

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Investigação química e atividades biológicas de extratos de samambaias
coletadas nas regiões sul e sudeste do Brasil**

JULIANA MARIA DE MELLO ANDRADE

Porto Alegre, novembro de 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Investigação química e atividades biológicas de extratos de samambaias
coletadas nas regiões sul e sudeste do Brasil**

Dissertação apresentada por **Juliana
Maria de Mello Andrade** para
obtenção do GRAU DE MESTRE em
Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Amélia T. Henriques

Porto Alegre, novembro de 2011

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 28 de novembro de 2011, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof^a. Dr^a. Edna Sayuri Suyenaga
Universidade Feevale

Dr. Mário Luiz Conte da Frota Junior
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. José Ângelo Silveira Zuanazzi
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Andrade, Juliana Maria de Mello

Investigação química e atividades biológicas de extratos de samambaias coletadas nas regiões sul e sudeste do Brasil / Juliana Maria de Mello Andrade. - 2011. 137 f.

Orientadora: Amélia Teresinha Henriques.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. Samambaias. 2. Análise química. 3. Antioxidante. 4. Antiquimiotaxia. 5. Inibidores da MAO. I. Henriques, Amélia Teresinha, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Amélia Henriques no laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia e contou com a colaboração da Msc. Maria Angélica Kieling-Rubio e Prof. Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno. A pesquisa foi financiada pelo CNPq e CAPES.

*“Deus não escolhe os capacitados, mas capacita os escolhidos, fazer ou não
fazer algo depende apenas da nossa vontade e perseverança.”*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar sempre presente em minha vida, iluminando meu caminho e tornando tudo possível.

À Prof^a. Dr^a. Amélia Henriques pela orientação, estímulo e ensinamentos que me proporcionou.

À Prof^a. Dr^a. Gilsane Von Poser, considerada co-orientadora do trabalho, por todo incentivo, companheirismo e contribuições relevantes que despendeu no desenvolvimento do mesmo.

À Msc. Maria Angélica Kieling-Rubio e ao Prof. Dr. Paulo Roberto Moreno pelo trabalho botânico realizado. À Prof^a. Dr^a. Miriam Apel, ao Dr. Roger Dresch e à Msc. Carolina Passos pelos conselhos e discussões acerca do trabalho e experimentos em colaboração que proporcionaram maior conhecimento do assunto, além da amizade e apoio.

Aos meus pais, Antonio e Zuleica Andrade, pelo amor incessante, nunca medindo esforços para me proporcionar estudo de boa qualidade e sempre estando ao meu lado, apoiando minhas decisões.

Ao meu noivo, Daniel Fasolo, pelo amor, confiança e por fazer minha vida ter sentido, estando sempre ao meu lado e provando que o amor é maior que tudo.

À minha avó, Juracy 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 desde o início.

Aos grandes amigos, colegas de laboratório e padrinhos, Renata Biegelmeyer e Douglas Rambo que durante essa trajetória estiveram sempre do meu lado dando forças, alegrias e demonstrando a verdadeira amizade. Às amigas quase irmãs, Greice Vargas, Tatiana Badalotti, Laura Goulart pelo companheirismo, demonstração de amizade sincera e incentivo durante essa caminhada.

Aos colegas do laboratório de Farmacognosia, Carolina, Rafaela, Eduardo, Marina, Ana, Leandro, Melissa, Aline, Cláudia, Cristiano, Júlia, Letícia, Tiago pelos momentos de necessária descontração e contribuição na realização deste trabalho.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS pelo suporte técnico-científico disponibilizado.

RESUMO

Investigação química e atividades biológicas de extratos de samambaias coletadas nas regiões sul e sudeste do Brasil

Antioxidantes, antiinflamatórios e inibidores da enzima monoamina oxidase (MAO) estão relacionados a algumas neuropatologias, como as doenças de Parkinson e Alzheimer, apresentando-se como valiosos agentes terapêuticos. Assim, a pesquisa acerca de novas fontes desses compostos estimula o desenvolvimento de novas opções terapêuticas para melhoria dos sintomas dessas doenças. Samambaias são plantas que pertencem ao grupo das pteridófitas e apresentam cerca de 9000 espécies distribuídas mundialmente. Nesse contexto, os objetivos desse trabalho foram as análises química e biológica de 14 extratos de samambaias coletadas no Rio Grande do Sul (RS) e em São Paulo (SP). Os extratos brutos etanólicos das samambaias foram analisados utilizando CLAE, com detector de arranjo de diodos. Os extratos foram testados *in vitro* quanto às suas capacidades antioxidantes, pelo método do potencial reativo total (TRAP), nas concentrações de 0,1; 1,0; 10,0; 50,0 e 100,0 µg/mL. Quercetina e mangiferina também foram avaliadas (1,0; 10,0 e 100,0 µM). O ensaio de antiquimiotaxia foi realizado utilizando placa de 48 poços, no qual os extratos foram testados nas concentrações de 0,01; 0,10; 1,0 e 10,0 µg/mL. Mangiferina foi avaliada a 0,1; 1,0; 10,0; 50,0 e 100,0 µM. A avaliação de integridade da membrana celular de células polimorfonucleares na presença dos extratos (10 µg/mL) foi realizada utilizando-se neutrófilos, pelo método de liberação da lactato desidrogenase citosólica. A atividade inibitória da MAO foi realizada utilizando método baseado em fluorescência, testando-se os extratos a 100 µg/mL. A maioria dos extratos das plantas analisadas apresentou cromatograma com alta complexidade química. Na espécie *Asplenium gastonis* foi caracterizado o glicosil flavonóide hesperidina, além de dois derivados do canferol, enquanto que *A. serra* apresentou a xantona mangiferina. A análise das plantas da família Blechnaceae, em duas espécies (*Blechnum occidentale* e *B. brasiliense*) permitiu a identificação de ácido caféico. Em *B. occidentale*, ácido clorogênico também foi identificado. O cromatograma do extrato de *B. binervatum* demonstrou presença de rutina e quercetina 3D-galactosídeo, sendo este último composto encontrado também no extrato de *B. brasiliense*. Em *Cyathea phalerata* três derivados glicosilados de canferol foram identificados. O cromatograma de *Lastreopsis amplissima* demonstrou presença de cumarina e seus derivados. A investigação química das outras espécies deste trabalho não foi possível, com base nos padrões utilizados. Todas as amostras apresentaram

potente efeito antioxidante a 10 µg/mL. *Asplenium serra*, *Lastreopsis amplissima* (coletada no RS) e *Cyathea dichromatolepis* foram as mais ativas, sendo que os valores não diferem, estatisticamente, de alguns outros extratos ($p < 0,05$). Quercetina e mangiferina, mesmo na mais baixa concentração testada (1 µM), apresentaram pronunciada capacidade antioxidante. No teste de antiqumiotaxia, as amostras mais ativas foram: *Asplenium serra* ($94,06 \pm 1,63\%$), *Didymochlaena truncatula* ($93,41 \pm 0,93\%$) e *Blechnum occidentale* ($92,08 \pm 1,41$), sendo seus valores comparáveis aos da mangiferina e de outras 5 espécies avaliadas ($p < 0,05$). Todos os extratos demonstraram viabilidade da membrana no teste para alterações morfológicas. As amostras mais ativas frente a MAO-A, a 100 µg/mL, foram *D. truncatula* (82,61%), *Alsophila setosa* (82,21%), *Blechnum brasiliense* (79,47%), *Cyathea phalerata* (74,07%) e *C. delgadii* (70,32%). Todos os extratos foram menos ativos frente a MAO-B, indicando alta seletividade, especialmente de alguns extratos, para inibição apenas da subunidade A desta enzima. *Blechnum brasiliense* foi a única das espécies avaliadas que demonstrou potentes atividades em todos testes realizados. Investigações adicionais são necessárias a fim de identificar qual (is) composto (s) é (são) responsável (is) por essas atividades. Estes achados contribuem para a avaliação química e conhecimento farmacológico sobre essas samambaias brasileiras.

Palavras-chave: samambaias, análise química, antioxidante, antiqumiotaxia, inibidores da MAO

ABSTRACT

Chemical evaluation and biological activities of fern extracts from Southern and Southeastern Brazil

Antioxidants, anti-inflammatory and monoamine oxidase (MAO) inhibitors are related with some neuropathologies, such as Parkinson and Alzheimer diseases, being characterized as valuable therapeutic agents. Therefore, research on new sources of these compounds stimulating the development of new therapeutic options to improve the symptoms of these diseases. Ferns are a group of pteridophytes that present 9,000 species all around the world. Thus, the objectives of this study were the chemical and biological analysis of 14 extracts from ferns collected in Rio Grande do Sul (RS) and in São Paulo (SP). The crude ethanolic extracts of ferns were analyzed using RP-LC, with a DAD detector. The extracts were tested for their *in vitro* antioxidant activity, using the total reactive antioxidant potential (TRAP) method, at concentrations of 0.1, 1.0, 10.0, 50.0 and 100.0 $\mu\text{g/mL}$. Quercetin and mangiferin were also tested in the concentrations of 1.0, 10.0 and 100 μM . The antichemotaxic assay was performed using a 48-well plate and the extracts were assayed at concentrations of 0.01, 0.10, 1.0 and 10.0 $\mu\text{g/mL}$. Mangiferin was tested at concentrations of 0.1, 1.0, 10.0, 50.0 and 100.0 μM . The cytotoxic effects of ferns (10 $\mu\text{g/mL}$) on polymorphonuclear neutrophils were determined by the release of the cytosolic lactate dehydrogenase. The MAO inhibitory activity, of the extracts at 100 $\mu\text{g/mL}$, was also performed, using a fluorescence-based method. The majority of the analyzed plants showed high complexity in their extracts. In the species *Asplenium gastonis*, the glycosil flavonoid hesperidin, as well as, two kaempferol derivatives, were characterized, while *A. serra* presented the xanthone mangiferin. For the Blechnaceae family, two species (*Blechnum occidentale* and *B. brasiliense*) showed caffeic acid in their extracts. For *B. occidentale*, chlorogenic acid was also identified. The extract of *B. binervatum* presented rutin and quercetin 3D-galactoside, being this last compound found also in *B. brasiliense* chromatogram. The analysis of *Cyathea phalerata* allowed the identification of three kaempferol-glycoside derivatives. *Lastreopsis amplissima* chromatogram showed the presence of coumarin and its derivatives. The chemical investigation of some other analyzed species was not possible, based on the available standards used. Results of the antioxidant potential showed that all samples presented strong antioxidant effects at 10 $\mu\text{g/mL}$. The highest values of activity were found for *Asplenium serra*, *Lastreopsis amplissima* (collected in

RS) and *Cyathea dichromatolepis*, although their values do not differ significantly from some other samples ($p < 0.05$). Quercetin and mangiferin, even at the lowest concentration of 1 μM , presented strong antioxidant capacity. In the antichemotactic assay, the most active samples were *Asplenium serra* ($94.06 \pm 1.63\%$), *Didymochlaena truncatula* ($93.41 \pm 0.93\%$) and *Blechnum occidentale* (92.08 ± 1.41), where their activity was compared to another 5 fern extracts tested and to mangiferin ($p < 0.05$). All extracts showed adequate membrane cell viability when assayed for morphological alterations. The most active samples against MAO-A, at 100 $\mu\text{g/mL}$, were *D. truncatula* (82.61%), *Alsophila setosa* (82.21%), *Blechnum brasiliense* (79.47%), *Cyathea phalerata* (74.07%) and *C. delgadii* (70.32%). All samples were less active against MAO-B, indicating a high selectivity, especially for some extracts, to inhibit only the subunit A of the enzyme. *Blechnum brasiliense* was the only one species, among the analyzed, that showed potent activity for all tests. Further investigations are necessary in order to identify which compound/s is/are responsible for the demonstrated activities. These findings contribute to the chemical evaluation and also to the pharmacological knowledge about these Brazilian fern species.

Keywords: ferns, chemical analysis, antioxidant, antichemotaxis, MAO inhibitors

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| 1. INTRODUÇÃO GERAL..... | 1 |
| 2. OBJETIVOS..... | 7 |
| 2.1. OBJETIVO GERAL..... | 9 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 9 |
| 3. REVISÃO DO TEMA..... | 11 |
| 3.1. Doenças neurodegenerativas..... | 13 |
| 3.1.1. Importância da enzima monoamina oxidase..... | 15 |
| 3.1.2. Antioxidantes e neurodegeneração..... | 16 |
| 3.1.3. Antiinflamatórios e neurodegeneração..... | 18 |
| 3.2. Samambaias..... | 20 |
| 3.2.1. Aspectos botânicos..... | 20 |
| 3.2.2. Aspectos químicos..... | 23 |
| 3.2.3. Aspectos farmacológicos..... | 32 |
| 4. MANUSCRITO I..... | 37 |
| 5. MANUSCRITO II..... | 59 |
| 6. DISCUSSÃO GERAL..... | 91 |
| 7. CONCLUSÕES..... | 99 |
| 8. PERSPECTIVAS..... | 103 |
| 9. REFERÊNCIAS..... | 107 |
| 10. ANEXOS..... | 133 |

1. INTRODUÇÃO GERAL

As plantas medicinais constituem-se em importantes fontes de compostos biologicamente ativos, os quais possuem uma ampla variedade de estruturas, apresentando diversas propriedades físico-químicas e farmacológicas de interesse. A Organização Mundial da Saúde define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos” (WHO, 1998).

O uso dos produtos vegetais iniciou-se há milhares de anos por populações de vários países na busca de tratamento, cura e/ou prevenção para inúmeras patologias, apresentando-se como uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (VEIGA-JÚNIOR e MELLO, 2008).

Dados da Organização Mundial da Saúde estimam que cerca de 80% da população mundial ainda utiliza plantas medicinais no tratamento primário de problemas de saúde, como forma alternativa ou complementar aos medicamentos sintéticos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Esse uso se dá, principalmente, pelas populações carentes, devido à dificuldade de acesso aos centros de atendimento hospitalares e à obtenção de medicamentos. Estes motivos, associados à fácil aquisição e à tradicionalidade de uso de plantas medicinais, contribuem para sua utilização.

O Brasil apresenta a maior biodiversidade mundial, sendo a flora brasileira composta por, aproximadamente, 41.000 espécies, incluindo fungos, algas, briófitas, pteridófitas, gimnospermas e angiospermas (FORZZA *et al.*, 2010). Essa flora encontra-se distribuída nos cinco principais biomas: floresta amazônica, cerrado, mata atlântica, pantanal e caatinga e devido a essas características, apresenta-se como uma das mais ricas fontes de substâncias bioativas. No entanto, este potencial para a descoberta de plantas como fonte de novos compostos de interesse é insuficientemente explorado ou desconhecido (ALBUQUERQUE E HANAZAKI, 2006; LUSTOSA *et al.*, 2008; VEIGA-JÚNIOR e MELLO, 2008).

Apesar dos grandes avanços na medicina moderna, estima-se que cerca de 25 a 30% de todos os fármacos utilizados na terapêutica sejam derivados de produtos naturais (CALIXTO, 2005). Pesquisadores e a indústria farmacêutica, incentivados pela busca da população por plantas, atuam na investigação de novos fármacos a partir de fontes naturais, principalmente com o objetivo de minimizar a carência de informações sobre plantas medicinais.

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, a etnofarmacologia (MACIEL *et al.*, 2002). A descoberta de novas drogas a partir de fontes naturais deve, portanto, constituir-se de uma atividade multidisciplinar, garantindo o sucesso dessa busca.

Dentre os princípios ativos encontrados em plantas medicinais estão os metabólitos secundários, os quais possuem funções ecológicas importantes para a sobrevivência da espécie. O metabolismo secundário não está diretamente envolvido no crescimento e desenvolvimento da planta, mas é essencial para a sobrevivência e continuidade da espécie dentro do ecossistema (HARBORNE, 1982).

O estudo envolvendo os metabólitos secundários é de grande interesse, desde longa data, até a atualidade, sendo observada uma vasta gama de artigos publicados em periódicos científicos sobre o tema (FOGLIO *et al.*, 2006). Dentre esses compostos, estão os fenólicos, abundantes em inúmeras espécies vegetais, os quais desempenham, isoladamente ou em extratos vegetais, inúmeras atividades biológicas, avaliadas tanto em modelos *in vitro*, quanto em experimentos *in vivo*. Os fenólicos são divididos em diversas classes químicas, como flavonoides, xantonas, dentre outros (KOO e SUHAILA, 2001).

Dentre as espécies que compõem a flora mundial, estão as samambaias, pertencentes ao grupo das pteridófitas, compostas por um extenso grupo de plantas vasculares, amplamente distribuídas. Para essas plantas, existem relatos da presença de compostos fenólicos, principalmente derivados glicosilados de

flavonoides em sua composição (IWASHINA *et al.*, 1995; IMPERATO e MINUTIELLO, 1997; BRIGHENTE *et al.*, 2007; IMPERATO, 2007; FANG *et al.*, 2008; CAZAROLLI *et al.*, 2009). Além disso, outros metabólitos secundários são também relatados (LI *et al.*, 2009).

Diversas ações fisiológicas e farmacológicas são atribuídas aos fenólicos, tais como: inibição da enzima monoamina oxidase, atividades antitumoral, citotóxica, antibacteriana, antifúngica e tuberculostática, propriedades antiinflamatória e antioxidante, entre outras (LOPES *et al.*, 2000; HOWES *et al.*, 2003; DIDEROT *et al.*, 2006; FRANKLIN *et al.*, 2009; TANAKA *et al.*, 2009; SELA *et al.*, 2010).

Dentre as doenças que afetam a população, destacam-se as doenças neurodegenerativas, as quais vem apresentando incidência rapidamente aumentada no mundo inteiro devido, principalmente, ao aumento da expectativa de vida. A neurodegeneração é caracterizada por um conjunto de doenças que afetam principalmente a população de faixa etária mais elevada. A alta incidência dessas doenças ameaça a economia e o desenvolvimento social, bem como a vida e a saúde de milhões de pessoas, representando um desafio de saúde para o desenvolvimento global no próximo século (WHO, 2003). Assim, compostos que apresentam características neuroprotetoras vem sendo explorados na busca de novas entidades farmacologicamente ativas.

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 (PICADA *et al.*, 2005). Substâncias antioxidantes foram as primeiras drogas a serem estudadas em uma tentativa de retardar o progresso dessas doenças (SCHAPIRA e OLANOW, 2004). Inibidores da enzima monoamina oxidase 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 (KENNEDY *et al.*, 2003; RANG *et al.*, 2004).

Neste contexto, a busca por novas entidades químicas em vegetais, representa uma ferramenta importante no desenvolvimento de fármacos, para compor o arsenal terapêutico para tais patologias, que cada vez mais atingem a população frente a condições de estresse da sociedade atual e aumento da expectativa de vida.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O presente trabalho visa a investigação química e farmacológica de extratos de plantas de 5 diferentes famílias de samambaias, Aspleniaceae - *Asplenium gastonis* Fée, *Asplenium serra* Langsd. & Fisch., Blechnaceae - *Blechnum binervatum* (Poir.) C.V. Morton & Lellinger, *Blechnum brasiliense* Desv., *Blechnum occidentale* L., Cyatheaceae - *Alsophila setosa* Kaulf., *Alsophila sternbergii* (Sternb.) D.S. Conant, *Cyathea atrovirens* (Langsd. & Fisch.) Domin, *Cyathea delgadii* Sternb., *Cyathea dichromatolepis* (Fee) Domin e *Cyathea phalerata* Mart., Dryopteridaceae - *Dydimochlaena truncatula* (Sw.) J. Sm. e *Lastreopsis amplíssima* (C. Presl) Tindale e Pteridaceae - *Vittaria lineata* (L.) Sm., coletadas no Rio Grande do Sul (RS) e no estado de São Paulo (SP).

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar metodologia adequada para extração e investigação de compostos de interesse das espécies coletadas;
- Avaliar qualitativamente o perfil químico de extratos obtidos de espécies de samambaias coletadas no Rio Grande do Sul e em São Paulo, através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Comparação entre as constituições químicas das espécies coletadas nos dois diferentes estados brasileiros;
- Avaliar o efeito dos extratos de samambaias frente a radicais livres, em modelo *in vitro* de ensaio;
- Determinar a atividade antiquimiotática dos extratos, *in vitro*;
- Avaliar possíveis alterações de membrana, relacionadas à provável toxicidade celular dos extratos, pelo ensaio da enzima lactato desidrogenase (LDH), empregando-se leucócitos polimorfonucleares;

- Investigar a atividade dos extratos frente à monoamina oxi (MAO), através de modelo enzimático *in vitro*.

3. REVISÃO DO TEMA

3.1. Doenças Neurodegenerativas

Doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer (DA) e 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 Sistema Nervoso Central (SNC), uma vez que, para cada doença, existe uma vulnerabilidade seletiva de populações de células cerebrais (ROSS e POIRIER, 2004).

A doença de Parkinson é um distúrbio universal, 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. Estimativas da Organização Mundial da Saúde demonstram que, globalmente, 24,3 milhões de pessoas sofrem da doença de Alzheimer, com 4,6 milhões de novos casos anualmente (WHO, 2006).

A doença de Parkinson 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, levando à perda de neurônios dopaminérgicos e à degeneração precoce das terminações nervosas. 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 e McGEER, 2008).

Identificar o número exato de pacientes com DP é difícil, especialmente nos estágios iniciais da doença. Muitos atribuem os sintomas iniciais ao "processo de envelhecimento" e não procuram ajuda de seus médicos. O diagnóstico também é difícil, porque outras patologias apresentam sintomas semelhantes. Estudos clínico-patológico em material cerebral de bancos do

Canadá e do Reino Unido demonstraram que cerca de 25% dos pacientes foram diagnosticados incorretamente como portadores da DP pelos médicos (WHO, 2006).

A abordagem farmacológica para o tratamento sintomático dessa doença baseia-se na utilização do precursor de dopamina L-DOPA, de inibidores da enzima monoamina oxidase subunidade B (geralmente usados em associação com L-DOPA) ou de agonistas dopaminérgicos (LA REGINA *et al.*, 2008). Especificamente, fármacos inibidores da MAO-B protegem a dopamina da degradação intraneuronal (RANG *et al.*, 2004).

A DA é caracterizada por progressiva perturbação da memória e cognição. Depósitos extracelulares de peptídeo β -amilóide, ou A β , conhecidos como placas senis, derivadas da proteína precursora do amilóide (APP) e a presença de emaranhados neurofibrilares intracelulares (NFT) são as características neuropatológicas da doença (BRAAK e BRAAK, 1991; PARIHAR e HEMNANI, 2004). 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 (PARIHAR e HEMNANI, 2004; VEIGAS-JÚNIOR *et al.*, 2004).

Tratando-se de uma doença que envolve inúmeras alterações bioquímicas, várias abordagens terapêuticas vêm sendo demonstradas para tratamento da DA (AISEN, 2002; SCARPINI *et al.*, 2003). Destacando-se o restabelecimento dos níveis diminuídos de neurotransmissores, a neuroproteção e o combate a aspectos específicos da doença (CITRON, 2004). A principal estratégia empregada no tratamento da doença de Alzheimer visa aumentar a eficiência da transmissão colinérgica cerebral dos pacientes afetados, sendo a

alternativa terapêutica mais eficaz aquela que faz o uso de inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE).

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 acetilcolinesterase (AChE), monoamina oxidase (MAO) e catecol-O-metil-transferase (COMT), a deposição de proteína β -amilóide, e o estresse oxidativo. Dentre esses alvos, três são comuns para ambas as doenças (AChE, MAO e estresse oxidativo). Assim, o desenvolvimento de moléculas com alvos multifuncionais, ou seja, capazes de atuarem em mais de um destino etiológico das doenças, pode oferecer novas abordagens para o tratamento de muitos distúrbios, incluindo aqueles associados com declínio cognitivo (ROTH *et al.*, 2004). A abordagem pode ser a chave para os futuros regimes de tratamento para doenças neurodegenerativas com declínio cognitivo associado.

3.1.1. Importância da enzima monoamina oxidase

Monoamina oxidase (MAO) é uma enzima encontrada no cérebro e em regiões periféricas do organismo, sendo responsável pela desaminação oxidativa de catecolaminas e serotonina, inativando muitas substâncias bioativas, incluindo dopamina, serotonina, norepinefrina e tiramina. A MAO apresenta-se como duas principais isoformas, A e B. Alguns substratos possuem maior afinidade por determinada isoforma da enzima, sendo a dopamina o único substrato para ambas isoformas da enzima (YOUUDIM *et al.*, 2005).

