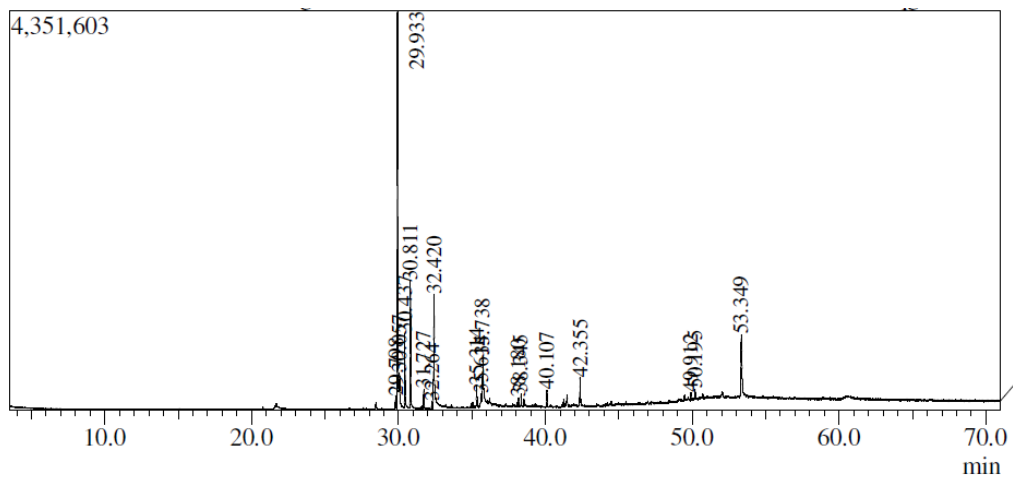




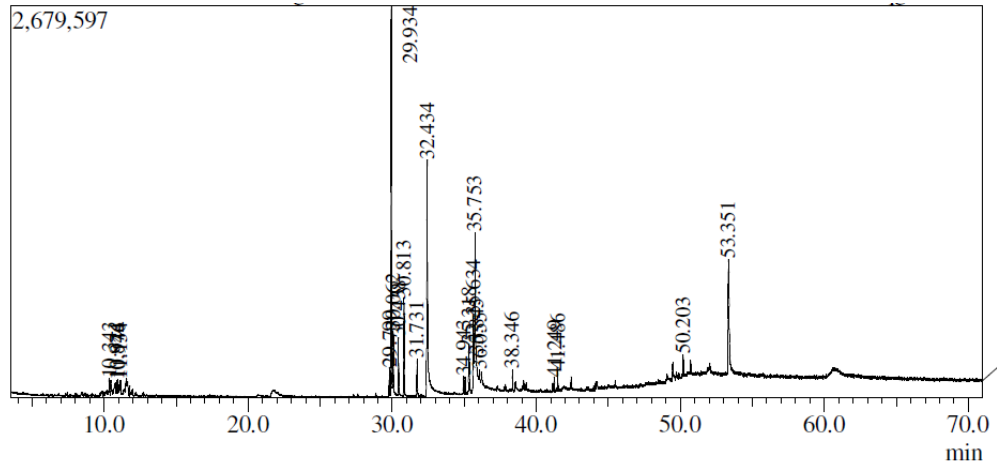
Cromatograma obtido por CG-EM da fração diclorometano de *B. binervatum*.



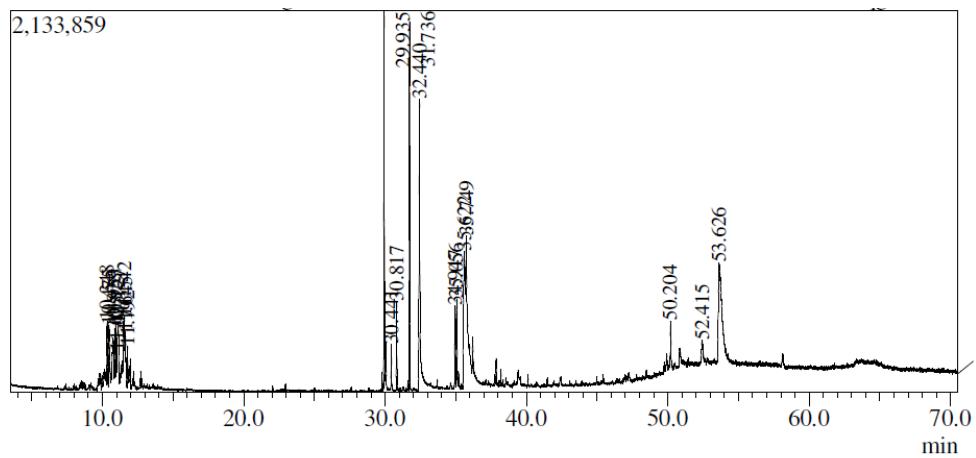
Cromatograma obtido por CG-EM da fração diclorometano de *B. brasiliense*.



