



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**O extrato etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia*
(Asteraceae) modula funções efectoras de neutrófilos: um
promissor agente fitoterápico para o tratamento de processos
inflamatórios mediados por estas células**

Andréa Silva Garcia de Figueiredo Rinhel

**Ribeirão Preto
2015**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**O extrato etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia*
(Asteraceae) modula funções efetoras de neutrófilos: um promissor
agente fitoterápico para o tratamento de processos inflamatórios
mediados por estas células**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos

Orientada: Andréa Silva Garcia de Figueiredo Rinhel

Orientadora: Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 02/10/2015. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto / USP.

Ribeirão Preto
2015

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

Figueiredo-Rinhel, Andréa Silva Garcia de

O extrato etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) modula funções efectoras de neutrófilos: um promissor agente fitoterápico para o tratamento de processos inflamatórios mediados por estas células. Ribeirão Preto, 2015.

169 f.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Lucisano-Valim, Yara Maria.

1. neutrófilo. 2. *Baccharis dracunculifolia*. 3. ácido cafeico. 4. lipossoma. 5. atividade anti-inflamatória. 6. artrite reumatóide.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome da aluna: Andréa Silva Garcia de Figueiredo Rinhel

Título do trabalho: O extrato etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) modula funções efetoras de neutrófilos: um promissor agente fitoterápico para o tratamento de processos inflamatórios mediados por estas células

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientadora: Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicat6ria

Dedico este trabalho:

Aos meus pais Ricardo e Rosi, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, que sempre me amaram, apoiaram minhas escolhas e me deram todo o suporte necessário para que eu trilhasse meu caminho e alcançasse meus objetivos.

Ao meu marido Ricardo, que sempre apoiou e incentivou meu trabalho, que tem sido, ao longo dos mais de 15 anos juntos, um companheiro maravilhoso e que me deu o maior e o mais lindo presente da minha vida: nosso filho!

Ao Rian, meu filho, que faz meus dias mais felizes e coloridos, que me ensinou o verdadeiro sentido da vida e que me fez conhecer o maior amor do mundo!

À profa. Yara e à Aninha, que há 11 anos me receberam no laboratório e que têm acompanhado e participado de muitos dos momentos mais importantes de minha vida. Com certeza minha formação, inclusive pessoal, não teria sido a mesma sem vocês.

Agradecimientos

A Deus

*Pelo dom da vida e por todas as graças que o Senhor tem derramado nela.
Por ter me abençoado com uma família maravilhosa e com amigos especiais.
Todas minhas conquistas, tudo o que tenho e o que sou são Graças ao Senhor e
por isso serei eternamente grata.*

*“Direi do Senhor: Ele é o meu Deus, o meu refúgio e a minha fortaleza, e nele
confiarei”. (Salmo 91:2)*

À minha família

Aos meus pais Ricardo e Rosi, pela minha formação pessoal e profissional. Por todos os ensinamentos que sempre me fizeram crescer a cada dia, por cuidar (e muito bem) do meu filho para que eu pudesse terminar minha pesquisa e, principalmente, por todo amor, carinho e afeto. AMO muito vocês!

Aos meus irmãos Renato e Fábio, minhas cunhadas Poliana e Letícia e minhas sobrinhas Isis e Anne, pela amizade, pelo companheirismo e por todo amor e carinho. Vocês estarão sempre no meu coração!

*Ao meu marido Ricardo, pela paciência, pela cumplicidade, pelo companheirismo, por todo apoio e incentivo durante todos esses anos. Por compartilhar as maiores alegrias e também as tristezas, por me ajudar a superar as dificuldades, por caminhar ao meu lado e por construir um futuro e uma família comigo: serei eternamente grata!
TE AMO para sempre!*

Ao meu filho Rian, simplesmente por existir em minha vida. Agradeço a Deus todos os dias por ter me escolhido para ser sua mãe. Obrigada por ter me dado a oportunidade de conhecer esse amor tão imenso!

À minha segunda família, Domingos, Teresinha, Cláudia, Arnaldo, Aaron, Aalec, Cesar, Fabiana e Enrico, pelas agradáveis conversas e pelo apoio que sempre recebi de todos vocês. Muito obrigada por tudo.

*“A verdadeira felicidade está na própria casa, entre as alegrias da família.”
(Leon Tolstoi)*

À Professora Dra. Yara Maria Lucisano Valim

Pela orientação no desenvolvimento deste trabalho, por todos os momentos de discussão e reflexão, que contribuíram imensamente na minha formação profissional e pessoal. Pelos conselhos, pela convivência e por ser um exemplo de pessoa e de profissional. Os ensinamentos que adquiri neste laboratório durante esses 11 anos vão muito além da pesquisa científica e com certeza irão me acompanhar durante toda a minha vida. Muito obrigada por tudo!

“Sem Deus não há vida, sem família não há base e sem amigos não há mundo colorido” (Verena)

A todos os queridos amigos do laboratório de Bioquímica:

Ana Elisa Caleiro Seixas Azzolini, pela preciosa colaboração no desenvolvimento de cada etapa do trabalho, pelos diversos ensinamentos profissionais e pessoais, por estar sempre disposta a ajudar, por ser uma das mais dedicadas e competentes profissionais que já conheci, que ama o que faz e é querida e admirada por todos. Obrigada pela amizade e pelos agradáveis anos de convivência.

Dra. Luciana Mariño Kabeya, por todo apoio no desenvolvimento dos trabalhos científicos, pelos inúmeros ensinamentos durante todos esses anos, pela amizade e pelos momentos de reflexão e descontração que me ajudaram muito a crescer pessoal e profissionalmente.

Dra. Ana Paula Landi Librandi, por todo o apoio no desenvolvimento da pesquisa, pelos inúmeros ensinamentos profissionais e pessoais, pela agradável convivência e pela linda e sincera amizade cultivada durante todos esses anos.

Dra. Adriana B. P. Paschoalato, pelo apoio, pelas agradáveis discussões e pelos conselhos sempre muito bem-vindos.

Dra. Larissa F. Marchi, pela preciosa colaboração, agradável convivência e produtivas conversas.

Dr. Everton O. L. dos Santos, pelo auxílio na execução e discussão dos experimentos e agradável convivência.

Doutorando Micássio Fernandes de Andrade, pelo precioso auxílio na realização dos experimentos, pelas produtivas discussões, por estar sempre disposto a ajudar todos que precisam, pelo exemplo de esforço e dedicação na busca dos sonhos, enfim, por ser um grande companheiro de trabalho e amigo para todas as horas.

Mestranda Camila Carvalho, pela amizade, pelo apoio, pelos inúmeros momentos de reflexão no caminho da faculdade e pela agradável convivência.

Mestrando Lamartine L. de Melo, pelo auxílio na realização dos experimentos e pelos momentos de descontração.

Mestranda Lucinéia Reuse Albiero, pela agradável convivência durante o pouco tempo que passamos juntas. Como disse para o Micássio uma vez, espero que, como eu, você seja muito feliz neste laboratório!

Márcia A. Okuro, pela preciosa colaboração no desenvolvimento do trabalho, pela amizade e convivência agradável.

Denise Cesario Damasceno, secretária dedicada e competente, pela amizade, atenção e auxílio.

Ieda Maria Razaboni Prado, pelos auxílios técnicos e conselhos, pela amizade sincera, por todos os momentos de reflexão e de descontração, enfim, por ser esta pessoa maravilhosa e de bem com a vida.

Ana Cristina Morseli Polizello, por todo auxílio técnico, por estar sempre disposta a ajudar, pela amizade e agradável convivência.

Nadir Mazzucato, pelo imprescindível trabalho na manutenção da limpeza e organização dos materiais de laboratório e carinho com que sempre trata as pessoas, pelas inúmeras e divertidas conversas, enfim, obrigada por tudo.

Alcides Pereira, por todo auxílio dado durante todos esses anos, pela colaboração no preparo de soluções e agradável convivência.

Luciana Ceribelli, por todo auxílio técnico, pela amizade, pelos momentos de descontração e risos.

Professores do laboratório de bioquímica: Prof. Dr. Augusto César Cropanese Sapdaro, Profa. Dra. Carem Gledes Vargas Recchia, Prof. Dr. Carlos Curti, Profa. Dra. Luciane Carla Alberice, Profa. Dra. Carolina Patrícia Aires, por colocarem à disposição a área experimental e os laboratórios.

Amigos que fizeram parte do grupo e que deixaram saudades: Maria Regina de Pila Raphaeloski, Taís Nader Chrysostomo, Carolina Nakau Fuzissaki, Joel G. Souza, Alexandre Kanashiro, Livia Maria C. S. Ambrosio. Todos vocês, cada qual a sua maneira, foram especiais durante minha caminhada neste laboratório e contribuíram muito com meu crescimento.

Profa, Dra. Cleni M. M. Machado, e toda a equipe de seu laboratório, pelo apoio, pelos momentos de reflexão e discussão dos experimentos e pela agradável convivência.

A todos que também contribuíram com este trabalho:

Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos, pelo fornecimento das amostras, pela preciosa cooperação, pelos valiosos ensinamentos, pelas discussões produtivas e por estar sempre disposto a ajudar.

Dra. Cristiane Teixeira Vilhena Bernardes, pela imprescindível ajuda com o fornecimento das amostras, com a produção dos extratos e com as análises com HPLC. Pela prontidão em ajudar e pela amizade sincera.

Todos os voluntários doadores de sangue, que contribuíram de forma determinante para a realização deste trabalho.

Funcionários da seção de Pós Graduação da FCFRP-USP, principalmente, Rosana Ferreira L.S. Florêncio, Eleni Angeli Passos, Henrique Theodoro, Rafael Braga Poggi e Rosemary Ioshimine Gerolineto, pela precisa assistência durante o desenvolvimento deste trabalho, prontidão em ajudar e bom andamento do programa.

Integrantes do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Integrantes do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e Universidade de São Paulo por fornecer a infraestrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho e pelo oferecimento de um ensino público de qualidade.

Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da FCFRP-USP pelo excelente ensino e programa de pesquisa e extensão oferecidos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro nas etapas iniciais do Doutorado (processo 141067/2011-0).

Todos meus amigos que, indiretamente, contribuíram para este trabalho me dando apoio e incentivo.

Todos aqueles que, embora não citados, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
(FAPESP), pelo auxílio financeiro concedido para a realização
deste trabalho (processo 2010/19504-0).*

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

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

FIGUEIREDO-RINHEL, A. S. G. **O extrato etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) modula funções efetoras de neutrófilos: um promissor agente fitoterápico para o tratamento de processos inflamatórios mediados por estas células.** 2015. 141f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Os neutrófilos são células fagocíticas do sistema imunológico mobilizadas principalmente no combate a infecções. Estas células são capazes de matar os micro-organismos através da desgranulação, que leva à liberação de moléculas antimicrobianas, e da produção de espécies reativas de oxigênio. Embora o recrutamento de neutrófilos seja essencial para a proteção do organismo, sua ativação excessiva resulta na intensa liberação de moléculas citotóxicas no meio extracelular, o que pode desencadear o desenvolvimento e/ou agravar o quadro clínico de doenças autoimunes e inflamatórias, como a artrite reumatoide. Uma possível abordagem terapêutica para o tratamento destas doenças é a modulação das funções efetoras dos neutrófilos. Estudos prévios mostraram que o extrato etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia* (EEBd) possui grande potencial terapêutico, uma vez que apresenta expressiva atividade antioxidante frente ao metabolismo oxidativo dos neutrófilos. Para dar continuidade à investigação da atividade anti-inflamatória e/ou imunomoduladora deste extrato, o presente trabalho avaliou, na primeira etapa, o seu efeito modulatório sobre importantes funções efetoras de neutrófilos que medeiam o reconhecimento e eliminação de patógenos – fagocitose, desgranulação e atividade microbida – e sobre a atividade de enzimas lisossomais. Verificou-se que o EEBd, dependendo da concentração, inibe o metabolismo oxidativo dos neutrófilos sem alterar a capacidade de defesa das células. Na segunda etapa, foi avaliada a atividade antioxidante de sete compostos isolados do EEBd – ácido cafeico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido cinâmico, aromadendrina-4'-metil éter, isosacuranetina e hispidulina – frente ao metabolismo oxidativo dos neutrófilos, a fim de propor possíveis marcadores químicos para as atividades biológicas do extrato. Os resultados apontaram o ácido cafeico como um potencial marcador químico da atividade biológica em questão. Na terceira etapa, com o intuito de aumentar a biodisponibilidade e favorecer o uso terapêutico dos produtos naturais estudados, o EEBd e o ácido cafeico foram incorporados em lipossomas, e constatou-se que a incorporação não alterou suas atividades antioxidantes frente aos neutrófilos, quando comparado às respectivas amostras na forma livre. Por fim, foi avaliado o efeito terapêutico do EEBd e do ácido cafeico, ambos na forma livre e incorporada em lipossomas, em um modelo animal de artrite. Verificou-se que as amostras na forma livre melhoraram expressivamente os parâmetros inflamatórios nas articulações, promovendo redução do edema e da migração de células totais e de neutrófilos, e discreta diminuição da concentração das citocinas inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-1 β . Além disso, a incorporação do EEBd e do ácido cafeico em lipossomas pode auxiliar na redução das suas concentrações necessárias para a obtenção dos efeitos terapêuticos desejados. Assim, pode-se concluir que o EEBd tem grande potencial para se tornar um agente terapêutico adjuvante no tratamento de doenças inflamatórias mediadas por neutrófilos, sendo o ácido cafeico um possível marcador químico para a atividade anti-inflamatória do extrato.

Palavras-chave: neutrófilo, *Baccharis dracunculifolia*, ácido cafeico, lipossoma, atividade anti-inflamatória, artrite reumatoide.

ABSTRACT

FIGUEIREDO-RINHEL, A. S. G. **Ethanollic extract of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) leaves modulates neutrophil effector functions: a promising herbal agent for the treatment of inflammatory processes mediated by these cells.** 2015. 141f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Neutrophils are phagocytic immune cells mobilized primarily to fight against infections. These cells are capable to kill microorganisms through degranulation, which leads to the release of antimicrobial molecules, and production of reactive oxygen species. Although neutrophil recruitment is essential for host protection, excessive activation of these cells culminates in intense discharge of cytotoxic molecules to the extracellular milieu, which can elicit the development of and/or aggravate the clinical condition in autoimmune and inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis. Modulation of the effector functions of neutrophils is a possible therapeutic approach to treat these diseases. Previous studies have shown that the ethanollic extract of *Baccharis dracunculifolia* leaves (EEBd) has a great therapeutic potential due to its significant antioxidant effect towards the oxidative metabolism of neutrophils. To continue investigating the anti-inflammatory and/or immunomodulatory action of such extract, the first part of the present work examined its modulator effect on three important effector functions of human neutrophils that mediate recognition and clearance of pathogens – phagocytosis, degranulation, and microbial killing – and on the activity of lysosomal enzymes. EEBd inhibited the oxidative metabolism of neutrophils without affecting their defense ability, depending on the extract concentration used. To propose possible chemical markers for the biological effects of the extract, the second part of this study evaluated the antioxidant activity of seven compounds isolated from EEBd – caffeic acid, coumaric acid, ferulic acid, cinnamic acid, aromadendrin-4'-methyl ether, isosakuranetin, and hispidulin – towards the oxidative metabolism of neutrophils. The results pointed to caffeic acid as a potential chemical marker for this biological activity. The third part of this investigation aimed to improve the bioavailability and favor the therapeutic use of the natural products studied. EEBd and caffeic acid were incorporated into liposomal carrier systems. The incorporation of both samples into liposomes did not alter their antioxidant activity towards neutrophils, as compared with their respective free forms. Finally, this study examined the therapeutic effect of EEBd and caffeic acid, both in the free form and incorporated into liposomes, in an animal model of arthritis. The free samples markedly improved the joint inflammatory parameters: they reduced edema and migration of total cells and neutrophils, and slightly lowered the levels of the inflammatory cytokines tumor necrosis factor α and interleukin 6 and 1 β (TNF- α , IL-6, and IL-1 β , respectively). In addition, incorporation of EEBd and caffeic acid into liposomes can help to reduce their concentrations required to achieve the desired therapeutic effect. Based on the set of results obtained in this study, we conclude that EEBd has a great potential to become a therapeutic adjuvant in the treatment of neutrophil-mediated inflammatory diseases, and that caffeic acid is a possible chemical marker of the anti-inflammatory activity of the extract.

Keywords: neutrophil, *Baccharis dracunculifolia*, caffeic acid, liposome, anti-inflammatory activity, rheumatoid arthritis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagem representativa de um neutrófilo	03
Figura 2 – Representação esquemática das principais etapas do recrutamento dos neutrófilos da circulação sanguínea para o local da inflamação.....	05
Figura 3 – Representação esquemática da produção de ERO no fagolisossoma de neutrófilos	08
Figura 4 – Ramo exemplar de <i>Baccharis dracunculifolia</i>	14
Figura 5 – Diferentes etapas do ensaio de quimioluminescência (QL) para o cálculo dos valores de CI_{50} (concentração que inibe 50% da QL produzida pelos neutrófilos)	26
Figura 6 – Neutrófilos humanos incubados com os diferentes controles ou diferentes concentrações de EEBd após processo de fagocitose de Zlops durante 1 hora a 37°C.....	47
Figura 7 – Efeito de diferentes concentrações de EEBd sobre a capacidade fagocítica de neutrófilos humanos após estimulação com zimosan opsonizado durante 1 hora a 37°C.....	48
Figura 8 – Efeito de diferentes concentrações de EEBd sobre o índice fagocítico de neutrófilos humanos após estimulação com zimosan opsonizado durante 1 hora a 37°C.....	49
Figura 9 – Perfil da cinética de degradação do substrato SAAVNA pela enzima elastase liberada de neutrófilos humanos estimulados com fMLP na presença de diferentes concentrações do EEBd	50
Figura 10 – Efeito inibitório de diferentes concentrações de EEBd sobre a atividade da enzima elastase liberada de neutrófilos humanos estimulados com fMLP.....	50
Figura 11 – Perfil da atividade da enzima elastase previamente liberada de neutrófilos humanos após tratamento com diferentes concentrações do EEBd.....	51
Figura 12 – Efeito inibitório de diferentes concentrações de EEBd sobre a atividade catalítica da enzima elastase previamente liberada de neutrófilos humanos.....	52
Figura 13 – Atividade da enzima lisozima liberada por neutrófilos humanos ativados por zimosan opsonizado após incubação com diferentes concentrações do EEBd durante 45 minutos	53

Figura 14 – Inibição da atividade da enzima lisozima liberada por neutrófilos humanos previamente incubados com diferentes concentrações de EEBd após 45 minutos de estimulação.....	54
Figura 15 – Atividade da enzima lisozima isolada após incubação com diferentes concentrações do EEBd	55
Figura 16 – Inibição da atividade da enzima lisozima após incubação com diferentes concentrações de EEBd.....	56
Figura 17 – Valores de absorvância referentes à oxidação do TMB por compostos derivados do HOCl produzido pela enzima mieloperoxidase de neutrófilos humanos	57
Figura 18 – Valores de porcentagem de inibição da oxidação do TMB por diferentes concentrações do EEBd após incubação com neutrófilos humanos estimulados com zimosan opsonizado.....	57
Figura 19 – Valores de absorvância referentes à oxidação do TMB pela taurina-Cl formada através da interação da taurina com HOCl residual após incubação do HOCl com as diferentes concentrações do EEBd.....	59
Figura 20 – Valores de porcentagem de inibição da oxidação do TMB pelas diferentes concentrações do EEBd após interação com o HOCl presente no meio	60
Figura 21 – Valores de absorvância referentes à oxidação do TMB pela taurina-Cl residual após incubação deste composto com as diferentes concentrações do EEBd	61
Figura 22 – Valores de porcentagem de inibição da oxidação do TMB pelas diferentes concentrações do EEBd após interação com a taurina-Cl presente no meio	62
Figura 23 – Avaliação da viabilidade de <i>Candida albicans</i> , analisada através do ensaio de redução do MTT, após incubação com diferentes amostras na presença e na ausência de neutrófilos humanos.....	63
Figura 24 – Porcentagem de morte de <i>Candida albicans</i> após incubação com neutrófilos humanos previamente tratados com diferentes amostras	64
Figura 25 – Estruturas químicas de alguns compostos presentes no extrato de <i>Baccharis dracunculifolia</i> . <u>A -Fenilpropanoides</u> : a) ácido cinâmico; b) ácido cumárico; c) ácido cafeico; d) ácido ferúlico; <u>B - Flavonoides</u> : a) aromadendrina-4'-metil-éter - AME; b) isosacuranetina; c) hispidulina.....	65

Figura 26 – Efeito inibitório das diferentes concentrações de flavonoides (AME, isosacuranetina e hispidulina) e de fenilpropanoides (ácidos cinâmico, cumárico, cafeico e ferúlico) sobre a QLLum produzida por neutrófilos humanos estimulados com zimosan opsonizado	66
Figura 27 – Valores de CI_{50} (concentração capaz de inibir 50% da QLLum) dos diferentes compostos presentes no EEBd (ácido cafeico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido cinâmico, AME, isosacuranetina e hispidulina) sobre a QLLum produzida por neutrófilos humanos estimulados com zimosan opsonizado	67
Figura 28 – Efeito inibitório das diferentes concentrações de flavonoides (AME, isosacuranetina e hispidulina) e de fenilpropanoides (ácidos cinâmico, cumárico, cafeico e ferúlico) sobre a QLLuc produzida por neutrófilos humanos estimulados com zimosan opsonizado	68
Figura 29 – Valores de CI_{50} (concentração capaz de inibir 50% da QLLuc) dos diferentes compostos presentes no EEBd (ácido cafeico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido cinâmico, AME, isosacuranetina e hispidulina) sobre a QLLuc produzida por neutrófilos humanos estimulados com zimosan opsonizado.....	69
Figura 30 – Gráficos representativos da caracterização físico-química dos lipossomas quanto à distribuição do tamanho após a etapa de ultracentrifugação e retirada dos compostos não encapsulados. A- lipossomas preparados apenas com o solvente das amostras (DMSO); B- lipossomas incorporados com EEBd e C- lipossomas incorporados com ácido cafeico.....	72
Figura 31 – Efeito inibitório de diferentes concentrações do EEBd incorporados em lipossomas sobre a QLLuc e a QLLum produzida por neutrófilos humanos estimulados com zimosan opsonizado.....	73
Figura 32 – Comparação entre os valores de CI_{50} (concentração capaz de inibir 50% da QL) do EEBd nas formas livres e incorporados em lipossomas, sobre a QLLum e a QLLuc produzida por neutrófilos humanos estimulados com zimosan opsonizado.....	74
Figura 33 – Efeito inibitório de diferentes concentrações de ácido cafeico incorporados em lipossomas sobre a QLLuc e a QLLum produzida por neutrófilos humanos estimulados com zimosan opsonizado.....	75
Figura 34 – Comparação entre os valores de CI_{50} (concentração capaz de inibir 50% da QL) do ácido cafeico nas formas livres e incorporados em lipossomas, sobre a QLLum e a QLLuc produzida por neutrófilos humanos estimulados com zimosan opsonizado.....	76
Figura 35 – Variação no diâmetro das articulações dos animais tratados com os diferentes compostos.....	77