Inibidores da MAO-A são candidatos no tratamento de depressão e transtornos de ansiedade. Sabe-se, de longa data, que distúrbios do humor, como os citados acima, afetam uma porcentagem significativa de indivíduos portadores da doença de Alzheimer e da doença de Parkinson 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 (WRAGG e JESTE, 1989; CUMMINGS e MASTERMAN, 1999; ZESIEWICZ *et al.*, 1999). A depressão

na DP é geralmente associada a uma redução de catecolaminas cerebrais, como a serotonina e a dopamina.

Enquanto inibidores da MAO-A estão associados ao tratamento da depressão, inibidores da MAO-B são utilizados para o tratamento sintomático da DP. Essa divisão é contestável, uma vez que inibidores seletivos e reversíveis da MAO-A, como a moclobemida, também podem ser empregados no tratamento da DP, por demonstrarem melhora psicomotora e sobre a memória de longo prazo (YOU DIM e BAKHLE, 2006).

A relação entre a DA e o aumento da atividade enzimática da monoamina oxidase (MAO) é conhecida há muitos anos, sendo a atividade da MAO elevada em pacientes com DA (JOSSAN *et al.*, 1991). 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 (PRIEST *et al.*, 1995) 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).

3.1.2. Antioxidantes e neurodegeneração

O desbalanço entre a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a reparação da produção excessiva dos mesmos, causa danos oxidativos a membranas, proteínas, lipídios e genes, sendo os mecanismos de defesa do organismo capazes de controlar esse processo. O dano mediado por esses radicais livres está relacionado ao envelhecimento normal e a diversas doenças neurodegenerativas, sendo os metabólitos da oxidação, em muitas vezes, utilizados como biomarcadores desses distúrbios (GIULIANO *et al.*, 2003; ZARKOVIC, 2003; BEAL, 2004; FAROOQUI e FAROOQUI, 2009).

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 hidroxil; por fim, o cérebro possui baixos níveis de defesas antioxidantes, comparado a outros órgãos (BEHL, 1999).

Na doença de Alzheimer, alguns estudos *in vitro* e *in vivo* evidenciaram a formação de radicais livres que se dá através dos depósitos extracelulares de peptídeo β -amilóide ($A\beta$) que atraem e ativam as células da microglia, a qual produz radicais óxido nítrico (NO). Adicionalmente, $A\beta$ pode se converter a um estado radicalar. Além disso, na interação com a membrana neuronal, $A\beta$ induz a formação de peróxidos e induz a peroxidação lipídica (McGEER e McGEER, 1995; BEHL, 1999).

O estresse oxidativo associado à doença de Parkinson pode ser o resultado de um colapso na regulação da dopamina e de ferro. Este último, na presença de peróxido de hidrogênio, formado do metabolismo da dopamina, leva à formação de radicais livres, pela reação de Fenton (BARNHAM *et al.*, 2004). 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 (KIM *et al.*, 2000).

O óxido nítrico (NO) é um dos radicais acumulados que contribui para a neurodegeneração uma vez que estudos revelam a possibilidade existente de que o NO reaja com radicais livres de oxigênio, como superóxido, formando intermediário mais tóxico, como o peróxinitrito ($ONOO^-$). Adicionalmente, NO

pode reagir com lipídeos de membrana, induzindo a peroxidação lipídica (LIU *et al.*, 2002). Produtos da peroxidação lipídica, como malondialdeído, acroleína e 4-hidróxi-2,3-nonenal, são considerados marcadores dessas patologias (DEXTER *et al.*, 1989; PEDERSEN *et al.*, 1998; ARLT *et al.*, 2002; BUTTERFIELD *et al.*, 2002; SELLEY *et al.*, 2002).

Diante do exposto acima, pode-se analisar que uma característica comum das doenças de Alzheimer e de Parkinson é a sua relação com alterações nos níveis de ERO. Estas são capazes de ativar cascatas bioquímicas responsáveis por provocar neurodegeneração. As espécies reativas formadas provêm de múltiplas reações bioquímicas (VAN DER SCHYF *et al.*, 2006). Apesar do grande volume de dados evidenciando ação positiva dos antioxidantes em culturas de células que apresentam características dessas doenças neurodegenerativas, a avaliação clínica desses compostos é, ainda, limitada e escassa (MOOSMANN e BEHL, 2002).

3.1.3. Antiinflamatórios e neurodegeneração

A inflamação crônica parece ser um fator complicador em muitas das doenças relacionadas ao envelhecimento (McGEER *et al.*, 2005). Imunohistoquímica e evidências genéticas moleculares demonstram a presença de inflamação crônica nos tecidos afetados de diversas doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson, a esclerose múltipla, dentre outras (BRUCK e STADELMANN, 2003; McGEER e McGEER, 2004a; McGEER e McGEER, 2004b).

A doença de Alzheimer possui também um forte componente inflamatório, sendo observado aparente envolvimento de citocinas pró-inflamatórias na neuropatologia desta doença (AKIYAMA *et al.*, 2000). Os mediadores inflamatórios apresentam-se, portanto, como importantes candidatos na terapêutica da patologia. A hipótese seria que a neurodegeneração é um efeito proporcionado devido à resposta inflamatória causada pela presença de placas amilóides e emaranhados neurofibrilares (MOREIRA *et al.*, 2006).

Estudos clínicos preliminares e mais antigos já sugeriam que antiinflamatórios poderiam diminuir a taxa de declínio cognitivo na DA aumentando, portanto, o interesse pelo potencial envolvimento de mecanismos inflamatórios na progressão da doença (AISEN e DAVIS, 1994; McGEER e McGEER, 1997). Ainda, estudos sugerem que o uso prolongado de antiinflamatórios não-esteroides (AINEs) cause um atraso no aparecimento e retarde a progressão da DA (SCARPINI *et al.*, 2003). Entretanto, deve-se observar em qual estágio da doença que a terapia foi iniciada e, ainda, qual o fármaco escolhido para o tratamento, a fim de garantir a eficácia da terapia com esses agentes.

Diversas citocinas pró-inflamatórias já foram evidenciadas em tecidos *post mortem* de pacientes portadores de doença de Parkinson. Existe a hipótese de que essas citocinas sejam potentes ativadores da enzima sintetase indutora de óxido nítrico (iNOS) em células cerebrais (DING *et al.*, 1997). Esse óxido nítrico, que por sua vez é um radical livre, em excesso, é capaz de induzir danos oxidativos a essas células, causando efeitos deletérios irreversíveis.

Muitos estudos epidemiológicos indicam que o uso crônico de antiinflamatórios não-esteroides (AINEs) reduz muito o risco de DA, evidenciando a importância da reação inflamatória na DA. Ainda, subsequentes estudos indicam que o uso de AINEs também reduz o risco de DP (CHEN *et al.*, 2003). Sendo assim, a identificação dos principais mediadores da reação inflamatória e a descoberta de inibidores eficazes apresentam-se como relevantes temas para investigação no estudo de doenças neurodegenerativas.

Embora a inflamação não se apresente tipicamente como um fator desencadeante das doenças neurodegenerativas, dados recentes utilizando modelos animais evidenciam que as respostas inflamatórias envolvendo microglia e astrócitos (células alteradas na maioria dessas doenças) contribuem para a progressão das doenças (GLASS *et al.*, 2010). Porém, cabe aos

pesquisadores avaliar se a inibição dessas respostas será um meio seguro e eficaz de reverter ou retardar o curso dessas patologias.

3.2. Samambaias

3.2.1. Aspectos botânicos

As samambaias pertencem ao grupo das pteridófitas, apresentando-se como plantas vasculares que não produzem sementes, sendo sua reprodução realizada através de esporos. Essas plantas são muito antigas em termos evolutivos, possuindo raízes verdadeiras, caule do tipo rizoma e frondes (PRYER *et al.*, 2004; SMITH *et al.*, 2006). Samambaias possuem, em sua maioria, folhas verdes brilhantes, muitas apresentando tamanhos grandes, tornando-as tão visualmente atraentes que muitas são utilizadas e comercializadas como plantas ornamentais.

O filo Pteridophyta é amplamente distribuído pelo mundo, englobando uma riqueza estimada em mais de 13.000 espécies, sendo encontradas principalmente em climas tropicais e sub-tropicais (MORAN, 2008). Recentes estudos filogenéticos revelaram uma nova divisão para as plantas vasculares, na qual as samambaias fazem parte das eufilófitas, classe monilófitas (plantas sem semente), apresentando cerca de 9000 espécies mundialmente distribuídas. No Brasil estão catalogadas 1176 pteridófitas, das quais as samambaias representam a maioria das espécies (PRADO e SYLVESTRE, 2010).

Algumas espécies de samambaias 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 certamente 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 e 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 maior diversidade de samambaias, apresentando cerca de 65% das espécies, porém, mesmo em terras áridas ou em superfícies recém expostas a queimaduras, 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 inacessíveis.

O gênero *Pteridium* possui alta capacidade de colonização de ambientes, formando populações muito densas de suas plantas e, por essa razão, essas são

consideradas invasoras. *Pteridium* geralmente contém vários compostos químicos considerados cancerígenos, sendo muito perigosos para a saúde de animais e seres humanos que ingerem plantas que os contêm. Em situações em que são indesejados, ou seja, considerados “ervas invasoras”, vegetais do gênero *Pteridium* são dificilmente erradicados, portanto, a pesquisa ecológica acerca desse grupo continua a ser um assunto importante na área (ROBINSON, 2007). Estudos com *Pteridium* e outras samambaias abundantes têm ajudado a compreender as complexas relações entre essas plantas e seus ambientes.

As samambaias são compostas por diversas famílias vegetais, para as quais existem diversos estudos quanto à ocorrência no Brasil, especialmente no estado do Rio Grande do Sul. As análises realizadas por FRAGA (2007) no RS demonstraram a ocorrência de diversas espécies de samambaias no estado, observando-se para a região estudada (São Francisco de Paula), presença de 31 espécies dessas plantas, pertencentes a 17 gêneros e a 8 famílias. As famílias com maior riqueza específica encontradas foram Polypodiaceae (11 espécies) e Aspleniaceae (8) e o gênero que apresentou maior número de espécies foi *Asplenium* (8).

Outro estudo realizado no município de Osório, situado na região nordeste do RS, demonstrou presença de 53 espécies de pteridófitas compondo a vegetação local, sendo essas pertencentes a 31 gêneros e 16 famílias. Dessas famílias, 14 são 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, não pertencem à classe das samambaias (SANTOS e WINDISCH, 2008).

Em estudo realizado no município de Teutônia, RS, foi apresentada uma listagem de 71 espécies, pertencentes a 36 gêneros, ocorrentes no Morro da

Harmonia, nesta localidade. 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 e WINDISCH, 2007).

3.2.2. Aspectos químicos

Quanto à composição química, estudos realizados demonstram que os flavonóides canferol e quercetina, bem como seus derivados, são os compostos com maior número de relatos nas diferentes espécies de samambaias, distribuídas mundialmente. Outros estudos ainda relatam a presença de compostos de outras classes de metabólitos secundários, demonstrando a diversidade química encontrada entre diferentes espécies de samambaias, inclusive pertencentes ao mesmo gênero (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 flavonóides em espécies da família Aspleniaceae, dos quais canferol foi encontrado em 80% das espécies, 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 às suas composições químicas. Dezesesseis flavonóides 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 flavonóides 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 e HARBORNE, 1971; IMPERATO, 1980; RICHARDSON e LORENZ-LIBURNAU, 1982; IMPERATO, 1991a; IMPERATO, 1991b).

Para o extrato total 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 sesquiterpenóides tricíclicos, que possuem inúmeras atividades biológicas relatadas (KHAN *et al.*, 1971). Atualmente, existem mais de 50 cheilantanas conhecidas, encontradas em outras fontes vegetais e organismos marinhos (UNGUR e 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. polyanthose*, *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 puderam ser observados (MARKAM e 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 triterpenóides nestas espécies (ARAI *et al.*, 2003). Canferol e seus derivados, assim como derivados do ácido caféico, 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 cyatenosina A, um derivado spiropiranosil do ácido protocatecuico em extratos do caule dessa planta. Derivados dos ácidos caféico e cumárico também foram verificados, corroborando os resultados do outro autor.

BRESCIANI e colaboradores (2003) estudaram a composição fitoquímica 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 àquelas encontradas para a mesma espécie, oriundas de outros países.

Em pesquisa realizada com raízes de *Didymochlaena truncatula*, os autores encontraram derivados de lignana, como didymochlaenonas 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 IC₅₀ de 10 µg/mL (CAO *et al.*, 2006).

Pteridium aquilinum é uma samambaia conhecida por apresentar ptaquilosídeo, um glicosídeo sesquiterpenóide, considerado o principal composto cancerígeno e mutagênico dessa planta (CARVALHO *et al.*, 2006). 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 na quantidade de ptaquilosídeo que a planta apresenta (ALONSO-AMELOT, 1999; SMITH *et al.*, 1999).

Duas lactonas inéditas, angiopterlactonas A e B, além de três lactonas conhecidas, 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, incluindo seus diferentes isômeros e sesquiterpenos

foram isolados do extrato diclorometano das frondes de *Woodsia scopulina* (ECONOMIDES e ADAM, 1998).

Em recente revisão elaborada por SANTOS e colaboradores (2010) acerca das espécies de pteridófitas estudadas no Brasil, os autores encontraram 78 estudos químicos de 60 espécies e 2 variedades de plantas desse grupo, sendo a sua grande maioria pertencente ao subgrupo das samambaias. Muitos desses estudos já foram citados, mas outras plantas também foram avaliadas, como *Equisetum arvense*, a qual demonstrou presença de taninos, saponinas, flavonoides e esteroides na composição do extrato hidroalcoólico (DO MONTE *et al.*, 2004). Para *E. giganteum*, a presença de alcaloides, saponinas e flavonoides já foi descrita por DANIELSKI e colaboradores (2007).

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

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

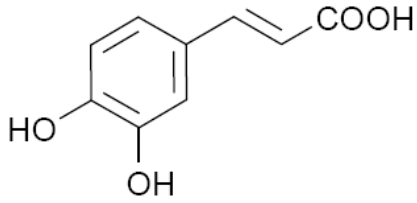
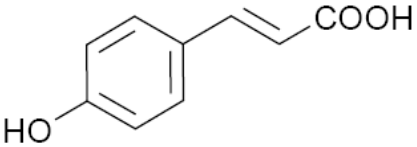
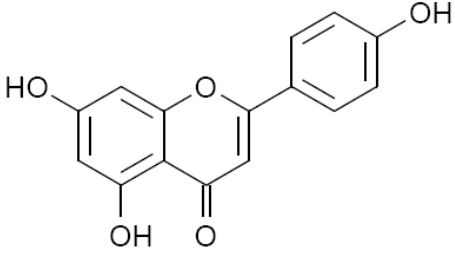
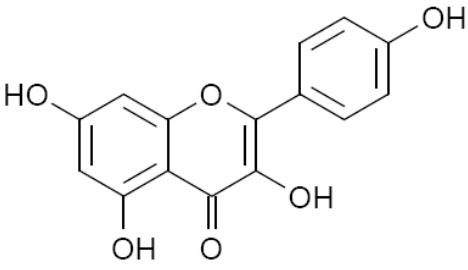
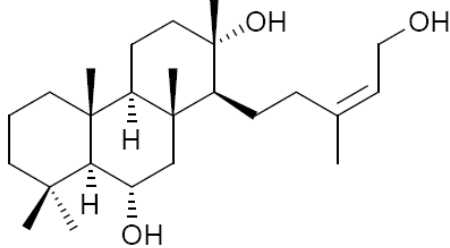
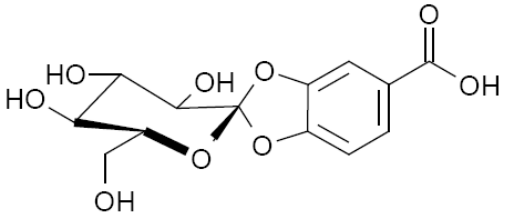
| Composto / Estrutura química | Espécie(s) |
|---|--|
|  <p>ácido caféico</p> | <i>Cyathea phalerata</i> (HORT, 2006; PIZZOLATTI <i>et al.</i> , 2007) |
|  <p>ácido p-cumárico</p> | <i>C. phalerata</i> (HORT, 2006; PIZZOLATTI <i>et al.</i> , 2007) |
|  <p>apigenina</p> | <i>Hymenophyllum barbatum</i> (MARKAM e WALLACE, 1980) Derivados glicosilados para espécies de <i>Asplenium</i> (MATSUMOTO <i>et al.</i> , 2003) |
|  <p>canferol</p> | <i>Hymenophyllum polyanthrose</i> , <i>Trichomanes thysanossoma</i> , <i>T. javanicum</i> e <i>T. recurvum</i> (MARKAM e WALLACE, 1980) Espécies da família Aspleniaceae (UMILKASOM e HARBORNE, 1991) Derivados glicosilados para <i>Cheilanthes glauca</i> (PASTENE <i>et al.</i> , 2001) e <i>Asplenium trichomanes-ramosum</i> (IWASHINA <i>et al.</i> , 1995) <i>Cyathea phalerata</i> (HORT, 2006) |
|  <p>cheilantatriol</p> | <i>Cheilanthes farinosa</i> (KHAN <i>et al.</i> , 1971) |
|  <p>cyatenosina A</p> | <i>Cyathea phalerata</i> (PIZZOLATTI <i>et al.</i> , 2007) |

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

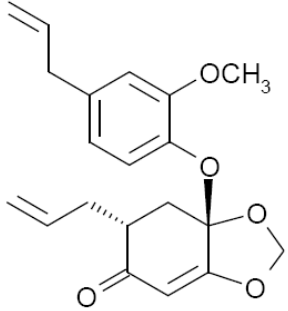
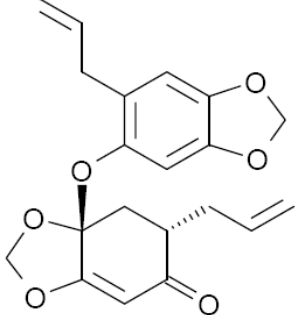
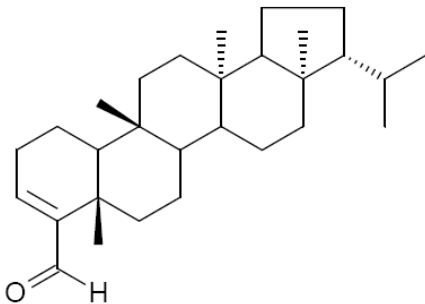
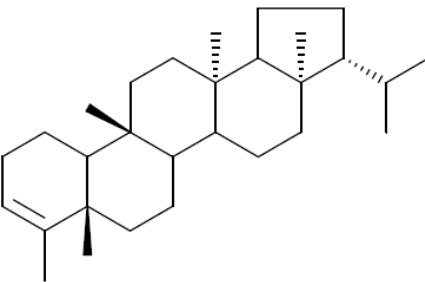
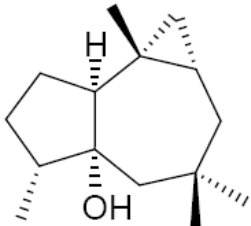
| Composto / Estrutura química | Espécie(s) |
|---|--|
|  | <i>Didymochlaena truncatula</i> (CAO <i>et al.</i> , 2006) |
| didymochlaenona A | |
|  | <i>Didymochlaena truncatula</i> (CAO <i>et al.</i> , 2006) |
| didymochlaenona B | |
|  | <i>Adiantum cuneatum</i> (BRESCIANI <i>et al.</i> , 2003) |
| filicenal | |
|  | <i>Adiantum cuneatum</i> (BRESCIANI <i>et al.</i> , 2003) |
| filiceno | |
|  | <i>Anemia tomentosa</i> var. <i>anthriscifolia</i> (SANTOS <i>et al.</i> , 2006) |
| isoafricanol | |

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

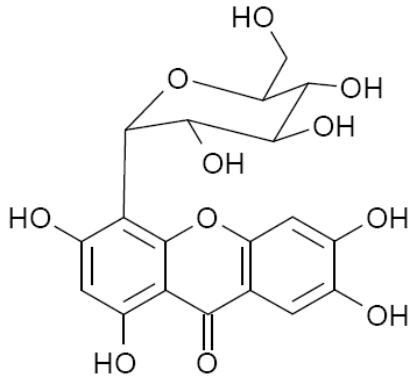
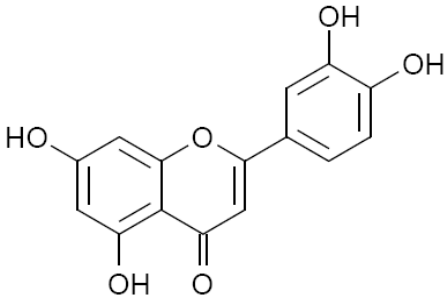
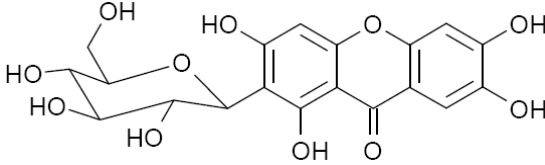
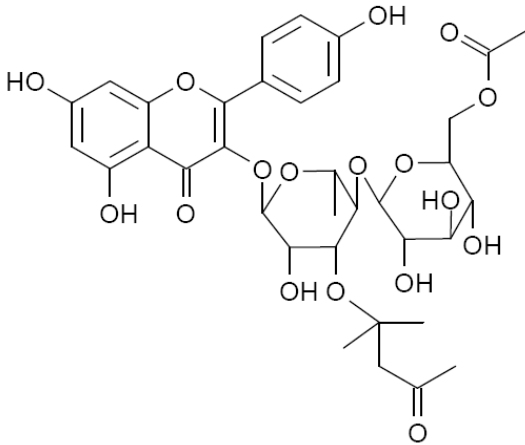
| Composto / Estrutura química | Espécie(s) |
|---|--|
|  | <p><i>Asplenium adiantum-nigrum</i>, <i>Asplenium montanum</i> e <i>Cystopteris fragilis</i> (SMITH e HARBORNE, 1971; IMPERATO, 1980; RICHARDSON e LORENZ-LIBURNAU, 1982; IMPERATO, 1991a; IMPERATO, 1991b;) Espécies da família Hymenophyllaceae (MARKAM e WALLACE, 1980)</p> |
| iso-mangiferina | |
|  | <p>Derivados glicosilados para espécies de <i>Asplenium</i> (MATSUMOTO <i>et al.</i>, 2003)</p> |
| luteolina | |
|  | <p><i>Asplenium adiantum-nigrum</i>, <i>Asplenium montanum</i> e <i>Cystopteris fragilis</i> (SMITH e HARBORNE, 1971; IMPERATO, 1980; RICHARDSON e LORENZ-LIBURNAU, 1982; IMPERATO, 1991a; IMPERATO, 1991b;) Espécies da família Hymenophyllaceae (MARKAM e WALLACE, 1980)</p> |
| mangiferina | |
|  | <p><i>Neocheiropteris palmatopedata</i> (YANG <i>et al.</i>, 2010)</p> |
| palmatosídeo A | |

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

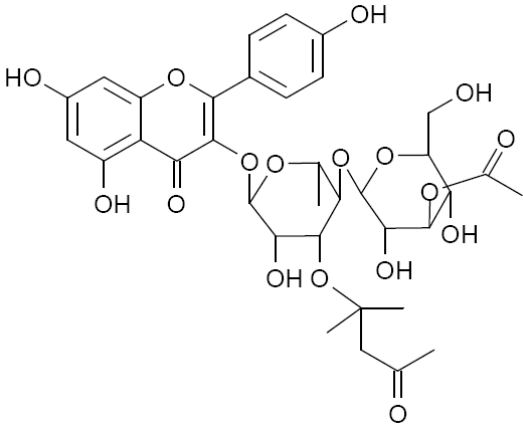
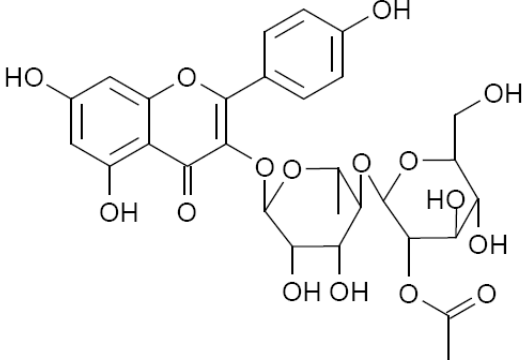
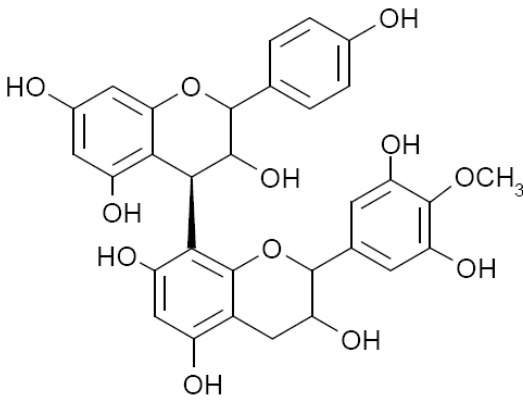
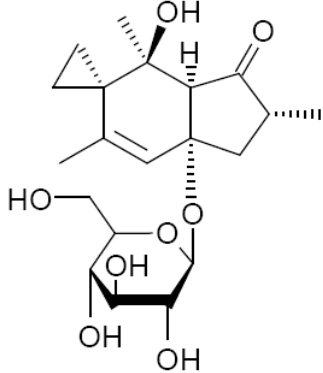
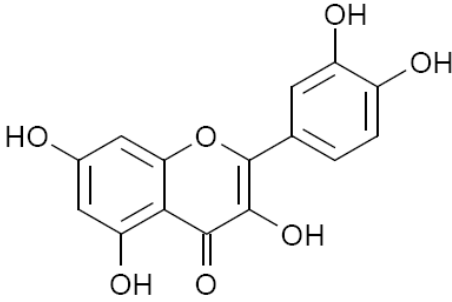
| Composto / Estrutura química | Espécie(s) |
|---|--|
|  | <i>Neocheiropteris palmatopedata</i> (YANG <i>et al.</i> , 2010) |
| palmatosídeo B | |
|  | <i>Neocheiropteris palmatopedata</i> (YANG <i>et al.</i> , 2010) |
| palmatosídeo C | |
|  | Espécies da família Aspleniaceae (UMILKASOM e HARBORNE, 1991) |
| proantocianidina A | |

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

| Composto / Estrutura química | Espécie(s) |
|--|---|
|  | <p><i>Pteridium aquilinum</i> (CARVALHO <i>et al.</i>, 2006)</p> |
| ptaquilosídeo | |
|  | <p><i>Hymenophyllum barbatum</i> (MARKAM e WALLACE, 1980) Espécies da família Aspleniaceae (UMILKASOM e HARBORNE, 1991) Derivados glicosilados para <i>Cheilanthes glauca</i> (PASTENE <i>et al.</i>, 2001) e <i>Asplenium trichomanes-ramosum</i> (IWASHINA <i>et al.</i>, 1995)</p> |
| quercetina | |

3.2.3. Aspectos farmacológicos

As atividades biológicas dessas plantas descritas na literatura são, em sua maioria, realizadas para extratos vegetais, obtidos com diferentes solventes de extração. Essas propriedades 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 extratos de *Cyathea phalerata* (HORT, 2006; HORT *et al.*, 2008), capacidade citotóxica e apoptótica de extrato aquoso de *Cheilanthes farinosa* frente a células hepáticas cancerosas (RADHIKA *et al.*, 2010), sendo relatadas, para a mesma espécie, atividades antinociceptiva e antiinflamatória (YONATHAN *et al.*, 2006). Relatos de atividade anticâncer para algumas espécies de gêneros distintos de samambaias (GRAHAM *et al.*, 2000; CHANG *et al.*, 2010) também foram encontrados, dentre outros trabalhos pesquisados.