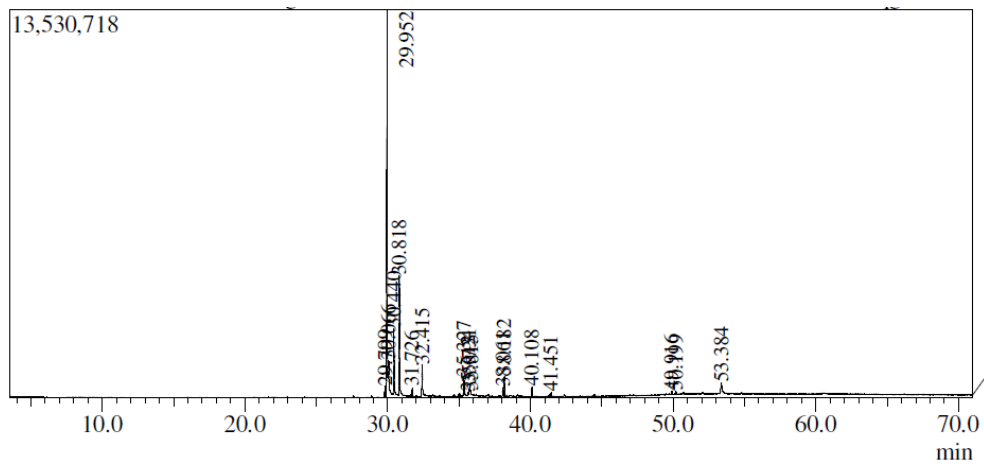
Cromatograma obtido por CG-EM da fração diclorometano de *B. occidentale*.



Cromatograma (CG-EM) da fração hexano de *B. binervatum*.



Cromatograma (CG-EM) da fração hexano de *B. brasiliense*.



Cromatograma (CG-EM) da fração hexano de *B. occidentale*.



0604149725960098

AUTORIZAÇÃO DE ACESSO E DE REMESSA DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO nº 010549/2012-9

O CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO - CNPq, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 246, de 27 de agosto de 2009, para autorizar instituições nacionais, públicas ou privadas, que exerçam atividades de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar e remeter amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, neste ato representado pelo seu Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde, nos termos da Portaria CNPq nº 161/2010, autoriza a instituição abaixo qualificada a acessar e remeter amostras de componentes do patrimônio genético.

Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS

CNPJ: 929.698.560/0001-98

Representante Legal: FLAVIO PEREIRA KAPCZINSKI

Cargo/Função: Coordenador do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

CPF: 454.866.700-87 **RG:** 4020710127

Projeto: INVESTIGAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ESPÉCIES DE *Blechnum* COLETADAS NA REGIÃO SUL DO BRASIL

Coordenador do Projeto: Amelia Teresinha Henriques

CPF: 123.749.034-00 **RG:** 5076368868 - SSP / RS

Finalidade do projeto: Frondes de samambaias do gênero *Blechnum*, incluídas no presente projeto, coletadas no Rio Grande do Sul, serão investigadas quanto às composições químicas de seus extratos, sendo necessária autorização para acesso desse Patrimônio Genético. Paralelamente, o estudo avaliará as possíveis atividades biológicas dos extratos dessas espécies prevenindo a formação de radicais livres, bem como a possibilidade de identificação de moléculas desses extratos com potencial inibitório sobre as enzimas monoamina oxidase e acetilcolinesterase.

Amostras a serem acessadas:

Espécie(s): *Blechnum binervatum*, *Blechnum brasiliense*, *Blechnum occidentale*

Tipo de material/quantidade de amostras: no máximo, 1kg de frondes das plantas.

Local de depósito de subamostra: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Equipe do projeto: AMELIA TERESINHA HENRIQUES / CPF 123.749.034-00

JULIANA MARIA DE MELLO ANDRADE / CPF 013.981.500-70

MARIA ANGELICA KIELING-RUBIO / CPF 665.616.470-68

Validade da Autorização: 18/04/2013 a 27/09/2015

A instituição acima qualificada deverá enviar ao CNPq, por meio da Plataforma Carlos Chagas, relatório anual sobre o andamento do projeto de pesquisa, nos termos do Decreto nº. 4.946/2003.

Esta autorização está vinculada às informações, declarações e termos de compromisso firmados pelo coordenador do projeto e pelo representante legal, constantes do Processo nº 010549/2012-9. Atividades de acesso aos conhecimentos tradicionais associados, de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético com finalidade comercial, aplicação industrial, bioprospecção ou desenvolvimento tecnológico não estão autorizadas.