Figura 36 – Migração de células totais e de neutrófilas para o local da inflamação (sinóvia) 6 horas após a indução da artrite com zimosan.	78
Figura 37 – Concentração das citocinas inflamatórias A) TNF- α , B) IL-6 e C) IL1- β , presentes no líquido sinovial dos animais tratados com os diferentes compostos seis horas após a indução da artrite com zimosan.....	79
Figura 38 – Variação no diâmetro das articulações dos animais tratados com controles e com diferentes compostos incorporados nos lipossomas (EEBd 9,0 mg/Kg, Ácido cafeico 3,0 mg/Kg e Quercetina 1,5 mg/Kg).....	80
Figura 39 – Migração de células totais e de neutrófilos para o local da inflamação (sinóvia) dos animais tratados com os controles e com os diferentes compostos incorporados nos lipossomas (EEBd 9,0 mg/Kg, Ácido cafeico 3,0 mg/Kg e Quercetina 1,5 mg/Kg).....	81
Figura 40 – Concentração das citocinas inflamatórias A- TNF- α , B- IL-6 e C- IL1- β , presentes no líquido sinovial dos animais tratados com os diferentes compostos incorporados nos lipossomas (EEBd 9,0 mg/Kg, Ácido cafeico 3,0 mg/Kg e Quercetina 1,5 mg/Kg).....	82
Figura A1 – Cromatograma do Extrato Etanólico das folhas de <i>Baccharis dracunculifolia</i> recém preparado (início dos estudos com o EEBd)...	119
Figura A2 – Cromatograma do Extrato Etanólico das folhas de <i>Baccharis dracunculifolia</i> estocado durante o andamento dos estudos de doutorado.....	120
Figura A3 – Efeito inibitório das diferentes concentrações dos Extratos Etanólicos das folhas de <i>Baccharis dracunculifolia</i> – EEBd ($\mu\text{g/mL}$) de maio/07a e maio/07b sobre: A- quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) e B- quimioluminescência dependente de lucigenina (QLluc), produzidas por PMNs humanos estimulados com zimosan opsonizado.....	121
Figura A4 – Gráficos de CI_{50} (concentração do EEBd que inibe a QL em 50%) dos Extratos Etanólicos das folhas de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (EEBd) de maio/07a e maio/07b sobre A- quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) e B- quimioluminescência dependente de lucigenina (QLluc), produzidas por PMNs humanos estimuladas com zimosan opsonizado.....	122
Figura A5 – Curva padrão de variação da D.O. (450 nm) em função da concentração de lisozima (ng/mL) presente no meio.....	123

Figura A6 – Concentração de lisozima liberada no meio reacional por diferentes concentrações de neutrófilos (PMNs) estimulados com diferentes concentrações de zimosan opsonizado (Zlops).....	124
Figura A7 – Concentração de lisozima liberada no meio reacional por neutrófilos humanos estimulados com zimosan opsonizado, após incubação com diferentes concentrações do solvente do EEBd (DMSO)	126
Figura A8 – Valores de absorvância referentes à oxidação do TMB por compostos derivados do HOCl produzidos pelas enzimas mieloperoxidase de diferentes concentrações de PMNs humanos...	127
Figura A9 – Valores de absorvância referentes à oxidação do TMB por compostos derivados do HOCl produzido pela enzima mieloperoxidase de neutrófilos	129
Figura A10 – Curva padrão de HOCl incubado com taurina (5mM).....	130
Figura A11 – Espectro de varredura de 200 nm a 700 nm do Extrato Etanólico das folhas de <i>Baccharis dracunculifolia</i> - EEBd (60 µg/mL), com pico de absorvância em 322 nm.....	131
Figura A12 – Curva padrão do extrato etanólico das folhas de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (EEBd) relacionando os diferentes valores de absorvância em 322 nm com as respectivas concentrações do EEBd.....	132
Figura A13 – Espectro de varredura de 200 nm a 700 nm do ácido cafeico na concentração de 40 µM em solução etanólica, com pico de absorvância em 324 nm	132
Figura A14 – Curva padrão do ácido cafeico relacionando os diferentes valores de absorvância em 324 nm com as respectivas concentrações deste composto	133
Figura A15 – Padronização da quantidade de zimosan utilizada para a indução da artrite nos animais.....	134
Figura A16 – Padronização do intervalo de tempo entre o tratamento dos animais e a indução da artrite.....	135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividade antioxidante de compostos isolados presentes no extrato etanólico das folhas de <i>Baccharis dracunculifolia</i> , avaliada através de quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) e de lucigenina (QLluc)	70
Tabela 2 – Caracterização físico-química dos lipossomas contendo EEBd, ácido cafeico e o solvente das amostras (DMSO)	71
Tabela A1 – Parâmetros utilizados na separação dos compostos presentes no extrato etanólico das folhas de <i>Baccharis dracunculifolia</i> através de cromatografia líquida de alta eficiência antes do período de estocagem.....	118
Tabela A2 – Gradiente da fase móvel utilizado na separação cromatográfica dos compostos presentes nos extratos de <i>Baccharis dracunculifolia</i> antes da estocagem.....	118

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorvância
AME	Aromadendrina-4'-metil éter
ANOVA	Análise de variância
AR	Artrite reumatoide
ATCC	Do inglês, "American Type Culture Collection"
c.p.m.	Fótons contados por minuto (do inglês, "counted photons per minute")
CF	Capacidade fagocítica
CFD	Diluyente de Fixação de Complemento
CHOL	Colesterol (do inglês, "cholesterol")
Cl ₅₀	Concentração que inibe 50% da resposta biológica
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
CPQBA	Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrônomicas
D.O.	Densidade óptica
DGC	Doença Granulomatosa Crônica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPI	Difenileno-iodônio
EEBd	Extrato Etanólico das folhas de <i>Baccharis dracunculifolia</i>
ELISA	Imunoensaio enzimático (do inglês, "Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay")
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
fMLP	N-formilmetionil-leucil-fenilalanina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HOCl	Ácido hipocloroso
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IF	Índice fagocítico
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
MPO	Mieloperoxidase
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NBT	azul de nitrotetrazólio
NETs	Armadilhas extracelulares de neutrófilos (do inglês, “neutrophil extracellular traps”)
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
PBS	Solução salina tamponada com fosfato (do inglês “phosphate buffered saline”)
PC	Fosfatidilcolina (do inglês, “phosphatidylcholine”)
PMA	do inglês, “Phorbol 12-myristate 13-acetate”
PMNs	Leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos)
p-NA	p-nitroanilina
QL	Quimioluminescência
QLluc	Quimioluminescência dependente de lucigenina
QLlum	Quimioluminescência dependente de luminol
r.p.m.	Rotações por minuto
SAAVNA	Succinil-Ala-Ala-Val-p-nitroanilida
SOD	Superóxido dismutase
Tau-Cl/ Taurina-Cl	Taurina cloramina
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
UC	Ultracentrifugação
Ufc	Unidades formadoras de colônias
v/v	Volume/volume
ZI	Zimosan
Zlops	Zimosan opsonizado

SUMÁRIO

Resumo	I
Abstract	li
Lista de figuras	lii
Lista de tabelas	Viii
Lista de abreviaturas e siglas	lx
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Neutrófilos.....	2
1.1.1 Aspectos Gerais	2
1.1.2 Doença inflamatória com envolvimento de neutrófilos: Artrite reumatoide	11
1.2 A espécie <i>Baccharis dracunculifolia</i> De Candolle.....	14
1.3 Lipossomas como carreadores de substâncias naturais	17
2 OBJETIVOS	19
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	21
3.1 Principais reagentes e Soluções	22
3.2 Principais Equipamentos Utilizados	23
3.3 Sujeitos da pesquisa	23
3.4 Obtenção de Leucócitos Polimorfonucleares (PMNs) – Neutrófilos.....	24
3.5 Obtenção do soro humano para opsonização do zimosan (estímulo).....	24
3.6 Preparo do estímulo (zimosan opsonizado)	25
3.7 Ensaio de quimioluminescência (QL)	25
3.8 Extrato Etanólico das folhas de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (EEBd).....	27
3.8.1 Obtenção e tratamento do material vegetal utilizado no preparo do EEBd ..	27
3.8.2 Preparo do Extrato Etanólico Bruto de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (EEBd).....	27
3.9 Efeito do EEBd sobre a fagocitose de neutrófilos: Avaliação da capacidade fagocítica e do índice fagocítico	28

3.10 Efeito do EEBd sobre a desgranulação: atividade das enzimas elastase e lisozima.....	29
3.10.1 Enzima elastase	29
3.10.1-1 Atividade da elastase liberada de neutrófilos após incubação com EEBd.....	30
3.10.1-2 Efeito do EEBd sobre a atividade da enzima elastase previamente liberada.....	31
3.10.2 Enzima lisozima.....	32
3.10.2-1 Atividade da lisozima liberada de neutrófilos após incubação com EEBd.....	32
3.10.2-2 Efeito do EEBd sobre a atividade da enzima lisozima padrão	33
3.11 Efeito do EEBd sobre a atividade da enzima mieloperoxidase e seus produtos.....	34
3.11.1 Efeito do EEBd sobre a atividade da enzima mieloperoxidase: avaliação da produção de HOCl pelos neutrófilos	35
3.11.2 Avaliação da atividade “scavenger” do EEBd sobre HOCl e Taurina-Cl.....	36
3.11.2-1 HOCl	36
3.11.2-2 Taurina-Cl	37
3.12 Efeito do EEBd sobre a atividade microbicida dos neutrófilos.....	38
3.13 Obtenção de compostos isolados de <i>Baccharis dracunculifolia</i> e avaliação de suas atividades antioxidantes	40
3.13.1 Obtenção de compostos isolados de <i>Baccharis dracunculifolia</i>	40
3.13.2 Avaliação da atividade antioxidante de algumas substâncias presentes no extrato de <i>Baccharis dracunculifolia</i> através de ensaios de quimioluminescência.....	40
3.14 Incorporação do EEBd e do ácido cafeico em vesículas lipossômicas e avaliação de suas atividades antioxidantes sobre os neutrófilos	41
3.14.1 Preparo e caracterização dos lipossomas contendo EEBd e ácido cafeico	41
3.14.2 Avaliação da atividade antioxidante dos lipossomas contendo EEBd e ácido cafeico sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos: ensaios de QL.....	42
3.15 Efeito terapêutico do EEBd e do ácido cafeico em modelo animal de artrite	43
3.15.1 Efeito do EEBd e do ácido cafeico sobre o modelo animal de artrite ..	44
3.15.2 Efeito do EEBd e do ácido cafeico incorporados em lipossomas sobre o modelo animal de artrite	44

4 RESULTADOS.....	45
4.1 Efeito do EEBd sobre a fagocitose de neutrófilos: Avaliação da capacidade fagocítica e do índice fagocítico	46
4.1.1 Efeito do EEBd sobre a capacidade fagocítica dos neutrófilos	47
4.1.2 Efeito do EEBd sobre o índice fagocítico dos neutrófilos	48
4.2 Efeito do EEBd sobre a desgranulação: atividade das enzimas elastase e lisozima.....	49
4.2.1 Enzima Elastase	49
4.2.1-1 Atividade da elastase liberada de neutrófilos após incubação com EEBd.	49
4.2.1-2 Efeito do EEBd sobre a atividade da enzima elastase previamente liberada	51
4.2.2 Enzima lisozima	52
4.2.2-1 Atividade da lisozima liberada de neutrófilos após incubação com EEBd.	52
4.2.2-1 Efeito do EEBd sobre a atividade da enzima lisozima padrão.....	54
4.3 Efeito do EEBd sobre a atividade da enzima mieloperoxidase e seus produtos.....	56
4.3.1 Efeito do EEBd sobre a atividade da enzima mieloperoxidase: avaliação da produção de HOCl pelos neutrófilos	56
4.3.2 Avaliação da atividade “scavenger” do EEBd sobre HOCl e Taurina-Cl	58
4.3.2-1 HOCl	58
4.3.2-2 Taurina-Cl	60
4.4 Efeito do EEBd sobre a atividade microbicida dos neutrófilos.....	62
4.5 Obtenção de compostos isolados de <i>Baccharis dracunculifolia</i> e avaliação de suas atividades antioxidantes	64
4.5.1 Quimioluminescência dependente de Luminol (QLlum)	65
4.5.2 Quimioluminescência dependente de Lucigenina (QLluc)	68
4.6 Incorporação do EEBd e do ácido cafeico em vesículas lipossômicas e avaliação de suas atividades antioxidantes.....	70
4.6.1 Preparo e caracterização dos lipossomas contendo EEBd e ácido cafeico	70
4.6.2 Avaliação da atividade antioxidante dos lipossomas contendo EEBd e ácido cafeico sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos: ensaios de QL	73
4.6.2-1 Atividade antioxidante dos lipossomas contendo EEBd.....	73

4.6.2-2 Atividade antioxidante dos lipossomas contendo ácido cafeico.....	74
4.7 Efeito terapêutico do EEBd e do ácido cafeico em modelo animal de artrite.	76
4.7.1 Efeito do EEBd e do ácido cafeico sobre o modelo animal de artrite.....	77
4.7.2 Efeito do EEBd e do ácido cafeico incorporados em lipossomas sobre o modelo animal de artrite	80
5 DISCUSSÃO	83
6 CONCLUSÕES	98
REFERÊNCIAS	101
APÊNDICES	116
Apêndice A – Avaliação da manutenção do perfil químico e da atividade biológica do EEBd	117
Apêndice B – Padronização de parâmetros experimentais para avaliação do efeito do EEBd sobre a atividade da enzima lisozima	123
Apêndice C – Padronização de parâmetros experimentais para avaliação do efeito do EEBd sobre a atividade da enzima mieloperoxidase e seus produtos	127
Apêndice D – Curvas padrão do EEBd e do ácido cafeico para a determinação das eficiências de incorporação das amostras nos lipossomas.....	131
Apêndice E - Padronização das condições experimentais para avaliação do efeito terapêutico do EEBd e do ácido cafeico em modelo animal de artrite ...	134
ANEXOS	137
Anexo A – Certificado de aprovação do comitê de ética em pesquisa com seres humanos	138
Anexo B – Termo de consentimento livre e esclarecido assinado pelos voluntários doadores de sangue.....	139
Anexo C – Certificado de aprovação da comissão de ética no uso de animais	141

1. Introdução

1.1 Neutrófilos

1.1.1 Aspectos gerais

Os neutrófilos são células que compõem o sistema imune inato, desempenhando um papel essencial em processos inflamatórios agudos e na defesa do organismo contra patógenos (Kumar; Sharma, 2010; Mantovani et al., 2011; Bardoel et al., 2014).

Estas células se originam na medula óssea e, quando totalmente diferenciadas e maduras, são liberadas na corrente sanguínea, onde constituem de 50 a 70% do total de leucócitos circulantes e possuem um tempo de vida médio de 8 a 12 horas (Mantovani et al., 2011; Kolaczkowska; Kubes, 2013; Nauseef; Borregaard, 2014).

Devido às funções bactericida e fungicida altamente potentes e por serem as primeiras células a serem recrutadas da corrente sanguínea para o local da inflamação, os neutrófilos são considerados a primeira linha de defesa do organismo (Kumar; Sharma, 2010; Kolaczkowska; Kubes, 2013).

A importância destas células na defesa do hospedeiro é verificada pela alta morbidade e mortalidade dos indivíduos que são profundamente privados de neutrófilos normais circulantes. Além disso, pacientes com doenças genéticas que comprometem os neutrófilos sofrem infecções microbianas frequentes e graves, mostrando que um número mínimo de neutrófilos normais circulantes é crucial para manter um sistema de defesa eficaz contra micro-organismos patogênicos (Freitas et al., 2009).

Além de atuar diretamente na destruição dos patógenos, os neutrófilos também são capazes de produzir mediadores pró-inflamatórios (que contribuem para o recrutamento de novas células para o foco inflamatório), de atuar como células apresentadoras de antígenos e de sinalizar e instruir outras células do sistema imunológico (tais como células dendríticas, macrófagos, células “natural killer”, células B e células T), o que evidencia seu importante papel na regulação da resposta imune inata e adaptativa (Abdallah et al., 2011; Mantovani et al., 2011; Bardoel et al., 2014). Adicionalmente, os neutrófilos auxiliam na remoção de células mortas, de corpos celulares gerados por apoptose e de outros “debris” celulares; além de produzirem citocinas que auxiliam na resolução da inflamação, na cicatrização e na remodelação de tecidos danificados (Borregaard et al., 2007; Kolaczkowska; Kubes, 2013).

Morfologicamente, os neutrófilos são facilmente distinguidos das outras células sanguíneas devido ao seu exclusivo núcleo multi-lobulado (**Figura 1**), o que confere a estas células o nome alternativo de leucócitos polimorfonucleares (PMNs), sendo os dois nomes usados sem distinção (Bardoel et al., 2014). Além do núcleo multi-lobulado (com 3 a 5 lóbulos), os neutrófilos apresentam formato esférico com cerca de 12 a 15 μm de diâmetro, e grânulos em abundância no citoplasma. Tais grânulos são classificados como azurófilos (ou primários), específicos (ou secundários), de gelatinase (ou terciários) e vesículas secretoras (Mayer-Scholl et al., 2004; Borregaard et al., 2007).

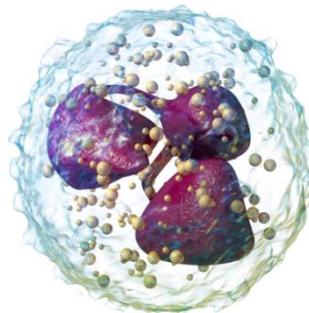


Figura 1: Imagem representativa de um neutrófilo (Blausen, 2014).

Os grânulos citoplasmáticos dos PMNs são produzidos em sequência, sendo primeiro os grânulos azurófilos ou primários (os quais contêm diversos componentes de defesa como a mieloperoxidase, elastase e defensinas); em seguida, durante a maturação dos neutrófilos, são formados os grânulos secundários ou específicos (que contêm colagenase, lactoferrina, gelatinase, lisozima, entre outras proteínas) e, posteriormente, são produzidos os grânulos terciários ou de gelatinase que se assemelham aos secundários, porém com altas concentrações de gelatinase. Quando maduros, os neutrófilos desenvolvem as vesículas secretoras, que são altamente mobilizáveis e contêm, na superfície de suas membranas, componentes enzimáticos, receptores, proteínas sinalizadoras e moléculas de adesão, além de proteínas plasmáticas presentes na matriz (Borregaard et al., 2007; Bardoel et al., 2014).

Então, os vários subconjuntos de grânulos contidos nos neutrófilos, além de armazenar um grande arsenal de moléculas potencialmente citotóxicas, também constituem um reservatório de diversos receptores associados à membrana, e é a

mobilização controlada destas organelas citoplasmáticas que permite a transformação dos neutrófilos, presentes na circulação, de células não ativadas para potentes células efetoras da imunidade inata (Faurischou; Borregaard, 2003).

Para atuar na defesa do organismo, os neutrófilos possuem como principais atividades funcionais: a migração orientada para o local da infecção (quimiotaxia), a aderência ao patógeno e seu englobamento (fagocitose), e a destruição dos microrganismos invasores, através da liberação das substâncias tóxicas presentes nos grânulos e da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Kolaczkowska; Kubes, 2013). Juntamente com a liberação das várias moléculas antimicrobianas, os PMNs intensamente estimulados também liberam armadilhas extracelulares (do inglês, “neutrophil extracellular traps” - NETs) para a contenção da infecção e da inflamação. As NETs são formadas como consequência da liberação extracelular dos conteúdos nucleares dos neutrófilos e são compostas por elementos de DNA, aos quais são ligadas histonas, proteínas (como a lactoferrina e catepsinas) e enzimas (como a elastase e mieloperoxidase), liberadas dos grânulos. As NETs são capazes de imobilizar os patógenos, impedindo-os de se espalharem e facilitando a fagocitose subsequente dos micro-organismos capturados. Além disso, também é possível que as NETs sejam capazes de matar diretamente os patógenos por meio de histonas antimicrobianas e das proteases. O mecanismo molecular da formação das NETs ainda é pouco conhecido, mas acredita-se que as ERO desempenham um papel central neste processo (Kumar; Sharma, 2010; Kolaczkowska; Kubes, 2013; Nauseef; Borregaard, 2014).

I – Quimiotaxia

Para atingir os sítios de inflamação ou injúria, os neutrófilos circulantes devem deixar a corrente sanguínea através do endotélio e migrar, ao longo de um gradiente químico, para o local da lesão nos tecidos, processo este chamado de quimiotaxia (Zachariae, 1993).

As sequências de eventos da jornada dos neutrófilos do lúmen vascular para o tecido intersticial podem ser divididas nas seguintes etapas: próximo dos locais de injúria, ocorre o reconhecimento e a ancoragem dos PMNs em moléculas de adesão que são expostas pelas células endoteliais em resposta aos estímulos inflamatórios, posteriormente ocorre o rolamento dos PMNs ao longo do endotélio, a adesão às células endoteliais, a transmigração através do endotélio e a migração das células

nos tecidos intersticiais em direção ao estímulo quimiotático (**Figura 2**) (Amulic et al., 2012; Kolaczkowska; Kubes, 2013; Nauseef; Borregaard, 2014).

Os agentes responsáveis pelo estímulo quimiotático são, na maioria das vezes, pequenas proteínas contendo cerca de 60 a 100 aminoácidos e podem ser classificados como exógenos ou endógenos. Os agentes exógenos mais comuns são os produtos bacterianos, enquanto os endógenos incluem componentes do sistema complemento (especialmente C5a e C3a) e interleucinas (Zachariae, 1993).

A ligação destas moléculas quimioatraentes aos receptores de membrana dos PMNs desencadeia uma série de eventos citoplasmáticos, os quais resultam em alterações bioquímicas, mudança de forma e ativação do citoesqueleto dessas células, permitindo a migração dos PMNs para o tecido alvo e a efetuação da fagocitose (Dale et al., 2008).

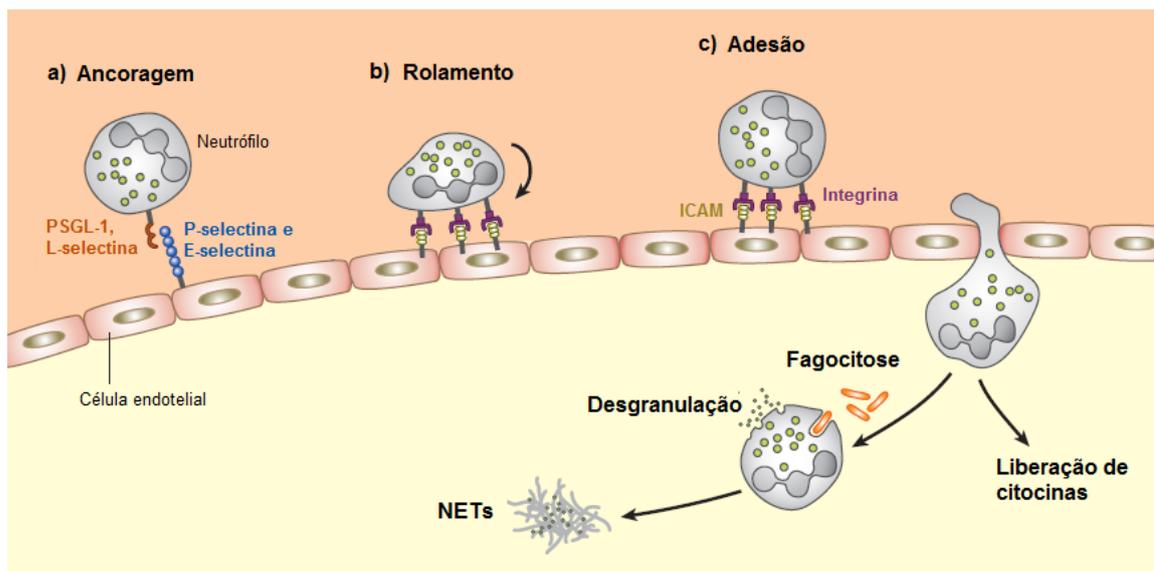


Figura 2: Representação esquemática das principais etapas do recrutamento dos neutrófilos da circulação sanguínea para o local da inflamação. Os PMNs circulantes reconhecem sinais de inflamação e migram para as áreas onde seu arsenal antimicrobiano é necessário para a eliminação da infecção. **(a)** perto dos locais inflamatórios as células endoteliais são estimuladas a exporem moléculas de adesão, as quais são reconhecidas pelos neutrófilos circulantes que se ligam ao endotélio. **(b)** Os PMNs iniciam o processo de rolamento ao longo do endotélio. **(c)** Ocorre a adesão dos PMNs ao endotélio. Subsequentemente, os neutrófilos atravessam o endotélio e chegam ao local de inflamação, onde liberam citocinas que recrutam outras células do sistema imunológico e utilizam seus mecanismos de defesa antimicrobiana através da fagocitose, desgranulação e formação de NETs. Figura adaptada de Amulic e colaboradores (2012).