A atividade antimicrobiana dos extratos 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 a *Escherichia coli*, enquanto que *Adiantum venustum* inibiu o crescimento de *Aspergillus terreus* em uma 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).

Alguns estudos farmacológicos vem sendo desenvolvidos especificamente para plantas da família Blechnaceae. NONATO e colaboradores (2009) demonstraram que extratos de folhas de *Blechnum occidentale*, quando administrados por via intraperitoneal (ip) e oral, produziram efeito

antiinflamatório e antinociceptivo, justificando seu uso na medicina popular, na qual esta planta é relatada no tratamento de doenças inflamatória e pulmonar, infecções urinárias e complicações hepáticas (BARROS e ANDRADE, 1997). Para *Blechnum orientale*, usada tradicionalmente no tratamento de diferentes doenças de pele, bem como na dor de estômago e bexiga, foram demonstradas potenciais atividades antioxidante, anticâncer, na terapia do câncer de cólon e antibacteriana, principalmente frente a *Staphylococcus aureus* resistente e a outras bactérias gram-positivas (LAI *et al.*, 2010). Recente estudo desenvolvido por HINCAPIÉ e colaboradores (2011) demonstrou atividade antioxidante, pelo método de DPPH (radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil), 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.

Em estudo realizado com cinco espécies de diferentes famílias, incluindo, *Acrostichum aureum* (Pteridaceae), *Asplenium nidus* (Aspleniaceae), *Blechnum orientale* (Blechnaceae), *Cibotium barometz* (Cyatheaceae), *Dicranopteris linearis* (Gleicheniaceae), quanto à capacidade antioxidante e antibacteriana de seus extratos, foi verificada maior capacidade sequestradora de radicais livres, pelo método de DPPH, 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* (IC₅₀= 5,4 µg/mL), *Nothoperanema hendersonii* (IC₅₀= 5,9 µg/mL) e *Braomea insignis* (IC₅₀= 6,1 µg/mL). Os autores ainda inferiram que, para a maioria dos extratos que apresentou 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 cafeoilquínico foi o composto com maior atividade antioxidante nos métodos de DPPH ($IC_{50} = 10 \mu M$) e capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (2 mM). Derivados do ácido caféico, 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 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 pteridófitas, desenvolvida por TALUKDAR e colaboradores (2011), os autores encontraram relatos desse potencial para 31 espécies de samambaias, sendo que destas, 6 são pertencentes ao gênero *Equisetum*.

Os compostos isolados da samambaia *Neocheiropteris palmatopedata* apresentados na seção anterior, foram avaliados quanto às suas capacidades anticâncer, baseadas na inibição do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), produção de NO, inibição da enzima aromatase, dentre outros. Os compostos mais ativos foram: palmatosídeos B e C, que inibiram o TNF- α , apresentando valores de IC_{50} de 15,7 e 24,1 μM , respectivamente e multiflorina A, que inibiu a enzima aromatase, com valor de IC_{50} de 15,5 μM (YANG *et al.*, 2010). Dentro do tema atividade anticâncer, o flavonoide isolado de *Thelypteris torresiana*, protoapigenona, demonstrou potente atividade frente a células ovarianas cancerosas, demonstrando-se interessante agente na quimioterapia (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 e PAMUKCU, 1982). A substância responsável por essa atividade é o ptaquilosídeo, o qual é eliminado na urina, tornando-se capaz de induzir tumores de bexiga em bovinos (CARVALHO *et al.*, 2006). Foi verificada excreção deste composto também no leite, com risco potencial para a saúde humana (ALONSO-AMELOT, 1997).

No estudo abordado anteriormente a respeito da constituição química de *Adiantum cuneatum* (popularmente conhecida como avenca), os autores realizaram, também, avaliação das capacidades analgésica e antiinflamatória da fração não-polar e, ainda, dos compostos isolados filiceno e filicenal. Os resultados das análises demonstraram que a fração hexânica, bem como as substâncias isoladas, exibiram potentes atividades analgésica e antiinflamatória nos modelos em ratos avaliados: teste de contorção e dor induzida por formalina. O filiceno apresentou inibição com valor de IC₅₀ de 19,5 mmol/kg de peso corporal no teste de contorção, administrado via ip. Este composto, na concentração de 10 mg/kg (24 mmol/kg), exibiu atividade antiinflamatória observada no modelo da formalina. Os autores concluem que esses resultados confirmam e justificam o uso popular dessa planta no tratamento de processos dolorosos (BRESCIANI *et al.*, 2003).

Estudo mais recente do mesmo grupo de pesquisa, acerca do triterpeno 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 via ip, sendo mais potente do que as substâncias de referência, acetaminofeno, diclofenaco e ácido acetilsalicílico, nas mesmas doses testadas. Filiceno também produziu inibição dose-dependente da dor causada pela capsaicina e pelo glutamato, com valores de IC₅₀ 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).

4. MANUSCRITO I

A ser submetido ao periódico **Phytochemical Analysis**

**CHEMICAL PROFILES, BY RP-LC ANALYSIS, OF FERNS FROM
SOUTHERN AND SOUTHEASTERN BRAZIL**

Juliana M. M. Andrade^{a,*}, Maria A. Kieling-Rubio^b, Paulo R. H. Moreno^c, Gilsane L. Von Poser^a and Amélia T. Henriques^a

^aFaculdade de Farmácia, UFRGS, Av. Ipiranga 2752, 90.610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

^bDepartamento de Botânica, UFRGS, Av. Bento Gonçalves, Campus, 93022-000, Porto Alegre, RS, Brazil

^c Departamento de Química Fundamental, USP, Av. Prof. Lineu Prestes 748 B11 Cidade Universitária, 05508-000, São Paulo, SP, Brazil

Corresponding author. Tel.: +55 51 3308 5258.

E-mail address: juandrdep@gmail.com (J.M.M. Andrade).

ABSTRACT

Introduction: Brazilian flora comprises about 41,000 described species, among them, 1,176 species are from pteridophytes division. Ferns are a group of pteridophytes with few related studies.

Objectives: This study aimed the chemical analysis of extracts from seven fern species collected in Southern and Southeastern of Brazil.

Materials and Methods: The air-dried and powdered aerial parts of ferns were extracted with ethanol, filtered and evaporated to dryness. Then, the samples were dissolved in methanol to a final concentration extracts of 30 mg/mL. The analyses were performed using RP-LC, with a DAD detector. A thin layer chromatography (TLC) of the extracts was also employed.

Results: The majority of the analyzed plants showed high complex extracts. *Asplenium gastonis* presented hesperidin and two kaempferol derivatives in its extract, while *A. serra* showed the xanthone mangiferine. For the Blechnaceae family, two species (*Blechnum occidentale* and *B. brasiliense*) showed caffeic acid in their extracts. For *B. occidentale*, chlorogenic acid was also identified, and for *B. brasiliense* was identified quercetin 3D-galactoside, besides caffeic acid. The extract of *B. binervatum* presented rutin and quercetin 3D-galactoside. The analysis of *Cyathea phalerata* allowed the identification of three kaempferol-glycoside derivates. Southeast *Lastreopsis amplissima* extract showed more complex composition compared with southern species.

Conclusion: This study presents a screening of the chemical profile of some ferns and contributes to the knowledge of the chemical composition of these plants, which are still little studied.

Keywords: Ferns, Liquid Chromatography, Mangiferin, Flavonoids, HPLC.

SHORT ABSTRACT

The chemical analysis, by RP-LC, of seven ferns from Southern and Southeastern Brazil was performed. Hesperidin was found for *Asplenium gastonis* and mangiferine was shown for *A. serra*. For *Blechnum occidentale*, caffeic and chlorogenic acids were observed. For *B. brasiliense* just caffeic acid was found in the chromatogram. The extract of *B. binervatum* presented rutin and quercetin 3*D*-galactoside, among others. *Cyathea phalerata* presented three kaempferol-glycoside derivatives. Southeast *Lastreopsis amplissima* showed more complex composition compared with the Southern species.

INTRODUCTION

Plants are an important source of biological active natural products, which present a wide variety of structure, physico-chemical and biological properties. Brazil presents several important biomes and ecosystems, which lodge about 10% to 20% of the world's known living species. Brazilian flora comprises about 41,000 described species, including Fungi, Algae, Bryophytes, Pteridophytes, Gymnosperms and Angiosperms (Forzza *et al.*, 2010). Among the plant kingdom division, Pteridophyta represent a group of vascular plants, presenting more than 13,000 species which many are tree ferns found in the tropical and subtropical regions of the world (Moran 2008). Brazil has with about 1,200 species of this group (Forzza *et al.*, 2010).

Few studies have demonstrated the presence of some secondary metabolites in ferns. The most related are flavonoid glycosides, mainly kaempferol, quercetin, luteolin and apigenin derivatives. Other compounds such as xanthenes, spiropyranosyl derivatives and triterpenoids have also been reported. For Brazilian species, the number of studied ferns is still low. The extract of these plants appears as complex mixtures of substances, requiring the use of sensible techniques that allow the separation of compounds for further identification. Among the separation techniques used, is the reverse phase liquid chromatography (RP-LC) that represents nowadays the most widespread separation technique applied commonly in pharmacology, toxicology, clinical analysis as well as various research fields (Pragst *et al.*, 2004; Stroh *et al.*, 2008; Vogeser and Seger, 2008).

In this context, the chemical analysis of Brazilian plants still poorly studied, such as ferns, which have wide variety of species, is very important since new compounds and/or active extracts can be discovered. Thus, this study aimed the chemical analysis, by RP-LC, of crude ethanolic extracts of seven fern species collected

in southern and southeastern Brazil, trying to identify some compounds. A thin layer chromatography (TLC) of the extracts was also performed.

EXPERIMENTAL

Plant material

Six plant specimens of ferns were collected in the regions of Morro Reuter (29°32'17"S, 51°04'51"W) and of Campo Bom (29°40'39"S, 51°01'97"W), Rio Grande do Sul state (RS), Brazil, in September 2010 and received botanic identification by Msc. Angélica Kienling-Rubio. A voucher specimen has been deposited at the Herbarium of Instituto de Ciências Naturais from Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil (ICN/UFRGS).

Two specimens from ferns were collected in the Reserva Biológica Alto da Serra de Paranapiacaba (23°46'18"-23°47'05"S, 46°20'24"-46°18'15"W), Santo André, São Paulo state (SP), Brazil, in August 2010. The botanical identification of specimens was done by Dr. Jefferson Prado. A voucher specimen has been deposited at the Herbarium of Universidade de São Paulo (SPF/USP).

The species collected in different locations of Southern and Southeastern of Brazil are described in Table 1.

Extraction method

The air-dried and powdered aerial parts of ferns were extracted with ethanol in a turboextraction system, using IKA T50 homogenizer Ultra Turrax apparatus. The obtained extracts were filtered and evaporated under reduced pressure, on a rotary evaporator at 40–45 °C. Then, the samples were resuspended in methanol (LC grade) to obtain a final concentration extracts of 30 mg/mL. These extracts were filtered

through a 0.45 µm pore size membrane (Millipore, Bedford, USA) before injection into the LC system.

Chemicals and Reagents

Caffeic acid and 3-*D*-galactoside-quercetin were obtained from Fluka Chemie (Buchs, Switzerland). Hesperidin and rutin were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Kaempferol, flavone and quercetin were purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA). Apigenin was obtained from Extrasynthese (Genay Cedex France) and chlorogenic acid from MP Biomedicals (Illkirch, France). Mangiferin was obtained as a secondary standard metabolite from *Mangifera indica* L. Methanol (HPLC grade) was purchased from Tedia (Fairfield, USA). Trifluoroacetic acid (analytical grade) was obtained from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). All other chemicals were analytical grade.

Thin layer chromatography (TLC)

For the thin layer chromatographic analysis of plants from the genus *Asplenium*, the same extraction method described above was used, changing only the dissolution of the extracts, which was performed in methanol (analytical grade), obtaining samples final concentrations of 10 mg/mL. Each extract was applied (20 µL) on a thin-layer silica plate (Merck, Darmstadt, Germany). After solvent evaporation, the plate was developed in ethyl acetate:formic acid:acetic acid:water (100:11:11:26) according to Wagner and Bladt (1996) described method. The plate was then sprayed with natural reagent A and exposure to UV light and visible to detect the compounds.

Liquid chromatographic conditions

The analyses were performed using a Waters 2695 Separation Module, consisting of a pump, a column heater, an auto sampler, a degasser and a DAD (UV/VIS Waters 996) photodiode array detector; equipment control, data acquisition and integration were managed with Waters Empower software (Waters, Milford, MA, USA). A C18 reversed-phase column (Phenomenex, 150 x 4.6mm x 5 μ m) with a C18 Security Guard cartridge (C18) operating at a temperature of 25 ± 2 °C was used.

Elution of samples was performed using a linear gradient system, and the mobile phases consisted of a mixture of water:trifluoroacetic acid (100:0.025; v/v) (A) and methanol (100; v) (B). The gradient profile was: 0–10 min from 5 to 17% of B, 10–15 min from 17 to 30% of B, 15–40 min from 30 to 50% of B, 40–45 min from 50 to 100% B. 45–70 min 100% of B. At the end of each analysis, 7 min of 95% A was used to restore the initial conditions. The flow-rate was 0.6 mL/min and the injection volume was of 10 μ L. The detection was at 254 nm. All sample analysis were compared with pure commercial standards and with a secondary standard substance (mangiferin) injected at the same conditions.

RESULTS AND DISCUSSION

The majority of the plant extracts showed to be highly complex, with many peaks in both, polar, medium and non-polar regions of the chromatograms. The LC of *Asplenium gastonis* (Fig. 1) presented mainly eight compounds, being most from high to medium polarity, having greater affinity for 30 to 50% of B mobile phase. In comparison with the chromatograms and UV spectra of the standards tested in our study, it was possible to analyze that the sample present some compound with quercetin related structure (peak at 20.3 min), two kaempferol derivatives (27.50 min; 28.21 min) and with hesperidin (47.56 min) as chemical compounds of the extract.

Another species of Aspleniaceae family tested was *Asplenium serra*. This chromatogram species (Fig. 2A) presented mangiferin as main compound. The retention time of mangiferin was 21.95 min (UV_{max}: 258.1, 315.3 and 361.8 nm). The identification of the compound was confirmed comparing the chromatogram and UV spectra of the peak with those of the isolated substance (Fig. 2B). The TLC performed for the samples confirmed the presence of mangiferin in the extract of *A. serra*. According to this analysis, the R_f of bands from mangiferin and *A. serra* extract was the same: 0.64 (Fig. 3).

Some authors have previously reported the presence of xanthonones as mangiferin and its analogue (isomangiferin) in *Asplenium* species such as *Asplenium montanum* (Smith and Harborne, 1971) and *Asplenium adiantum-nigrum* (Imperato, 1991). Matsumoto *et al.* (2003) in their work found the presence of flavonoids in hybrids of *Asplenium normale*. Apigenin and luteolin glycosides were the mainly detected compounds of the natural hybrids analyzed.

For any Brazilian fern species were previously identified the presence of xanthonones in its composition. Mangiferin is well known as antioxidant and analgesic compound (Dar *et al.*, 2005), having antidiabetic activity, mainly in type 2 diabetes (Muruganandan *et al.*, 2005), also exhibiting cardioprotective and antigenotoxic properties (Prabhu *et al.*, 2006; Viswanadh *et al.*, 2010) among others.

Three species of Blechnaceae family were also analyzed (Fig. 4). The chromatograms of two of them (*Blechnum occidentale* and *B. brasiliense*) showed caffeic acid in their composition. Another similarity was an unidentified peak at approximately 28 min (UV_{max} 301 nm) for *B. occidentale* and *B. binervatum*. The extract of *B. occidentale* demonstrated also the presence of chlorogenic acid. The chromatogram of *B. binervatum* showed also the presence of rutin and 3D-galactoside-

quercetin, and another compound with UV spectrum similar to that of rutin, being a quercetin derivative. *Blechnum brasiliense* presented a compound with UV_{max} at 253 and 353 nm (30.10 min) that was identified as quercetin 3*D*-galactoside, by comparisons of the UV spectra and retention time of an authentic sample.

The chromatogram of *Cyathea phalerata* (Fig. 5) presented six compounds majority, 5 of them with similar UV spectra. For this sample, we found two distinct regions where compounds were eluted, being one of them relatively more polar and another non-polar region. Three kaempferol-derivatives glycosides were characterized in the extract of this fern species.

Triterpenes, phenolic acids and flavonoids, whose aglicone is frequently kaempferol, were found in some records of phytochemical Brazilian studies of the genus *Cyathea*. Pizzolatti *et al.* (2007) showed the presence of a glucopyranosyl caffeic acid, a glucopyranosyl *p*-coumaric acid, besides cyathenosin A in their study with *Cyathea phalerata*. The isolation of kaempferol, and its glucopyranoside as well as a glucopyranosyl caffeic acid was described in the studies of *C. phalerata* by Brighente *et al.* (2007). Further studies using the same plant, resulted in the isolation and identification of 9 substances, being kaempferol-3-neohesperidoside the major component of the extract (Hort *et al.*, 2008).

The species *Lastreopsis amplissima* was the only collected in the two regions of Brazil (south and southeast) to compare the chemical composition. Four of the 5 majority peaks of *L. amplissima* (RS) presented UV maximum (215.5 and 277.1 nm, or just 277.1 nm) very similar to those found for coumarin and its derivatives. These substances are of medium polarity, since they were eluted until 50% of B. For *L. amplissima* (SP) the same UV_{max} were found for four compounds and another four non-

polar and non-identified substances, eluted with 100% B, were viewed in this chromatogram (results not shown).

Many factors are involved in the composition differences observed for plants of same species, collected in different locations. Different weather and soil conditions of southern and southeastern Brazil regions, where samples were collected, are the main reasons for the differences in the compounds found in the same sample plant (*Lastreopsis amplissima*), obtained from these different regions. The age and plant development, as well as, different plant organs, are also of considerable importance and may influence not only the total amount of metabolites produced, but also the relative proportions of the mixture. Other factors also may affect the final content of secondary metabolites in medicinal plants, such as conditions of collection, stabilization and storage that can have a great influence on the quality and consequently in the therapeutic value of the final product (reviewed in Gobbo-Neto and Lopes, 2007).

CONCLUSIONS

The fern extract chromatograms showed high complexity of compounds, with many peaks in both polar, medium polarity and non-polar regions of the chromatograms. For *Asplenium gastonis* chromatogram could be observed polar and medium polarity regions, being found hesperidin and kaempferol derivatives in its extract. For *Asplenium serra*, mangiferin was identified as the main compound of the extract. Caffeic acid was found in *Blechnum occidentale* and *B. brasiliense* extracts, whereas rutin and quercetin 3D-galactoside were found in *Blechnum binervatum* extract. Chlorogenic acid was also identified in *B. occidentale* chromatogram. *Cyathea phalerata* showed both polar and non-polar regions on its chromatogram. *Lastreopsis*

amplissima seems to present coumarin derivatives in its extract and the sample of southeast Brazil showed more complex composition.

The results of this work should be further more explored to better understand the chemical composition of these Brazilian pteridophytes. The results described here are the first report of phytochemical studies of ferns from southern and southeastern Brazil, being very important for the future isolation of new compounds of interest in these plants.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by CAPES and CNPq, Brazil.

REFERENCES

- Brighente MC, Dias M, Verdi LG, Pizzolatti MG. 2007. Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species. *Pharm Biol* **45(2)**: 156-161.
- Dar A, Faizi S, Naqvi S, Roome T, Zikr-ur-Rehman S, Ali M, Firdous S, Moin ST. 2005. Analgesic and antioxidant activity of mangiferin and its derivatives: the structure activity relationship. *Biol Pharm Bull* **28(4)**: 596-600.
- Dias BFS. 2003. A implementação da convenção sobre biodiversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades. In *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. (5th Edn.). UFRGS/ UFSC Academic Press, Porto Alegre/Florianópolis, Brazil; 13-26.
- Forzza RC, Leitman PM, Costa AF, Carvalho Jr AA, Peixoto AL, Walter BMT, Bicudo C, Zappi D, Costa DP, Lleras E, Martinelli G, Lima HC, Prado J, Stehmann JR,

Baumgratz JFA, Pirani JR, Sylvestre L, Maia LC, Lohmann LG, Queiroz LP, Silveira M, Coelho MN, Mamede MC, Bastos MNC, Morim MP, Barbosa MR, Menezes M, Hopkins M, Secco R, Cavalcanti TB, Souza VC. 2010. Introdução. In *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

Gobbo-Neto L, Lopes NP. 2007. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. *Quim. Nova* **30(2)**: 374-381.

Hort MA, Dalbó S, Brighente IMC, Pizzolatti MG, Pedrosa RC, Ribeiro-do-Valle RM. 2008. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Cyathea phalerata* Mart. (Cyatheaceae). *Basic Clin Pharmacol* **103(1)**: 17-24.

Imperato F. 1991. Xanthone 2,4-di-C-glycosides from *Asplenium adiantum-nigrum*. *Phytochemistry* **30(11)**: 3839-3840.

Matsumoto S, Iwashina T, Kitajima J, Mitsuta S. 2003. Evidence by flavonoid markers of four natural hybrids among *Asplenium normale* and related species (Aspleniaceae) in Japan. *Biochem Syst Ecol* **31**: 51-58.