Caso seja identificado uso econômico de produto ou processo, passível ou não de proteção intelectual, originado das amostras de componente do patrimônio genético acessado no âmbito desta autorização, a instituição beneficiada se compromete a adotar as providências cabíveis, nos termos da legislação vigente, junto ao CGEN/MMA.

A remessa de amostra de componente do patrimônio genético deverá ser precedida da assinatura do Termo de Transferência de Material (TTM) ou do Termo de Responsabilidade para Transporte de Amostra de Componente do Patrimônio Genético (TRM). Para a remessa de componente do patrimônio genético para instituição sediada no exterior, deverá ser solicitada ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, por meio de

formulário específico e mediante a apresentação de TTM ou TRTM, licença de exportação complementar a autorização de remessa, mormente quando se tratar de remessa de espécies constantes nos Anexos da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (Cites).

Brasília, 18 de Abril de 2013

Paulo Sergio Lacerda Beirao
Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde

Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Amostra de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página <http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/> e informar o número do protocolo 0604149725960098 para recuperá-la do banco de dados do CNPq, ou poderá selecionar o arquivo salvo em seu computador (em formato PKCS7). V.Sa. pode também usar outro aplicativo disponível no mercado capaz de reconhecer arquivos no padrão PKCS7 para fazer a visualização e extração do documento.



U F R G S

UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 23374

Título: INVESTIGAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ESPÉCIES DE *Blechnum*
COLETADAS NA REGIÃO SUL DO BRASIL

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

AMELIA TERESINHA HENRIQUES - coordenador desde 01/09/2011
MARIA ANGÉLICA KIELING RUBIO - pesquisador desde 01/09/2011
CRISTINA NIQUELE GONCALVES - pesquisador desde 01/09/2011
Juliana Maria de Mello Andrade - Aluno de Doutorado desde 01/09/2011

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 35 ratos Wistar machos, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Quinta-Feira, 13 de Dezembro de 2012

STELA MARIS KUZE RATES
Coordenador da comissão de ética

PRODUÇÃO INTELECTUAL REALIZADA NO PERÍODO DO DOUTORAMENTO

Artigos Científicos:

DE OLIVEIRA, M. H.; INNOCENT, A. M.; PEREIRA, A. G.; DIAS, D. O.; DE OLIVEIRA, E. G.; BARRETO, F.; DE FREITAS, F. A.; MEIRELLES, G. C.; DA SILVA, G. N. S.; MACHADO, J. C.; BIDONE, J.; ANDRADE, J. M. M.; SCHWINGEL, L.; MÜLLER, L. G.; PINTO, P. S.; BERNARDI, R. M.; KAISER, S.; DE SOUZA, T. J.; GNOATTO, S. C. B. Semi-síntese: Uma solução para problemas farmacológicos de produtos naturais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. IX, p. 62-88, 2012.

CODEVILLA, C.; LANGE, A. D.; ANDRADE, J. M. M.; SEGALIN, J.; FROEHLICH, P. E.; BERGOLD, A. Photodegradation kinetics of lodenafil carbonate, structure elucidation of two major degradation products using UPLC-MS/MS and *in vitro* cytotoxicity. **Analytical Methods**, v. 5, p. 6511-6516, 2013.

ANDRADE, J. M. M.; DE JONG, E. V.; HENRIQUES, A. T. Byproducts of orange extraction: influence of different treatments in fiber composition and physical and chemical parameters. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, p. 473-482, 2014.

COSTA, M. C. N.; BARDEN, A. T.; ANDRADE, J. M. M.; OPPE, T. P.; SCHAPOVAL, E. E. S. Quantitative evaluation of besifloxacin ophthalmic suspension by HPLC, application to bioassay method and cytotoxicity studies. **Talanta**, v. 119, p. 367-374, 2014.

BERNARDI, R. M.; DAVILA, F. B.; TODESCHINI, V.; ANDRADE, J. M. M.; FROEHLICH, P. E.; BERGOLD, A. M. Main degradation products of dabigatran etexilate evaluated by LC-UV and LC-ESI-MS, degradation kinetics and *in vitro* cytotoxicity studies. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 4, p. 660-666, 2015.

TODESCHINI, V.; SANGOI, M. S.; GOELZER, G. K.; ANDRADE, J. M. M.; VOLPATO, N. M. Delapril and manidipine main degradation products: LC-UV and LC-ESI-MS evaluations, decay kinetic and *in vitro* cytotoxicity studies. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, 2015. *in press*.

PASSOS, C. DOS S.; KLEIN-JÚNIOR, L. C.; ANDRADE, J. M. M.; MATTÉ, C.; HENRIQUES, A. T. The catechol-*O*-methyltransferase (COMT) inhibitory potential of *Z*-vallesiachotamine by *in silico* and *in vitro* approaches. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2015. *in press*.