II – Fagocitose

A fagocitose é o principal mecanismo utilizado para remover detritos celulares e agentes patogênicos. É um processo ativo, mediado por receptores, durante o qual uma partícula é internalizada pela membrana celular para um vacúolo chamado de fagossoma (Flannagan et al., 2012).

Orientados pelos agentes quimiotáticos e pela presença de receptores para tais agentes em suas membranas, os PMNs atingem o local da lesão e atuam na defesa do organismo através da fagocitose, que inclui: a *adesão* dessas células com o patógeno (que é facilitada quando este se encontra opsonizado) e a *ingestão* do patógeno. Dependendo do tipo de interação entre os PMNs e os micro-organismos, a ingestão do patógeno pode ocorrer tanto com a emissão de pseudópodes, rodeando e internalizando a partícula (ativação de receptores Fc), como através do “afundamento” das partículas para dentro da célula (ativação dos receptores de complemento) (Lee et al., 2003; Amulic et al., 2012).

Após a ingestão, os fagossomas formados são relativamente benignos para os micro-organismos, e a maquinaria celular necessária para a destruição e eliminação dos patógenos internalizados é adquirida através da fusão dos grânulos com os fagossomas (formando os fagolisossomas) e ativação do metabolismo oxidativo. A destruição dos patógenos ocorre tanto através de mecanismos independentes de oxigênio (com a ação das substâncias tóxicas contidas nos grânulos) como através de mecanismos dependentes de oxigênio (com a produção de ERO com grande potencial microbicida) (Lee et al., 2003; Mayer-Scholl et al., 2004; Amulic et al., 2012; Kolaczkowska; Kubes, 2013).

III – O processo de desgranulação

Os constituintes dos diferentes subtipos de grânulos dos neutrófilos são os responsáveis pelos mecanismos de destruição dos patógenos de forma independente de oxigênio. A fusão dos grânulos com a membrana plasmática ou com a membrana dos fagossomas e a liberação das substâncias microbidas podem causar a morte dos patógenos. Tais substâncias microbidas são, principalmente, proteínas e enzimas antimicrobianas como a defensina e a lisozima (que funcionam rompendo a superfície aniônica bacteriana) e proteases (que degradam proteínas bacterianas) (Mayer-Scholl et al., 2004; Pham, 2006; Bardoel et al., 2014).

A enzima lisozima é um componente chave do sistema imune inato e age principalmente através de hidrólise catalítica dos peptidoglicanos das paredes celulares de bactérias, o que provoca perturbação das superfícies aniônicas bacterianas, tornando-as mais permeáveis e causando o seu rompimento. Esta enzima está presente em praticamente todos os grânulos dos PMNs, sendo um dos componentes principais dos grânulos secundários (Faurichou; Borregaard, 2003; Mayer-Scholl et al., 2004; Klüter et al., 2014).

Na década de 1920, Alexander Fleming descreveu a lisozima como um fator bactericida dos tecidos humanos. Ele também descobriu e nomeou a bactéria amarela *Micrococcus lysodeikticus*, que foi altamente suscetível à morte mediada por lisozima (Ganz, 2003).

A enzima elastase é uma serino-protease presente nos grânulos primários dos PMNs em concentrações superiores a 5 mM. Fisiologicamente, esta enzima está envolvida na degradação de materiais estranhos ingeridos durante a fagocitose e é considerada uma molécula efetora chave no sistema imune inato, com potente atividade contra fungos e bactérias, principalmente as Gram negativas (Pham, 2006; Heinz et al., 2012).

Sob intensa ativação celular, a elastase é rapidamente liberada no espaço extracelular, onde pode matar patógenos ali presentes, além de degradar fatores de virulência bacterianos. A elastase secretada é, também, responsável pela degradação das proteínas da matriz extracelular local, remodelação do tecido danificado e facilitação da migração dos PMNs através do tecido durante a migração em direção ao sítio de inflamação (Fujie et al., 1999; Brinkmann et al., 2004; Heinz et al., 2012).

Dentre os componentes da matriz extracelular que podem ser alvos da atividade enzimática da elastase estão uma variedade de ligantes de superfície celular, proteínas solúveis, alguns tipos de colágeno, fibronectina, proteoglicanas, fibras de elastina e um grande número de importantes moléculas de adesão (Pham, 2006; Korkmaz et al., 2010; Takeuchi et al., 2010).

Entretanto, em processos inflamatórios crônicos como em glomerulonefrite, doenças pulmonares e artrite reumatoide, a elastase favorece a inflamação e é considerada uma das principais enzimas responsáveis pela destruição tecidual. Desta forma, esta enzima parece ser um importante alvo para a terapia de doenças

inflamatórias crônicas (Beyer; Melzig, 2005; Pham, 2006; Takeuchi et al., 2010; Sandhaus; Turino, 2013; Tsai et al., 2015).

IV – Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

Além dos mecanismos microbicidas independentes de oxigênio, o processo de fagocitose é acompanhado de um conjunto de alterações metabólicas nas células fagocíticas, denominado “burst” ou explosão respiratória, metabólica ou oxidativa. O “burst” respiratório é caracterizado, dentre outros fatores, pelo aumento no consumo de oxigênio molecular e pela produção de grande quantidade de ERO, as quais são potentes agentes oxidantes e atuam em conjunto com os constituintes dos grânulos para matar e digerir os agentes fagocitados (Winterbourn; Kettle, 2013).

As principais enzimas envolvidas na produção das ERO pelos neutrófilos são a NADPH oxidase (responsável pela geração de superóxido) e a mieloperoxidase (MPO liberada dos grânulos azurófilos e que gera outras espécies oxidantes, como o HOCl) (**Figura 3**) (Klebanoff et al., 2013; Winterbourn; Kettle, 2013).

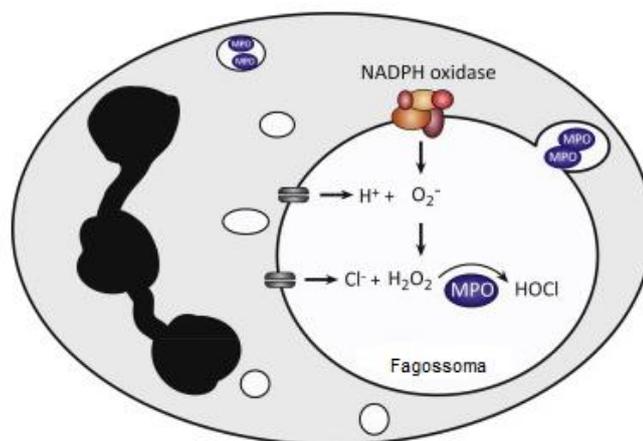
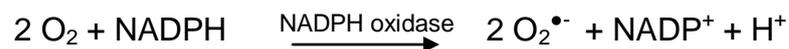


Figura 3: Representação esquemática da produção de ERO no fagolisossoma de neutrófilos. A MPO é armazenada dentro dos grânulos azurófilos do neutrófilo. Depois da fagocitose, os grânulos fundem-se com o fagossoma e liberam a MPO. O complexo enzimático da NADPH oxidase gera o superóxido que é convertido em peróxido de hidrogênio. A MPO utiliza o peróxido de hidrogênio para catalisar a produção de potentes moléculas antimicrobianas, como o ácido hipocloroso. Figura adaptada de Bardeel e colaboradores (2014).

O metabolismo oxidativo se inicia com o complexo enzimático da NADPH oxidase, localizado na membrana plasmática e fagossomal dos PMNs. Esse complexo permanece inativo nas células em repouso, tornando-se ativo somente

após estimulação das células com componentes bacterianos ou com alguns estímulos imunes, tais como o agente promotor de tumores PMA (do inglês, “Phorbol 12-myristate 13-acetate”), o potente peptídeo quimiotático fMLP (N-formilmetionil-leucil-fenilalanina), ácido araquidônico (AA), concanavalina A, complexos imunes e ainda partículas antigênicas (zimosan, látex) opsonizadas com anticorpos e componentes do sistema complemento (Brown, 1995; Babior, 1999; Groemping; Rittinger, 2005; Souabni et al., 2012).

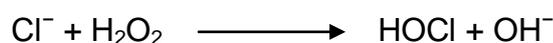
A NADPH oxidase reduz o oxigênio molecular presente no meio a ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que é a primeira ERO formada e a precursora de todas as demais produzidas durante o metabolismo oxidativo (Freitas et al., 2009; Bardoel et al., 2014).



O superóxido produzido, apesar de não ser um forte oxidante para a maioria dos substratos biológicos, é rapidamente dismutado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) espontaneamente ou através da enzima superóxido dismutase (SOD) (Freitas et al., 2009; Amulic et al., 2012).



Após a desgranulação, a enzima MPO (heme peroxidase), liberada dos grânulos azurófilos, reage com o H_2O_2 formado e com um haleto (predominantemente o cloreto, devido à sua alta concentração nos fluidos biológicos) para produzir o ácido hipocloroso (HOCl), um dos oxidantes mais bactericidas produzidos pelos neutrófilos, sendo cerca de 100 a 1000 vezes mais tóxico que o O_2^{\bullet} e que o H_2O_2 (Mayer-Scholl et al., 2004; Freitas et al., 2009; van der Veen et al., 2009; Klebanoff et al., 2013).



A MPO constitui cerca de 5% do conteúdo total de proteínas de neutrófilos e 25% das proteínas dos grânulos. A maior parte do H_2O_2 produzido pelos neutrófilos

nos fagolisossomas é consumido pela MPO para catalisar a formação de ácido hipocloroso (HOCl). O HOCl formado pode, além de agir diretamente sobre os patógenos presentes nos fagolisossomas, reagir com proteínas do hospedeiro, resultando na produção de cloraminas, cuja toxicidade depende muito de sua carga e capacidade de se difundir nas bactérias. Embora sejam oxidantes mais fracos e, geralmente, menos tóxicos que o HOCl, as cloraminas são capazes de manter sua capacidade bactericida por mais tempo, podendo contribuir de forma relevante para a atividade microbicida nos fagolisossomas (Freitas et al., 2009; Amulic et al., 2012; Klebanoff et al., 2013; Winterbourn; Kettle, 2013).

Além das ERO mencionadas, uma grande variedade de outras espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio são produzidas durante a ativação do “burst” oxidativo, como o oxigênio singleto, radicais hidroxilas, peroxinitritos e outros produtos microbicidas (Freitas et al., 2009; Klebanoff et al., 2013).

Apesar de os fagócitos possuírem outros mecanismos microbicidas (como os peptídeos e enzimas antimicrobianas presentes nos grânulos), a geração das ERO e do HOCl durante a fagocitose é considerado um mecanismo crítico na destruição de grande parte dos patógenos (Dale et al., 2008). Isso ocorre porque, além das ERO matarem diretamente os patógenos (causando danos oxidativos aos biocompostos), elas também atuam indiretamente na destruição e eliminação dos micro-organismos através de vários mecanismos não oxidativos (por exemplo, estimulando a sinalização de receptores de reconhecimento padrão, as respostas de linfócitos T e a formação das NETs) (Paiva; Bozza, 2014).

A importância das ERO na defesa do organismo fica bastante evidente pela grande susceptibilidade às infecções de indivíduos com Doença Granulomatosa Crônica (DGC, uma doença genética em que a NADPH oxidase é inativa ou tem sua atividade fortemente reduzida), em que os pacientes necessitam constantemente de terapia com antibióticos ou antifúngicos para combater os micro-organismos (Winterbourn; Kettle, 2013; Bardoel et al., 2014). Alguns indivíduos com deficiências na MPO também sofrem de infecções frequentes ou graves, especialmente com espécies de *Candida*. No entanto, a deficiência de MPO é relativamente comum, mas apenas ocasionalmente associada com infecções. Isso ocorre porque, na ausência da MPO, outras espécies reativas (por exemplo, superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e peroxinitrito) ainda podem ser produzidas no fagossoma neutrófilo

em concentrações microbicidas, porém, de forma bem mais lenta que na presença da MPO, podendo ser satisfatórias para controlar as infecções leves. Além disso, algumas pessoas possuem apenas deficiências parciais na MPO e apenas uma atividade residual desta enzima pode ser suficiente para as atividades antimicrobianas da célula (Amulic et al., 2012; Winterbourn; Kettle, 2013).

As ERO produzidas pelos PMNs estimulados podem ser medidas por vários métodos, dentre eles: os eletroquímicos (com utilização do eletrodo de Clark, por exemplo, que detecta o consumo de O_2 pelos fagócitos durante o “burst” oxidativo para a produção do $O_2^{\bullet-}$), o colorimétrico (em que a oxidação de sondas colorimétricas, como o NBT, MTT, TMB e o ferricitocromo c, produz produtos coloridos), o fluorimétrico (com utilização de diversas sondas que produzem produtos fluorescentes após reação com as ERO), a citometria de fluxo (que permite, através de sondas fluorescentes, a avaliação de um ou vários parâmetros para cada célula individualmente) e a quimioluminescência (em que as sondas quimioluminescentes são oxidadas pelas ERO, ampliando a produção de luz produzida pelos PMNs durante o metabolismo oxidativo) (Smith; Weidemann, 1993; Freitas et al., 2009; Dupre-Crochet et al., 2013).

Dentre os métodos citados, a quimioluminescência (QL) tem sido amplamente utilizada como uma metodologia altamente sensível e precisa para a avaliação das espécies reativas produzidas pelos neutrófilos (Freitas et al., 2009). Este método permite uma boa avaliação da cinética do metabolismo oxidativo dos PMNs, possibilitando o monitoramento do início, da amplitude e também do fim da produção das ERO (Dupre-Crochet et al., 2013). Além disso, como a produção de QL é dependente de ERO, este método tem sido empregado no estudo de substâncias com atividade antioxidante, sendo muito utilizado para a verificação da atividade antioxidante de produtos naturais em PMNs (Zielinska et al., 2000; Kanashiro et al., 2007; Simões-Ambrosio et al., 2010; Andrade et al., 2013; Czerwińska et al., 2013; Vongsak et al., 2013; Fernandes et al., 2014; Santos et al., 2014).

1.1.2 Doença inflamatória com envolvimento de neutrófilos: artrite reumatoide

Embora as ERO e o conteúdo dos grânulos sejam importantes para a resposta imune inata, atuando tanto na eliminação de agentes infecciosos quanto

nas funções de sinalização das células, o arsenal citotóxico liberado pelos neutrófilos não é específico para os patógenos invasores, podendo ser prejudiciais para o hospedeiro (Kobayashi et al., 2003; Paiva; Bozza, 2014).

Para evitar os efeitos nocivos das ERO, o organismo humano possui diversas enzimas, moléculas antioxidantes e inibidores de proteases endógenos, os quais têm a função de neutralizar as espécies reativas e as proteases presentes no espaço extracelular, além de reparar os danos que elas causam (Filippin et al., 2008; Burgos et al., 2009; Freitas et al., 2009).

Apesar disso, em algumas condições, principalmente em situações de intensa ativação celular, ocorre um grande acréscimo na produção de oxidantes e proteases nos sítios de inflamação, resultando em consumo e depleção desses inibidores, bem como na inativação dos mesmos (Filippin et al., 2008). A liberação excessiva e prolongada desses compostos citotóxicos no meio extracelular e suas ações inespecíficas fazem com que tais moléculas reajam com componentes do organismo do hospedeiro, ocasionando a destruição dos tecidos saudáveis e contribuindo para a patogênese de diversas doenças como a glomerulonefrite, vasculite, aterosclerose, doença pulmonar obstrutiva crônica, lúpus eritematoso sistêmico, doença inflamatória intestinal e a artrite reumatoide (Dallegrì; Ottonello, 1997; Kobayashi et al., 2003; Burgos et al., 2009; Freitas et al., 2009; van der Veen et al., 2009; Flannagan et al., 2012; Nemeth; Mocsai, 2012).

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica que está associada ao intenso recrutamento e ativação de neutrófilos. É caracterizada principalmente por hiperplasia sinovial, grandes infiltrados celulares, concentrações elevadas de citocinas pró-inflamatórias, destruição das articulações e manifestações extra-articulares que levam à dor, perda de função e redução na qualidade de vida (Cascao et al., 2010; Nemeth; Mocsai, 2012; Bardoel et al., 2014).

Embora a etiopatogenia desta condição não seja totalmente conhecida, é sabido que os PMNs estão envolvidos nos mecanismos que impulsionam o início da AR (Cascao et al., 2010).

Os neutrófilos são as células mais abundantes presentes no fluido sinovial das articulações de pacientes com AR e muitos destes neutrófilos são encontrados próximos às áreas de erosão da cartilagem, onde ocorre a maioria dos danos teciduais. Tal fato reforça a hipótese de que estas células causam danos nos tecidos através da liberação

de oxidantes e proteases, contribuindo para o desenvolvimento da lesão articular (van der Veen et al., 2009; Nemeth; Mocsai, 2012; Bardoel et al., 2014).

Durante o processo inflamatório da AR, os neutrófilos secretam, além das substâncias citotóxicas, diversos mediadores pró-inflamatórios (como TNF- α , IL-1 β e IL-6), os quais causam a ativação dos próprios PMNs e de outras células imunes, promovendo um quadro de inflamação aguda e persistente. Além disso, os neutrófilos persistem no sítio inflamatório durante um maior tempo, aumentando a liberação das ERO e das potentes enzimas destrutivas no meio extracelular (Cascao et al., 2010; Kundu et al., 2012).

A dor intensa e contínua nas articulações dos pacientes com AR acarreta consideráveis consequências socioeconômicas (Hunt; Emery, 2014), como o que ocorreu em 2013 no Brasil, quando, no intervalo de apenas duas semanas, cerca de 770 mil pessoas deixaram de realizar suas atividades habituais devido a quadros relacionados com a artrite (IBGE, 2015). Deste modo, é de grande interesse realizar a pesquisa de novos agentes que sejam capazes de atenuar os sintomas desta doença e, embora seja evidente a importância dos neutrófilos na defesa do hospedeiro, essas células também devem ser consideradas como um potencial alvo terapêutico em autoimunidade (Bardoel et al., 2014).

Atualmente, a grande maioria dos fármacos utilizados para o tratamento da AR, principalmente os fármacos sintéticos antirreumáticos modificadores da doença, (como o metotrexato) e imunossupressores (como a ciclofosfamida e azatioprina), provocam uma expressiva redução da quantidade de neutrófilos circulantes (neutropenia), podendo expor o paciente a grande risco de infecções e aumento do risco com a profundidade e duração da neutropenia (Lazaro; Morel, 2015).

Diante do exposto, uma abordagem atraente para o tratamento de AR é a intervenção nas atividades dos PMNs de modo a modular a produção e/ou a liberação excessiva das ERO e do conteúdo citotóxico dos grânulos, sem alterar as funções de defesa destas células contra os patógenos invasores (Cascao et al., 2010). Para isso, existe uma busca contínua por reguladores das funções efetoras desta célula, para que novos fármacos, com atividades anti-inflamatória e antioxidante, sejam produzidos. Estudos com produtos naturais têm demonstrado resultados satisfatórios e algumas substâncias com efeitos sobre o metabolismo oxidativo e sobre a desgranulação já foram identificadas (Zielinska et al., 2000; Kanashiro et al., 2007;

Paula et al., 2009; Simões-Ambrosio et al., 2010; Andrade et al., 2013; Figueiredo-Rinhel et al., 2013; Ji et al., 2013; Kabeya et al., 2013; Figueiredo-Rinhel et al., 2014; Santos et al., 2014). Apesar de muitos destes produtos naturais terem grande potencial para serem usados como adjuvantes no tratamento da AR, estudos adicionais devem ser realizados para verificar se tais substâncias também interferem nos processos de reconhecimento e destruição dos micro-organismos pelos PMNs.

1.2 A espécie *Baccharis dracunculifolia* De Candolle

Dentre os produtos naturais com expressiva atividade modulatória sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos encontra-se a *Baccharis dracunculifolia* De Candolle (DC) (família Asteraceae) (Figueiredo-Rinhel et al., 2013).

Esta planta, conhecida popularmente como “alecrim-do-campo”, “alecrim-de-vassoura”, “vassourinha” e “vassoura” é uma espécie brasileira, com registros de ocorrência nas regiões sul, sudeste e centro-oeste, principalmente nas áreas de cerrado (Park et al., 2002, 2004). As plantas desta espécie são arbustos ramificados e perenes que podem chegar a cerca de quatro metros de altura e cuja floração ocorre após a estação das chuvas (Park et al., 2004) (**Figura 4**). São encontrados em campos ou áreas abertas e constituem formações densas e dominantes sobre terras não cultivadas ou degradadas (Bastos et al., 2011).



Figura 4: Ramo exemplar de *Baccharis dracunculifolia* (Figueiredo, 2010).

Considerando o emprego na medicina popular, é relatado o uso dos ramos e folhas de *B. dracunculifolia* para combater distúrbios gástricos e afecções febris, além da utilização no tratamento de feridas e processos inflamatórios (dos Santos et

al., 2010). Além disso, estudos científicos têm revelado diversas atividades biológicas desta planta como: anti-inflamatória, antiulcerogênica, antioxidante, antimicrobiana, antifúngica, antiviral, acaricida, tripanocida, anticariogênica, imunomodulatória, antígenotóxica, antimutagênica e hepatoprotetora (Leitão et al., 2004; Lemos et al., 2007; Missima et al., 2007; da Silva Filho et al., 2008; Bufalo et al., 2009; dos Santos et al., 2010; Johann et al., 2010; Parreira et al., 2010; Cestari et al., 2011; Bernardes et al., 2012; Guimarães et al., 2012; Resende et al., 2012; Bachiega et al., 2013; Figueiredo-Rinhel et al., 2013; Munari et al., 2014; Rezende et al., 2014; de Assis Lage et al., 2015; Pedrazzi et al., 2015).

Com relação ao metabolismo secundário, a *Baccharis dracunculifolia* apresenta diversos compostos como o ácido cinâmico e seus derivados (ácidos cafeico, *p*-cumárico e ferúlico), flavonoides (como pinobancsina, canferol, canferide, isosacuranetina, aromadendrina-4'-metil éter, crisina, acacetina e apigenina), monoterpenos (como timol, carvacrol e limoneno), sesquiterpenos (como farnesol, nerolidol e espatulenol), além de outros importantes compostos como: artepelina C, drupanina, bacarina e óxido de baccharis (Park et al., 2004; de Alencar et al., 2005; Fukuda et al., 2006; Missima et al., 2007; Chang et al., 2008; Marostica et al., 2008; de Sousa et al., 2009; Oliveira et al., 2011; Martinez-Correa et al., 2012; de Assis Lage et al., 2015).