Moran RC. 2008. Diversity, biogeography and floristics. In *Biology and evolution of ferns and lycophytes*. Ranker TA, Haufler CH (Ed.). Cambridge University Press. Cambridge; 417-461.

Muruganandan S, Srinivasan K, Gupta S, Gupta PK, Lal J. 2005. Effect of mangiferin on hyperglycemia and atherogenicity in streptozotocin diabetic rats. *J Ethnopharmacol* **97(3)**: 497-501.

- Pizzolatti MG, Brighente IMC, Bortolluzi AJ, Schripsema J, Verdi LG. 2007. Cyathenosin A, a spiropyranosyl derivative of protocatechuic acid from *Cyathea phalerata*. *Phytochemistry* **68**: 1327-1330.
- Prabhu S, Jainu M, Sabitha KE, Devi SCS. 2006. Cardioprotective effect of mangiferin on isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Indian J Exp Biol* **44**: 209-215.
- Pragst F, Herzler M, Erxleben BT. 2004. Systematic toxicological analysis by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). *Clin Chem Lab Med* **42**: 1325–1340.
- Smith DM, Harborne JB. 1971. Xanthones in the Appalachian *Asplenium* complex. *Phytochemistry* **10**: 2117-2119.
- Stroh JG, Petucci CJ, Brecker SJ, Nogle LM. 2008. Sub-2 μm HPLC coupled with sub-ppm mass accuracy for analysis of pharmaceutical compound libraries. *J Sep Sci* **31**: 3698–3703.
- Viswanadh EK, Rao BN, Rao BSS. 2010. Antigenotoxic effect of mangiferin and changes in antioxidant enzyme levels of Swiss albino mice treated with cadmium chloride. *Hum Exp Toxicol* **29(5)**: 409-418.
- Vogeser M, Seger C. 2008. A decade of HPLC-MS/MS in the routine clinical laboratory – goals for further developments. *Clin Biochem* **41**: 649–662.
- Wagner H, Bladt S. 1996. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. 2. ed. Berlin Heidelberg: Springer Verlag; 384.

Table 1. Species of ferns collected in different locations of Rio Grande do Sul state and in São Paulo state, Brazil.

| Specimens | Rio Grande do Sul state | | São Paulo state |
|---|-------------------------|------------|---------------------|
| | Morro Reuter* | Campo Bom* | RBASP, Santo André* |
| <i>Asplenium serra</i> Langsd. & Fisch. | | x | |
| <i>Asplenium gastonis</i> Fée | x | | |
| <i>Blechnum binervatum</i> (Poir.) C.V. Morton & Lellinger | x | | |
| <i>Blechnum brasiliense</i> Desv. | x | | |
| <i>Blechnum occidentale</i> L. | | x | |
| <i>Lastreopsis amplissima</i> (C. Presl) Tindale | x | | x |
| <i>Cyathea phalerata</i> Mart. | | | x |

*Morro Reuter (29°32'17"S, 51°04'51"W), Campo Bom (29°40'39"S, 51°01'97"W), RBASP (Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba), Santo André (23°46'18"-23°47'05"S, 46°20'24"-46°18'15"W).

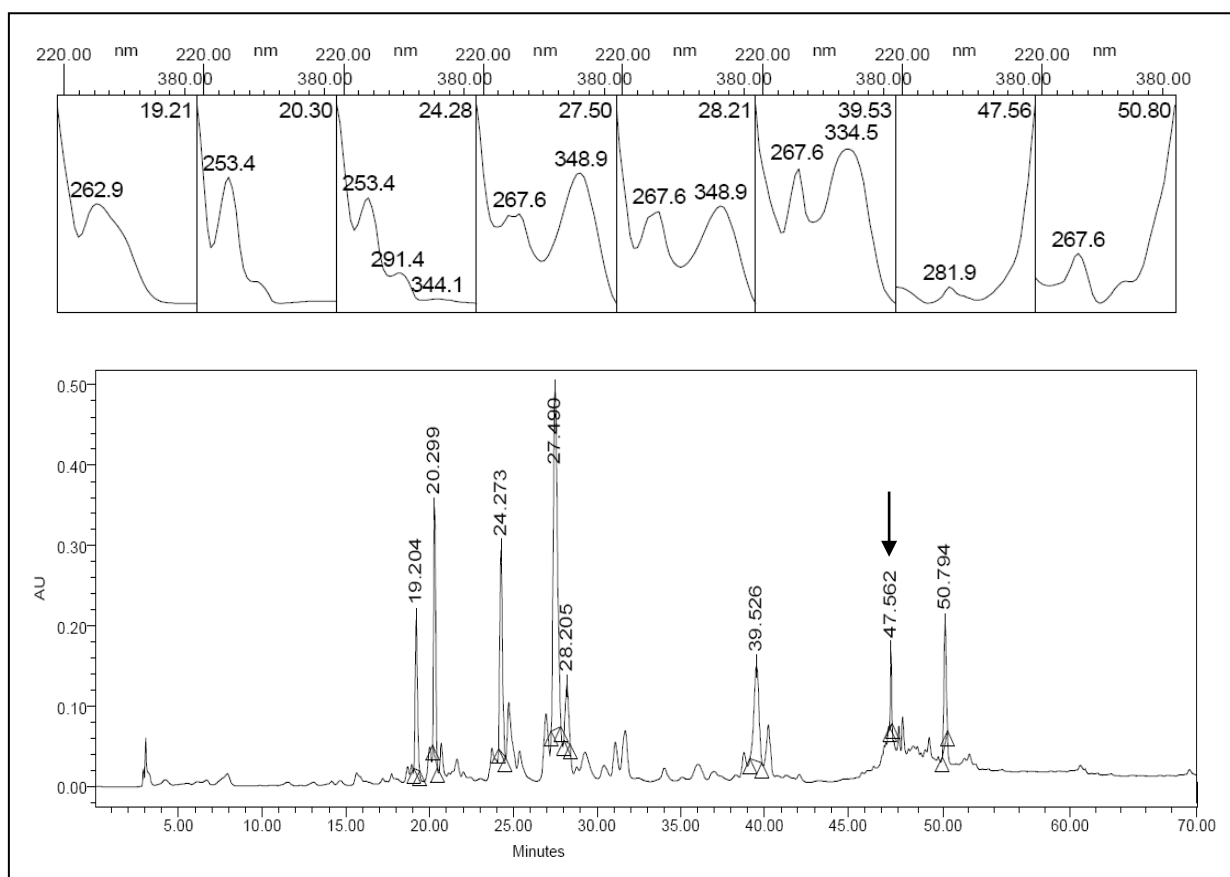


Fig. 1. Chromatogram and UV spectra of major compounds of *Asplenium gastonis*. The selected peak is from hesperidin. The mobile phases used in the linear gradient system consisted of a mixture of water:trifluoroacetic acid (100:0.025; v/v) (A) and methanol (100; v) (B). The flow-rate was 0.6 mL/min and the injection volume was of 10 μ L. The detection was at 254 nm.

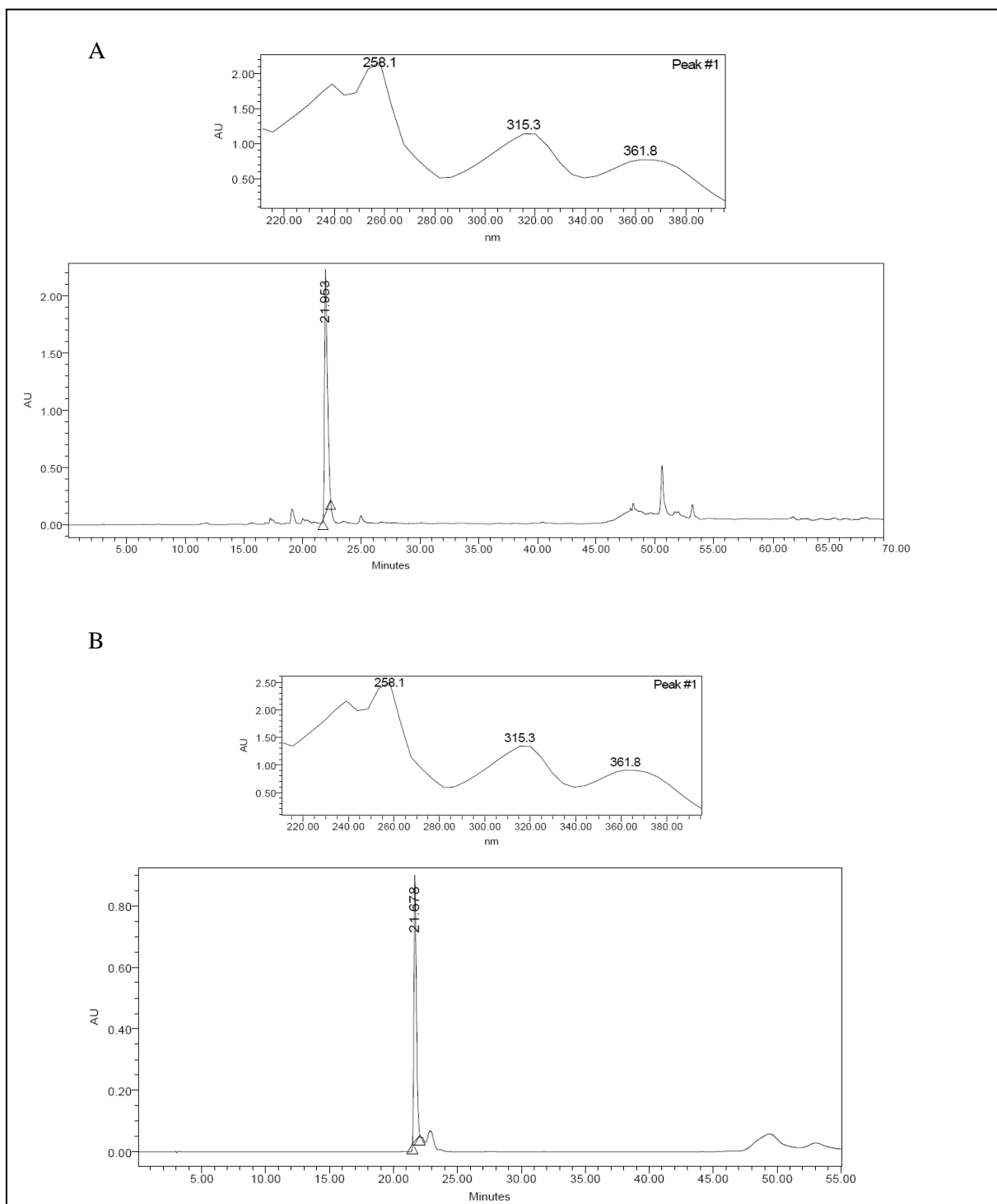


Fig. 2. A) Chromatogram and UV spectra of *Asplenium serra* extract. B) Chromatogram with UV spectra of mangiferin. The analysis of this sample was aborted in 55 min, being the compound of interest eluted before that time. The detection was at 254 nm. HPLC analysis conditions are described in section of Materials and methods.

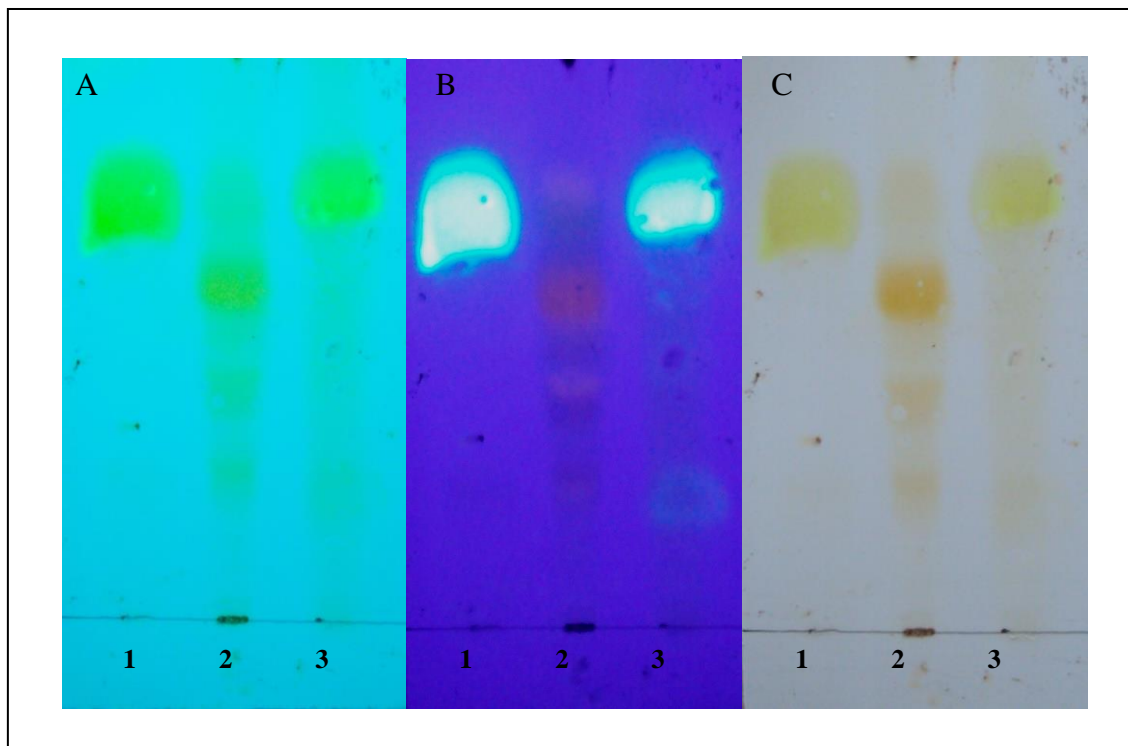


Fig. 3. Thin layer chromatographic analysis, using silica gel plate, of standard substance and some fern extracts. The plate was developed in ethyl acetate:formic acid:acetic acid:water (100:11:11:26, v/v/v/v), and then sprayed with natural reagent A. A) TLC under UV light (254 nm); B) TLC under UV light (365 nm); C) TLC observed under visible. 1. mangiferina; 2. *A. gastonis*; 3. *A. serra*.

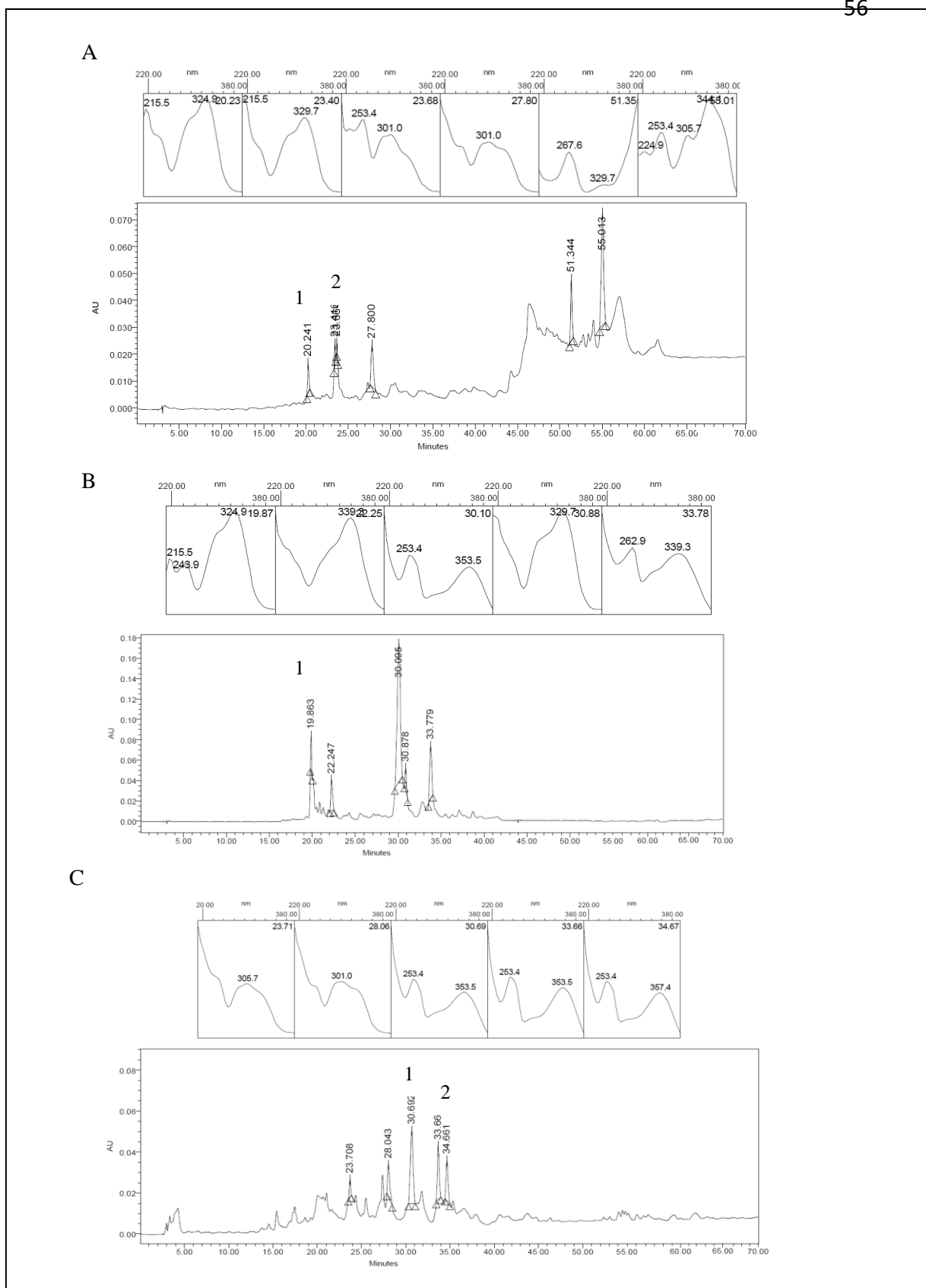


Fig. 4. Chromatogram profiles and UV spectra of *B. occidentale* (A), *B. brasiliense* (B) and *B. binervatum* (C). In A and B chromatograms, the peak 1 corresponds to caffeic acid. In Fig. A, chlorogenic acid was identified as peak 2. The peaks 1 and 2 of Fig. C are, respectively, from quercetin 3D-galactoside and rutin. The HPLC analyses were performed as described above. Samples were injected separately and the detection was at 254 nm.

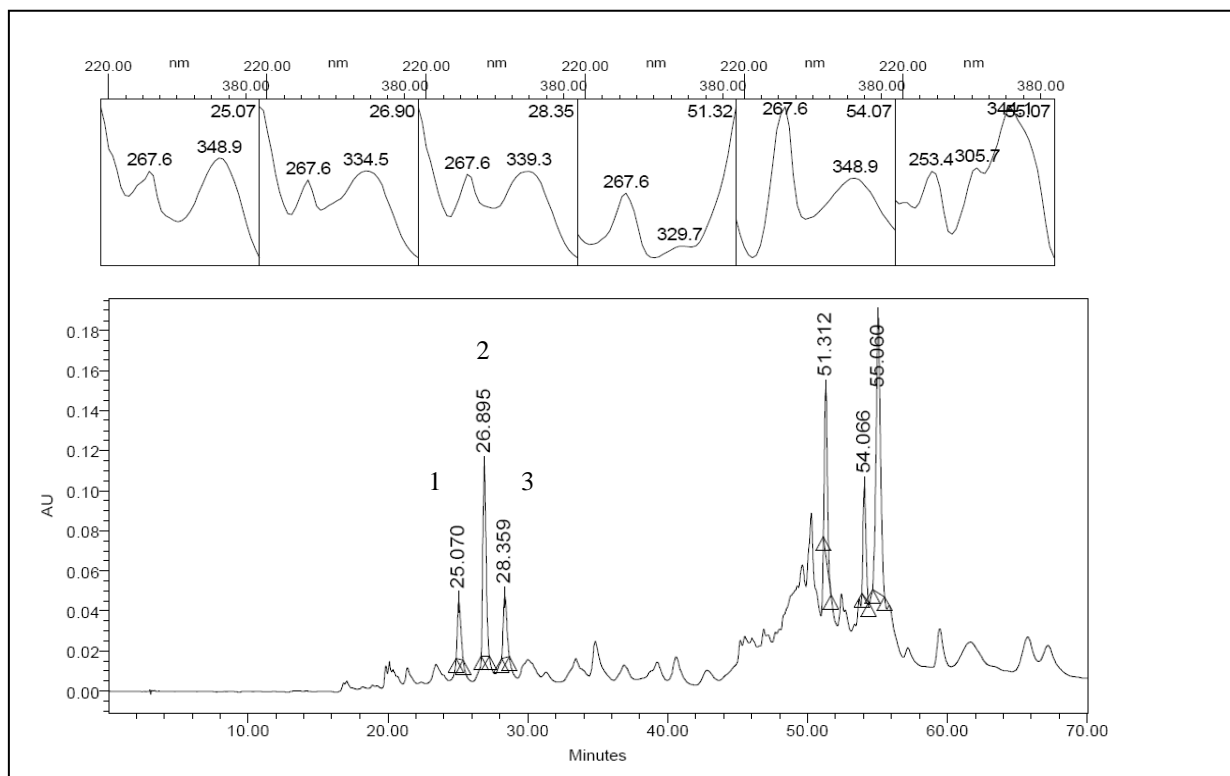


Fig. 5. Chromatogram profiles and UV spectra of *C. phalerata*. Peaks 1, 2 and 3 were identified as kaempferol-derivatives glycosides. The HPLC analyses were performed as described above. The detection was at 254 nm.

5. MANUSCRITO II

Submetido ao periódico **Journal of Pharmacy and Pharmacology**

**FERNS FROM SOUTHERN AND SOUTHEASTERN BRAZIL
WITH ANTIOXIDANT, ANTICHEMOTACTIC AND
MONOAMINE OXIDASE INHIBITORY ACTIVITIES**

Juliana M. M. Andrade^{a,*}, Carolina dos S. Passos^a, Roger Remy Dresch^a, Miriam A. Apel^a, Maria A. Kieling-Rubio^b, Paulo R. H. Moreno^c and Amélia T. Henriques^a

^aFaculdade de Farmácia, UFRGS, Av. Ipiranga 2752, 90.610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

^bPrograma de Pós-Graduação em Botânica, UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9500, 91.501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

^cDepartamento de Química Fundamental, USP, Av. Prof. Lineu Prestes 748 B11 Cidade Universitária, 05.508-000, São Paulo, SP, Brazil

Corresponding author. Tel.: +55 51 3308 5258.

E-mail address: juandradep@gmail.com (J.M.M. Andrade).

Abstract

Objectives: Antioxidant and antichemotactic activities as well as the ability to inhibit monoamino oxidase enzyme of some ferns collected in Rio Grande do Sul (RS) and São Paulo (SP) Brazilian states were investigated.

Methods: Extracts from fourteen ferns were tested for their *in vitro* antioxidant activity, by the total reactive antioxidant potential method. The measurement of leukocyte migration characterized the antichemotactic determinations, while the monoamine oxidase assay, using the subunits A and B of the enzyme, was carried out with a fluorescence-based method.

Key findings: The most antioxidant active samples were *Asplenium serra*, *Lastreopsis amplissima* and *Cyathea dichromatolepis* extracts at 100, 50 and 10 µg/mL. High antichemotactic activity were found for *A. serra* ($94.06 \pm 1.63\%$) and *Didymochlaena truncatula* ($93.41 \pm 0.93\%$), among other most active samples, at 10 µg/mL. Against MAO-A, *D. truncatula* (82.61%), *Alsophila setosa* (82.21%), *Blechnum brasiliense* (79.47%), *Cyathea phalerata* (74.07%) and *C. delgadii* (70.32%) were the most active extracts (100 µg/mL). All samples were less active against MAO-B.

Conclusions: Some fern extracts demonstrated strong antioxidant and antichemotactic activities. In addition, it was observed a strong inhibitory effect against MAO-A. Further investigations must be carried out in order to discover which compound/s is/are responsible for such activities.

Keywords: Ferns, Antioxidant, TRAP, Antichemotactic, IMAO.

Introduction

Ferns and lycophytes comprise a group of plants presenting 13,600 species all around the world,^[1] with about 1,200 species of this group occurring in Brazil.^[2] Of these, about 600 species have been described for the south-southeastern region of Brazil, which is one of the centers of endemism and speciation of pteridophytes in the South–American continent.^[3] This group of plants is formed by two Lineages, Lycophyta and Monilophytes.^[4] The Monilophytes represent the species traditionally termed “ferns”.