Capítulo de Livro:

ANDRADE, J. M. M.; FASOLO, D. **Polyphenol antioxidants from natural sources and contribution to health promotion**. In: WATSON, R. R.; PREEDY, V. R.; ZIBADI, S. (Org.). Polyphenols in Human Health and Disease. 1ed. Reino Unido: Elsevier, 2014, v. 1, p. 253-263.

ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO

Trabalhos Apresentados em Eventos:

GONÇALVES, C. N.; ANDRADE, J. M. M.; HENRIQUES, A. T. **Análise química e atividade antiqumiotóxica do extrato de *Asplenium serra* (Aspleniaceae)**. In: XIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS. 2012.

ANDRADE, J. M. M.; GONÇALVES, C. N.; PASSOS, C. dos S.; KIELING-RUBIO, M. A.; HENRIQUES, A. T. **Chemical profile and monoamine oxidase inhibitory effect of extracts from three Blechnaceae species**. XXII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. 2012.

ANDRADE, J. M. M.; GONÇALVES, C. N.; PASSOS, C. dos S.; KIELING-RUBIO, M. A.; HENRIQUES, A. T. **Potential antichemotactic and monoamine oxidase inhibitory effects of *Blechnum* extracts from south Brazil**. In: IV Encontro do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - UFRGS. 2012.

ANDRADE, J. M. M.; LOPES, D. V.; HENRIQUES, A. T. **Effect of extracts and fractions of *Blechnum* species in the stabilization of free radicals**. In: 5th Meeting of the Pharmaceutical Science Graduate Program and Mercosur Meeting on Pharmaceutical Sciences. 2013.

ANDRADE, J. M. M.; LOPES, D. V.; HENRIQUES, A. T. **Potential multi-capacity of *Blechnum brasiliense* against oxidative process and free radicals: hydroxyl, nitric oxide and lipoperoxidation**. In: 4th Brazilian Conference on Natural Products (BCNP) and The XXX Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (RESEM). 2013.

LOPES, D. V.; ANDRADE, J. M. M.; HENRIQUES, A. T. **Efeito do extrato de *Blechnum binervatum* sobre espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e na lipoperoxidação**. In: XIV Salão de Iniciação Científica PUCRS. 2013.

ANDRADE, J. M. M.; LOPES, D. V.; KIELING-RUBIO, M. A.; PASSOS, C. S.; HENRIQUES, A. T. **Rosmarinic acid isolated from *Blechnum brasiliense* as multifunctional compound against neurodegenerative disorders**. In: 6th Meeting of the Pharmaceutical Sciences Post Graduate Program. 2014.

Bancas Examinadoras:

ANDRADE, J. M. M.; FASOLO, D.; KLIEMANN, L. M. M. **Participação em banca de Gabriela Spagnol Tessarolo**. Consumo de medicamentos ansiolíticos pelos acadêmicos da URI - Campus de Santo Ângelo. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões.

ANDRADE, J. M. M.; FASOLO, D.; KRATZ, C. P. **Participação em banca de Carine Luft.** Avaliação da qualidade de comprimidos revestidos de ibuprofeno. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões.

ANDRADE, J. M. M.; FASOLO, D.; MULLER, N. T. G. **Participação em banca de Francine Nunes Bertaso.** Controle de qualidade microbiológico e determinação de flavonóides totais em emulsões contendo extrato seco de *Ginkgo biloba* L. manipuladas em farmácias do município de Santo Ângelo - RS. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões.

ANDRADE, J. M. M.; BERTELLI, P. **Participação em banca de Juliana Salton.** Avaliação inibitória *in vitro* da monoamina oxidase de alcaloides indol monoterpênicos obtidos de *Psychotria vellosiana* Benth. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - UFRGS.

ANDRADE, J. M. M.; CAMASSOLA, M. **Participação em banca de Susana Aschidamini Ferreira.** Avaliação do efeito da morina, um flavonoide, sobre células-tronco mesenquimais. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - UFRGS.

Palestras:

ANDRADE, J. M. M. **Plantas Medicinais do Brasil: Uso popular, Estudos científicos e Fitoterapia.** Palestra ministrada na IX Jornada Acadêmica de Ciências Farmacêuticas da URI - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. 2011.

ANDRADE, J. M. M. **Etnofarmacologia, Atualidades e Aspectos Regulatórios de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.** Palestra ministrada na I Semana Acadêmica do Curso de Farmácia da UNISINOS - Universidade do Vale do Rio dos Sinos. 2015.

Organização de Eventos Científicos:

ANDRADE, J. M. M. Participação na Comissão Organizadora do 5th Meeting of the Pharmaceutical Sciences Graduate Program and Mercosur Meeting on Pharmaceutical Sciences. 2013.