Os metabólitos secundários produzidos pelas plantas podem estar associados com diversas funções, como a atração de polinizadores, proteção contra a luz ultravioleta e apoio estrutural. Além destas funções, estas substâncias são consideradas parte da estratégia de defesa da planta contra o ataque de insetos herbívoros. No entanto, alguns herbívoros usam estes metabólitos secundários para se defender de seus próprios predadores (Park et al., 2004; de Alencar et al., 2005; Chang et al., 2008; Nascimento et al., 2008; Bufalo et al., 2010; Bastos et al., 2011; Guimarães et al., 2012; de Oliveira et al., 2014). Isso ocorre, por exemplo, no caso das abelhas *Apis mellifera*, que utilizam os metabólitos secundários das plantas para a produção de própolis, que possui várias funções nas colmeias como preenchimento de lacunas, redução dos espaços de entrada e saída, mumificação de insetos mortos e para evitar a infestação de micro-organismos (Bastos et al., 2011).

Contudo, é sabido que a produção destes metabólitos pela planta é sensível a diversos fatores como variações climáticas, fatores ambientais e, especialmente,

interações com insetos e predadores (Park et al., 2004; Bastos et al., 2011).

A *Baccharis dracunculifolia* é considerada a principal fonte botânica da própolis verde, sendo a própolis um produto altamente valorizado e comercializado em várias preparações farmacêuticas e cosméticas, tais como: comprimidos, pastilhas, dentifrícios, loções, cremes faciais, tinturas, pomadas etc. (Bankova et al., 2000; Park et al., 2002). Além disso, a própolis verde tem sido alvo de inúmeros estudos farmacológicos que demonstraram atividades antitumoral, antimicrobiana, anti-inflamatória, tripanocida, imunomodulatória, antioxidante e “scavenger” de radicais livres (Bankova et al., 1999, 2000; Simões et al., 2004; Fischer et al., 2007; Jorge et al., 2008; Bufalo et al., 2010; Fonseca et al., 2011; de Oliveira et al., 2014).

Estudos prévios demonstraram que tanto a própolis verde quanto a *Baccharis dracunculifolia*, nas formas de extrato etanólico, foram capazes de inibir o metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados, inibição esta que ocorreu de forma dependente da concentração e não relacionada a eventos tóxicos sobre as células (Simões-Ambrósio et al., 2010; Figueiredo-Rinhel et al., 2013). Observou-se também que, tanto a concentração dos constituintes químicos quanto o efeito antioxidante do extrato de *Baccharis dracunculifolia*, foram influenciados por fatores sazonais (Figueiredo-Rinhel et al., 2013), evidenciando a importante relação entre o perfil químico e a amplitude da atividade biológica desempenhada por esta planta.

Dessa maneira, torna-se necessário verificar a importância relativa de determinados constituintes do extrato na atividade antioxidante frente aos PMNs, a fim de se determinar possíveis marcadores químicos para esta propriedade biológica. Ainda, a definição de marcadores químicos, que representam a ação terapêutica das plantas, é indispensável para a validação de plantas medicinais, para o uso popular mais seguro e para testes de qualidade e integridade de fitoterápicos (Bessa et al., 2013).

Desta forma, estudos adicionais são necessários para a determinação de possíveis marcadores químicos que reflitam a atividade antioxidante do extrato sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos; para o melhor entendimento sobre os mecanismos de ação envolvidos nesta atividade antioxidante e para verificar se, além da capacidade de modular a quantidade de ERO produzida pelas células durante o processo inflamatório (as quais podem agravar o quadro de lesão tecidual em doenças como a AR), o extrato também interfere em algumas funções

primordiais dos PMNs para a defesa do organismo (como a fagocitose, a desgranulação, a liberação de moléculas citotóxicas e atividade microbicida).

1.3 Lipossomas como carreadores de substâncias naturais

Um fator que muitas vezes limita a utilidade clínica de extratos é a baixa biodisponibilidade de seus constituintes. Isto ocorre porque muitos dos componentes biologicamente ativos dos extratos (como alguns flavonoides, taninos, terpenos etc.) são moléculas com baixa solubilidade lipídica (o que limita severamente sua capacidade de atravessar membranas biológicas) e/ou grande tamanho molecular (não permitindo absorção por difusão passiva) (Ajazuddin; Saraf, 2010).

Para contornar este problema, pesquisadores e algumas empresas realizam a incorporação dos extratos em sistemas carreadores tipo lipossomas, os quais oferecem uma série de vantagens para os medicamentos fitoterápicos, incluindo aumento da solubilidade e biodisponibilidade, proteção contra toxicidade, aumento da atividade farmacológica, aumento da estabilidade através de proteção da degradação física e química etc. (Ajazuddin; Saraf, 2010).

Depois de serem absorvidos, os lipossomas são reconhecidos pelo sistema imunológico e parecem ter sua eliminação mediada principalmente pelos componentes do sistema complemento (Huong et al., 2001; Landi-Librandi, et al., 2012a). Estudos verificaram que algumas características físico-químicas como composição, tamanho e carga superficial podem influenciar o tempo de permanência dos lipossomas na circulação sanguínea. Foi observado que vesículas com baixo diâmetro (abaixo de 800 nm), distribuição de tamanho homogênea (caracterizada pelo baixo índice de polidispersão) e carga superficial neutra (caracterizada pelo baixo valor do potencial zeta) são mais adequadas para utilização em meio biológico uma vez que, nestas condições, há um menor reconhecimento das vesículas pelo sistema imunológico e uma menor depuração dos lipossomas, permitindo que o carreador permaneça mais tempo na corrente sanguínea e atinja o sítio de ação desejado (Devine; Bradley, 1998; Huong et al., 2001).

Em relação à composição dos lipossomas, estudos prévios demonstraram que lipossomas compostos por fosfatidilcolina de soja e colesterol em proporção de massa de 5:1 foram bastante adequados para utilização como um sistema carreador

de produtos naturais, uma vez que foram capazes de incorporar quantidades satisfatórias desses produtos sem ativar de forma exacerbada o sistema complemento (Landi-Librandi et al., 2010; Landi-Librandi et al., 2012a,b).

Os lipossomas também têm sido bastante utilizados para o tratamento de processos inflamatórios crônicos, uma vez que permitem uma liberação mais direcionada e um maior acúmulo do fármaco nos locais de inflamação, reduzindo os efeitos colaterais sistêmicos e reforçando a efetividade terapêutica (Prasad et al., 2015).

Em relação ao tratamento da artrite, estudos mostraram que, em virtude de seu tamanho e composição química, os lipossomas tem se mostrado muito eficazes para reter o fármaco no interior da cavidade sinovial, podendo aumentar seu tempo de permanência na sinóvia em mais de 40 horas. Além disso, o uso dos lipossomas reduz a exposição do fármaco aos demais tecidos, eliminando grande parte dos efeitos indesejáveis associados com a terapia, mostrando que os lipossomas são excelentes carreadores para os compostos utilizados no tratamento da AR (Edwards et al., 2007; Kapoor et al., 2014).

Uma vez que o uso de lipossomas possui como vantagens: alta biocompatibilidade (pois são veículos biodegradáveis e não tóxicos), facilidade de preparo, versatilidade química (permitindo o carreamento de compostos hidrofílicos, anfifílicos e lipofílicos) e por direcionar e aumentar o tempo de permanência dos fármacos nos locais de lesão, a utilização deste sistema como carreador do extrato de *B. dracunculifolia* possui um grande potencial na superação dos principais problemas associados ao uso de fitoterápicos, podendo assegurar a atividade biológica do extrato.

De acordo com o exposto, a incorporação do extrato de *B. dracunculifolia* em sistemas carreadores tipo lipossomas pode contribuir para o desenvolvimento de um agente terapêutico brasileiro.

2. Objetivos

Objetivo geral:

Diante da literatura apresentada e da observação de que o extrato etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia* (EEBd) possui expressiva atividade antioxidante sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos, em concentrações não tóxicas, o presente trabalho estudou a ação imunomodulatória deste extrato sobre diversas funções efetoras dos neutrófilos, com vistas ao desenvolvimento de um agente fitoterápico para o tratamento de processos inflamatórios mediados por estas células. Para atingir este objetivo, foi empregada a seguinte estratégia experimental:

Objetivos específicos:

- I- Avaliar o efeito do EEBd, sobre as seguintes funções efetoras do neutrófilo:
 - a. fagocitose,
 - b. desgranulação, através da medida da atividade das enzimas elastase e lisozima,
 - c. atividade da enzima mieloperoxidase e seus produtos,
 - d. atividade microbicida das células.

- II- Avaliar, através de ensaios de quimioluminescência (QL), a atividade antioxidante de alguns compostos presentes no EEBd sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos.

- III- Incorporar o EEBd e o seu possível marcador químico em sistemas carreadores tipo lipossomas e realizar a caracterização físico-química das vesículas formadas.

- IV- Avaliar a capacidade dos compostos incorporados nos lipossomas em inibir a QL de neutrófilos estimulados e relacionar suas atividades antioxidantes com as atividades biológicas dos compostos livres.

- V- Avaliar, em estudos “in vivo”, os efeitos terapêuticos do EEBd e de seu possível marcador químico (tanto nas formas livres como incorporadas nos lipossomas) em modelo animal de artrite através da:
 - a. medida do edema da articulação,
 - b. avaliação do infiltrado celular no líquido sinovial,
 - c. quantificação de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-1 β).

3. Casuística e Métodos

3.1 Principais reagentes e Soluções

- Ácido cafeico – Sigma-Aldrich C0625;
- Ácido cinâmico – Sigma-Aldrich C6004;
- Ácido cumárico – Sigma-Aldrich C9008;
- Ácido ferúlico – Sigma-Aldrich F3500;
- Água sanitária comercial – Marca Candura;
- BioBond® - Eletrinic Microscopy Science 71304;
- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil) tetrazólio (MTT) – (Sigma M2128);
- *Candida albicans* (ATCC 64548);
- Catalase – Sigma-Aldrich C10;
- CFD - Diluente de Fixação de Complemento com 0,1% de gelatina (pH 7,2);
- Citocalasina B – Sigma-Aldrich C6762;
- Colesterol - Riedel de Haën 20808;
- Corante Panótico Rápido – LB Laborclin;
- Dexametasona - Sigma-Aldrich D4902;
- Dimetilsulfóxido (DMSO) – Merck;
- DPI (difenileno-iodônio) - Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., USA;
- Etanol - Merck;
- Fosfatidilcolina de soja - Sigma-Aldrich P7443;
- kit citocinas IL-6 e TNF- α – Invitrogen KRC0062 e KRC3012;
- kit citocinas IL-1 β – R&D Systems;
- lisozima (Sigma-Aldrich L 6876);
- Líquido de Turk (violeta de gensiana 1% em solução de ácido acético 1%);
- Lucigenina (10,10'-dinitrato-dimetil-bis-acrinidina) - Sigma-Aldrich;
- Luminol (5-amino-2,3-diidro-1,4-ftalazinodiona) - Sigma-Aldrich;
- *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma-Aldrich M 3770);
- Quercetina – Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., USA;
- Solução de Alséver (tampão citrato com azida sódica pH 6,1);
- Solução de gelatina (*Difco*) 2,5% em NaCl 0,15 mol/L;
- Solução de Hanks pH 7,2;
- Solução de NH₄Cl 0,83% pH 7,2;

- Solução fisiológica (NaCl 0,15 mol/L);
- Succinil-Ala-Ala-Val-p-nitroanilida (SAAVNA) – Calbiochem 454454;
- Taurina – Sigma-Aldrich T0625;
- Tetrametilbenzidina (TMB) – Sigma-Aldrich T2885;
- Triton x-100 - Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., USA;
- Zymosan A (*Saccharomyces cerevisiae*) – Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.

3.2 Principais Equipamentos Utilizados

- Agitador automático tipo “shaker” (Marconi – modelo MA 420);
- Agitador com placa de aquecimento (Marca Ika – modelo C MAG-HS7);
- Balança analítica de precisão (Marca Shimadzu – Modelo AUW220D);
- Banho-Maria (Marca Cientec – modelo- CT-245);
- Bomba à vácuo (Marca Tecnal – modelo TE 058);
- Centrífuga (Marca Eppendorf – modelo 5810R);
- Cromatógrafo de fase líquida (marca Shimadzu);
- Espectrofotômetro (Marca Hitachi – modelo U2910);
- Evaporador rotativo (Marca Tecnal – modelo – TE 120);
- Freezer -20°C e -70°C (Forma Scientific);
- Laser Light Scattering – Zeta Sizer Nano Series, Nano-ZS – Malven Instruments;
- Leitor de ELISA – Espectrofotômetro (Marca Varian – modelo Cary 50 Bio);
- Luminômetro (Marca EG&G Berthold – modelo Auto Lumat LB 953);
- Microscópio Óptico (Marca Olympus – modelo – BX51);
- pHmetro (Marca Gehaka – modelo PG1800);
- Ultracentrífuga (Marca Beckman - modelo XL-70);

3.3 Sujeitos da pesquisa

Os sujeitos utilizados neste trabalho consistiram de cerca de 20 voluntários saudáveis (alunos de graduação, pós-graduação e funcionários da FCFRP-USP), de ambos os sexos, não fumantes, na faixa etária de 20 a 40 anos, que não estavam fazendo uso de qualquer tipo de medicamento há pelo menos uma semana em

relação à data em que participaram da pesquisa. Foi feita a coleta de sangue periférico, o qual foi utilizado para o isolamento de neutrófilos e obtenção de soro para opsonização do estímulo. Foram seguidos os procedimentos recomendados pela resolução 196/96 da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CONEP) e o trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa com seres humanos da FCFRP-USP (Protocolo de pesquisa CEP/FCFRP nº 200 – Anexo A). Os voluntários foram conscientizados dos objetivos do trabalho e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo B).

3.4 Obtenção de Leucócitos Polimorfonucleares (PMNs) - Neutrófilos

Os neutrófilos foram obtidos a partir de sangue total de humanos saudáveis, colhido através de punção venosa com sistema a vácuo. Após a coleta, este sangue foi transferido para um tubo Falcon contendo anticoagulante Alséver pH 6,1 (v/v).

A técnica empregada para separação das células foi o método de Henson (1971) modificado por Lucisano e Mantovani (1984). O sangue colhido foi centrifugado a 755 x g por 10 minutos e o plasma removido. As células sedimentadas foram suspensas com uma solução de gelatina a 2,5% em solução fisiológica (NaCl 0,9%), na proporção de duas vezes o volume de células, e deixadas em repouso por 15 minutos a 37°C. Posteriormente, o sobrenadante contendo os neutrófilos foi centrifugado a 270 x g por 10 minutos, com finalidade de retirar a gelatina. Para eliminar as hemácias presentes na solução foi utilizado um tratamento com cloreto de amônio 0,83%, pH 7,2 por 5 minutos. Após este período foi realizada a centrifugação a 270 x g por 10 minutos. As células foram depois lavadas com uma solução fisiológica e centrifugadas a 270 x g por 10 minutos. Os neutrófilos foram suspensos em Hank's contendo 0,1% de gelatina de acordo com as concentrações requeridas para cada experimento.

3.5 Obtenção do soro humano para opsonização do zimosan (estímulo)

Os soros foram obtidos a partir do sangue total de voluntários saudáveis, colhido por punção venosa, utilizando-se tubos tipo *vacutainer* sem anti-coagulante. O sangue foi deixado em repouso à temperatura ambiente durante 1 hora para formação e retração do coágulo, sendo posteriormente centrifugado a 480 x g por 10 minutos. O soro obtido foi reunido em um "pool", fracionado e estocado a -70°C.

3.6 Preparo do estímulo (zimosan opsonizado)

Zimosan (ZI) é uma preparação insolúvel em meio aquoso, formada de resíduos de polissacarídeos da parede celular de levedura que, em contato com o soro, ativa o sistema complemento, produzindo partículas revestidas (opsonizadas). Nesta forma, estas partículas são reconhecidas por receptores presentes na membrana dos neutrófilos, facilitando o processo de fagocitose (Woeber; Ingbar, 1973).

Uma suspensão de ZI (2 mg/mL) em solução fisiológica foi mantida em banho fervente durante 30 minutos, sendo depois centrifugada a 270 x g por 5 minutos. Para cada mg de ZI adicionou-se 0,1 mL de soro humano diluído 1:2 em CFD (Tampão Diluente para Fixação de Complemento). Após incubação em banho-maria a 37°C durante 30 minutos obteve-se o zimosan opsonizado (Zlops). A suspensão foi centrifugada a 480 x g por 5 minutos e o sedimento formado foi lavado com solução fisiológica nas mesmas condições. A concentração da suspensão de Zlops foi ajustada, de acordo com a requerida para cada experimento, com solução de Hanks contendo 0,1% de gelatina.

3.7 Ensaios de quimioluminescência (QL)

Para todos os ensaios de QL realizados durante o trabalho de doutorado foram utilizadas duas sondas: luminol e lucigenina, produzindo, respectivamente, a quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) e a quimioluminescência dependente de lucigenina (QLluc).

Nos ensaios de QL, todas as amostras avaliadas (EEBd e compostos isolados, incorporados ou não em lipossomas) foram incubadas juntamente com os neutrófilos e com as sondas (concentração final de $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L). Após incubação de 3 minutos a 37°C, foi adicionado o estímulo Zlops ou a solução de Hanks com gelatina a 0,1% (controle sem estímulo - espontâneo) e, imediatamente a seguir, foram medidas as QLlum ou QLluc em c.p.m. (fótons contados por minuto) durante 15 minutos a 37°C, em luminômetro. Como controle dos experimentos foi medida a produção de QL pelas células utilizando-se o solvente no lugar da amostra.

Através das curvas de QLlum e QLluc em função do tempo foram calculados os valores de área integrada de 0 a 15 minutos. Tais valores foram utilizados para determinar a porcentagem de inibição promovida pelas diferentes concentrações das substâncias em relação aos respectivos controles, através da fórmula:

$$\% \text{ inibição da QL} = 100 - \frac{\text{Área integrada das amostras} \times 100}{\text{Área integrada dos respectivos controles (DMSO 0,1\%)}}$$

Foram realizados ensaios preliminares para determinar as concentrações de cada composto a serem utilizadas, de modo que fosse possível calcular os CI_{50} (concentração da amostra capaz de inibir 50% da QL), que foram calculados através da utilização de regressão não linear. As diferentes amostras foram testadas em, no mínimo, cinco diferentes concentrações, sendo pelo menos dois valores acima e dois valores abaixo dos CI_{50} . Os valores de CI_{50} foram expressos como médias \pm desvio padrão e foram utilizados como parâmetro para comparação da atividade antioxidante entre as diferentes amostras (**Figura 5**).

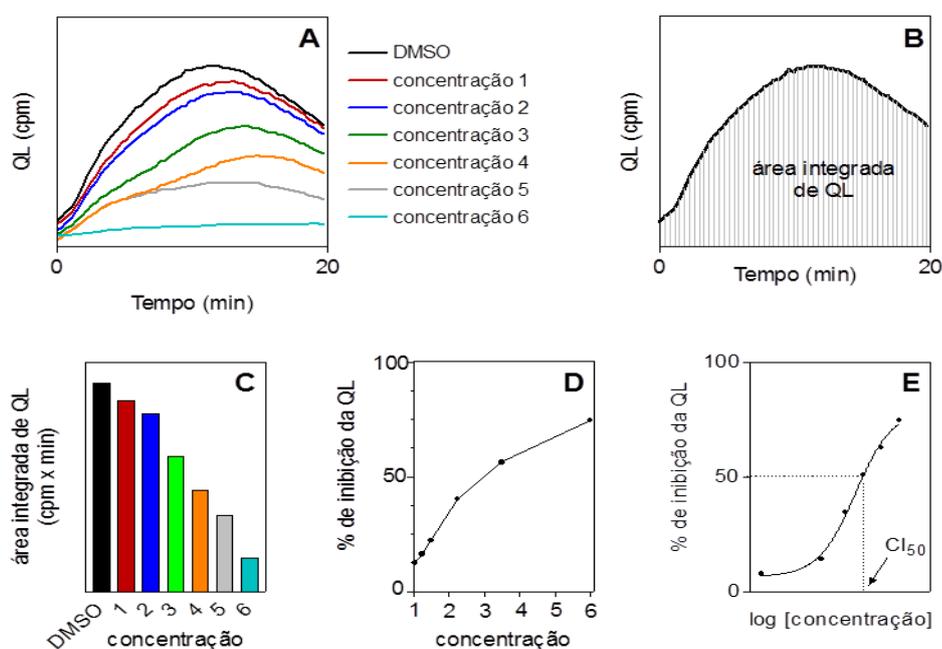


Figura 5: Diferentes etapas do ensaio de quimioluminescência (QL) para o cálculo dos valores de CI_{50} (concentração que inibe 50% da QL produzida pelos neutrófilos). A: Perfil representativo da QL produzida pelo controle (neutrófilos incubados com DMSO 0,1%) e pelas amostras (neutrófilos incubados com as diferentes concentrações das amostras). B: Representação do cálculo da área integrada de QL para o controle e para cada amostra. C: Gráfico representativo da área integrada de QL do controle e das amostras. D: Gráfico representativo da porcentagem de inibição de cada amostra em relação ao controle. E: Gráfico representativo do cálculo dos valores de CI_{50} de cada amostra através de regressão não linear.

3.8 Extrato Etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia* (EEBd)

Foi utilizado, durante todo o trabalho de doutorado, o EEBd preparado a partir do material vegetal coletado no mês de maio/07. Este extrato foi selecionado devido à sua maior atividade antioxidante em ensaios de quimioluminescência realizados durante um estudo prévio de sazonalidade (Figueiredo, 2010; Figueiredo-Rinhel et al., 2013). Antes de iniciar os estudos deste trabalho, verificou-se que o EEBd manteve tanto o perfil químico quanto a atividade biológica do EEBd utilizado nos estudos prévios (Apêndice A).

3.8.1 Obtenção e tratamento do material vegetal utilizado no preparo do EEBd

Os materiais vegetais utilizados na preparação do extrato foram as partes aéreas de *Baccharis dracunculifolia*, cujas mudas foram providas do CPQBA-UNICAMP (Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agronômicas). O material vegetal foi coletado no mês de maio de 2007 em uma área de cerrado da cidade de Cajuru – SP. Após coleta, o material foi seco e estabilizado em estufa de ar quente e circulante a 40°C, por 48 horas. Posteriormente, o material vegetal seco e estabilizado foi submetido ao processo de pulverização com uniformização do tamanho de partículas (mesh 46), através da utilização de um moinho de facas. Uma pequena porção do material seco e pulverizado foi empregada no preparo do extrato etanólico de *B. dracunculifolia* (EEBd). O restante foi acondicionado em sacos plásticos, os quais foram vedados, identificados e armazenados em freezer a -20°C (condições que protegem os componentes do material vegetal da degradação, segundo estudos realizados no laboratório de farmacognosia). Todo o material vegetal foi fornecido pelo Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos da FCFRP-USP.