The biological activities of some of these plants are described in the literature. Recent studies on the beneficial properties of ferns include: antibacterial activity of *Dryopteris crassirhizoma*;^[5] anticancer, antioxidant and antibacterial activity for *Blechnum orientale*;^[6] antimicrobial activity for some *Adiantum* species;^[7] cytotoxic and apoptotic capacity against liver cancer cells,^[8] as well as, antinociceptive and anti-inflammatory activities for *Cheilanthes farinosa*.^[9]

A significant number of fern species are commonly used in Brazilian folk medicine. An example is *Blechnum occidentale* L; this species has been used to treat urinary infections, inflammatory, pulmonary diseases and liver diseases.^[10] Another fern species commonly used in folk medicine as an expectorant and for kidney diseases is *Cyathea phalerata* Mart.^[11] This species is also used for several inflammatory diseases and, in southeastern Brazil, is reported for the treatment of varicose veins and hemorrhoids. The species *Adiantum raddianum* C. Presl, popularly known as “avenca”, is especially used in Brazil to treat respiratory diseases and dolorous processes.^[12]

Anti-inflammatory, antioxidant, antidepressant and anti-neurodegenerative agents are valuable therapeutics, and medicinal plants are widely used in the folk medicine of many countries to treat different pathological conditions. However, for

many of the plants in use, the efficacy and the relevant active principles are unknown. Therefore, the aims of this research were to investigate the *in vitro* antioxidant and antichemotactic activities of different species of ferns from Southern and Southeastern Brazil, as well as to evaluate the inhibitory effects displayed by ferns extracts on MAO-A and B obtained from rat brain mitochondria. This study was carried out in order to characterize the biological properties of these plants and the association of their use in folk medicine with scientific findings.

Materials and Methods

Materials

Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione), quercetin, glycogen from oyster (type II), bovine albumin, heparin and LPS (Lipopolysaccharide from *Escherichia coli*), were all purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA). AAPH and trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) were purchased from Aldrich Chemical (Milwaukee, WI, USA). Glycine was purchased from Nuclear (Diadema, Brazil). All other chemicals were of reagent grade.

Plant material

Ten ferns were collected in the regions of Morro Reuter (29°32'17"S, 51°04'51"W) and of Campo Bom (29°40'39"S, 51°01'97"W), Rio Grande do Sul state (RS), Brazil, in September 2010 and received botanic identification by Maria Angélica Kienling-Rubio M.Sc.. Voucher specimens were deposited at the Herbarium of the Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil (ICN/UFRGS). Another six fern specimens were collected in the Reserva Biológica

Alto da Serra de Paranapiacaba (23°46'18"-23°47'05"S, 46°20'24"-46°18'15"W), Santo André, São Paulo state (SP), Brazil, in August 2010. The botanical identification of the specimens was performed by Dr. Jefferson Prado. A voucher specimen was deposited at the Herbarium of the Universidade de São Paulo (SPF/USP). The species collected in different locations of Southern and Southeastern Brazil are described in Table 1.

Preparation of the ethanolic extracts

The air-dried and powdered aerial parts of ferns were exhaustively extracted with ethanol in a turboextraction system, using an IKA T50 homogenizer Ultra Turrax apparatus. The extracts obtained were filtered and evaporated under reduced pressure, on a rotary evaporator at 40–45 °C.

Evaluation of antioxidant activity using the total reactive antioxidant potential (TRAP) method

The total reactive antioxidant potential (TRAP) is widely used to estimate the antioxidant capacity of samples *in vitro*. This method is based on the quenching of luminol-enhanced chemiluminescence (CL) derived from the thermolysis of 2,20-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) as the free radical source.^[13] A 96 cell-plate was used in the assay. The CL emission was monitored for 3000 s, in a luminescence counter (MicroBeta TriLux 1450 LSC, PerkinElmer).

The dried ethanolic fern extracts were resuspended in DMSO (dimethylsulfoxide), and then diluted with glycine buffer to their final concentrations. The extracts were evaluated at concentrations of 0.1, 1.0, 10.0, 50.0 and 100.0 µg/mL. The highest concentration of DMSO in samples was 1%. Quercetin and mangiferin

(secondary standard obtained from *Mangifera indica* L.) were also tested in the concentrations of: 1.0, 10.0 and 100 μM . All samples were tested in triplicates and the results were expressed as the area under curve (AUC) versus concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

Antichemotactic assay

The antichemotaxic assay was performed using a 48-well plate, as described by Boyden (1962),^[14] with minor modifications introduced by Suyenaga *et al.* (2011).^[15] The dried ethanolic extracts resuspended in DMSO (final concentration of up to 1%) were assayed at concentrations of 0.01, 0.10, 1.0 and 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Mangiferin was tested at concentrations of 0.1, 1.0, 10.0, 50.0 and 100.0 μM . All the samples were dissolved in Hanks' balanced salt solution (HBSS, pH 7.4) to obtain final concentrations for the test.

Chemotactic migration of leukocytes was measured using the micrometer on a fine-focus knob of a Nikon Alphaphot-2 YS2 microscope. The distance from the top of the filter to the farthest focus plane of the containing two cells, in ten microscopic fields, allowed leukocyte migration to be determined. Samples were tested in duplicate.

Measurement of the cytotoxicity of extracts against leucocytes

The cytotoxic effects of ferns on PMN were determined by the release of the cytosolic lactate dehydrogenase, LDH (EC1.1.1.27), according to Selloum *et al.* (2003).^[16] PMNs (1.5×10^7 cells/mL) were incubated with the concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of fern extract, for 30 min at 37 °C. The LDH activity in the supernatant was measured at 492 nm using a commercial kit (Doles). All concentrations given are final ones. The values for the samples were obtained using a standard curve.

Monoamine oxidase inhibition assay

The MAO inhibition assays were carried out with a fluorescence-based method (end-point reading), according to Van Diermen *et al.* (2009).^[17] The substrate used for the assay was kynuramine, which is non-fluorescent until it undergoes oxidative deamination by MAO, resulting in the fluorescent metabolite 4-hydroxyquinoline.^[18] Product formation was quantified by comparing the fluorescence emission of the samples to that of known amounts of the authentic metabolite, 4-hydroxyquinoline.

Reactions were performed in black, flat bottom 96-well plates, using a final volume of 200 μ l. The mitochondrial fraction of MAO enzyme, obtained from brain homogenized of male Wistar rats (180-220 g), was prepared to obtain a final protein concentration of 1.0 mg/mL, in the assay mixture.^[19] The samples were tested at the concentration of 100 μ g/mL. The dried ethanolic extracts were resuspended in DMSO (at a final concentration of 1%) and then diluted in potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4, made isotonic with KCl). Quercetin and mangiferin were also tested at concentrations of 10.0 and 100.0 μ M.

Pargiline and MAO enzyme fraction were added to the sample buffer to measure the activity against MAO-A. For MAO-B inhibition activity, clorgiline and MAO enzyme fraction were added. Fluorescence emission at 380 nm was measured with a 96-well microplate fluorescent reader (EnVision 2104, PerkinElmer). Measurements by extracts, quercetin and mangiferin were performed in triplicate. The results of this assay were expressed as % of inhibition \pm standard deviation mean (SDM).

Statistical analysis

For the antioxidant assay (TRAP), results were expressed as mean \pm standard deviation mean (SDM) of the mean. In the antichemotactic assay, the data of leucocyte

migration distances obtained from these experiments were analyzed as mean values \pm S.D. of the mean (in micrometers) and were expressed as a percentage of the maximal chemotaxis towards reference chemoattractant (LPS). For the monoamine oxidase inhibition assay, values were expressed as the percentage inhibition of the enzymatic activity with relative standard deviation (RSD).

A one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test was used for the comparison of means. A difference was considered statistically significant when $p < 0.05$. Data analyses were performed using Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., CA, USA).

Results

Antioxidant activity (AOA)

The antioxidant activity of extracts from ferns was measured using the total reactive antioxidant potential (TRAP) assay. A strong antioxidant effect was verified for all samples at concentrations of 100.0, 50.0 (data not shown) and of 10.0 $\mu\text{g/mL}$. The AOA of the samples at these concentrations were higher than the standard Trolox (200 nM). No significant differences between the values for these three concentrations, tested for the same sample, were found ($p < 0.05$). Figure 1 shows the radical scavenging activity of fern extracts at 10 $\mu\text{g/mL}$. According to this figure, the *Alsophila setosa* extract showed the lowest antioxidant potential among the samples, followed by the *Didymochlaena truncatula* extract. For the first sample, its values were significantly different from the others, except in comparison to *D. truncatula* ($p < 0.05$). The highest antioxidant capacities were obtained for the extracts of *Asplenium serra*, *Lastreopsis amplissima* (RS) and *Cyathea dichromatolepis*, although their values do not differ

significantly from some other samples ($p < 0.05$). Quercetin and mangiferin, even at the lowest concentration of 1 μM , presented AOA.

Trolox was used as a positive control at concentrations of 200 and 500 nM. The sample at 500 nM showed longer lasting and superior activity when compared to the other concentration (Figure 2A), indicating sensitivity of the system to variations in the concentration and its potential antioxidant capacity even in very low concentrations.

Figure 2B demonstrates the comparison between the same species (*Lastreopsis amplissima*) collected at two different regions in Brazil. It could be observed that both presented potent AOA at concentrations of 100, 50 and 10 $\mu\text{g/mL}$. At the concentration of 1 $\mu\text{g/mL}$, the sample from the RS state showed a high antioxidant activity, compared to that exhibited by the highest concentrations tested, which did not occur for the sample collected in the SP state. These samples, at this concentration, presented statistically different values ($p < 0.05$), where the Southern region sample was more active than that from the Southeast region.

Antichemotactic activity

The values of migration distances (μm) and percentages of inhibition for samples at 10 $\mu\text{g/mL}$ and mangiferin at 100 μM are presented in Table 2. Figure 3 presents the inhibition percentage as well as the statistical significant between values of samples. All samples showed more than 54% of leukocyte migration inhibition towards the chemotactic factor (LPS). *Alsophila sternbergii* had the lowest activity ($60.46 \pm 5.68\%$), followed by *Cyathea dichromatolepis* ($65.85 \pm 3.90\%$) and *Vittaria lineata* ($66.65 \pm 4.72\%$). The most active samples were *Asplenium serra* ($94.06 \pm 1.63\%$), *Didymochlaena truncatula* ($93.41 \pm 0.93\%$) and *Blechnum occidentale* (92.08 ± 1.41), where their activity was compared to another 5 fern extracts tested ($p < 0.05$).

The *Cyathea atrovirens*, collected in SP, presented lower activities, at three of the concentrations assayed (0.01, 0.1 and 1.0 µg/mL) than those obtained for the RS specimen. However, at 10 µg/mL, there was no significant difference between the inhibition percentage of both samples ($p < 0.05$) (Figure 4A). The same observations, but at different inhibition levels (Figure 4B), were found for *Lastreopsis amplissima* from the RS and SP states. Under the assay conditions used, cell toxicity was not observed for any of the samples assayed, as determined by LDH release. All samples were compared to the control, indicating total membrane cell viability (data not shown).

Monoamine oxidase inhibition

The results for inhibitory activity displayed by fern extracts on MAO are presented in Table 3. The samples that inhibited MAO-A stronger were *Didymochlaena truncatula* (82.61%), *Alsophila setosa* (82.20%), *Blechnum brasiliense* (79.47%), *Cyathea phalerata* (74.07%) and *C. delgadii* (70.32%), without differences among the values ($p < 0.05$). The pure substance, quercetin (100 µM), showed a comparable activity against MAO-A (94.46%) to the positive control (98.98%) ($p < 0.05$), and also a high inhibitory activity on MAO-B (63.76%), which demonstrates low selectivity for the different monoamine oxidase subunits.

With regards to MAO-B inhibition, the most active sample was *Lastreopsis amplissima* (45.13%), followed by *Blechnum occidentale* (39.90%) and *Cyathea atrovirens* (39.18%). On Figure 5 it is clearly observed that all of the fern samples were less active against MAO-B, since none resulted in more than 50% of inhibition. The samples that were most active against MAO-A, presented the lowest inhibitions of MAO-B, indicating a high degree of selectivity for the isoform A of the enzyme.

Discussion

Antioxidant activity

There are several *in vitro* and *in vivo* methods for evaluating the antioxidant activity of complex substance mixtures or even single compounds. Each method provides different results, expressed in different ways and units. The comparison of results of AO, measured by different methods, is often impossible. In the current study, we used the total reactive antioxidant potential (TRAP) method, characterized as a simple and fast method providing reliable results that are expressed as the area under the curve (AUC). This method is particularly useful for extract samples that often contain multiple ingredients and have complex reaction kinetics, being employed for any antioxidant compound (or complex mixture) independent of the kinetic emission profile.^[20] A strong antioxidant effect was verified, using this method, for all samples at the concentration of 10.0 µg/mL (Figure 1).

Talukdar *et al.* (2011)^[20] reviewed pteridophytes antioxidants, demonstrating a total of 36 species with antioxidant activity and 8 species in which the isolation of antioxidant compounds was performed. From the species reported in their studies, only one was also tested in this study, namely *Cyathea phalerata*. In our study, this fern presented a strong antioxidant activity, compared with that exhibited for the most active ferns *Asplenium serra*, *Lastreopsis amplissima* (RS) and *Cyathea dichromatolepis* ($p < 0.05$).

In another study by Hort *et al.* (2008),^[21] the antioxidant and hepatoprotector potential of the crude hydroalcoholic extract and of fractions obtained from *C. phalerata* was investigated. The authors noted that the ethyl acetate fraction of the crude extract displayed the best antioxidant activity, especially as a scavenger of the OH[•]

radical and for inhibiting lipid peroxidation by *in vitro* tests. For the *in vivo* tests, the same extract decreased thiobarbituric acid reactive substances levels, DNA damage and carbonyl protein contents, and also increased catalase and glutathione S-transferase activities. They still concluded that the flavonoids contained in this fraction could be responsible for these activities.

Brighente *et al.* (2007)^[22] determined the antioxidant activity of extracts and fractions of six vegetal species from the Brazilian Atlantic Forest, among them *Cyathea phalerata*. The hydroalcoholic extract from leaves of this plant presented IC₅₀ of 9.0 µg/mL in the DPPH assay, demonstrating high free radical sequestering activity. The authors also found that there was no parallelism between AOA and phenolic compounds content for this species tested.

Ding *et al.* (2008)^[23] analyzed 31 species of ferns, focusing on their phenolic composition and antioxidant activity. Results showed that most of the extracts had strong antioxidant activities as well as high total phenolic contents. None of the species tested by the authors was analyzed in our present study.

It is well established that free radical stress is involved in the etiology of several degenerative and non-degenerative disorders such as Alzheimer,^[24] cancer,^[25] cardiovascular disease,^[26] diabetes,^[27] inflammation,^[28] neurological disease,^[29] vascular disease,^[30] among others. Thus, antioxidant agents act in the prevention and cure of many human diseases. The discovery of new sources of AO is of extreme interest to scientists, since it provides increased the available treatment options for the patients.

Antichemotactic assay

Chemotaxis plays an important role in leukocyte recruitment and therefore constitutes a target for anti-inflammatory drug discovery, whose objective is to develop methods to control inflammation by modulating or blocking leukocyte chemotaxis to the site of inflammation.^[31] Given that the suppression of neutrophil functions can control inflammatory responses and is one of the mechanisms of action of certain nonsteroidal anti-inflammatory drugs,^[32] 16 samples from different ferns were investigated, in the present study, for their effects on leukocyte chemotaxis, using the Boyden chamber *in vitro* assay.

The *Asplenium serra* plant demonstrated strong antioxidant and antichemotactic activities. It has been previously demonstrated that the antioxidant properties of some substances found in plants may be partially responsible for some of their attributed therapeutic properties, such as anti-inflammatory activities.^[33] Schinella *et al.* (2002)^[34] verified that the anti-inflammatory activity of plant extracts can be due to the synergistic effect of pro-inflammatory enzyme inhibitors, free radical scavenging activities or corticoid-like effects. Therefore, the knowledge of the chemical composition of this species will help, in future studies, to understand the mechanisms of action of this plant extract.

Nonato *et al.* (2009)^[35] evaluated the *in vivo* antinociceptive and anti-inflammatory action of the methanolic crude extract of blades of *Blechnum occidentale*. The extract produced anti-inflammatory effect on carrageenan-induced paw edema and was able to inhibit carrageenan-induced neutrophil migration to the peritoneal cavity. In our study, *B. occidentale* presented one of the highest values of leucocyte migration inhibition ($92.08 \pm 1.41\%$), indicating that the *in vitro* results of here presented corroborate with those previously found with *in vivo* models.

MAO inhibition

Monoamine oxidase (MAO) is an enzyme that oxidizes a variety of monoamine neurotransmitters and neuromodulators, as well as exogenous bioactive monoamines in the central nervous system or peripheral tissues. MAO-A preferentially degrades biogenic amines such as epinephrine, norepinephrine, and serotonin^[36] and is very sensitive to the MAO-A inhibitor clorgiline. In contrast, MAO-B is the main enzyme implicated in the metabolism of dopamine, and is more sensitive to the MAO-B inhibitor, pargiline.^[18]

MAO-A inhibitors have proven to be effective in the pharmacological treatment of depression.^[37] Several studies have shown that MAO-B is implicated in aging-related neurodegenerative diseases, such as Parkinson's disease^[38,39] and in the formation of plaque-associated astrocytes present in the brains of patients suffering from Alzheimer's disease.^[40] This division is questionable, since selective and reversible MAO-A inhibitors, such as moclobemide, may also be used for the treatment of Parkinson, demonstrating improvement in the psychomotor and long-term memory.^[41]

In this context, some extracts of ferns evaluated in our study that showed potential selective activity against MAO-A, such as *Didymochlaena truncatula* (82.61%), *Alsophila setosa* (82.20%), *Blechnum brasiliense* (79.47%), *Cyathea phalerata* (74.07%) and *C. delgadii* (70.32%) can be considered as antidepressant candidates, or even, sources of active molecules against this disease. These fern extracts may also be considered in the treatment of Parkinson and Alzheimer disease. Complementary studies must be done to confirm these hypotheses, as this is the first study to report such activity for fern extracts, demonstrating high relevance in pharmacological sciences.

Conclusions

Our results showed that some Brazilian ferns present antioxidant and antichemotactic activities, corroborating with previous research findings and contributing to the rational use of these plants in folk medicine. *Asplenium serra*, *Lastreopsis amplissima* (RS) and *Cyathea dichromatolepis* are examples of ferns with strong antioxidant capacity, whilst *A. serra* and *Didymochlaena truncatula* inhibit PMN migration towards LPS. Since it is well established that free radical stress is involved in the etiology of several human disorders, and that inflammatory injuries affects people all over the world, ferns may be considered as important tools in the search for new substances that will contribute to the improvement of various human diseases.

The results for MAO inhibition activity, in this study, showed that five ferns (*Didymochlaena truncatula*, *Alsophila setosa*, *Blechnum brasiliense*, *Cyathea phalerata* and *C. delgadii*) demonstrated more than 70% of inhibition against MAO-A, acting selectively on this subunit of the enzyme, and may be important candidates for the development of new antidepressant substances and/or new compounds acting on Parkinson and Alzheimer diseases. In this context, our findings contribute to the pharmacological knowledge about these few-studied fern species.

Acknowledgements

This work was supported by CAPES and CNPq, Brazil.

References

1. Moran RC. *Diversity, biogeography and floristics*. In: Ranker TA, Haufler CH (ed.) *Biology and evolution of ferns and lycophytes*. Cambridge University Press. Cambridge, 2008: 417-461.
2. Forzza RC *et al.* *Introdução*. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010.
3. Tryon RM. The biogeography of species, with special reference to ferns. *Bot Rev* 1986; 52(2): 117-156.
4. Smith AR *et al.* A classification for extant ferns. *Taxon* 2006; 55(3): 705–731.
5. Kwon DY *et al.* Antibacterial effect of *Dryopteris crassirhizoma* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia* 2007; 78: 430-433.
6. Lai HY *et al.* *Blechnum orientale* Linn - a fern with potential as antioxidant, anticancer and antibacterial agent. *BMC Complem Altern M* 2010; 30: 10-15.
7. Singh M *et al.* Antimicrobial activity of some important *Adiantum* species used traditionally in indigenous systems of medicine. *J Ethnopharmacol* 2008; 115: 327–329.
8. Radhika NK *et al.* Cytotoxic and apoptotic activity of *Cheilanthes farinosa* (Forsk.) Kaulf. against human hepatoma, Hep3B cells. *J Ethnopharmacol* 2010; 128: 166-171.
9. Yonathan M *et al.* *In vivo* anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Cheilanthes farinosa*. *J Ethnopharmacol* 2006; 108: 462-470.

10. Barros ICL, Andrade LHC. *Pteridófitas medicinais (samambaias, avencas e plantas afins)*. Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1997: 214.
11. Korbes CV. *Plantas Medicinats*. Francisco Beltrão, Paraná, Associação de Estudos, Orientação e Assistência Rural, 1995: 32.
12. Michalak E. *Apontamentos fitoterápicos da irmã Eva Michalak*. Ed. Epagri, Florianópolis-SC, Brazil, 1997.
13. Dresch MTK *et al.* Optimization and validation of an alternative method to evaluate Total Reactive Antioxidant Potential (TRAP). *Anal Biochem* 2009; 385(1): 107-14.
14. Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 1962; 115: 453-466.
15. Suyenaga ES *et al.* Appraisal of the antichemotactic activity of flavonoids on polymorphonuclear neutrophils. *Planta Med* 2011; 77: 698-704.
16. Selloum L *et al.* Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. *Exp Toxicol Pathol* 2003; 54: 313-318.
17. Van Diermen D *et al.* Monoamine oxidase inhibition by *Rhodiola rosea* L. roots. *J Ethnopharmacol* 2009; 122: 397-401.
18. Novaroli L *et al.* Human recombinant monoamine oxidase B as reliable and efficient enzyme source for inhibitor screening. *Bioorgan Med Chem* 2005; 13: 6212–6217.
19. Lowry OH *et al.* Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.

20. Talukdar AD *et al.* A review on pteridophyte antioxidants and their potential role in discovery of new drugs. *Biol Environ Sci* 2011; 7: 151-155.
21. Hort MA *et al.* Antioxidant and hepatoprotective effects of *Cyathea phalerata* Mart. (Cyatheaceae). *Basic Clin Pharmacol* 2008; 103(1): 17-24.
22. Brighente IMC *et al.* Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species. *Pharm Biol* 2007; 45(2): 156-161.
23. Ding ZT *et al.* Phenolic content and radical scavenging capacity of 31 species of ferns. *Fitoterapia* 2008; 79: 581–583.
24. Hensley K *et al.* Reactive oxygen species as causal agents in the neurotoxicity of the Alzheimer's disease-associated amyloid beta peptide. *Ann NY Acad Sci* 1996; 786: 120–134.
25. Lau AT *et al.* Reactive oxygen species: current knowledge and applications in cancer research and therapeutic. *J Cell Biochem* 2008; 104: 657–667.
26. Touyz RM. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells—implications in cardiovascular disease. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37: 1263–1273.
27. Muhammad S *et al.* Reactive oxygen species in diabetes-induced vascular damage, stroke, and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2009; 16: 775–785.
28. Reuter S *et al.* Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Bio Med* 2010; 49(11): 1603-1616.

29. Bolanos JP *et al.* Mitochondria and reactive oxygen and nitrogen species in neurological disorders and stroke: therapeutic implications. *Adv Drug Delivery Rev* 2009; 61: 1299–1315.
30. Haurani MJ, Pagano PJ. Adventitial fibroblast reactive oxygen species as autocrine and paracrine mediators of remodeling: bellwether for vascular disease? *Cardiovasc Res* 2007; 75: 679–689.
31. Entschladen F *et al.* Analysis methods of human cell migration. *Exp Cell Res* 2005; 307: 418–426.
32. Rioja I *et al.* An anti-inflammatory ditriazine inhibiting leukocyte functions and expression of inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2. *Eur J Pharmacol* 2000; 397: 207–217.
33. Cao G *et al.* Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med* 1997; 22: 749–760.
34. Schinella GR *et al.* Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. *Life Sci* 2002; 70: 1023–1033.
35. Nonato FR *et al.* Antiinflammatory and antinociceptive activities of *Blechnum occidentale* L. extract. *J Ethnopharmacol* 2009; 125: 102-107.
36. Shih JC *et al.* Monoamine oxidase: from genes to behavior. *Annu Rev Neurosci* 1999; 22: 197-217.
37. Priest RG *et al.* Reversible and selective inhibitors of monoamine oxidase A in mental and other disorders. *Acta Psychiat Scand* 1995; 386: 40–43.