3.8.2 Preparo do Extrato Etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia* (EEBd)

Foram utilizados 5 g do material vegetal seco e pulverizado, os quais foram transferidos para frascos tipo Erlenmeyer, com posterior adição de 100 mL de solução Etanol:Água na proporção de 9:1. As amostras foram mantidas em agitador mecânico do tipo “shaker” a 27°C, por 2 horas a 145 r.p.m. Após este período, o material foi filtrado em papel de filtro e, para uma melhor eficiência de extração das substâncias presentes na amostra, o material vegetal retido no filtro (torta) foi submetido a uma

nova extração nas mesmas condições anteriores (100 mL do solvente hidroalcoólico, agitação a 27°C por 2 horas a 145 r.p.m., filtração em papel de filtro). Os filtrados referentes às duas extrações foram reunidos e o volume total do filtrado foi concentrado em evaporador rotativo (banho a 55°C), submetido a ultrassom (para recuperação de todo sólido aderido na parede da vidraria), transferido para um pequeno frasco, previamente pesado e identificado e colocado em uma estufa de ar circulante a 50°C durante 5 dias, para secagem dos extratos. Após completa secagem do extrato, foi obtida a massa do resíduo sólido total, denominada de EEBd, que foi utilizado para a realização dos ensaios propostos. O referido extrato seco foi mantido em frasco tampado, protegido da luz e sob refrigeração (4°C).

Para avaliação das atividades biológicas, os EEBd secos foram solubilizados em DMSO ou Etanol:Água (9:1) em diferentes concentrações, sendo estas soluções estocadas por, no máximo, 1 semana. No dia do experimento, estas soluções sofreram uma diluição de 100 vezes em tampão Hanks com gelatina a 0,1% para reduzir a quantidade de solvente no meio, uma vez que, para os ensaios biológicos, altas concentrações dos solventes (DMSO ou etanol) podem interferir nas metodologias ou podem causar toxicidade às células (Kahler, 2000). As soluções diluídas em tampão foram utilizadas nos ensaios de forma que as concentrações finais dos EEBd variaram de 1,0 a 100 µg/mL e as concentrações finais dos solventes foram de 0,1% para o DMSO e 0,05% para o etanol. De acordo com estudos prévios, as concentrações utilizadas neste estudo não são tóxicas para as células (Figueiredo-Rinhel et al., 2013).

3.9 Efeito do EEBd sobre a fagocitose de neutrófilos: avaliação da capacidade fagocítica e do índice fagocítico

O ensaio de fagocitose foi realizado com a finalidade de averiguar se o EEBd possui alguma ação sobre a capacidade das células de reconhecer e fagocitar micro-organismos presentes no meio. Para isso, foram examinadas duas diferentes concentrações do referido extrato (50 e 10 µg/mL) representando, respectivamente, a maior concentração e a concentração próxima ao CI_{50} nos ensaios de quimioluminescência.

Alíquotas de neutrófilos (1×10^6 células/mL) foram adicionadas em tubos tipo *ependorf* juntamente com solução de Hanks (controle positivo), ou DMSO a 0,1% (controle do solvente) ou com as diferentes concentrações de EEBd (amostras).

Como controle negativo foi utilizado 20 μ M de citocalasina B, uma vez que esta substância é um inibidor da polimerização da actina e sua utilização impede a realização da fagocitose pelas células. Após incubação a 37°C durante 15 minutos, foram adicionadas partículas de zimosan opsonizado – Zlops (1 mg/mL), as quais são reconhecidas por receptores presentes nas membranas dos neutrófilos, iniciando o processo de fagocitose em um volume final de 500 μ L. Os tubos foram transferidos para um agitador automático tipo “shaker”, onde permaneceram durante 1 hora a 37°C e 133 r.p.m. Posteriormente, os tubos foram colocados em banho de gelo durante 5 minutos (para interromper o processo de fagocitose) e alíquotas de 50 μ L de cada tubo foram adicionadas sobre lamínulas previamente tratadas com fixador tecidual (BioBond®). Depois de permanecerem em repouso durante 20 minutos, a temperatura ambiente, as lamínulas foram coradas com corante Panótico, fixadas em lâminas e levadas ao microscópio óptico para contagem do número de fagócitos ativos e do número total de partículas de Zlops no interior dos neutrófilos. Através desses dados foram calculados os valores de Capacidade Fagocítica (CF) e Índice Fagocítico (IF) segundo metodologia descrita por Silva e colaboradores (2012) e por França e colaboradores (2008), conforme as fórmulas:

$$\% \text{ CF} = (\text{número de neutrófilos fagocitando} / \text{total de neutrófilos contados}) \times 100$$

$$\text{IF} = \text{total de partículas de Zlops fagocitadas} / \text{número de neutrófilos fagocitando.}$$

Para análise dos resultados empregou-se o software GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software, Inc.). O efeito do EEBd sobre a fagocitose dos neutrófilos foi avaliado em três experimentos independentes com medidas em duplicata.

3.10 Efeito do EEBd sobre a desgranulação: atividade das enzimas elastase e lisozima

3.10.1 Enzima elastase

Descrito por Johansson e colaboradores (2002) e modificado por Kanashiro e colaboradores (2009), este ensaio avalia a atividade catalítica da enzima elastase, dos neutrófilos presentes, no meio extracelular. Tal enzima está presente nos

grânulos azurófilos dos neutrófilos e é liberada durante o processo de desgranulação, após a estimulação celular.

Para avaliar a quantidade de elastase liberada foi utilizado o substrato incolor succinil-Ala-Ala-Val-p-nitroanilida (SAAVNA) que na presença desta enzima é degradado no produto de coloração amarela, p-nitroanilina (p-NA), o qual passa a ser quantificado espectrofotometricamente a 405 nm. A utilização deste substrato permitiu a avaliação do efeito do EEBd sobre a atividade da elastase em ensaios com células (item 3.10.1-1), e em ensaios com a enzima previamente isolada (item 3.10.1-2). Foram realizados ensaios preliminares para determinar as concentrações do EEBd a serem utilizadas, de modo que fosse possível calcular os valores de CI_{50} .

3.10.1-1 Atividade da elastase liberada de neutrófilos após incubação com EEBd

Para verificar se o EEBd possuía algum efeito sobre o processo de liberação da elastase dos grânulos dos neutrófilos, foram realizados os ensaios de desgranulação com diferentes concentrações do EEBd (5, 10, 20, 25, 35 e 50 $\mu\text{g/mL}$).

Alíquotas da suspensão de neutrófilos (1×10^6 células/mL) foram adicionadas em microplaca de 96 poços, juntamente com 1 μM de citocalasina B e as diferentes concentrações do EEBd (amostras) ou DMSO a 0,1% (controle positivo). Após incubação a 37°C durante 10 minutos, foi adicionado 1 μM do estímulo fMLP aos poços e a microplaca foi deixada em repouso durante 30 minutos a 37°C para que ocorresse a desgranulação em um volume final de 100 μL . O substrato SAAVNA (1 mM) foi adicionado ao meio e, imediatamente após a adição (tempo zero), foi realizada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 405 nm. O sistema foi mantido a 37°C e novas leituras foram realizadas a cada 10 minutos durante 30 minutos para verificar a formação de p-NA durante este período. Como controle negativo, foi medida a liberação espontânea da enzima, quantificando a degradação do substrato por 1×10^6 células apenas na presença do meio.

Para corrigir possíveis interferências do extrato nas leituras a 405 nm, foram feitos “brancos” contendo os extratos nas diferentes concentrações juntamente com os demais compostos da reação exceto o substrato SAAVNA, o qual foi substituído pelo seu solvente (DMSO a 0,28% em Hanks). Os valores de absorvância obtido nestes poços foram subtraídos dos valores de absorvância das respectivas amostras.

O efeito do EEBd sobre a liberação da enzima elastase foi averiguado em quatro experimentos diferentes, realizados em quadruplicada. Para análise dos resultados empregou-se o software GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software, Inc.).

3.10.1-2 Efeito do EEBd sobre a atividade da enzima elastase previamente liberada

Este ensaio foi realizado com o intuito de verificar se o extrato possuía alguma ação sobre a atividade catalítica da enzima elastase liberada no meio extracelular. Para isso, a desgranulação dos neutrófilos foi promovida colocando-se, em um tubo, os neutrófilos (1×10^6 células/mL) juntamente com $1 \mu\text{M}$ de citocalasina B e, após incubação de 10 minutos a 37°C , adicionou-se $1 \mu\text{M}$ do estímulo fMLP. O volume final da reação foi de 4 mL. Simultaneamente, foi feito o controle negativo contendo apenas células e tampão. Após incubação a 37°C durante 30 minutos para a efetivação da desgranulação, a enzima elastase foi separada através de centrifugação a $755 \times g$ por 10 minutos e recolhimento do sobrenadante para a utilização nos ensaios.

Alíquotas do sobrenadante foram adicionadas em microplaca de 96 poços juntamente com diferentes concentrações de EEBd (10, 20, 35, 50, 70 e $100 \mu\text{g/mL}$), ou DMSO a 0,1% (controle positivo). O controle negativo foi realizado com o sobrenadante do tubo contendo as células não estimuladas juntamente com o tampão. O volume de reação utilizado foi de $100 \mu\text{L}$. Finalmente, o substrato SAAVNA (1 mM) foi adicionado e iniciou-se a leitura da absorvância (tempo zero) em leitor de ELISA em comprimento de onda de 405 nm. A microplaca foi mantida a 37°C e foram realizadas outras leituras a 405 nm a cada 10 minutos durante 30 minutos para quantificar a produção de p-NA durante esse período. Da mesma forma que no ensaio com células (item 3.10.1-1) as possíveis interferências das amostras na absorvância a 405 nm foram corrigidas com a utilização de “brancos” contendo os extratos nas diferentes concentrações e o sobrenadante das células na ausência do substrato SAAVNA, o qual foi substituído pelo seu solvente (DMSO a 0,28 % em Hanks). Os valores de absorvância obtido nestes poços foram subtraídos dos valores de absorvância das respectivas amostras.

O efeito do EEBd sobre a atividade da enzima elastase foi verificado em quatro experimentos diferentes, realizados em quadruplicada. Para análise dos resultados empregou-se o software GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software, Inc.).

3.10.2 Enzima lisozima

O método clássico para avaliar o processo de desgranulação e a atividade catalítica da enzima lisozima dos neutrófilos é baseado na habilidade que esta enzima possui de causar lise em uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus*, reduzindo a densidade óptica (D.O.) do meio (Smolelis; Hartsell, 1949).

Para determinar a quantidade de lisozima liberada pelos neutrófilos nos ensaios, foi realizada uma curva padrão de lisozima (Sigma-Aldrich L 6876) (Apêndice B). Após a confecção da curva padrão, foi realizada uma curva com diferentes concentrações de células e de estímulo (Zlops) para determinar as melhores condições de liberação da lisozima no meio, ficando definidas as concentrações de 2×10^6 células/mL e de 0,5 mg/mL de Zlops (Apêndice B). Além disso, foi confeccionada uma curva com diferentes concentrações do solvente (DMSO) para avaliar se o solvente utilizado nos EEBd poderia interferir nesta metodologia e foi observado que concentrações do solvente abaixo de 0,5% não interferiram na metodologia. Desta forma, as amostras foram diluídas de modo que a concentração final do solvente no meio fosse de 0,1% (Apêndice B). Depois de definidas as condições experimentais, foi avaliada a atividade da enzima lisozima liberada pelos neutrófilos após incubação com EEBd (item 3.10.2-1) e o efeito do EEBd sobre a atividade da enzima isolada (item 3.10.2-2). Foram realizados ensaios preliminares para determinar as concentrações do EEBd a serem utilizadas, de modo que fosse possível calcular os valores de CI_{50} .

3.10.2-1 Atividade da lisozima liberada de neutrófilos após incubação com EEBd

Este ensaio teve o intuito de verificar se diferentes concentrações do EEBd possuíam algum efeito sobre a liberação da lisozima no meio extracelular. Para isso, alíquotas de neutrófilos (2×10^6 células/mL) foram incubados com diferentes concentrações do EEBd (10, 25, 50, 75 e 100 µg/mL) e estimuladas com Zlops (0,5 mg/mL) durante 45 minutos a 37°C. Como controle positivo do ensaio foi utilizado o tampão Hanks com gelatina a 0,1% e como controle do solvente foi utilizado o DMSO 0,1% no lugar das amostras. Como controle espontâneo as células foram avaliadas na ausência do estímulo. Os tubos foram centrifugados a 755 x g durante 10 min a 4°C e os sobrenadantes foram mantidos em banho de gelo para em seguida serem testados quanto à capacidade de reduzir a D.O. da suspensão de *M. lysodeikticus*. Para isso,

os sobrenadantes foram misturados volume a volume com uma suspensão de *M. lysodeikticus* (Sigma-Aldrich M 3770) 0,40 mg/mL em tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,0. Foi verificada uma D.O. inicial da reação entre 0,6 e 0,8 em 450 nm e a redução desta D.O. foi acompanhada durante 15 minutos a 37°C. A atividade da enzima foi avaliada através da diferença entre as D.O. iniciais e finais.

Através dos resultados obtidos foi possível a determinação da porcentagem de inibição da atividade da lisozima liberada, a qual foi calculada em relação ao controle do solvente (DMSO 0,1% no lugar da amostra, e que representa 100% de liberação da enzima), segundo a equação:

$$(\%) \text{ inibição} = 100 - \frac{\text{redução da D.O. pela amostra de EEBd durante 15 minutos} \times 100}{\text{redução da D.O. pelo controle do solvente durante 15 minutos}}$$

Os valores de porcentagem de inibição obtidos para cada concentração do EEBd foram utilizados para a determinação do valor de $CI_{50}^{\text{lisozima liberada}}$ (concentração do EEBd capaz de inibir em 50% a atividade da enzima lisozima liberada pelos neutrófilos), o qual foi calculado através da utilização de regressão não linear. O valor de CI_{50} foi expresso como média \pm desvio padrão.

O efeito do EEBd sobre a atividade da enzima lisozima liberada pelos neutrófilos foi testado em oito experimentos diferentes realizados em duplicada e para a análise dos resultados empregou-se o software GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software, Inc.).

3.10.2-2 Efeito do EEBd sobre a atividade da enzima lisozima padrão

Este ensaio foi realizado com o intuito de verificar se o EEBd possuía alguma ação sobre a atividade catalítica da enzima lisozima isolada.

Para realização destes ensaios foi utilizada a enzima lisozima padrão em concentrações próximas às liberadas pelos neutrófilos na ausência do extrato (1400 $\mu\text{g/mL}$). Então, diferentes concentrações do EEBd (10, 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g/mL}$) foram adicionadas à lisozima padrão. Como controle positivo do ensaio foi utilizado o tampão Hanks contendo gelatina a 0,1% e como controle do solvente foi utilizado DMSO 0,1% no lugar dos EEBd. As amostras foram então misturadas, volume a volume, com uma suspensão de *M. lysodeikticus* a 0,40 mg/mL para avaliação da redução a D.O. desta suspensão, como já descrito anteriormente. A atividade da enzima foi avaliada através da diferença entre as D.O. iniciais e finais. Através destes resultados foi possível determinar a porcentagem de inibição da atividade

catalítica da lisozima, a qual foi calculada em relação ao controle do solvente (DMSO 0,1% no lugar da amostra, e que representa 100% de atividade da enzima), segundo a equação:

$$(\%) \text{ inibição} = 100 - \frac{\text{redução da D.O. pela amostra de EEBd durante 15 minutos} \times 100}{\text{redução da D.O. pelo controle do solvente durante 15 minutos}}$$

Os valores de porcentagem de inibição obtidos para cada concentração do EEBd foram utilizados para a determinação do valor de $CI_{50}^{\text{lisozima isolada}}$ (concentração do EEBd capaz de inibir em 50% a atividade da enzima lisozima isolada), o qual foi calculado através da utilização de regressão não linear e expresso como média \pm desvio padrão.

O efeito do EEBd sobre a atividade da enzima lisozima isolada foi averiguado em oito experimentos diferentes, realizados em duplicada e para a análise dos resultados empregou-se o software GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software, Inc.).

3.11 Efeito do EEBd sobre a atividade da enzima mieloperoxidase e seus produtos

Este ensaio visou determinar se a atividade antioxidante do extrato está relacionada com a inibição da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), enzima chave do metabolismo oxidativo dos neutrófilos.

A avaliação da atividade da MPO foi realizada através da quantificação do produto (HOCl) formado pela interação da mieloperoxidase com o seu substrato, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2).



O princípio deste método consiste na rápida interação do HOCl (molécula instável) com a taurina em excesso presente no meio reacional, formando a taurina cloramina (taurina-Cl). A taurina-Cl, por sua vez, é capaz de oxidar o reagente tetrametilbenzidina (TMB), permitindo sua quantificação através de leitura espectrofotométrica em 630 nm.



Para avaliar a atividade da MPO dos neutrófilos, primeiramente foi feita uma curva com diferentes concentrações de células e de estímulo (Zlops), a fim de se determinar a melhor condição experimental, ficando definidas as concentrações de 4×10^6 células/mL e 2 mg/mL do estímulo Zlops (Apêndice C). Além disso, ensaios preliminares revelaram que o DMSO causava interferências na metodologia (Kabeya et al., 2013). Então, o EEBd foi solubilizado em etanol e foram realizados ensaios adicionais para verificar se diferentes concentrações deste solvente também poderiam interferir na metodologia, verificando-se que as concentrações de etanol abaixo de 0,1% não interferiram no método. Desta forma, as amostras foram solubilizadas em etanol de forma que a concentração final do solvente na reação fosse de 0,05% (Apêndice C). Depois de definidas as condições experimentais, foi avaliado o efeito do EEBd sobre a atividade da enzima mieloperoxidase dos neutrófilos (item 3.11.1), e o efeito do EEBd sobre a atividade “scavenger” de HOCl e de Taurina-Cl (item 3.11.2). Também foram realizados ensaios preliminares para determinar as concentrações do EEBd a serem utilizadas, de modo que fosse possível calcular os valores de CI_{50} .

3.11.1 Efeito do EEBd sobre a atividade da enzima mieloperoxidase: avaliação da produção de HOCl pelos neutrófilos

Os ensaios foram realizados com a incubação das células (4×10^6 células/mL) juntamente com diferentes concentrações do EEBd (concentrações finais de 10 / 20 / 35 / 50 e 75 $\mu\text{g/mL}$) em meio contendo Hanks com taurina (5 mM). A reação foi iniciada com a adição do estímulo Zlops (2 mg/mL) em um volume final de 500 μL . As amostras foram incubadas durante 30 min a 37°C e, posteriormente, foi adicionada catalase (40 $\mu\text{g/mL}$) para interromper a reação. Os tubos foram centrifugados $10620 \times g$ durante 5 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram separados e mantidos em banho de gelo. A quantificação da reação foi realizada adicionando-se em placa de 96 poços o sobrenadante da reação juntamente com a solução reveladora contendo TMB (2 mM) e, após 5 minutos, foi realizada a leitura da absorvância em 630 nm.

Como controles deste ensaio foram utilizados: o solvente do EEBd (etanol 0,05%) no lugar da amostra (controle positivo), a adição de Hanks com gelatina a 0,1% e catalase no lugar da amostra (controle negativo) e a adição somente do tampão Hanks com gelatina a 0,1% no lugar da amostra (espontâneo). Também foi

preparado um branco (contendo apenas o tampão e o TMB), sendo que os valores de absorvância referentes ao branco foram subtraídos dos valores das demais amostras.

Com os valores de absorvância (630 nm) referentes à oxidação do TMB de cada amostra foram calculadas as porcentagens de inibição em relação ao controle positivo (100% de oxidação do TMB). Os cálculos foram realizados da seguinte forma:

$$\% \text{ inibição da oxidação TMB} = 100 - \frac{\text{Abs amostra} \times 100}{\text{Abs controle positivo}}$$

O EEBd foi testado em cinco diferentes concentrações para a determinação do valor de CI_{50}^{MPO} (concentração que inibe em 50% a produção do HOCl pela MPO), o qual foi calculado através da utilização de regressão não linear. O valor de CI_{50}^{MPO} foi expresso como média \pm desvio padrão e foi utilizado para avaliar a magnitude da inibição desta enzima pelo EEBd.

O efeito do EEBd sobre a atividade da MPO dos neutrófilos foi avaliado em seis experimentos independentes, com medidas em quadruplicata. Para análise dos resultados empregou-se o software GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software, Inc.).

3.11.2 Avaliação da atividade “scavenger” do EEBd sobre HOCl e Taurina-Cl

Para verificar se o EEBd possuía a atividade “scavenger” sobre HOCl e taurina-Cl o extrato foi incubado juntamente com concentração conhecida de HOCl (presente em água sanitária comercial) ou com taurina-Cl (obtida com a incubação prévia de HOCl e taurina), com posterior verificação da alteração da concentração desses compostos presentes no meio (através do método de oxidação do TMB).

Após a quantificação do HOCl na água sanitária comercial e confecção de curva padrão da oxidação do TMB por diferentes concentrações de HOCl, foi selecionada a concentração de HOCl de 50 μ M para ser utilizada nos ensaios de avaliação da atividade “scavenger” do EEBd sobre o HOCl e sobre a taurina-Cl (Apêndice C).

3.11.2-1 HOCl

Para avaliar se o EEBd possuía atividade “scavenger” sobre o HOCl, adicionou-se em placas de 96 poços: HOCl (50 μ M), juntamente com diferentes concentrações do EEBd (1,0 / 2,0 / 3,5 / 5,0 / 7,5 / e 10 μ g/mL), as quais foram

previamente selecionadas para permitir o cálculo do CI_{50} . Como controle positivo do experimento foi adicionado o solvente do extrato (etanol 0,05%) no lugar da amostra. Para a confecção do branco nesta etapa foi adicionado apenas o tampão PBS.

Após incubação por 10 minutos em temperatura ambiente (tempo para o EEBd interagir com o HOCl presente no meio), foi adicionado em todos os tubos solução de PBS contendo taurina (5 mM), seguido de incubação por mais 10 minutos em temperatura ambiente. Nesta etapa, o HOCl residual (que não interagiu com o EEBd) reage com a taurina, formando a taurina-Cl. Em seguida, foi adicionado o revelador contendo TMB, o qual é oxidado pela taurina-Cl e após 5 minutos foi realizada a leitura espectrofotométrica em 630 nm. O valor de absorvância obtido pelo branco foi subtraído dos valores das demais amostras.

Com os valores de absorvância referentes à oxidação do TMB de cada amostra foram calculadas as porcentagens de inibição da oxidação do TMB em relação ao controle positivo (100% de oxidação do TMB). Os cálculos foram realizados da seguinte forma:

$$\% \text{ inibição da oxidação TMB} = 100 - \frac{\text{Abs amostra} \times 100}{\text{Abs controle positivo}}$$

O EEBd foi testado em seis diferentes concentrações para a determinação do valor de CI_{50}^{HOCl} (concentração que reduz em 50% o HOCl presente no meio), o qual foi calculado através da utilização de regressão não linear. O valor de CI_{50}^{HOCl} foi expresso como média \pm desvio padrão e foi utilizado para avaliar a intensidade da atividade “scavenger” do EEBd em relação ao HOCl.

O efeito do EEBd sobre a atividade “scavenger” de HOCl foi avaliado em quatro experimentos independentes, com medidas em quadruplicata. Para análise dos resultados empregou-se o software GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software, Inc.).

3.11.2-2 Taurina-Cl

Para avaliar se o EEBd possuía atividade “scavenger” sobre a taurina-Cl, adicionou-se em placas de 96 poços: HOCl (50 μM), juntamente com tampão PBS contendo 5 mM de taurina, os quais foram incubados em temperatura ambiente durante 10 minutos para que todo HOCl reagisse com a taurina e produzisse a taurina-Cl. Após incubação foram adicionadas as diferentes concentrações do EEBd (5 / 10 / 20 / 30 / 40 e 50 $\mu\text{g/mL}$), as quais foram previamente selecionadas para permitir o cálculo do CI_{50} .

Como controle positivo e branco foram adicionados, respectivamente, o solvente do extrato (etanol 0,05%) e o tampão PBS no lugar da amostra.

Após incubação por 10 minutos em temperatura ambiente (tempo para o EEBd interagir com a taurina-Cl presente no meio), foi adicionado o revelador contendo TMB, o qual é oxidado pela taurina-Cl residual (que não interagiu com o EEBd) e, após 5 minutos, foi realizada a leitura espectrofotométrica em 630 nm. O valor de absorvância obtido pelo branco foi subtraído dos valores das demais amostras.

Com os valores de absorvância referentes à oxidação do TMB de cada amostra foram calculadas as porcentagens de inibição da oxidação do TMB em relação ao controle positivo (100% de oxidação do TMB). Os cálculos foram realizados da seguinte forma:

$$\% \text{ inibição da oxidação TMB} = 100 - \frac{\text{Abs amostra} \times 100}{\text{Abs controle positivo}}$$

O EEBd foi testado em seis diferentes concentrações para a determinação do valor de $CI_{50}^{\text{tau-Cl}}$ (concentração que reduz em 50% a taurina-Cl presente no meio), o qual foi calculado através da utilização de regressão não linear. O valor de $CI_{50}^{\text{tau-Cl}}$ foi expresso como média \pm desvio padrão e foi utilizado para avaliar a intensidade da atividade “scavenger” do EEBd sobre a taurina-Cl.

O efeito do EEBd sobre a atividade “scavenger” da taurina-Cl foi avaliado em quatro experimentos independentes, com medidas em quadruplicata. Para análise dos resultados empregou-se o software GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software, Inc.).

3.12 Efeito do EEBd sobre a atividade microbicida dos neutrófilos

O ensaio da atividade microbicida foi realizado para averiguar se o EEBd interferia na capacidade das células de destruir os micro-organismos fagocitados. Para isso, em tubos contendo suspensões de neutrófilos (1×10^6 células/mL) foram adicionados: diferentes concentrações de EEBd (10 e 50 $\mu\text{g/mL}$, sendo a primeira referente à concentração próxima da CI_{50}^{QL} e a última referente à maior concentração do extrato obtidas nos ensaios de QL); o solvente das amostras (DMSO a 0,1%); o tampão Hanks contendo gelatina a 0,1% (controle) ou DPI (inibidor do complexo enzimático da NADPH oxidase) (1 μM). Após incubação a 37°C durante 15 minutos, foi adicionada uma suspensão de *Candida albicans* (ATCC 64548) na concentração final de $0,6 \times 10^6$ ufc/mL

e as células foram transferidas para agitador mecânico tipo “shaker” a 37°C durante 2 horas para a realização da fagocitose e destruição do patógeno. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 3220 x g durante 5 minutos e o sedimento lavado com tampão PBS nas mesmas condições. Os neutrófilos foram lisados com Triton X-100 a 1% e a levedura foi lavada duas vezes com NaCl a 0,9% (centrifugação a 3220 x g durante 5 minutos). Ao sedimento foi adicionado solução de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil) tetrazólio] (0,5 mg/mL em tampão de RPMI) e, a seguir, foi colocado em incubação a 37°C durante 4 horas ao abrigo da luz. As leveduras viáveis são capazes de reduzir o MTT, formando o metabólito insolúvel formazan, o qual possui coloração roxa e precipita no interior das células. Desta forma, a viabilidade da *C. albicans* pode ser considerada proporcional à leitura de absorvância das amostras a 545 nm. Os tubos foram centrifugados (3220 x g durante 5 minutos), o formazan contido no sedimento foi solubilizado em DMSO e uma alíquota de 100 µL foi adicionada em placa de 96 poços onde foi realizada e leitura da absorvância em 545 nm. Como controles do experimento, suspensões de *C. albicans* ($0,6 \times 10^6$ ufc/mL) foram incubadas com tampão Hanks contendo gelatina a 0,1% (controle positivo) e com as diferentes concentrações do EEbD (10 e 50 µg/mL) na ausência de neutrófilos. Como branco, uma solução de MTT (0,5 mg/mL em tampão de RPMI) foi incubada a 37°C durante 4 horas ao abrigo da luz. Após centrifugação (3220 x g durante 5 minutos), foi adicionado DMSO e uma alíquota de 100 µL foi transferida para placa de 96 poços onde foi realizada a leitura da absorvância em 545 nm. A absorvância referente ao branco foi subtraída das demais amostras. Com os valores de absorvância (545 nm) de cada amostra, foram calculadas as porcentagens de morte de *C. albicans* em relação ao controle positivo (100% de viabilidade) de cada experimento. Os cálculos foram realizados da seguinte forma:

$$\% \text{ morte } C. \text{ albicans} = 100 - \frac{\text{Abs amostra} \times 100}{\text{Abs controle positivo}}$$

O efeito do EEbD sobre a atividade microbicida dos neutrófilos foi avaliado em cinco experimentos independentes com medidas em duplicata. Para análise dos resultados empregou-se o software GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software, Inc.).

3.13 Obtenção de compostos isolados de *Baccharis dracunculifolia* e avaliação de suas atividades antioxidantes

3.13.1 Obtenção de compostos isolados de *Baccharis dracunculifolia*

A obtenção de alguns compostos conhecidamente presentes no extrato da *B. dracunculifolia* foi realizada em colaboração com o laboratório de farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP). Alguns compostos fenilpropanoides foram adquiridos comercialmente e fornecidos pelo prof. Dr. Fernando Batista Costa, são eles: ácidos cafeico, cumárico ferúlico e cinâmico; enquanto os flavonoides aromadendrina-4'-metil éter (AME), isosacuranetina e hispidulina foram isolados do próprio Extrato de *Baccharis dracunculifolia* no laboratório de farmacognosia da FCFRP-USP pela doutoranda Cristiane Teixeira Vilhena Bernardes, através de metodologia desenvolvida pela própria aluna. O isolamento dos flavonoides foi realizado por meio da associação de diversos métodos cromatográficos. Os compostos isolados e purificados foram submetidos a procedimentos que confirmaram a identificação dos flavonoides. Os cálculos de pureza apontaram que todos os compostos foram isolados com pureza acima de 95%, permitindo o uso destes nos ensaios biológicos com os neutrófilos estimulados (Bernardes et al., 2012).

3.13.2 Avaliação da atividade antioxidante de algumas substâncias presentes no extrato de *Baccharis dracunculifolia* através de ensaios de quimioluminescência (QL)

A atividade antioxidante das substâncias isoladas frente aos neutrófilos estimulados foi avaliada através de ensaios de quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) e de lucigenina (QLluc). Para isso, diferentes concentrações de cada composto foram incubadas com os neutrófilos nas mesmas condições dos ensaios de QL realizados para o EEBd (Figueiredo-Rinhel et al., 2013). Tanto para os ensaios de QLlum quanto para os de QLluc, foram realizados ensaios preliminares para determinar as concentrações de cada composto a serem utilizadas, de modo que fosse possível calcular os CI_{50} (concentração de cada composto que inibe em 50% a produção da QL pelos neutrófilos).

Para a realização dos ensaios de QL, aos tubos de reação foram adicionados: a suspensão de neutrófilos ($1,0 \times 10^6$ células/mL), as amostras de ácido cafeico (5/ 10/

50/ 100/ 250 e 500 μM), ácido ferúlico, ácido cumárico (10/ 50/ 100/ 250/ 500 e 1000 μM), ácido cinâmico (300/ 600/ 900/ 1200 e 1500 μM), AME (0,5/ 1,0/ 2,5/ 5,0/ 10/ 30/ 50 e 100 μM), isosacuranetina (0,5/ 1,0/ 2,5/ 5,0/ 10/ 50 e 1000 μM) ou hispidulina (0,5/ 1,0/ 2,5/ 5,0/ 10/ 30 e 50 μM) e as sondas luminol ou lucigenina ($1,0 \times 10^{-4}$ mol/L). Após incubação de 3 minutos a 37°C , foi adicionado o estímulo Zlops (1 mg/mL) ou a solução de Hanks com gelatina a 0,1% (controle sem estímulo - espontâneo) e, imediatamente a seguir, foram medidas as QLLum ou QLluc como já descrito anteriormente. Os valores entre parênteses representam as concentrações finais dos compostos no meio reacional. Como controle positivo do ensaio (100% de formação das espécies reativas de oxigênio - ERO) foi utilizado o solvente (DMSO 0,1%) no lugar das amostras.

A atividade antioxidante dos compostos foi avaliada em sete experimentos independentes, com medidas em duplicata. Para análise dos resultados empregou-se o software GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software, Inc.).

3.14 Incorporação do EEBd e do ácido cafeico em vesículas lipossômicas e avaliação de suas atividades antioxidantes sobre os neutrófilos

Uma vez constatado que o ácido cafeico possui um grande potencial para ser um bom marcador químico da atividade antioxidante do extrato, esta substância foi escolhida para dar prosseguimento aos estudos.

3.14.1 Preparo e caracterização dos lipossomas contendo EEBd e ácido cafeico

Foram preparadas vesículas lipossômicas unilamelares compostas de fosfatidilcolina de soja e colesterol (PC:CHOL) em proporção de massa de 5:1, uma vez que estudos prévios demonstraram que nestas condições os lipossomas formados são adequados para utilização em meio biológico (Landi-Librandi et al., 2012b). Para tanto, uma solução etanólica dos lipídeos (800 μL de PC e CHOL), contendo DMSO ou as amostras (EEBd na concentração de 6,25 mg/mL ou ácido cafeico na concentração de 98,75 mM), foi injetada de forma controlada (1-3 $\mu\text{L/s}$) em excesso de NaCl a 0,9% (10 mL) em temperatura entre 55 e 59°C sob agitação (Oliveira et al., 2005). Após ultracentrifugação (UC) das vesículas, o material não encapsulado (sobrenadante) foi removido e a eficiência da incorporação foi determinada pela medida da absorvância a 322 nm para o EEBd e a 324 nm para o ácido cafeico (pico de absorvância das

amostras) após rompimento das vesículas com excesso de etanol, de acordo com a fórmula:

$$\text{Eficiência de incorporação (\%)} = \frac{\text{Abs suspensão lipossomas após UC} \times 100}{\text{Abs suspensão lipossomas antes UC}}$$

Após confecção de curva padrão das amostras (Apêndice D), foi possível determinar as concentrações das amostras incorporadas nos lipossomas após a ultracentrifugação. A caracterização físico-química das vesículas foi feita pela determinação do diâmetro e do potencial zeta das partículas utilizando-se medidas de espalhamento de luz (Laser Light Scattering). Foram realizados quatro experimentos independentes, com medidas em duplicata e para a análise dos resultados empregou-se o software GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software, Inc.).

3.14.2 Avaliação da atividade antioxidante dos lipossomas contendo EEBd e ácido cafeico sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos: ensaios de QL

Os ensaios de QL para as amostras incorporadas nos lipossomas foram realizados da mesma maneira que para formas livres. Em síntese: aos tubos adicionou-se a suspensão de neutrófilos ($1,0 \times 10^6$ células/mL), a suspensão de lipossomas contendo EEBd (1,25/ 2,5/ 5/ 10/ 20/ 30 e 40 μM) ou suspensão de lipossomas contendo ácido cafeico (1,0/ 2,5/ 5/ 10/ 25/ 50 e 75 μM) e as sondas luminol ou lucigenina ($1,0 \times 10^{-4}$ mol/L). Após incubação (3 min., 37°C), foi adicionado o Zlops (1 mg/mL) ou a solução de Hanks com gelatina a 0,1% (controle sem estímulo - espontâneo) e medidas as QLlum ou QLluc, como já descrito anteriormente. Como controle foi medida a QL utilizando-se lipossomas contendo apenas o solvente (DMSO) no lugar da amostra. Os valores entre parênteses representam as concentrações finais dos compostos.

Os valores de CI_{50} , das amostras incorporadas nos lipossomas, foram expressos como médias \pm desvio padrão e foram comparados aos valores de CI_{50} das amostras na forma livre, a fim de avaliar se a incorporação nas vesículas lipossômicas altera de alguma forma a atividade antioxidante do EEBd e do ácido cafeico. Para cada amostra, foram realizados seis experimentos independentes, com medidas em duplicata e para a análise dos resultados empregou-se o software GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software, Inc.).

3.15 Efeito terapêutico do EEBd e do ácido cafeico em modelo animal de artrite

Para verificar se os efeitos antioxidantes do EEBd e do ácido cafeico (tanto na forma livre como incorporados nos lipossomas), observados nos ensaios celulares com neutrófilos ativados, podem apresentar algum efeito benéfico para o processo inflamatório desenvolvido no quadro da artrite reumatoide, foram realizados os ensaios para avaliar o efeito destes compostos em modelo animal de artrite.

Para isso, foram utilizados ratos Wistar machos de aproximadamente 180 a 220g fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos no biotério da FCFRP à temperatura de aproximadamente 25°C, ciclo claro/escuro 12/12 horas, com alimento e hidratação *ad libitum* até o momento do processo experimental, em que foram privados apenas de alimento. Foram seguidas todas as normas estabelecidas e o trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Anexo C).

A indução local da artrite foi realizada através de metodologia originalmente descrita por Keystone (1977), na qual se utiliza injeção intra-articular de zimosan (ZI) para induzir intensa reação inflamatória na articulação do joelho dos ratos. A metodologia utilizada neste trabalho foi adaptada de Kanashiro e colaboradores (2009).

Após padronização da concentração de ZI para a indução da artrite e do tempo de tratamento dos animais (Apêndice E), ficou estabelecido que a artrite seria induzida com 300 µg de ZI por articulação e que o tratamento dos animais seria realizado 1h antes da indução da artrite.

Os animais receberam, através de injeção intraperitoneal, os tratamentos com as amostras ou controles e após 1h houve a indução da artrite. Para isso, os animais foram anestesiados e 300 µg de ZI foi aplicado em cada articulação. Depois de decorrido o período de 6 horas da indução da artrite os animais foram eutanasiados, o líquido sinovial foi coletado e os parâmetros inflamatórios foram avaliados. Os parâmetros inflamatórios utilizados foram: o edema das articulações (através da medida do diâmetro transversal da articulação antes do processo ser realizado e depois de decorrido o tempo de 6 horas da indução da artrite), as células inflamatórias presentes no lavado sinovial (através da contagem, em câmara de Neubauer, do número de neutrófilos e de células totais) e a quantidade de citocinas inflamatórias presentes no lavado sinovial (TNF- α , IL-6 e IL-1 β), através da utilização de kits de ELISA.

3.15.1 Efeito do EEBd e do ácido cafeico sobre o modelo animal de artrite

As doses de 50 e de 100 mg/Kg de EEBd (n= 7 e n= 5, respectivamente) e a dose de 50 mg/Kg de ácido cafeico (n= 7) foram injetadas no peritônio dos animais 1 hora antes da indução da artrite. Como controles do ensaio foram utilizados grupos tratados apenas com o solvente das amostras (DMSO, n= 7) e com a droga padrão (dexametasona 4 mg/Kg, n= 5). Após o período de 6 horas os animais foram eutanasiados e os parâmetros inflamatórios foram avaliados. Para a análise dos resultados empregou-se o software GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software, Inc.).

3.15.2 Efeito do EEBd e do ácido cafeico incorporados em lipossomas sobre o modelo animal de artrite

Também foram avaliados os efeitos do EEBd e do ácido cafeico incorporados nos lipossomas no modelo animal de artrite. A dose 9,0 mg/Kg de EEBd e de 3,0 mg/Kg de ácido cafeico (quantidades máximas dos compostos incorporados nos lipossomas) foram injetadas nos animais (n= 12 para o EEBd e n= 11 para o ácido cafeico) 1 hora antes da indução da artrite. Como controles do ensaio foram utilizados grupos tratados apenas com o meio dos lipossomas (salina, n= 10), com lipossomas contendo apenas o solvente das amostras (DMSO, n= 14) e com lipossomas contendo quercetina (1,5 mg/Kg, n= 10). Após o período de 6 horas os animais foram eutanasiados e os parâmetros inflamatórios foram avaliados. Para a análise dos resultados empregou-se o software GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software, Inc.).

4. Resultados

Este trabalho teve como objeto de estudo o extrato etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia* (EEBd), que apresentou a maior inibição do metabolismo oxidativo de neutrófilos em estudos prévios de quimioluminescência, os quais avaliaram o efeito da sazonalidade na atividade antioxidante de *Baccharis dracunculifolia*. De acordo com o estudo prévio, realizado no mestrado, todas as amostras do EEBd inibiram tanto a quimioluminescência dependente de luminol quanto a quimioluminescência dependente de lucigenina de forma dependente da concentração, sendo que o EEBd referente à amostra colhida no mês de maio/07 foi o que apresentou a maior atividade antioxidante (Figueiredo, 2010; Figueiredo-Rinhel et al., 2013). Depois de verificar a atividade antioxidante do EEBd sobre os neutrófilos este trabalho deu continuidade à investigação da atividade anti-inflamatória e/ou imunomoduladora deste extrato.

4.1 Efeito do EEBd sobre a fagocitose de neutrófilos: avaliação da capacidade fagocítica e do índice fagocítico

O ensaio de fagocitose avaliou se o EEBd possuía alguma ação sobre a capacidade dos neutrófilos de reconhecer e fagocitar as partículas do estímulo (Zlops). Para isso, foi utilizada a maior concentração dos ensaios prévios de QL (50 µg/mL) e a concentração próxima da CI_{50}^{QL} (10 µg/mL). Após tratamento com os compostos e incubação com o estímulo, as células foram analisadas em microscópio óptico para avaliação da quantidade de neutrófilos fagocíticos e quantidade de partículas de Zlops fagocitadas por neutrófilo (**Figura 6**).

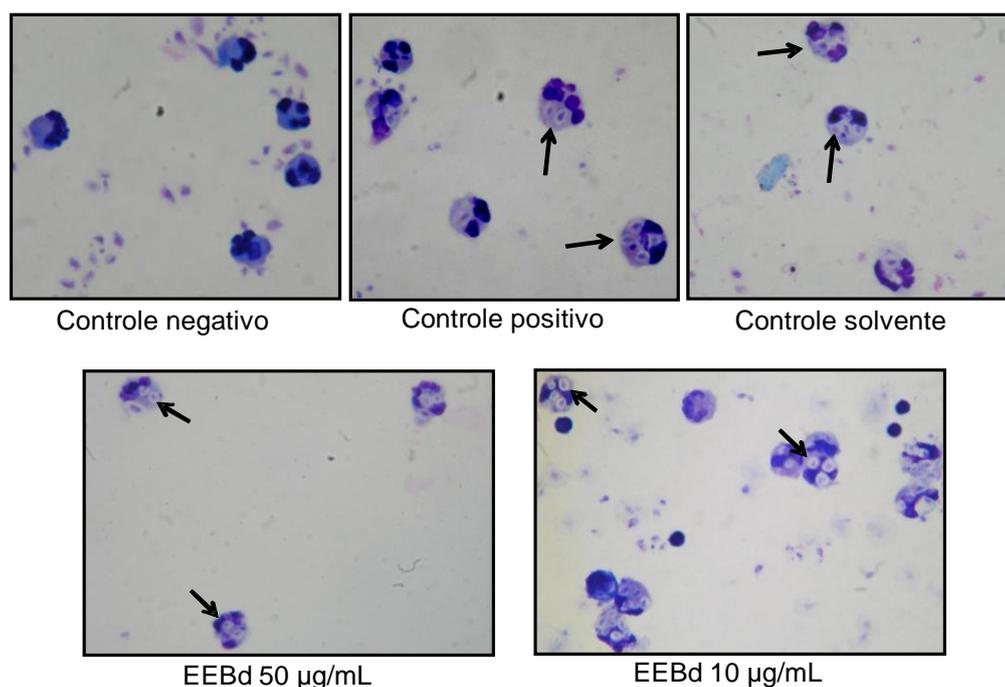


Figura 6: Neutrófilos humanos incubados com os diferentes controles ou diferentes concentrações de EEBd. Fotos obtidas após o processo de fagocitose de Zlops durante 1 hora a 37°C. As setas indicam algumas partículas de Zlops fagocitadas pelas células. Imagens obtidas por microscopia óptica de 1 experimento e representativas de outros dois realizados em duplicata. Controle negativo: células incubadas com 20 µM citocalasina B; controle positivo: células incubadas com solução de Hanks contendo gelatina a 0,1%; controle solvente: células incubadas com o solvente das amostras (DMSO a 0,1%). Abreviaturas: EEBd: Extrato Etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia*, Zlops: Zimosan opsonizado.

4.1.1 Efeito do EEBd sobre a capacidade fagocítica dos neutrófilos

A capacidade fagocítica avalia a porcentagem de neutrófilos que, após tratamento com os diferentes compostos (controles e diferentes concentrações do EEBd), permanecem com a capacidade de reconhecer e englobar as partículas do estímulo, ou seja, são capazes de realizar a fagocitose do Zlops.

Os resultados do efeito do extrato sobre a capacidade fagocítica das células estão representados na **Figura 7**.

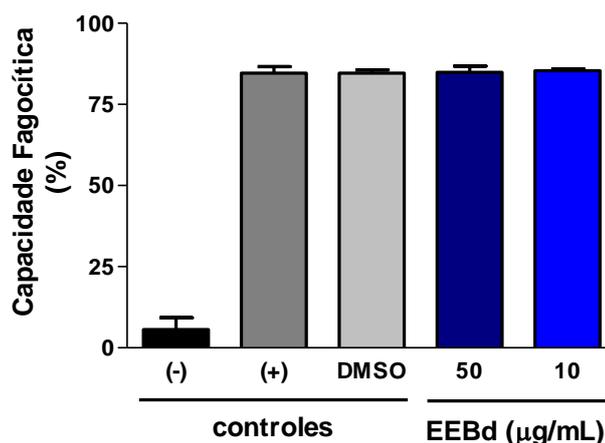


Figura 7: Efeito de diferentes concentrações de EEBd sobre a capacidade fagocítica de neutrófilos humanos (1×10^6 células/mL) após estimulação com 1 mg/mL de zimosan opsonizado durante 1 hora a 37°C. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata. Controles: (-): células incubadas com 20 μ M citocalasina B; (+): células incubadas com solução de Hanks contendo gelatina a 0,1%; DMSO: células incubadas com o solvente das amostras (DMSO a 0,1%). Abreviatura: EEBd: Extrato Etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia*, DMSO: dimetilsulfóxido.

Os dados mostram que o EEBd analisado não possui efeito sobre a capacidade fagocítica dos neutrófilos estimulados com Zlops quando comparados com o controle positivo (células incubadas com Hanks) e com o controle do solvente (células incubadas com DMSO a 0,1%) ($p > 0,05$), indicando que, nestas condições experimentais, o extrato não interfere na capacidade dos neutrófilos de reconhecer e englobar as partículas do estímulo presentes no meio reacional.

4.1.2 Efeito do EEBd sobre o índice fagocítico dos neutrófilos

O índice fagocítico expressa a quantidade média de partículas do estímulo que são fagocitadas pelos neutrófilos fagocíticos após tratamento com os diferentes compostos (controles e diferentes concentrações do EEBd).

A **Figura 8** mostra o índice fagocítico das células tratadas com as diferentes concentrações do extrato em relação aos controles.