38. Castagnoli N *et al.* Monoamine oxidase B inhibition and neuroprotection. Studies on selective adenosine A2A receptor antagonists. *Neurology* 2003; 61: S62-S68.
39. Magyar K, Szende B. (-)-Deprenyl, a selective MAO-B inhibitor, with apoptotic and anti-apoptotic properties. *Neurotoxicology* 2004; 25: 233-242.
40. Saura J *et al.* Increased monoamine oxidase B activity in plaque-associated astrocytes of Alzheimer brains revealed by quantitative enzyme radioautography. *Neuroscience* 1994; 62: 15-30.
41. Youdim MBH, Bakhle YS. Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. *Brit J Pharmacol* 2006; 147: S287–S296.

Table 1. Species of ferns collected from different locations of Rio Grande do Sul state and São Paulo state, Brazil.

| Specimens | Rio Grande do Sul state | | São Paulo state |
|---|-------------------------|------------|---------------------|
| | Morro Reuter* | Campo Bom* | RBASP, Santo André* |
| <i>Alsophila setosa</i> Kaulf. | | x | |
| <i>Alsophila sternbergii</i> (Sternb.) D.S. Conant | | | x |
| <i>Asplenium serra</i> Langsd. & Fisch. | | x | |
| <i>Asplenium gastonis</i> Fée | x | | |
| <i>Blechnum binervatum</i> (Poir.) C.V. Morton & Lellinger | x | | |
| <i>Blechnum brasiliense</i> Desv. | x | | |
| <i>Blechnum occidentale</i> L. | | x | |
| <i>Vittaria lineata</i> (L.) Sm. | | x | |
| <i>Lastreopsis amplissima</i> (C. Presl) Tindale | x | | X |
| <i>Didymochlaena truncatula</i> (Sw.) J. Sm. | x | | |
| <i>Cyathea delgadii</i> Sternb. | | | X |
| <i>Cyathea dichromatolepis</i> (Fée) Domin | | | X |
| <i>Cyathea atrovirens</i> (Langsd. & Fisch.) Domin | x | | X |
| <i>Cyathea phalerata</i> Mart. | | | X |

*Morro Reuter (29°32'17"S, 51°04'51"W), Campo Bom (29°40'39"S, 51°01'97"W), RBASP (Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba), Santo André (23°46'18"-23°47'05"S, 46°20'24"-46°18'15"W).

Table 2. Effect of sample extracts of ferns (10 µg/mL) and of mangiferin (100 µM) on the *in vitro* chemotaxis of polymorphonuclear neutrophils (PMN) towards LPS (lipopolysaccharide).

| | Migration distance (µm) | Inhibition (%) ± SDM |
|---------------------------|--------------------------------|----------------------|
| Control | 111.27 ± 5.88 / 101.00 ± 5.04* | 0.00 |
| Samples (10 µg/mL) | | |
| <i>A. setosa</i> | 10.25 ± 1.98 | 89.85 ± 1.98 |
| <i>A. sternbergii</i> | 44.00 ± 5.86 | 60.46 ± 5.68 |
| <i>A. serra</i> | 6.00 ± 1.63 | 94.06 ± 1.63 |
| <i>A. gastonis</i> | 88.62 ± 3.00 | 88.62 ± 3.00 |
| <i>B. binervatum</i> | 11.78 ± 3.38 | 88.34 ± 3.38 |
| <i>B. brasiliense</i> | 10.80 ± 2.15 | 89.31 ± 2.15 |
| <i>B. occidentale</i> | 8.00 ± 1.41 | 92.08 ± 1.41 |
| <i>V. lineata</i> | 37.11 ± 4.70 | 66.65 ± 4.72 |
| <i>L. amplissima</i> RS | 14.80 ± 2.68 | 86.70 ± 2.41 |
| <i>L. amplissima</i> SP | 12.40 ± 1.67 | 88.86 ± 1.50 |
| <i>D. truncatula</i> | 7.33 ± 1.03 | 93.41 ± 0.93 |
| <i>C. delgadii</i> | 19.75 ± 2.92 | 82.25 ± 3.40 |
| <i>C. dichromatolepis</i> | 38.00 ± 5.10 | 65.85 ± 3.90 |
| <i>C. atrovirens</i> RS | 17.14 ± 2.54 | 83.03 ± 2.54 |
| <i>C. atrovirens</i> SP | 80.83 ± 1.97 | 80.83 ± 1.97 |
| <i>C. phalerata</i> | 25.14 ± 3.44 | 77.40 ± 3.46 |
| mangiferin 100 µM | 13.50 ± 2.33 | 86.64 ± 2.16 |

*two values of control migration distance indicate the two experiments carried out for all samples.

Table 3. Values of monoamine oxidase inhibition (expressed as %) by ethanolic extracts from ferns (100 µg/mL) and of mangiferin and quercetin (100 µM, 10 µM). Standard deviation mean (SDM) of the values of activities against total monoamine oxidase, monoamine oxidase subunit A and subunit B are presented after each mean. Data were analyzed in triplicate.

| | MAO total (%) | SDM | MAO-A (%) | SDM | MAO-B (%) | SDM |
|-------------------------|---------------|------|-----------|-------|-----------|------|
| Positive Control | 98.98 | | 98.98 | | 98.98 | |
| Samples (100 µg/mL) | | | | | | |
| <i>A. setosa</i> | 17.80 | 4.66 | 82.20 | 4.54 | 17.80 | 3.88 |
| <i>A. sternbergii</i> | 37.89 | 1.25 | 62.11 | 2.00 | 37.89 | 3.71 |
| <i>A. serra</i> | 35.90 | 3.61 | 64.10 | 0.69 | 35.90 | 1.08 |
| <i>A. gastonis</i> | 35.05 | 2.99 | 64.95 | 2.42 | 35.05 | 1.91 |
| <i>B. binervatum</i> | 35.51 | 2.67 | 64.49 | 1.83 | 35.51 | 2.56 |
| <i>B. brasiliense</i> | 20.53 | 4.60 | 79.47 | 5.19 | 20.53 | 4.14 |
| <i>B. occidentale</i> | 39.90 | 4.03 | 60.10 | 2.09 | 39.90 | 4.74 |
| <i>V. lineata</i> | 37.26 | 2.77 | 62.74 | 3.66 | 37.26 | 0.92 |
| <i>L. amplissima</i> RS | 45.13 | 5.79 | 54.87 | 1.23 | 45.13 | 3.76 |
| <i>D. truncatula</i> | 17.39 | 2.32 | 82.61 | 6.56 | 17.39 | 3.99 |
| <i>C. delgadii</i> | 29.68 | 2.92 | 70.32 | 5.33 | 29.68 | 4.36 |
| <i>C. atrovirens</i> RS | 39.18 | 5.24 | 60.82 | 2.52 | 39.18 | 2.51 |
| <i>C. phalerata</i> | 25.93 | 5.21 | 74.07 | 12.63 | 25.93 | 0.88 |
| Mangiferin (100 µM) | 50.26 | 1.72 | 57.65 | 0.39 | 48.65 | 2.97 |
| Mangiferin (10 µM) | -5.34 | 2.62 | 9.38 | 0.40 | 33.59 | 0.36 |
| Quercetin (100 µM) | 86.00 | 3.30 | 94.46 | 2.50 | 63.76 | 0.17 |
| Quercetin (10 µM) | 22.61 | 3.12 | 32.33 | 0.36 | 27.25 | 1.68 |

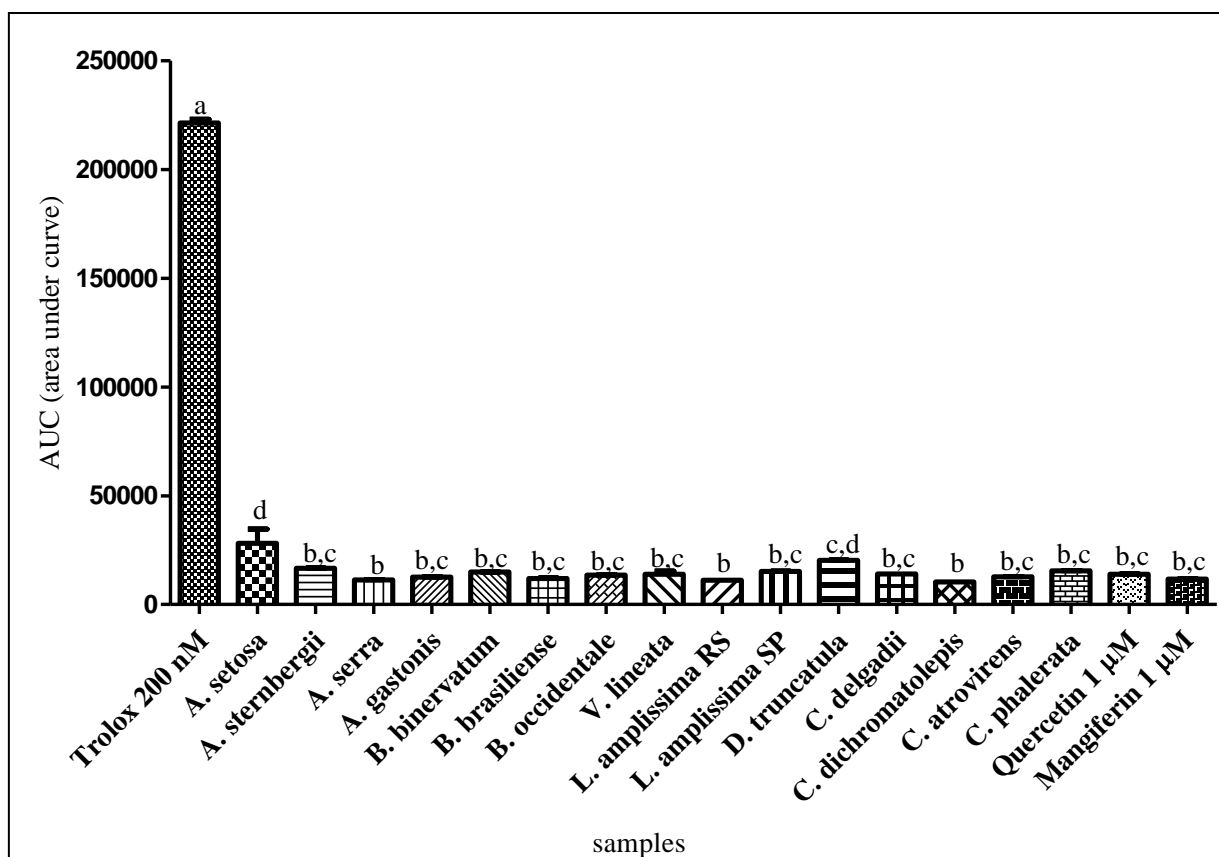


Fig. 1. Total reactive antioxidant potential (TRAP) from fern extract samples at 10 µg/mL. Trolox at 200 nM was used as standard antioxidant. Bars represent mean ± S.D. Statistically significant differences are represented by different letters in the graph ($p < 0.05$). (a) Statistically different from all the tested samples; (b) statistically different from *A. setosa*, *D. truncatula*; (c) statistically different from Trolox, *A. setosa*, *A. serra*, *L. amplissima* (RS), *C. dichromatolepis*; (d) statistically different from Trolox, *A. sternbergii*, *A. serra*, *A. gastonis*, *B. binervatum*, *B. brasiliense*, *B. occidentale*, *V. lineata*, *L. amplissima* (RS), *L. amplissima* (SP), *C. delgadii*, *C. dichromatolepis*, *C. atrovirens*, *C. phalerata*, quercetin and mangiferin.

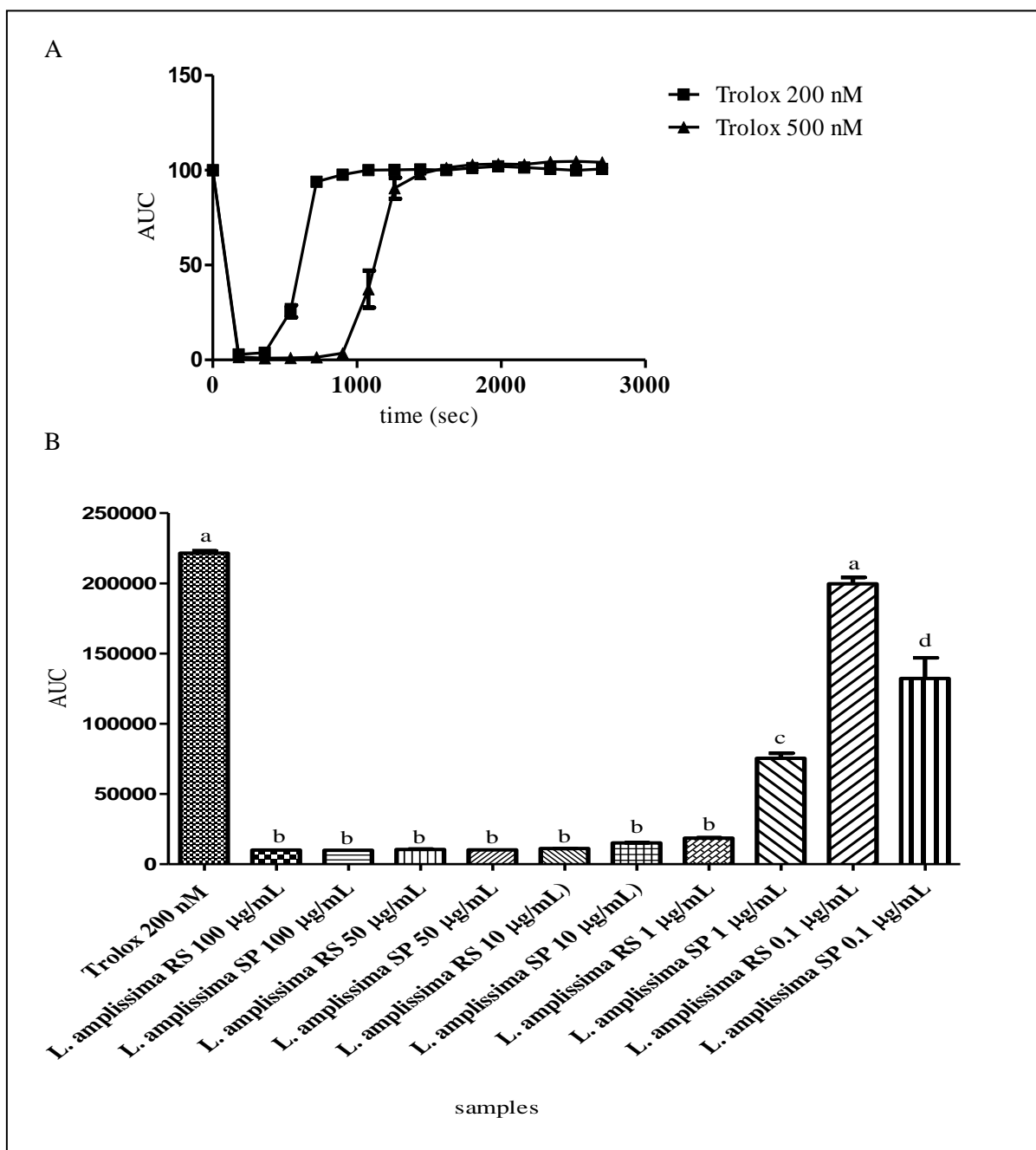


Fig. 2. Antioxidant activity by TRAP assay. A) Comparison of the kinetic activity from positive control (Trolox) at concentrations of 200 and 500 nM. B) Comparison of samples from *Lastreopsis amplissima*, from RS and SP states, at five different concentrations. (a) Statistically different from *L. amplissima* (RS and SP) 100, 50, 10 and 1 µg/mL, *L. amplissima* (SP) 0.1 µg/mL; (b) statistically different from Trolox, *L. amplissima* (SP) 1 µg/mL, *L. amplissima* (RS and SP) 0.1 µg/mL; (c) statistically different from Trolox, *L. amplissima* (RS and SP) 100, 50 and 10 µg/mL, *L. amplissima* (RS) 1 µg/mL, *L. amplissima* (RS and SP) 0.1 µg/mL; (d) statistically different from Trolox, *L. amplissima* (RS and SP) 100, 50, 10, 1 µg/mL, *L. amplissima* (RS) 0.1 µg/mL; $p < 0.05$.

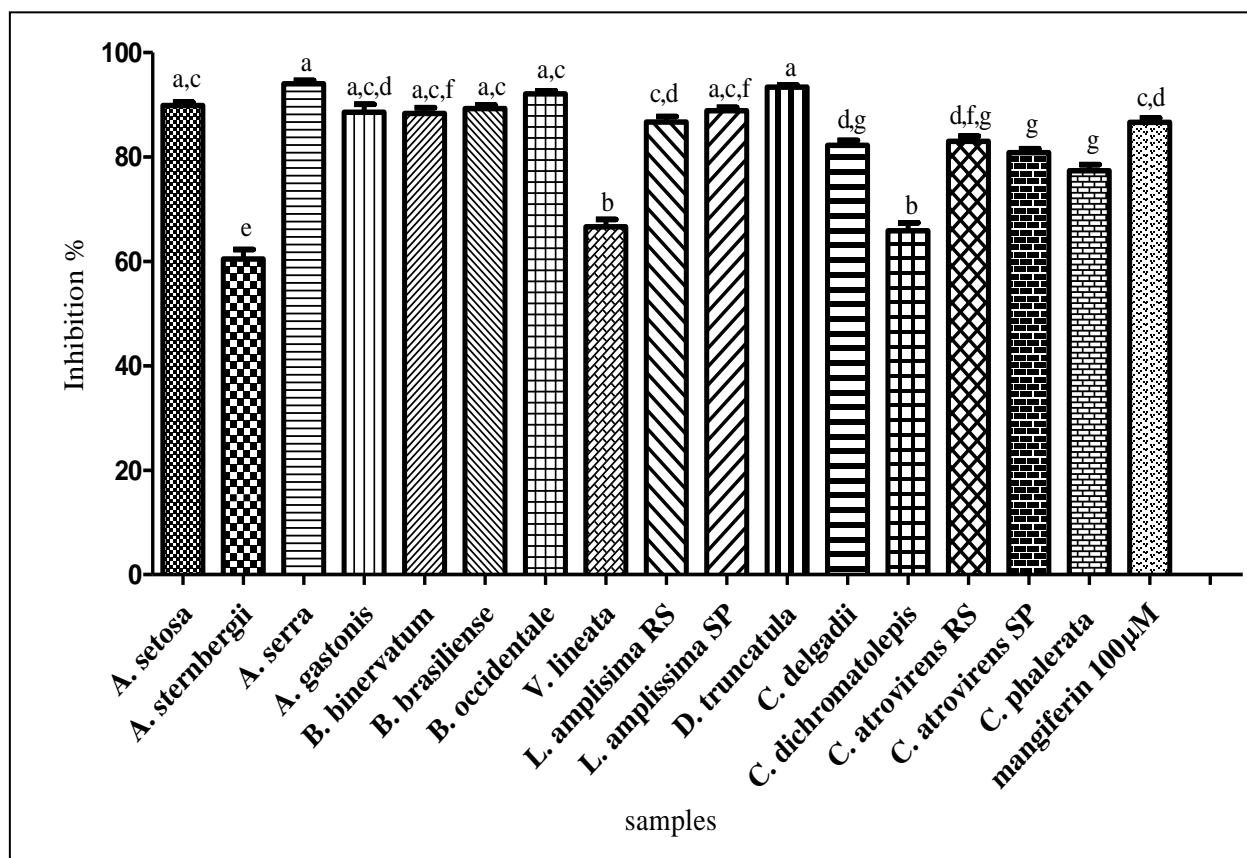


Fig. 3. Antichemotactic activity of fern extracts at 10 µg/mL and of mangiferin (100 µM), expressed as inhibition percentage. Different letters indicate significant variation between inhibition % values ($p < 0.05$). Experiments were done in duplicate. (a) Statistically different from *A. sternbergii*, *V. lineata*, *L. amplissima* (RS), *C. delgadii*, *C. dichromatolepis*, *C. atrovirens* (RS and SP), *C. phalerata* and mangiferin; (b) statistically different from *A. setosa*, *A. sternbergii*, *A. serra*, *A. gastonis*, *B. binervatum*, *B. brasiliense*, *B. occidentale*, *V. lineata*, *L. amplissima* (RS and SP), *D. truncatula*, *C. delgadii*, *C. atrovirens* (RS and SP), *C. phalerata* and mangiferin; (c) statistically different from *A. sternbergii*, *A. serra*, *V. lineata*, *D. truncatula*; *C. delgadii*, *C. atrovirens* (RS and SP), *C. phalerata*; (d) statistically different from *A. setosa*, *A. sternbergii*, *A. serra*, *B. binervatum*, *B. brasiliense*, *B. occidentale*, *V. lineata*, *L. amplissima* (SP), *D. truncatula*, *C. dichromatolepis*, *C. atrovirens* (SP), *C. phalerata*; (e) statistically different from *A. setosa*, *A. serra*, *A. gastonis*, *B. binervatum*, *B. brasiliense*, *B. occidentale*, *V. lineata*, *L. amplissima* (RS and SP), *D. truncatula*, *C. delgadii*, *C. dichromatolepis*, *C. atrovirens* (RS and SP), *C. phalerata* and mangiferin; (f) statistically different from *A. setosa*, *A. sternbergii*, *A. serra*, *A. gastonis*, *B. binervatum*, *B. brasiliense*, *B. occidentale*, *V. lineata*, *L. amplissima* (RS), *D. truncatula*, *C. delgadii*, *C. dichromatolepis*, *C. atrovirens* (SP), *C. phalerata* and mangiferin; (g) statistically different from *A. setosa*, *A. sternbergii*, *A. serra*, *A. gastonis*, *B. binervatum*, *B. brasiliense*, *B. occidentale*, *V. lineata*, *L. amplissima* (RS and SP), *D. truncatula*, *C. dichromatolepis* and mangiferin.

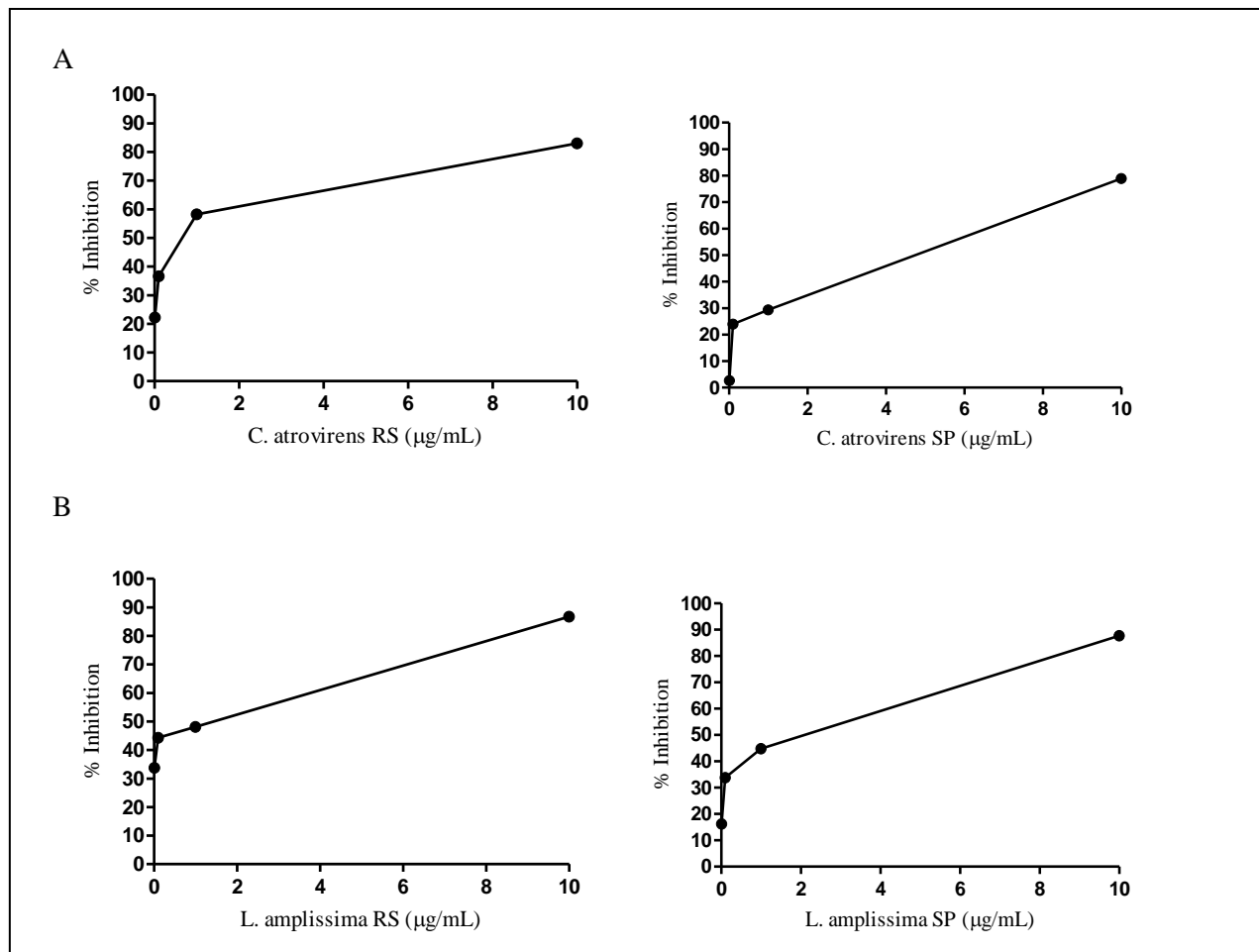


Fig. 4. A) Antichemotactic activity, expressed as inhibition percentage, of *Cyathea atrovirens* from Rio Grande do Sul and São Paulo, at the concentrations of 0.01, 0.10, 1.0 and 10.0 µg/mL. B) Inhibition percentage of leucocytes migration for *Lastreopsis amplissima* (RS and SP), at concentrations of 0.01, 0.10, 1.0 and 10.0 µg/mL.