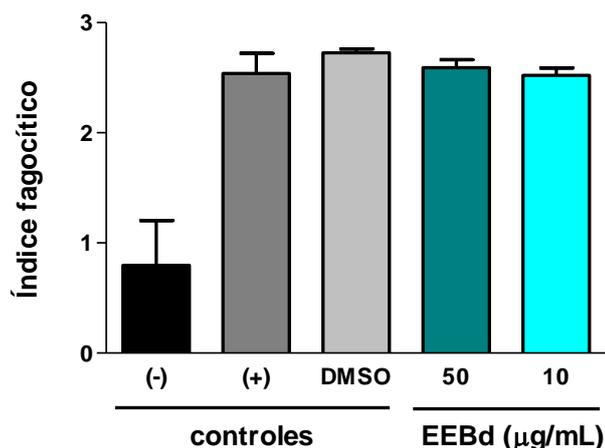


Figura 8: Efeito de diferentes concentrações de EEBd sobre o índice fagocítico de neutrófilos humanos (1×10^6 células/mL) após estimulação com 1 mg/mL de zimosan opsonizado durante 1 hora a 37°C. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata. Controles: (-): células incubadas com 20 μ M citocalasina B; (+): células incubadas com solução de Hanks contendo gelatina a 0,1%; DMSO: células incubadas com o solvente das amostras (DMSO a 0,1%). Abreviaturas: EEBd: Extrato Etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia*, DMSO: dimetilsulfóxido.

Os resultados mostram que não houve diferença significativa entre as diferentes concentrações do EEBd e os controles: positivo (Hanks com gelatina a 0,1%) e solvente (DMSO 0,1%), revelando que, nestas condições experimentais, o extrato não possui efeito sobre a quantidade de partículas fagocíticas englobadas pelas células.

4.2 Efeito do EEBd sobre a desgranulação: atividade das enzimas elastase e lisozima

4.2.1 Enzima Elastase

4.2.1-1 Atividade da elastase liberada de neutrófilos após incubação com EEBd

Para verificar o efeito do extrato sobre o processo de desgranulação da enzima elastase dos neutrófilos, foi avaliada a atividade desta enzima liberada pelas células após incubação com diferentes concentrações do EEBd. A atividade da enzima foi avaliada através da quantificação da degradação do substrato SAAVNA. A **Figura 9** apresenta um perfil representativo da cinética de degradação do substrato SAAVNA pela enzima elastase liberada das células.

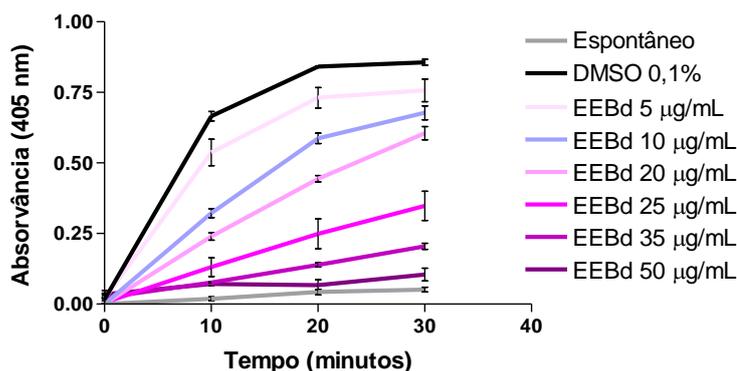


Figura 9: Perfil da cinética de degradação do substrato SAAVNA pela enzima elastase liberada de neutrófilos humanos (1×10^6 células/mL) estimulados com fMLP na presença de diferentes concentrações do EEBd. A avaliação foi realizada em espectrofotômetro a 405 nm através da formação do produto *p*-nitroanilina. Como controle positivo foi utilizado o solvente das amostras (DMSO a 0,1%). O espontâneo representa a liberação espontânea da elastase por células não estimuladas. Gráfico de um experimento, representativo de outros três realizados em quadruplicada. Abreviaturas: DMSO: dimetilsulfóxido, EEBd: Extrato Etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia*, fMLP: N-formil-metionil-leucil-fenilalanina, SAAVNA: N-succinil-Ala-Ala-Val-*p*-nitroanilida.

Os valores de absorvância no tempo de 30 minutos foram utilizados para o cálculo da inibição da atividade da enzima elastase, liberada pelas células, na presença das diferentes concentrações do EEBd em relação ao controle positivo (Figura 10).

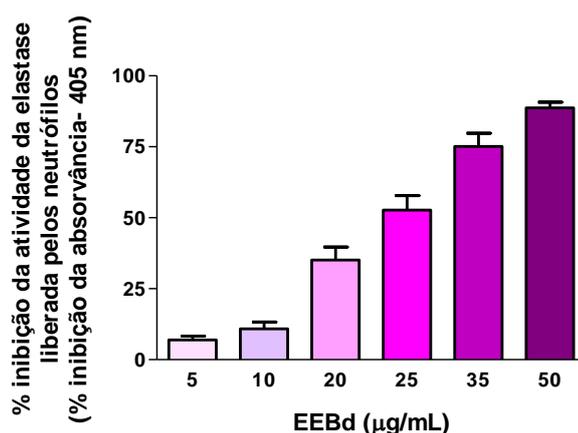


Figura 10: Efeito inibitório de diferentes concentrações de EEBd sobre a atividade da enzima elastase liberada de neutrófilos humanos (1×10^6 células/mL) estimulados com fMLP. A avaliação foi realizada em espectrofotômetro a 405 nm através da formação do produto *p*-nitroanilina a partir da degradação do substrato SAAVNA no tempo de 30 minutos. Como controle positivo (100% de atividade da elastase) foi utilizado o solvente das amostras (DMSO a 0,1%). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes realizados em quadruplicada. Abreviaturas: EEBd: Extrato Etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia*, fMLP: N-formil-metionil-leucil-fenilalanina, SAAVNA: N-succinil-Ala-Ala-Val-*p*-nitroanilida; DMSO: dimetilsulfóxido.

Os resultados apresentados mostram que o efeito do extrato sobre a atividade da enzima liberada do grânulo foi dependente da concentração, sendo que concentrações maiores que 20 µg/mL inibiram a atividade da enzima de forma estatisticamente significativa ($p < 0,01$) em relação ao controle positivo.

Através dos resultados obtidos da porcentagem de inibição, foi calculado o valor da concentração do EEBd que inibe 50% da atividade da enzima elastase liberada do grânulo ($CI_{50}^{\text{elastase liberada}}$), sendo este valor igual a $25,87 \pm 4,14$ µg/mL.

4.2.1-2 Efeito do EEBd sobre a atividade da enzima elastase previamente liberada

Com a finalidade de verificar se os resultados obtidos no item 4.2.1-1 estavam realmente relacionados com a inibição no processo de desgranulação ou se o EEBd possui uma ação direta sobre a atividade catalítica da enzima elastase liberada pelos neutrófilos, foi realizado o ensaio no qual utilizou-se apenas o sobrenadante das células, rico em elastase, após a realização do processo de desgranulação. Neste ensaio, foi avaliado o efeito do extrato sobre a capacidade da enzima elastase de reconhecer e degradar o substrato SAAVNA em *p*-nitroanilina.

A **Figura 11** apresenta o perfil representativo da cinética de degradação do substrato SAAVNA pela enzima elastase previamente liberada e tratada com as diferentes concentrações do extrato, enquanto a **Figura 12** mostra o efeito inibitório das diferentes concentrações do extrato sobre a enzima no tempo de 30 minutos.

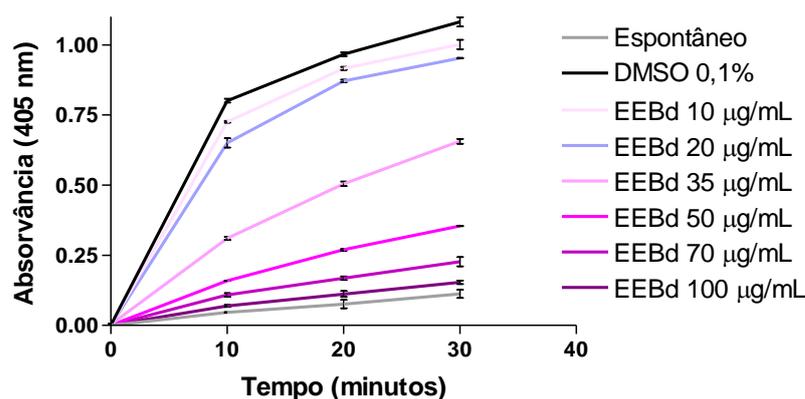


Figura 11: Perfil da atividade da enzima elastase previamente liberada de neutrófilos humanos (1×10^6 células/mL) após tratamento com diferentes concentrações do EEBd. A avaliação foi realizada em espectrofotômetro a 405 nm através da formação do produto *p*-nitroanilina a partir da degradação do substrato SAAVNA. Como controle positivo foi utilizado o solvente das amostras (DMSO a 0,1%). O espontâneo representa a liberação espontânea da elastase por células não estimuladas. Gráfico de um experimento, representativo de outros três realizados em quadruplicada. Abreviaturas: DMSO: dimetilsulfóxido, EEBd: Extrato Etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia*, SAAVNA: N-succinil-Ala-Ala-Val-*p*-nitroanilida.

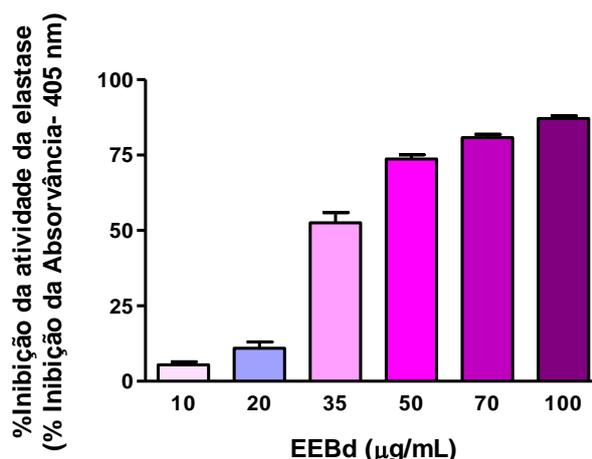


Figura 12: Efeito inibitório de diferentes concentrações de EEBd sobre a atividade catalítica da enzima elastase previamente liberada de neutrófilos humanos (1×10^6 células/mL). A avaliação foi realizada em espectrofotômetro a 405 nm através da formação do produto *p*-nitroanilina a partir da degradação do substrato SAAVNA no tempo de 30 minutos. Valores de % de inibição calculados em relação ao controle positivo (DMSO 0,1%). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes realizados em quadruplicada. Abreviaturas: EEBd: Extrato Etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia*, SAAVNA: N-succinil-Ala-Ala-Val-*p*-nitroanilida, DMSO: dimetilsulfóxido.

A análise dos dados revelou que o efeito do extrato sobre a atividade da enzima foi dependente da concentração e as concentrações maiores que 35 $\mu\text{g/mL}$ inibiram a atividade da enzima de forma estatisticamente significativa ($p < 0,01$) em relação ao controle positivo. É importante salientar que as concentrações do EEBd necessárias para inibir a atividade da enzima já presente no meio extracelular foram maiores que as necessárias para inibir a atividade da enzima liberada na presença do extrato.

Foi calculada a concentração do EEBd que inibe 50% da atividade da enzima elastase previamente liberada ($CI_{50}^{\text{atividade elastase}}$), sendo este valor igual a $34,34 \pm 3,50 \mu\text{g/mL}$.

4.2.2 Enzima lisozima

4.2.2-1 Atividade da lisozima liberada de neutrófilos após incubação com EEBd

Neste ensaio, os neutrófilos foram incubados com diferentes concentrações do EEBd e estimulados para liberação da enzima lisozima presente nos grânulos. Após estimulação, a atividade da enzima presente no sobrenadante das células foi avaliada através da redução da D.O. de uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus*.

A **Figura 13** representa a atividade da enzima lisozima liberada pelos neutrófilos após a incubação com as diferentes concentrações do EEBd ou com os controles.

Pôde-se observar que não houve diferença significativa entre o controle positivo (tampão Hanks) e o controle do solvente (DMSO 0,1%), mostrando que, nessas condições, o solvente não interfere na metodologia. Desta forma, a avaliação do efeito das diferentes concentrações do EEBd foi realizada em comparação ao controle do solvente.

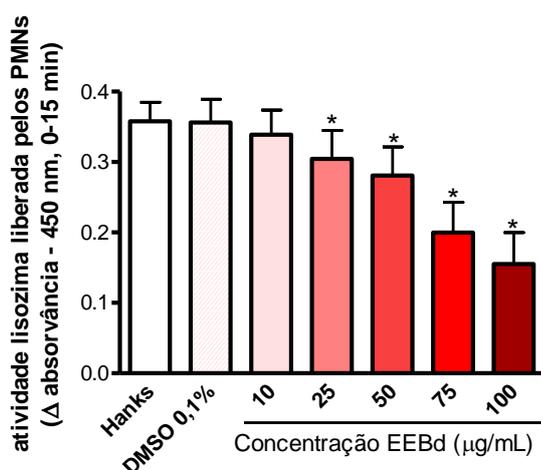


Figura 13: Atividade da enzima lisozima liberada por neutrófilos humanos (2×10^6 células/mL) ativados por 0,5 mg/mL de zimosan opsonizado após incubação com diferentes concentrações do EEBd durante 45 minutos. A atividade da enzima foi avaliada pela redução da D.O. de uma suspensão de *M. lysodeikticus* durante 15 minutos a 450 nm. Como controles foram utilizados o tampão (Hanks) e solvente das amostras (DMSO a 0,1%). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de oito experimentos independentes realizados em duplicada. Abreviaturas: PMNs: leucócitos polimorfonucleares, DMSO: dimetilsulfóxido, D.O.: densidade óptica, EEBd: Extrato Etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia*. Análise estatística: * resultados significativamente diferentes do controle do solvente ($p < 0,01$) - ANOVA seguido de Dunnett's Multiple Comparison Test.

Foi verificado que o EEBd inibiu a atividade da lisozima liberada pelos neutrófilos de forma dependente da concentração e que a incubação das células com concentrações do extrato maiores que 25 $\mu\text{g/mL}$ inibiram a atividade da enzima de forma estatisticamente significativa ($p < 0,01$).

Através dos resultados de atividade da enzima liberada após a incubação com as diferentes concentrações do EEBd, foram calculados os valores de porcentagem de inibição da atividade da enzima liberada em relação ao controle do solvente (100% de atividade) (**Figura 14**).

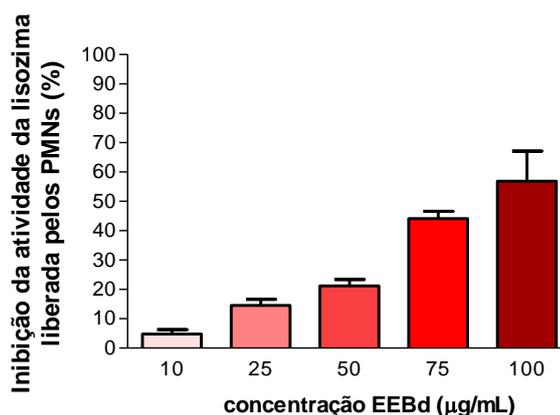


Figura 14: Inibição da atividade da enzima lisozima liberada por neutrófilos humanos (2×10^6 células/mL) previamente incubados com diferentes concentrações de EEBd após 45 minutos de estimulação. A atividade da enzima foi avaliada pela redução da D.O. de uma suspensão de *M. lysodeikticus* durante 15 minutos a 450 nm. Como controle (100% de atividade da enzima liberada) foi utilizado o solvente das amostras (DMSO a 0,1%). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de oito experimentos independentes realizados em duplicada. Abreviaturas: PMNs: leucócitos polimorfonucleares, DMSO: dimetilsulfóxido, D.O.: densidade óptica, EEBd: Extrato Etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia*.

Através dos resultados de porcentagem de inibição obtidos, foi calculado o valor da concentração do EEBd que inibe 50% da atividade da enzima lisozima liberada pelos neutrófilos ($CI_{50}^{\text{lisozima liberada}}$), sendo este valor igual a $82,82 \pm 7,99 \mu\text{g/mL}$.

Este resultado mostra que a incubação das células com o EEBd, antes do processo de desgranulação, resulta em inibição da atividade da enzima liberada. Este efeito pode ser devido tanto à inibição do processo de desgranulação quanto à inibição da atividade catalítica da enzima liberada no meio extracelular.

4.2.2-2 Efeito do EEBd sobre a atividade da enzima lisozima padrão

Este ensaio foi realizado para verificar se o EEBd possui efeito sobre a atividade catalítica da enzima lisozima. Para isso, a enzima lisozima padrão (concentração final de $1400 \mu\text{g/mL}$, semelhante à liberada pelas células) foi incubada juntamente com as diferentes concentrações do EEBd. Após incubação, a enzima foi avaliada quanto à sua capacidade de reduzir a D.O. de uma suspensão de *M. lysodeikticus* da mesma forma que nos ensaios com células.

Figura 15 representa a atividade da lisozima após incubação com as diferentes concentrações de EEBd.

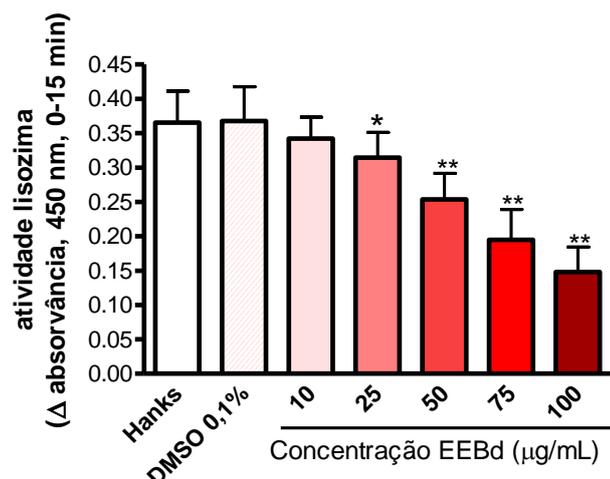


Figura 15: Atividade da enzima lisozima isolada após incubação com diferentes concentrações do EEBd. A atividade da enzima foi avaliada pela redução da D.O. de uma suspensão de *M. lysodeikticus* durante 15 minutos a 450 nm. Como controles foram utilizados o tampão (Hanks) e solvente das amostras (DMSO a 0,1%). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de oito experimentos independentes realizados em duplicada. Abreviaturas: DMSO: dimetilsulfóxido, D.O.: densidade óptica, EEBd: Extrato Etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia*. Análise estatística: *, ** resultados significativamente diferentes do controle do solvente, sendo * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ - ANOVA seguido de Dunnett's Multiple Comparison Test.

Como no ensaio com as células, observou-se que o solvente não interferiu na metodologia e que a incubação da enzima com concentrações do EEBd maiores que 25 $\mu\text{g/mL}$ inibem a atividade da lisozima de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Através destes resultados foram calculados os valores de porcentagem de inibição da atividade da enzima pelas diferentes concentrações do EEBd em relação ao controle do solvente (**Figura 16**).

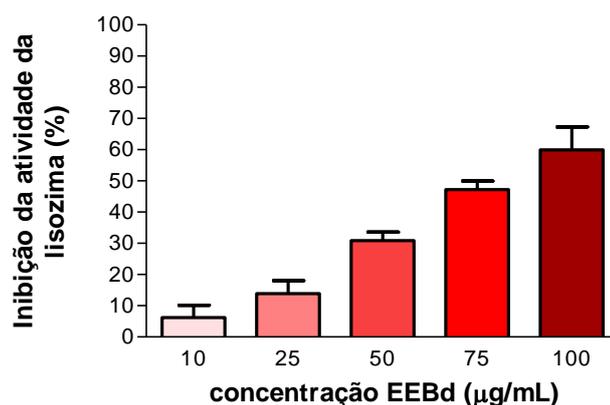


Figura 16: Inibição da atividade da enzima lisozima após incubação com diferentes concentrações de EEBd. A atividade da enzima foi avaliada pela redução da D.O. de uma suspensão de *M. lysodeikticus* durante 15 minutos a 450 nm. Como controle (100% de atividade da enzima) foi utilizado o solvente das amostras (DMSO a 0,1%). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de oito experimentos independentes realizados em duplicada. Abreviaturas: DMSO: dimetilsulfóxido, D.O.: densidade óptica, EEBd: Extrato Etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia*.

Da mesma forma que nos ensaios com células, os resultados mostraram que a atividade da enzima lisozima diminui na presença do EEBd de forma dependente da concentração. Com os resultados de porcentagem de inibição, foi calculado o valor da concentração do EEBd que inibe 50% da atividade da enzima lisozima (CI_{50} atividade lisozima), sendo este valor igual a $83,85 \pm 10,91 \mu\text{g/mL}$.

4.3 Efeito do EEBd sobre a atividade da enzima mieloperoxidase e seus produtos

4.3.1 Efeito do EEBd sobre a atividade da enzima mieloperoxidase: avaliação da produção de HOCl pelos neutrófilos

Para verificar se o EEBd interfere de forma expressiva sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) averiguou-se o efeito de diferentes concentrações do extrato sobre a produção do HOCl pela MPO de neutrófilos estimulados.

São apresentados nas **Figuras 17 e 18** os resultados referentes respectivamente à oxidação do TMB pelos derivados do HOCl e os resultados de porcentagem de inibição da oxidação do TMB. A porcentagem de inibição foi calculada levando-se em consideração o solvente (etanol 0,05%) como controle positivo (100% de oxidação do TMB).

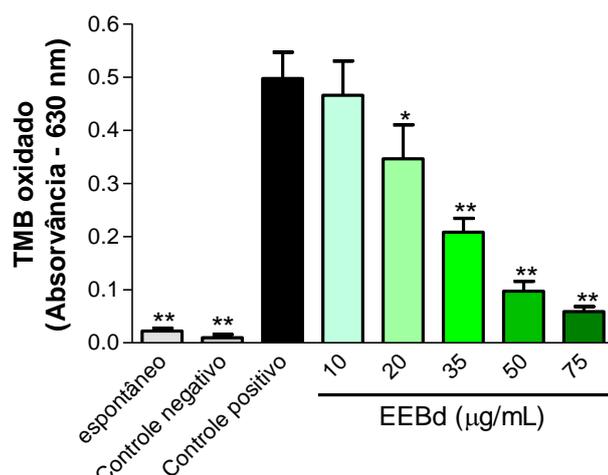


Figura 17: Valores de absorvância referentes à oxidação do TMB por compostos derivados do HOCl produzido pela enzima mieloperoxidase de neutrófilos humanos. As barras representam o efeito de diferentes concentrações do EEBd ou controles na produção de HOCl pela mieloperoxidase de neutrófilos humanos (4×10^6 células/mL), estimulados com zimosan opsonizado (2 mg/mL), com exceção do espontâneo no qual não há adição de estímulo (apenas células e tampão Hanks). Controle (+) solvente (etanol 0,05%); controle (-): Hanks com gelatina a 0,1% com a adição de catalase no início da reação. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de seis experimentos realizados em quadruplicata. Abreviaturas: TMB: tetrametilbenzidina; HOCl: ácido hipocloroso; EEBd: Extrato Etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia*. Análise estatística: *, ** resultados significativamente diferentes do controle positivo, sendo * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ - ANOVA seguido de Dunnett's Multiple Comparison Test.