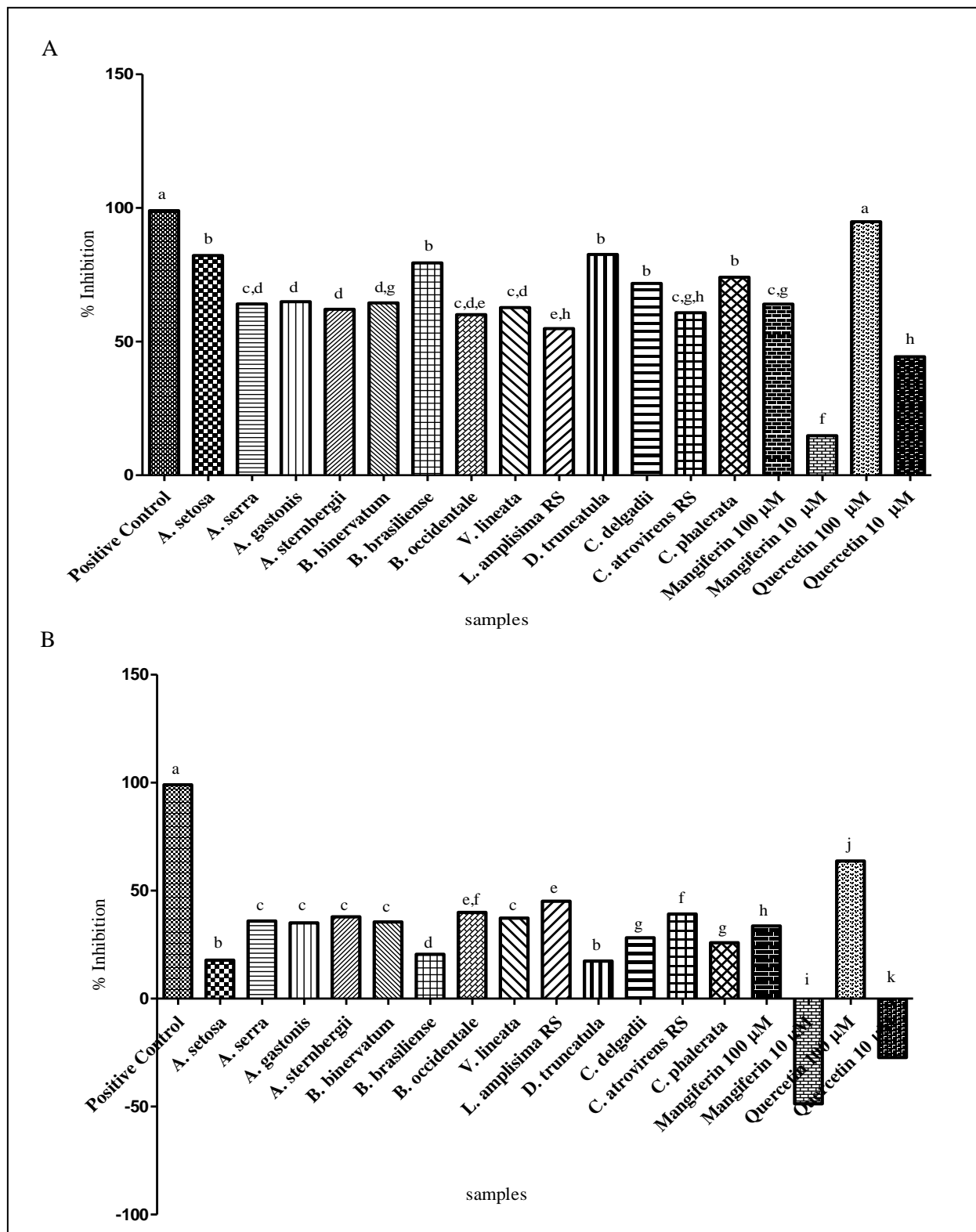


Fig. 5. Results for the ethanolic extracts from different ferns, at 100 µg/mL, for mangiferin and quercetin (100 µM, 10 µM). **A)** Extracts activity against MAO-A subunit. (a) Positive control statistically different from all samples, except from quercetin; (b) statistically different from control, *A. sternbergii*, *A. serra*, *A. gastonis*, *B. binervatum*, *B. occidentale*, *V. lineata*, *L. amplissima* (RS), *C. atrovirens* (RS), mangiferin and quercetin (100 and 10 µM); (c) statistically different from control, *A. setosa*, *A. gastonis*, *A. sternbergii*, *B. binervatum*, *B. brasiliense*, *L. amplissima* (RS), *D. truncatula*, *C. delgadii*, *C. phalerata*, mangiferin (10 µM) and quercetin (100 and 10 µM); (d)

statistically different from control, *A. setosa*, *B. brasiliense*, *L. amplissima* (RS), *D. truncatula*, *C. delgadii*, *C. atrovirens* (RS), *C. phalerata*, mangiferin and quercetin (100 and 10 μ M); (e) statistically different from control, *A. setosa*, *A. serra*, *A. gastonis*, *A. sternbergii*, *B. binervatum*, *B. brasiliense*, *V. lineata*, *D. truncatula*, *C. delgadii*, *C. atrovirens* (RS), *C. phalerata*, mangiferin and quercetin (100 and 10 μ M); (f) statistically different from control and all other samples; (g) statistically different from control, *A. setosa*, *A. serra*, *A. gastonis*, *A. sternbergii*, *B. brasiliense*, *B. occidentale*, *V. lineata*, *L. amplissima* (RS), *D. truncatula*, *C. delgadii*, *C. phalerata*, mangiferin (10 μ M) and quercetin (100 and 10 μ M); (h) statistically different from control, *A. setosa*, *A. serra*, *A. gastonis*, *A. sternbergii*, *B. binervatum*, *B. brasiliense*, *B. occidentale*, *V. lineata*, *L. amplissima* (RS), *D. truncatula*, *C. delgadii*, *C. phalerata*, mangiferin (100 and 10 μ M) and quercetin (100 μ M); **B**) % of inhibition against MAO-B subunit. Percentage values of inhibition for positive control were statistically different from all tested samples. *B. occidentale* presented % values of inhibition statistically not different compared to *L. amplissima* (RS) and *C. atrovirens* (RS). All other samples presented statistically different values of % inhibition; $p < 0.05$.

6. DISCUSSÃO GERAL

O presente trabalho objetivou as avaliações química e biológica de extratos obtidos de partes aéreas de 14 espécies de samambaias coletadas nos estados do Rio Grande do Sul e de São Paulo. Foram empregados diferentes métodos extrativos, dentre eles: maceração dinâmica e estática, maceração sob aquecimento, extração em aparelho tipo Soxhlet, turboextração e extração sob refluxo, para avaliação do rendimento de extraídos, possíveis degradações por calor e tempo necessário para extração. Os extratos etanólicos obtidos por cada uma das metodologias empregadas, sendo *A. setosa* a planta avaliada, devido à grande quantidade de vegetal disponível, foram analisados por cromatografia em camada delgada, utilizando método geral para flavonoides, para avaliação de possíveis degradações (WAGNER e BLADT, 1996).

Observou-se que as extrações que empregaram calor demonstraram perfis cromatográficos diferentes daqueles obtidos por métodos a frio, descartando as metodologias que fizeram uso de calor na extração, para evitar possível degradação nas amostras. Dentre os métodos a frio, a turboextração foi a que demonstrou maior rendimento em um menor tempo de extração, sendo escolhida, portanto, como método extrativo para as plantas deste trabalho.

A investigação química foi realizada através de análise por cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada a detector de arranjo de diodos, utilizando coluna de fase reversa, fazendo-se comparação dos perfis das amostras, com aqueles obtidos para alguns padrões utilizados. As análises biológicas compreenderam a avaliação das atividades antioxidante, antiquimiotática e capacidade de inibição da enzima monoamina oxidase dos extratos, caracterizando screenings preliminares dos extratos, buscando aqueles que possam apresentar potenciais substâncias multifuncionais, em adaptação aos estudos propostos por NOVAROLI e colaboradores (2005).

Para algumas das amostras estudadas, não foi possível a identificação química dos compostos presentes nos extratos, com base na comparação com os padrões utilizados para as análises cromatográficas. Assim, para *Alsophila*

setosa, *A. sternbergii*, *Didymochlaena truncatula*, *Vittaria lineata*, *Cyathea atroviens*, *C. delgadii* e *C. dichromatolepis* não foram identificados metabólitos secundários, de acordo com os métodos utilizados.

Através do método desenvolvido por cromatografia líquida, pode-se observar que o extrato de *Asplenium gastonis* demonstrou presença de hesperidina e dois derivados do canferol, enquanto que o extrato de *A. serra* apresentou composição majoritária de mangiferina. Para as espécies da família Blechnaceae, compostos similares foram encontrados para as três diferentes espécies analisadas. Assim, *Blechnum occidentale* e *B. brasiliense* apresentaram ácido caféico como componente em comum e esta última demonstrou presença de quercetina 3D-galactosídeo em seu extrato, bem como o observado para *B. binervatum*. Além disso, a análise do cromatograma de *B. occidentale* evidenciou, também, a presença de ácido clorogênico. Para *B. binervatum*, rutina também foi identificada na composição do extrato.

A espécie *Cyathea phalerata* demonstrou presença de derivados do canferol, com base nas comparações dos tempos de retenção e espectros de ultravioleta, com base na literatura. E, por fim, a análise do cromatograma de *Lastreopsis amplissima* permitiu a identificação de cumarina e seus derivados, sendo que a amostra de São Paulo demonstrou maior número de compostos em seu cromatograma, comparada à coletada no Rio Grande do Sul. Os resultados apresentados devem ser melhor avaliados para elucidação mais detalhada da composição química desses extratos, mas cabe ressaltar que demonstram o primeiro estudo de avaliação química de samambaias do sul e sudeste do Brasil.

Quanto às atividades biológicas, é possível inferir que as amostras ativas podem tornar-se importantes candidatas no tratamento de doenças neurodegenerativas, tanto na forma em que se encontram, ou seja, extratos, quanto para a futura obtenção de substâncias isoladas ativas. Sabe-se que nessas doenças existe um conjunto de fatores desencadeadores, que envolvem desde o balanço redox, até fatores ligados a processos inflamatórios. Algumas enzimas

também demonstram sua atividade alterada nessas patologias, como é o caso das enzimas monoamina oxidase, acetilcolinesterase, butirilcolinesterase, dentre outras.

Numerosas evidências sugerem que os radicais livres e o estresse oxidativo possam estar envolvidos na patogênese dos danos neurológicos associados a diversas doenças neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer e Parkinson. Os níveis aumentados de alguns radicais livres já foram observados em um número considerável dos casos de diagnóstico confirmado dessas doenças, bem como observações na redução da atividade das enzimas antioxidantes endógenas que participam desse balanço (PERRY *et al.*, 2003; BARNHAM *et al.*, 2004; SCHULZ e FALKENBURGER, 2004).

Assim, todas as amostras testadas, na concentração de 10 µg/mL, poderiam ser consideradas como entidades químicas com potencial atividade antioxidante. Em especial, os extratos de *Asplenium serra*, *Lastreopsis amplissima* (RS) e *Cyathea dichromatolepis* foram os mais ativos na avaliação de seus potenciais antioxidantes reativos totais (TRAP), sem variação significativa comparadas a outras amostras ($p < 0,05$). A cinética do potencial antioxidante dos extratos das três espécies de samambaias citadas acima está demonstrada na Figura 1 (em anexo). Ressalta-se ainda, que as substâncias isoladas quercetina e mangiferina, mesmo na concentração mais baixa testada, de 1 µM, apresentaram interessantes atividades.

A alta capacidade antioxidante observada para os extratos se deve, em grande parte, à presença de flavonoides e seus derivados, como quercetina, canferol e hesperidina, em um número considerável das amostras analisadas, já que sabe-se que uma das mais proeminentes propriedades desses compostos é a sua excelente atividade antioxidante. Os flavonóides podem inibir enzimas responsáveis pela produção de diversos radicais livres, além de poderem inibir a ciclooxigenase, lipoxigenase e monooxigenase microsomal, todas envolvidas na geração de EROs (HAVSTEEN, 2002).

Flavonoides são termodinamicamente capazes de reduzir radicais livres altamente oxidados, como o superóxido, através da doação de um átomo de hidrogênio (PIETTA, 2000). Destaca-se também, a capacidade quelante de metais, envolvidos no metabolismo do oxigênio, exibida por alguns desses compostos (COTELLE, 2001; HORT, 2006). Outros compostos também apresentam esse potencial, como demonstrado em estudos da literatura que flavonoides e ácidos fenólicos, como canferol, ácido caféico e ácido cumárico apresentam pronunciada atividade antioxidante (RUSSO *et al.*, 2002; BUTKOVIC *et al.*, 2004; PARK *et al.*, 2006).

A atividade antiinflamatória é outra propriedade importante dos flavonoides. Muitos desses compostos já foram testados frente a diferentes modelos, tanto isolados, como componentes de extratos complexos. Esses compostos são capazes de inibir uma série de enzimas que são ativadas durante o processo inflamatório (KWON *et al.*, 2005). Um exemplo disso é o efeito inibitório sobre o metabolismo do ácido araquidônico, cuja liberação é ponto de partida para uma resposta inflamatória geral (FERRANDIZ e ALCARAZ, 1991).

A biossíntese de prostaglandinas e óxido nítrico está envolvida na inflamação, sendo a sintetase indutora de óxido nítrico (iNOS) e a cicloxigenase responsáveis pela produção de grandes quantidades desses mediadores. Estudos *in vitro* realizados por outros pesquisadores confirmaram a hipótese de que a quercetina inibe a produção de óxido nítrico e a expressão da iNOS. Diferenças nas respostas entre vários flavonóides existem, mas estudos demonstram que essa atividade é extensiva a vários desses compostos, sendo variável apenas a forma de resposta e a dose (MARTÍNEZ-FLORES *et al.*, 2005).

No presente estudo foram observadas importantes atividades antiquimiotáticas, que consistem no processo de migração dos leucócitos ao local da inflamação, para os extratos testados. Na concentração de 10 µg/mL, os extratos mais ativos foram os de: *Asplenium serra*, *Dydimochlaena truncatula* e *Blechnum occidentale*, sendo seus valores estatisticamente não diferentes de

outras 5 espécies ($p < 0,05$). Na Figura 2 (em anexo) estão demonstradas as cinéticas de atividade antiqumiotática para *A. serra* e *D. truncatula*. Cabe salientar, ainda, que todas as amostras, nessa concentração, apresentaram porcentagens de inibição de migração superiores a 54%. Avaliando-se as alterações morfológicas que os extratos poderiam induzir, observou-se que nenhum extrato provocou dano à membrana, sem extravasamento da enzima lactato desidrogenase para o meio extracelular, comparável ao controle ($p < 0,05$).

Considerando-se que esses parâmetros biológicos estão alterados nas doenças neurodegenerativas e que, a enzima monoamina oxidase é uma das enzimas-chave no desenvolvimento de novos alvos para combate a neuropatologias, este estudo avaliou também, a atividade dos extratos de samambaias frente a esta enzima, em modelo *in vitro*. Os resultados demonstraram que 5 extratos, na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, (*Dydimochlaena truncatula*, *Alsophila setosa*, *Blechnum brasiliense*, *Cyathea phalerata* e *C. delgaddi*) apresentaram inibição enzimática, da subunidade A, superior a 70%. Frente à subunidade B desta enzima, nenhuma das amostras testadas (100 $\mu\text{g/mL}$) apresentou inibição superior a 50%, demonstrando alta seletividade pela MAO-A.

Na concentração de 100 μM , a quercetina demonstrou-se mais ativa tanto frente a MAO-A quanto a MAO-B, quando comparada à mangiferina. Alguns autores demonstraram, em seus estudos, que agliconas são mais ativas na inibição desta enzima, quando comparadas aos respectivos heterosídeos (SUZUKI *et al.*, 1981; HAN *et al.*, 2007; YOSHINO *et al.*, 2011). Este fato pode explicar as atividades menos pronunciadas de alguns extratos de samambaias, já que a análise química demonstrou a presença de compostos heterosídeos nos cromatogramas de algumas espécies.

Compilando os dados obtidos, pode-se verificar que os extratos da espécie *Blechnum brasiliense* foram os únicos, dentre os avaliados, que apresentaram

potentes atividades para todos os testes realizados. Este extrato (10 µg/mL) apresentou área sob a curva cerca de 18,5 vezes menor que a do Trolox (200 nM), indicando alto potencial antioxidante reativo total, além de potente inibição da migração dos leucócitos, no ensaio de quimiotaxia, apresentando, aproximadamente, 89,3% de inibição (10 µg/mL). Na concentração de 100 µg/mL, foi capaz de inibir a MAO-A em 79,5%, sugerindo o potencial desta espécie para desenvolvimento de estudos mais aprofundados, visando obtenção de compostos ativos nas doenças neurodegenerativas.

Assim, o presente trabalho demonstrou a presença de alguns flavonoides, ácidos fenólicos e xantonas em diferentes espécies de samambaias coletadas no sul e sudeste do Brasil. Algumas dessas plantas também demonstraram potentes efeitos antioxidantes e antiinflamatórios, nos ensaios *in vitro* realizados. Frente à enzima monoamina oxidase, alguns extratos foram ativos, seletivamente, para a subunidade A desta enzima. Esses resultados demonstram o potencial de algumas das espécies de samambaias estudadas, indicando a necessidade de desenvolvimento de estudos mais aprofundados para melhor compreensão de sua composição química, assim como, de suas atividades biológicas e mecanismos de ação.

7. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos nesse trabalho pode-se concluir que:

- Foi possível realizar a análise química de alguns extratos, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, de espécies de samambaias coletadas no Rio Grande do Sul e em São Paulo, avaliando seus perfis químicos;

- Foi observada uma variabilidade química acentuada entre as diferentes espécies de samambaias, sendo que flavonoides e seus derivados, ácidos fenólicos e xantonas foram os compostos majoritariamente encontrados nos extratos avaliados por CLAE;

- Potentes atividades antioxidantes, pelo método do TRAP, *in vitro*, foram observadas para a grande maioria dos extratos, sendo esta atividade mais pronunciada para *Asplenium serra*, *Lastreopsis amplissima* (RS) e *Cyathea dichromatolepis*, sem variação significativa comparadas a algumas outras amostras ($p < 0,05$);

- O efeito antiquimiotático de todos os extratos foi pronunciado, demonstrando alta capacidade de inibição da migração de leucócitos, apresentando valores de inibição superiores a 54%, dos quais 8 extratos de espécies distintas foram mais ativos;

- Nenhum extrato demonstrou dano à membrana das células polimorfonucleares avaliadas, nas concentrações determinadas no experimento, demonstrando, portanto, integridade da membrana, sugerindo não haver alterações morfológicas nas células estudadas;

- Frente à enzima monoamina oxidase, 5 extratos demonstraram ser mais ativos, seletivamente, para a subunidade A desta enzima, sendo que nenhum deles apresentou inibição da MAO-B superior a 50%;

- Comparando-se as substâncias isoladas, o flavonoide quercetina e a xantona mangiferina, ambos demonstraram valores estatisticamente similares na

avaliação da atividade antioxidante, sendo o primeiro mais ativo tanto frente a MAO-A quanto a MAO-B, comparado ao segundo;

- A espécie *Blechnum brasiliense* foi a única que apresentou potentes atividades para todos os testes realizados, demonstrando necessidade de estudos mais aprofundados para melhor compreensão desses potenciais e possível obtenção de compostos capazes de prevenir e/ou aliviar os sintomas das doenças neurodegenerativas.

8. PERSPECTIVAS

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

- Avaliação qualitativa do perfil químico de frações com diferentes polaridades obtidas a partir de extrato bruto de folhas de espécies do gênero *Blechnum*, através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Isolamento de compostos de interesse com base no estudo bio guiado das frações obtidas de espécies de *Blechnum*;
- Avaliação do efeito de frações e substâncias isoladas dessas samambaias frente a radicais livres, através de modelos *in vitro*, como inibição da produção de óxido nítrico e método TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico);
- Avaliação do efeito de frações e substâncias isoladas dessas samambaias sobre as enzimas monoamina oxidase (MAO), acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE), através de modelos enzimáticos *in vitro*;
- Realização de estudos de citotoxicidade com linhagens celulares diferenciadas a fim de verificar com mais detalhes os possíveis efeitos tóxicos de *Blechnum brasiliense*, *B. occidentale* e *B. binervatum*;
- Avaliação do perfil metabolômico das diferentes espécies de *Blechnum* de ocorrência no Brasil e em outros países, através de espectroscopia de RMN- ^1H e de análise multivariada de dados;
- Determinação das respostas de extratos, frações e compostos isolados nos testes realizados, determinando a presença de agentes multifuncionais nessas espécies de samambaias.

9. REFERÊNCIAS

AISEN, P. S. Development of antiinflammatory therapy for Alzheimer's Disease. **Drug Development Research**, v. 56, p. 421–427, 2002.

AISEN, P. S.; DAVIS, K. L. Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease: implications for therapy. **American Journal of Psychiatry**, v. 151, p. 1105-1113, 1994.

AKIYAMA, H.; BARGER, S.; BARNUM, S.; BRADT, B.; BAUER, J.; COLE, G. M.; COOPER, N. R.; EIKELENBOOM, P.; EMMERLING, M.; FIEBICH, B. L.; FINCH, C. E.; FRAUTSCHY, S.; GRIFFIN, W. S.; HAMPEL, H.; HULL, M.; LANDRETH, G.; LUE, L.; MRAK, R.; MACKENZIE, I. R.; McGEER, P. L.; O'BANION, M. K.; PACHTER, J.; PASINETTI, G.; PLATA-SALAMAN, C.; ROGERS, J.; RYDEL, R.; SHEN, Y.; STREIT, W.; STROHMEYER, R.; TOOYOMA, I.; VAN MUISWINKEL, F. L.; VEERHUIS, R.; WALKER, D.; WEBSTER, S.; WEGRZYNIAK, B.; WENK, G.; WYSS-CORAY, T. Inflammation and Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 21, n. 3, p. 383–421, 2000.

ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 678-689, 2006.

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.

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.

ARLT, S.; BEISIEGEL, U; KONTUSH, A. Lipid peroxidation in neurodegeneration: new insights into Alzheimer's disease. **Current Opinion in Lipidology**, v. 13, n. 3, p. 289–294, 2002.

BARNHAM, K. J.; MASTERS, C. L.; BUSH, A. I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. **Nature Reviews**, v. 3, n. 3, p. 205-214, 2004.

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

BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Alzheimer's and Parkinson's diseases and coenzyme Q10 as a potential treatment. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 36, n. 4, p. 381–386, 2004.

BEHL, C. Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches. **Progress in Neurobiology**, v. 57, n. 3, p. 301-323, 1999.

BRAAK, H.; BRAAK, E. Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. **Brain Pathology**, v. 1, n. 3, p. 213-216, 1991.

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.

BRUCK, W.; STADELMANN, C. Inflammation and degeneration in multiple sclerosis. **Neurological Sciences**, v. 24, n. 5, p. 265–267, 2003.

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*), p. 75-82. In: STICH, H. F. **Carcinogens and mutagens in the environment**. Boca Raton: CRC Press, 1982. P. 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.

BUTKOVIC, V.; KLASINC, L.; BORS, W. Kinetic study of flavonoid reactions with stable radicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 10, p. 2816-2820, 2004.

BUTTERFIELD, D. A.; CASTEGNA, A.; LAUDERBACK, C. M.; DRAKE, J. Evidence that amyloid β -peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. **Neurobiology of Aging**, v. 23, n. 5, p. 655–664, 2002.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131–134, 2005.

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.

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.

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, H.; ZHANG, S. M.; HERMAN, M. A.; SCHWARZSCHILD, M. A.; WILLETT, W. C.; COLDITZ, G. A.; SPEIZER, F. E.; ASCHERIO, A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease. **Archives of Neurology**, v. 60, n. 8, p. 1059–1064, 2003.

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.

CITRON, M. Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, n. 9, p. 677- 685, 2004.

COTELLE, N. Role of flavonoids in oxidative stress. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 1, p. 569-590, 2001.

CUMMINGS, J. L.; MASTERMAN, D. L. Depression in patients with Parkinson's disease. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 14, n. 9, p. 711–718, 1999.

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 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.

DEXTER, D. T.; CARTER, C. J.; WELLS, F. R.; JAVOY-AGID, F.; AGID, Y.; LEES, A.; JENNER, P.; MARSDEN, C. D. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 52, n. 2, p. 381–389, 1989.

DIDEROT, N. T.; SILVERE, N.; ETIENNE, T. Xanthones as therapeutic agents: chemistry and pharmacology. **Advances in Phytomedicine**, v. 2, p. 273-298, 2006.

DING, M.; ST PIERRE, B. A.; PARKINSON, J. F.; MEDBERRY, P.; WONG, J. L.; ROGERS, N. E.; IGNARRO, L. J.; MERRILL, J. E. Inducible nitric-oxide synthase and nitric oxide production in human fetal astrocytes and microglia. A kinetic analysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 17, p. 11327–11335, 1997.

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.

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.

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.

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

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

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.

FAROOQUI, T.; FAROOQUI, A. A. Aging: An important factor for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 130, n. 4, p. 203–215, 2009.

FERRANDIZ, M. L.; ALCARAZ, M. J. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. **Agents Actions**, v. 32, p. 283-288, 1991.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. **Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. Construindo a história dos produtos naturais**, 2006. Disponível em: <http://www.multiciencia.unicamp.br/art04_7.htm> Acesso em: 10 out. 2011.

FORZZA, R. C.; LEITMAN, P. M.; COSTA, A. F.; CARVALHO JR, A. A.; PEIXOTO, A. L.; WALTER, B. M. T.; BICUDO, C.; ZAPPI, D.; COSTA, D. P.; LLERAS, E.; MARTINELLI, G.; LIMA, H. C.; PRADO, J.; STEHMANN, J. R.; BAUMGRATZ, J. F. A.; PIRANI, J. R.; SYLVESTRE, L.; MAIS, L. C.; LOHMANN, L. G.; QUEIROZ, L. P.; SILVEIRA, M.; COELHO, M. N.; MAMEDE, M. C.; BASTOS, M. N. C.; MORIM, M. P.; BARBOSA, M. R.; MENEZES, M.; HOPKINS, M.; SECCO, R.; CAVALCANTI, T. B.; SOUZA, V. C. Introdução. In:____. **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro, Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 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 de mestrado (Qualidade Ambiental) - Programa de Pós-Graduação em Gestão Tecnológica: Qualidade Ambiental, FEEVALE, Novo Hamburgo, 2007.

FRANKLIN, G.; CONCEIÇÃO, L. F. R.; KOMBRINK, E.; DIAS, A. C. P. Xanthone biosynthesis in *Hypericum perforatum* cells provides antioxidant and antimicrobial protection upon biotic stress. **Phytochemistry**, v. 70, n. 1, p. 60-68, 2009.

GIULIANO, P.; DE CRISTOFARO, T.; AFFAITATI, A.; PIZZULO, G. M.; FELICIELLO, A.; CRISCUOLO, C.; DE MICHELE, G.; FILLA, A.; AVVEDIMENTO, E. V.; VARRONE, S. DNA damage induced by polyglutamine-expanded proteins. **Human Molecular Genetics**, v. 12, n. 18, p. 2301–2309, 2003.

GLASS, C. K.; SAIJO, K.; WINNER, B.; MARCHETTO, M. C.; GAGE, F. H. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 918–934, 2010.

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.

HAN, X. H.; HONG, S. S.; HWANG, J. S.; LEE, M. K.; HWANG, B. Y.; RO, J. S. Monoamine oxidase inhibitory components from *Cayratia japonica*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 30, n. 1, p. 13-17, 2007.

HARBORNE, J. B. **Introduction to Ecological Biochemistry**. 2 ed. New York: Academic Press, 1982.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, p. 67-202, 2002.

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, 2011.

HORT, M. A. **Estudo das atividades vasodilatadora e antioxidante de *Cyathea phalerata* Mart. (Cyatheaceae)**. Florianópolis: UFSC, 2006. 114 f. Dissertação de mestrado - 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.

HOWES, M. R.; PERRY, N. S.; HOUGHTON, P. J. Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 1, p. 1-18, 2003.

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

IMPERATO F.; MINUTIELLO, P. Kaempferol 3-O-(6"-caffeoylglucoside) from *Pteridium aquilinum*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 1, p. 199-200, 1997.

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

IMPERATO, F. A xanthone-O-glycoside from *Asplenium adiantum-nigrum*. **Phytochemistry**, v. 19, n. 9, p. 2030-3031, 1980.

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

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.

JOSSAN, S. S.; GILLBERG, P. G.; GOTTFRIES, C. G.; KARLSSON, I.; ORELAND, L. Monoamine oxidase B in brains from patients with Alzheimer's disease: a biochemical and autoradiographical study. **Neuroscience**, v. 45, n. 1, p. 1-12, 1991.

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.

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, W. G.; MOHNEY, R. P.; WILSON, B.; JEOHN, G. H.; LIU, B.; HONG, J. S. Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 16, p. 6309-6316, 2000.

KOO, H. M.; SUHAILA, M. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 3106-3112, 2001.

KWON, K. H.; MURAKAMI, A.; TANAKA, T.; OHIGASHI, H. Dietary rutin, but not its aglycon quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of proinflammatory gene expression. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, p. 395-406, 2005.

LA REGINA, G.; SILVESTRI, R.; GATTI, V.; LAVECCHIA, A.; NOVELLINO, E.; BEFANI, O.; TURINI, P.; AGOSTINELLI, E. Synthesis, structure-activity relationships and molecular modeling studies of new indole inhibitors of monoamine oxidases A and B. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 22, p. 9729-9740, 2008.

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, 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.

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.

LIU, B.; GAO, H. M.; WANG, J. Y.; JEOHN, G. H.; COOPER, C. L.; HONG, J. S. Role of nitric oxide in inflammation-mediated neurodegeneration. **Annual New York Academic Sciences**, v. 962, p. 318–331, 2002.

LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S. Flavonóides. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 17, p. 18-22, 2000.

LUSTOSA, S. R. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 447-454, 2008.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

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

MARTÍNEZ-FLORES, S.; GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, B.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; TUÑÓN, M. J. Quercetin prevents nitric oxide production and nuclear factor kappa B activation in interleukin- 1 β -activated rat hepatocytes. **Journal of Nutrition**, v. 135, p. 1359-1365, 2005.

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.

McGEER, E. G.; KLEGERIS, A.; McGEER, P. L. Inflammation, the complement system and the diseases of aging. **Neurobiology of Aging**, v. 26, n. 1, p. 94–97, 2005.

McGEER, E. G.; McGEER, P. L. Inflammatory cytokines in the CNS - possible role in the pathogenesis of neurodegenerative disorders and therapeutic implications. **CNS Drugs**, v. 7, n. 3, p. 214-228, 1997.

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

McGEER, P. L.; McGEER, E. G. Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 10, n. 1, p. S3–S7, 2004a.

McGEER, P. L.; McGEER, E. G. Inflammation and the degenerative diseases of aging. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1035, p. 104–116, 2004b.

McGEER, P. L.; McGEER, E. G. The inflammatory response system of brain-implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. **Brain Research Reviews**, v. 21, n. 2, p. 195-218, 1995.

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

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos**, 2006. Disponível em:

<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf>

Acesso em: 01 out. 2011.

MOOSMANN, M.; BEHL, C. Antioxidants as treatment for neurodegenerative disorders. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 11, n. 10, p. 1407–1435, 2002.

MORAN, R. C. Diversity, biogeography and floristics. In: RANKER, T. A.; HAUFLER, C. H. **Biology and evolution of ferns and lycophytes**. Cambridge, Cambridge University Press, 2008. P. 417-461.

MOREIRA, P. I.; ZHU, X.; NUNOMURA, A.; SMITH, M. A.; Perry, G. Therapeutic options in Alzheimer's disease. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 6, n. 6, p. 897-910, 2006.

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.

PAGE, C. N. Ecological strategies in fern evolution: a neopteridological overview. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 119, p. 1–33, 2002.

PARIHAR, M. S.; HEMNANI, T. Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 11, n. 5, p. 456-467, 2004.

PARK, J. S.; RHO, H. S.; KIM, D. H.; CHANG, I. S. Enzymatic preparation of kaempferol from green tea seed and its antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 8, p. 2951-2956, 2006.

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. **Boletin de la Sociedad Chilena de Quimica**, v. 46, n. 4, p. 449-457, 2001.

PEDERSEN, W. A.; FU, W.; KELLER, J. N.; MARKESBERY, W. R.; APPLE, S.; SMITH, R. G.; KASARSKIS, E.; MATTSON, M. P. Protein modification by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis patients. **Annals of Neurology**, v. 44, n. 5, p. 819-824, 1998.

PERRY, G.; TADDEO, M. A.; PETERSEN, R. B.; CASTELLANI, R. J.; HARRIS, P. L.; SIEDLAK, S. L.; CASH, A. D.; LIU, Q.; NUNOMURA, A.; ATWOOD, C. S.; SMITH, M. A. Adventiously-bound redox active iron and

copper are at the center of oxidative damage in Alzheimer disease. **Biometals**, v. 16, n. 1, p. 77-81, 2003.

PICADA, J. N.; ROESLER, R.; HENRIQUES, J. A. Genotoxic, neurotoxic and neuroprotective activities of apomorphine and its oxidized derivative 8-oxo-apomorphine. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 4, p. 477-486, 2005.

PIETTA, P. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

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.

PRADO, J.; SYLVESTRE, L. S. **Pteridófitas**. Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000007>> Acesso em: 20 out. 2011.

PRIEST, R. G.; GIMBRETT, R.; ROBERTS, M.; STEINERT, J. Reversible and selective inhibitors of monoamine oxidase A in mental and other disorders. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 386, p. 40-43, 1995.

PRYER, K. M.; SCHUETTPELZ, E.; WOLF, P. G.; SCHNEIDER, H.; SMITH, A. R.; CRANFILL, R. Phylogeny and evolution of ferns (monilophytes) with a focus on the early leptosporangiate divergences. **American Journal of Botany**, v. 91, p. 1582–1598, 2004.

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.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RICHARDSON, P. M.; LORENZ-LIBURNAU, E. C-glycosylxanthenes 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.

ROSS, C. A.; POIRIER, M. A. Protein aggregation and neurodegenerative disease, **Nature Medicine**, v. 10, p. S10–S17, 2004.

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.

RUSSO, A.; LONGO, R.; VANELLA, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. **Fitoterapia**, v. 73, n. 1, p. 21-29, 2002.

SALINO, A. **Estudos taxonômicos da família Thelypteridaceae (Polypodiopsida) no estado de São Paulo, Brasil**. Campinas: UNICAMP, 2000. 297 f. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

SANTOS, A. C. C.; WINDISCH, P. G. Análise da pteridoflora da área de proteção ambiental do morro da borússia (Osório-RS). **Instituto Anchietao de Pesquisas de São Leopoldo**, v. 59, p. 237-252, 2008.

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, 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.

SCARPINI, E.; SCHELTERNS, P.; FELDMAN, H. Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives. **Lancet Neurology**, v. 2, n. 9, p. 539-547, 2003.

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.

SCHULZ, J. B.; FALKENBURGER, B. H. Neuronal pathology in Parkinson's disease. **Cell and Tissue Research**, v. 318, p. 135–147, 2004.

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.

SELLEY, M. L.; CLOSE, D. R.; STERN, S. E. The effect of increased concentrations of homocysteine on the concentration of (E)-4-hydroxy-2-nonenal in the plasma and cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 23, n. 3, 383–388, 2002.

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.

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.

SMITH, A. R.; PRYER, K. M.; SCHUETTPELZ, E.; KORALL, P.; SCHNEIDER, H.; WOLF, P. G. A classification for extant ferns. **Taxon**, v. 55, n. 3, p. 705–731, 2006.

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. Xanthonenes in the Appalachian *Asplenium* complex. **Phytochemistry**, v. 10, n. 9, p. 2117-2119, 1971.

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.

SUZUKI, O.; KATSUMATA, Y.; OYA, M.; CHARI, V. M.; VERMES, B.; WAGNER, H.; HOSTETTMANN, H. Inhibition of type A and type B monoamine oxidases by naturally occurring xanthonenes. **Planta Medica**, v. 42, n. 5, p. 17-21, 1981.

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.

TANAKA, N.; KASHIWADA, Y.; KIM, S. Y.; SEKIYA, M.; IKESHIRO, Y.; TAKAISHI, Y. Xanthonenes from *Hypericum chinense* and their cytotoxicity evaluation. **Phytochemistry**, v. 70, n. 11-12, p. 1456-1461, 2009.

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 *Asplenioid* 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.; YODIM, M. B. H. Multifunctional drugs with different CNS targets for neuropsychiatric disorders. **Journal of Neurochemistry**, v. 99, n. 4, p. 1033–1048, 2006.

VEIGA-JÚNIOR, V. F.; MELLO, J. C. P. As monografias sobre plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 464-471, 2008.

VIEGAS-JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 655-660, 2004.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas**. 2 ed. Berlim: Springer Verlag; 384, 1996.

WALLACE, J. W. Chemosystematic implications of flavonoids and C-glycosylxanthones in “ferns”. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 17, n. 2, p. 145-153, 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Diet Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases, Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation, WHO Technical Report Series 916**, Geneva, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Neurological disorders: public health challenges**, Geneva, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review**, Geneva, 1998.

WRAGG, R. E.; JESTE, D. V. Overview of depression and psychosis in Alzheimer's disease. **American Journal of Psychiatry**, v. 146, n. 5, p. 577-587, 1989.

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.

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.

YOSHINO, S.; HARA, A.; SAKAKIBARA, H.; KAWABATA, K.; TOKUMURA, A.; ISHISAKA, A.; KAWAI, Y.; TERAOKA, J. Effect of quercetin and glucuronide metabolites on the monoamine oxidase-A reaction in mouse brain mitochondria. **Nutrition**, v. 27, n. 7-8, p. 847-852, 2011.

YOUSSEF, 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.

YOUSSEF, 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 caudatiformis*. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 5, p. 921-924, 2009.

ZARKOVIC, K. 4-Hydroxynonenal and neurodegenerative diseases. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 24, n. 4-5, p. 293–303, 2003.

ZESIEWICZ, T. A.; GOLD, M; CHARI, G.; HAUSER, R. A. Current issues in depression in Parkinson's disease. **American Journal of Geriatric Psychia** v. 7, n. 2, p. 110–118, 1999.

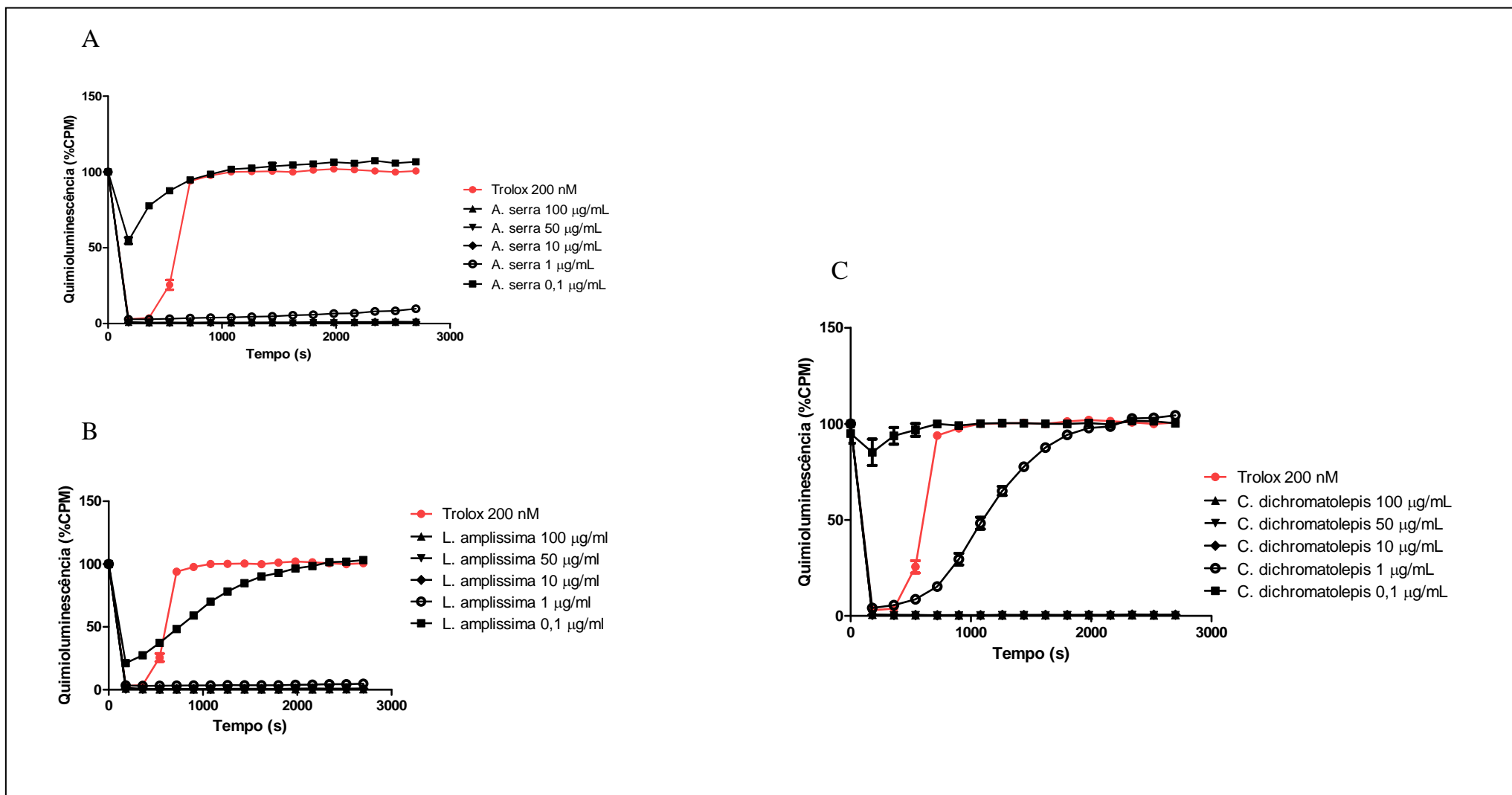


Figura 1. Cinética de potencial antioxidante relativo total dos extratos de *Asplenium serra* (A), *Lastreopsis amplissima* (B) e *Cyathea dichromatolepis* (C), nas concentrações de 100, 50, 10, 1 e 0,1 µg/mL.

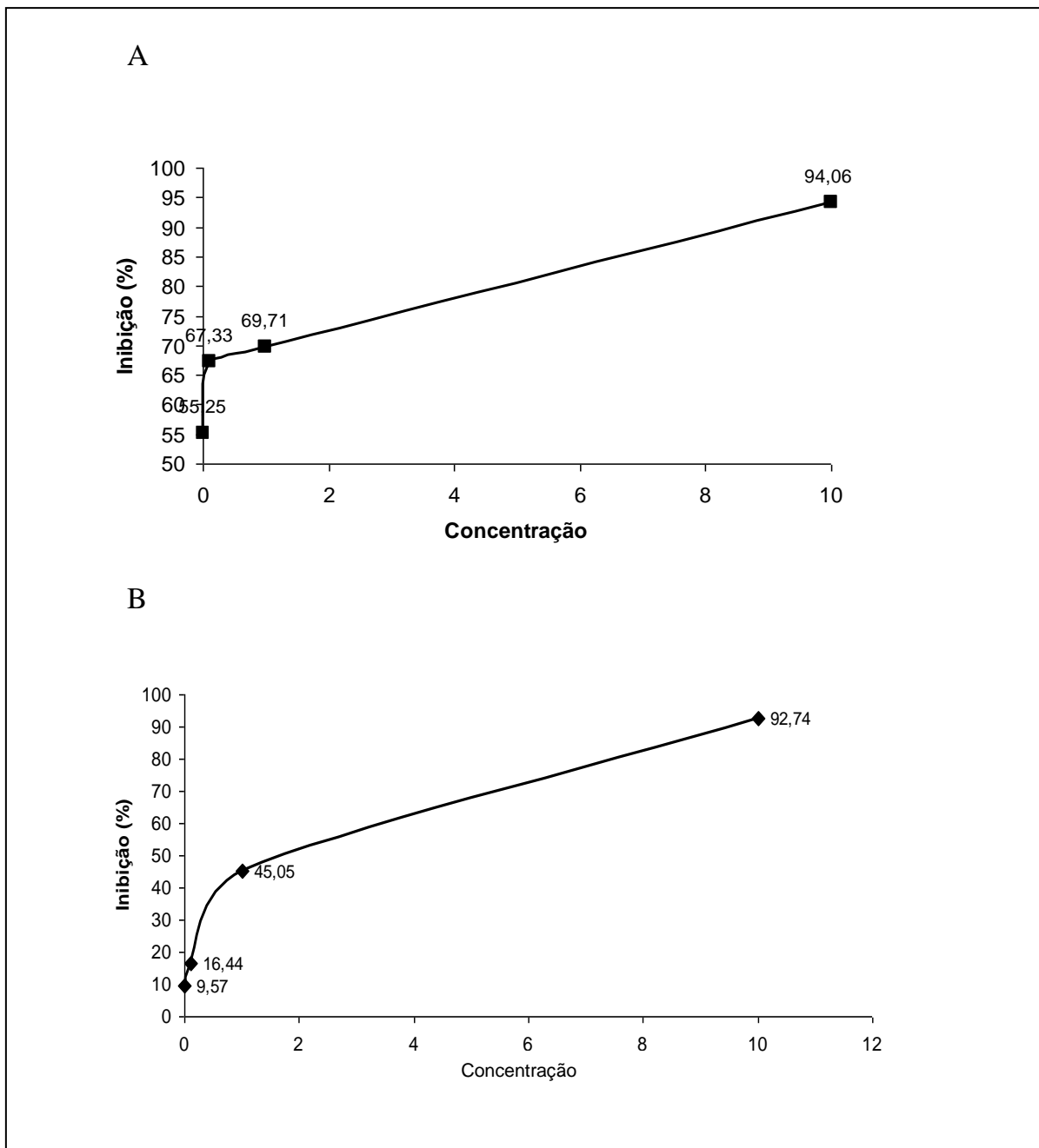


Figura 2. Cinética de atividade antiqumiotática para *Asplenium serra* (A) e *Didymochlaena truncatula* (B) nas concentrações de 0,01; 0,1; 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$.



UFRGS
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: 19920

Título: INVESTIGAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE EXTRATOS DE SAMAMBAIAS COLETADAS NAS REGIÕES SUL E SUDESTE DO BRASIL

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

AMELIA TERESINHA HENRIQUES - coordenador desde 01/04/2010

MARIA ANGÉLICA KIELING RUBIO - pesquisador desde 01/04/2010

Juliana Maria de Mello Andrade - pesquisador desde 01/04/2010

Equipe Externa:

Paulo Roberto Hirhorowitsch Moreno - pesquisador desde 01/04/2010

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 20/06/2011 - Sala de Reuniões do 2º andar da Reitoria, Campus Central, em seus aspectos éticos e metodológicos 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, Segunda-Feira, 27 de Junho de 2011

FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO
Coordenador da comissão de ética