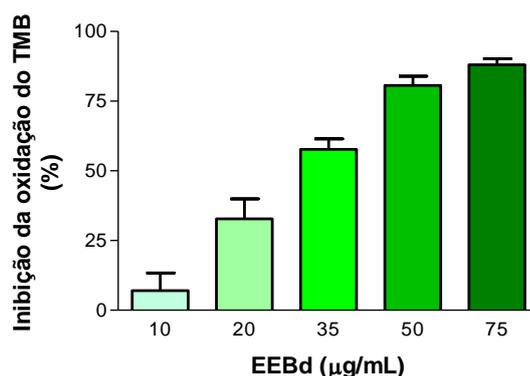


Figura 18: Valores de porcentagem de inibição da oxidação do TMB por diferentes concentrações do EEBd após incubação com neutrófilos humanos (4×10^6 células/mL) estimulados com zimosan opsonizado (2 mg/mL). A porcentagem de inibição foi calculada em relação ao controle positivo (100% oxidação do TMB) de cada experimento e indica o efeito das diferentes concentrações do EEBd sobre a atividade da MPO. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de seis experimentos realizados em quadruplicata. Abreviaturas: TMB: tetrametilbenzidina; EEBd: Extrato Etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia*, MPO: mieloperoxidase.

Os resultados mostraram que o EEBd inibiu a oxidação do TMB de forma dependente da concentração, indicando que o EEBd pode estar interferindo na MPO das células de forma a reduzir a formação do HOCl e de seus derivados. Foi constatado que os valores acima de 20 µg/mL já apresentaram uma inibição significativa ($p < 0,05$) da oxidação do TMB. Com os valores de porcentagem de inibição foi possível calcular o CI_{50}^{MPO} do EEBd, que apresentou o valor de $26,64 \pm 3,24$ µg/mL.

Uma vez que este ensaio avalia a oxidação do TMB por um composto derivado do HOCl (taurina-Cl), além do efeito inibitório sobre a atividade da enzima MPO (redução da formação do HOCl no meio), o EEBd pode ter reduzido a oxidação do TMB através de atividade “scavenger” (sequestradora), tanto sobre o HOCl como sobre a taurina-Cl formados durante a reação.

4.3.2 Avaliação da atividade “scavenger” do EEBd sobre HOCl e Taurina-Cl

Estes ensaios foram realizados com a intenção de verificar se o EEBd possui atividade sequestradora de HOCl e taurina-Cl, e desta forma tentar esclarecer se os resultados de inibição da oxidação do TMB apresentados anteriormente são devidos à inibição da MPO dos neutrófilos (redução da produção do HOCl no meio) ou se são devidos à captura dos intermediários da reação (HOCl e taurina-Cl) responsáveis pela oxidação do TMB.

4.3.2-1 HOCl

Para verificar se o EEBd possui efeito “scavenger” sobre o HOCl, o extrato foi incubado juntamente com HOCl e, posteriormente, foi adicionada a taurina no meio para reagir com o HOCl residual e formar a taurina-Cl que foi responsável pela oxidação do TMB.

A **Figura 19** mostra os valores de absorvância referentes à oxidação do TMB.

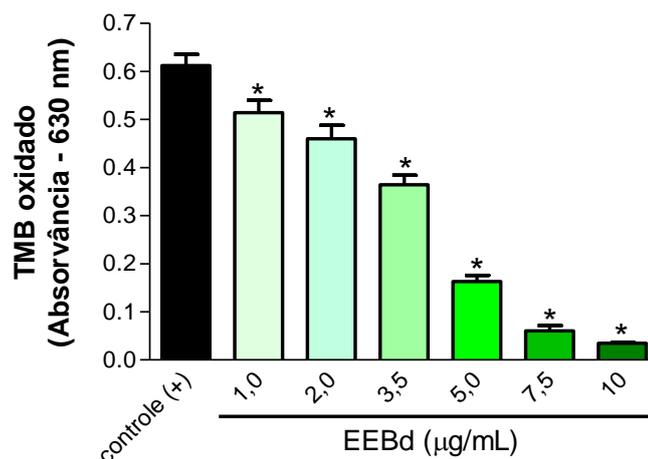


Figura 19: Valores de absorvância referentes à oxidação do TMB pela taurina-Cl formada através da interação da taurina com HOCl residual, após incubação do HOCl com as diferentes concentrações do EEbD. Como controle positivo (+) foi utilizado etanol a 0,05%. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos realizados em quadruplicata. Abreviaturas: TMB: tetrametilbenzidina; HOCl: ácido hipocloroso; EEbD: Extrato Etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia*. Análise estatística: resultados significativamente diferentes do controle positivo: * $p < 0,01$ - ANOVA seguido de Dunnett's Multiple Comparison Test.

Pode-se observar que houve uma redução da oxidação do TMB com o aumento da concentração do EEbD e que todos os valores testados apresentaram uma redução significativa da oxidação do TMB em relação ao controle positivo ($p < 0,01$).

De posse dos valores de absorvância das diferentes concentrações da amostra e do controle, foram calculados os valores de porcentagem de inibição da oxidação do TMB, cujos resultados estão presentes na **Figura 20**.

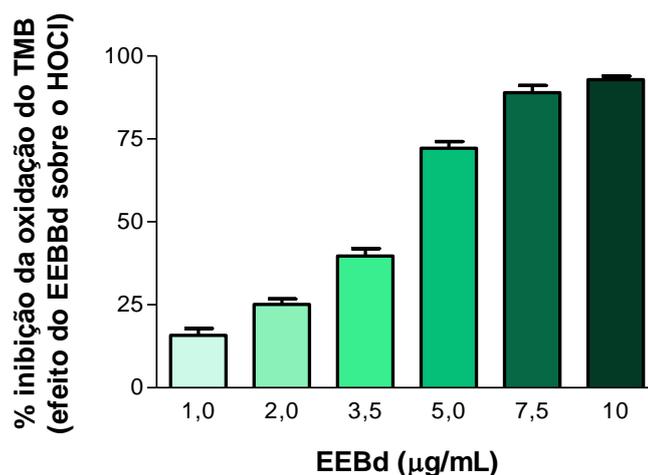


Figura 20: Valores de porcentagem de inibição da oxidação do TMB pelas diferentes concentrações do EEBd, após interação com o HOCl presente no meio. A porcentagem de inibição foi calculada em relação ao controle positivo (etanol a 0,05%) de cada experimento. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos realizados em quadruplicata. Abreviaturas: TMB: tetrametilbenzidina; HOCl: ácido hipocloroso; EEBd: Extrato Etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia*.

Os valores de porcentagem de inibição permitiram o cálculo do CI_{50}^{HOCl} (concentração que reduz em 50% o HOCl presente no meio), que foi de $4,0 \pm 0,1$ µg/mL.

4.3.2-2 Taurina-Cl

Para verificar se o EEBd possui efeito “scavenger” sobre a taurina-Cl, o extrato foi incubado na presença da taurina-Cl (formada pela incubação prévia do HOCl com taurina) e, posteriormente, foi adicionado o revelador de TMB, o qual foi oxidado pela taurina-Cl residual presente no meio.

A **Figura 21** mostra os valores de absorvância referentes à oxidação do TMB pela taurina-Cl após a interação com o EEBd.

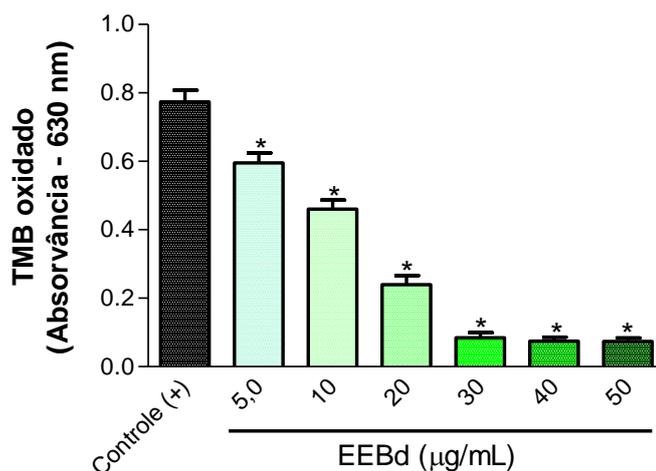


Figura 21: Valores de absorvância referentes à oxidação do TMB pela taurina-Cl residual, após incubação deste composto com as diferentes concentrações do EEBd. Como controle positivo (+) foi utilizado o etanol a 0,05%. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos realizados em quadruplicata. Abreviaturas: TMB: tetrametilbenzidina; EEBd: Extrato Etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia*. Análise estatística: resultados significativamente diferentes do controle positivo: * $p < 0,01$ - ANOVA seguido de Dunnett's Multiple Comparison Test.

Pode-se observar que houve inibição do TMB oxidado de forma dependente da concentração do EEBd e que todas as concentrações avaliadas reduziram a oxidação do TMB de forma significativa em relação ao controle positivo ($p < 0,01$).

Através dos valores de absorvância das diferentes concentrações do extrato, foram calculados os valores de porcentagem de inibição da oxidação do TMB em relação ao controle positivo (100% oxidação do TMB), cujos resultados estão presentes na **Figura 22**.

Os valores de porcentagem de inibição permitiram o cálculo do $CI_{50}^{\text{tau-Cl}}$ (concentração que reduz em 50% a taurina-Cl presente no meio) de $12,78 \pm 0,8$ µg/mL.

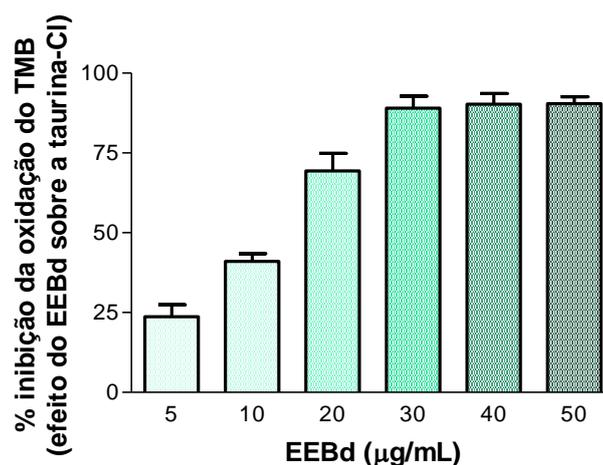


Figura 22: Valores de porcentagem de inibição da oxidação do TMB pelas diferentes concentrações do EEBd, após interação com a taurina-Cl presente no meio. A porcentagem de inibição foi calculada em relação ao controle positivo (etanol a 0,05%) de cada experimento. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos realizados em quadruplicata. Abreviaturas: TMB: tetrametilbenzidina; EEBd: Extrato Etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia*.

4.4 Efeito do EEBd sobre a atividade microbicida dos neutrófilos

Este ensaio visou determinar se o EEBd poderia causar alguma influência na capacidade dos neutrófilos de destruir os micro-organismos fagocitados.

Para isso, os neutrófilos foram pré-incubados com diferentes concentrações do EEBd (10 e 50 µg/mL) e, posteriormente, foi adicionada uma suspensão de *Candida albicans* ao meio. Após o período de incubação para a realização do processo de fagocitose e destruição do micro-organismo, a viabilidade da levedura foi avaliada através de ensaios de redução do MTT.

Os resultados referentes a este ensaio estão demonstrados na **Figura 23**.

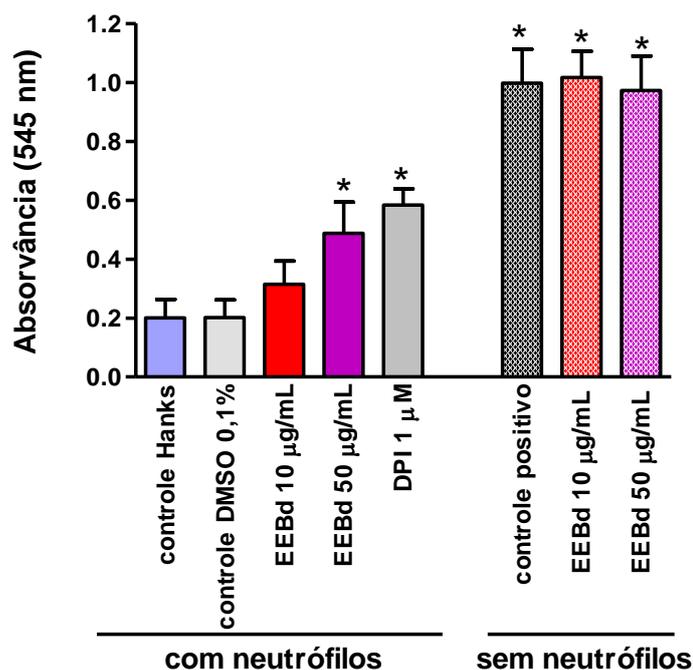


Figura 23: Avaliação da viabilidade de $0,6 \times 10^6$ ufc/mL de *Candida albicans* (ATCC 64548), analisada através do ensaio de redução do MTT, após incubação com diferentes amostras na presença e na ausência de neutrófilos humanos. A viabilidade do fungo é considerada proporcional à leitura da absorbância em 545 nm. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de cinco experimentos realizados em duplicata. Abreviaturas: DMSO: dimetilsulfóxido; DPI: difenileno-iodônio; EEBd: Extrato Etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia*; MTT: brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil) tetrazólio. Análise estatística: *amostras estatisticamente diferentes dos controles Hanks e DMSO 0,1% ANOVA seguido de Dunnett's Multiple Comparison test ($p < 0,01$).

Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre o controle positivo e os controles das diferentes concentrações do extrato na ausência de neutrófilos, indicando que nestas concentrações os EEBd não possuem efeito tóxico sobre a *C. albicans*. Além disso, os resultados demonstraram que houve diferenças significativas entre as amostras incubadas na ausência dos neutrófilos e o controle Hanks, confirmando a adequabilidade do método, pois na ausência de qualquer substância, os neutrófilos são capazes de reconhecer, fagocitar e destruir grande parte das leveduras presentes no meio.

Com os valores de Absorbância (545 nm), foram calculadas as porcentagens de morte de *C. albicans* em relação ao controle positivo de cada experimento (**Figura 24**).

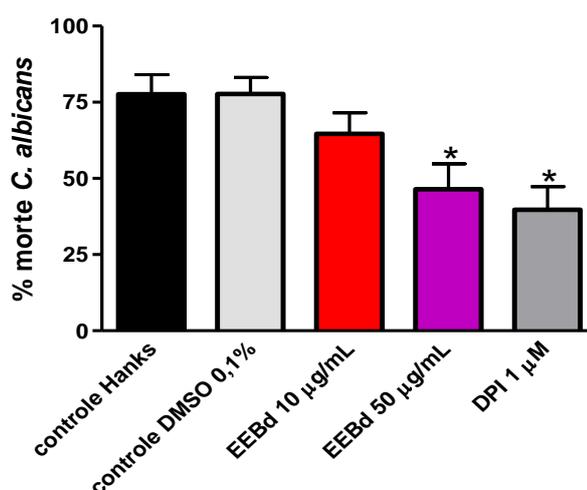


Figura 24: Porcentagem de morte de $0,6 \times 10^6$ ufc/mL de *Candida albicans* (ATCC 64548), após incubação com neutrófilos humanos (1×10^6 células/mL) previamente tratados com diferentes amostras. A porcentagem foi calculada em relação ao controle positivo (100% de viabilidade da levedura) de cada experimento. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de cinco experimentos realizados em duplicata. Abreviaturas: DMSO: dimetilsulfóxido; DPI: difenileno-iodônio; EEBd: Extrato Etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia*. Análise estatística: *amostras estatisticamente diferentes dos controles Hanks e DMSO 0,1% ANOVA seguido de Dunnett's Multiple Comparison test ($p < 0,05$).

Por meio deste experimento, notou-se que não há diferenças significativas entre a porcentagem de morte do fungo quando os neutrófilos são previamente incubados na presença do tampão Hanks e do solvente das amostras (DMSO 0,1%). Além disso, pode-se observar que a porcentagem de morte do fungo é diminuída com o aumento da concentração do extrato. Apesar disso, a concentração do EEBd de 10 µg/mL, próxima à concentração de CI_{50} , nos ensaios de QL, não apresentou diminuição significativa na capacidade dos neutrófilos de causar a morte do fungo.

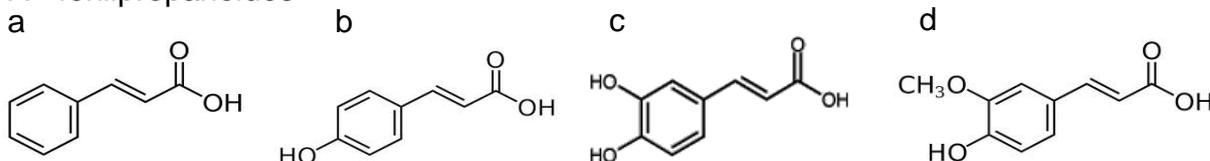
Também foi observado que quando os neutrófilos são previamente incubados com DPI 1 µM, um inibidor irreversível do complexo enzimático da NADPH oxidase, ocorre uma redução significativa da porcentagem de morte do patógeno.

4.5 Obtenção de compostos isolados de *Baccharis dracunculifolia* e avaliação de suas atividades antioxidantes

Foram obtidos alguns compostos isolados presentes no EEBd e avaliadas as suas atividades antioxidantes sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos. Para isso, foram

utilizados os fenilpropanoides derivados do ácido cinâmico: ácido cafeico, ácido cumárico, ácido ferúlico, e o próprio ácido cinâmico (adquiridos comercialmente e fornecidos pelo prof. Dr. Fernando Batista Costa do laboratório de farmacognosia da FCFRP-USP) cujas estruturas estão apresentadas na **Figura 25-A**, e os flavonoides aromadendrina-4'-metil éter (AME), isosacuranetina e hispidulina (isolados no laboratório de farmacognosia da FCFRP-USP), cujas estruturas estão dispostas na **Figura 25-B**.

A - fenilpropanoides



B - flavonoides

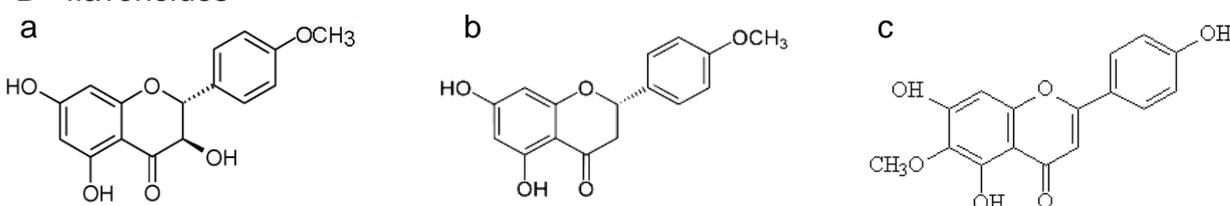


Figura 25: Estruturas químicas de alguns compostos presentes no extrato de *Baccharis dracunculifolia*. **A - Fenilpropanoides:** a) ácido cinâmico; b) ácido cumárico; c) ácido cafeico; d) ácido ferúlico; **B - Flavonoides:** a) aromadendrina-4'-metil-éter - AME; b) isosacuranetina; c) hispidulina.

Todos os compostos obtidos foram submetidos a ensaios de QLlum e QLluc nas mesmas condições utilizadas para o EEBd.

4.5.1 Quimioluminescência dependente de Luminol (QLlum)

O ensaio de QLlum avaliou a capacidade das amostras de reduzir todas as espécies reativas de oxigênio (ERO) presentes no meio. Através dos resultados de porcentagem de inibição das amostras em relação aos controles positivos de cada ensaio, foi constatado que, para todos os compostos analisados, a quantidade de ERO presente no meio foi reduzida com o aumento das concentrações (**Figura 26**).

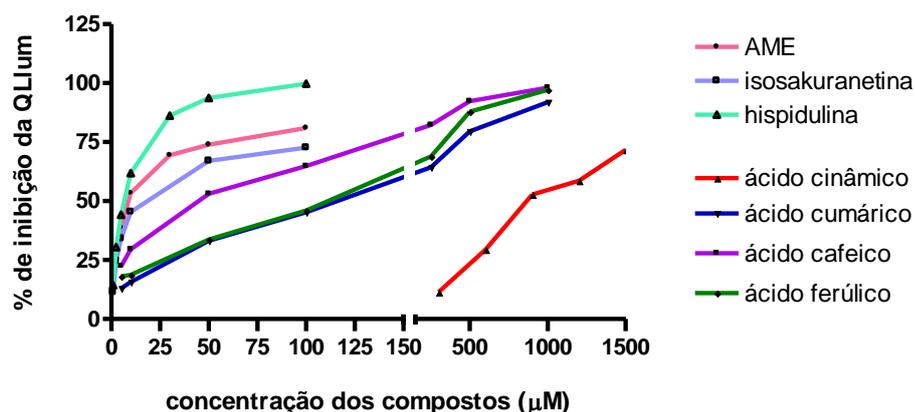


Figura 26: Efeito inibitório das diferentes concentrações de flavonoides (AME, isosacuranetina e hispidulina) e de fenilpropanoides (ácidos cinâmico, cumárico, cafeico e ferúlico) sobre a QLLum, produzida por neutrófilos humanos (1×10^6 células/mL) estimulados com 1 mg de zimosan opsonizado. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de sete experimentos realizados em duplicata. Abreviaturas: QLLum: quimioluminescência dependente de luminol; AME: aromadendrina-4'-metil-éter.

Pode-se verificar que, dentre as classes de compostos analisadas, os flavonoides inibiram mais a QLLum que os fenilpropanoides em todas as concentrações avaliadas.

Dentre os flavonoides, observa-se um grande efeito inibitório nas concentrações iniciais, sendo que este efeito inibitório parece ficar menos intenso com o aumento das concentrações. Foi verificada uma maior inibição da QLLum pela hispidulina seguido pela AME e isosacuranetina.

Entre os fenilpropanoides derivados do ácido cinâmico, observou-se que os valores de porcentagem de inibição dos compostos que apresentam hidroxilas no anel aromático (ácidos cafeico, cumárico e ferúlico) foram expressivamente maiores que o valor apresentado pelo ácido cinâmico.

As porcentagens de inibição da QLLum foram utilizadas para os cálculos das CI_{50} de cada amostra, permitindo a comparação da atividade antioxidante dos diferentes compostos (**Figura 27**).

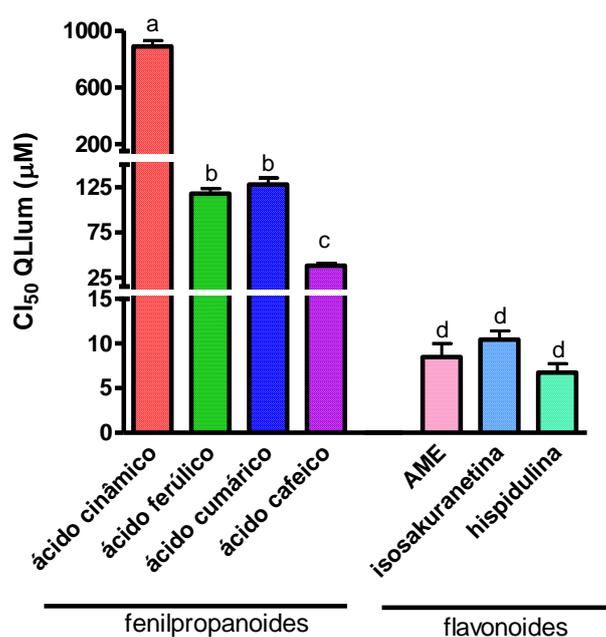


Figura 27: Valores de Cl₅₀ (concentração capaz de inibir 50% da QLIum) dos diferentes compostos presentes no EEBd (ácido cafeico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido cinâmico, AME, isosacuranetina e hispidulina) sobre a QLIum produzida por neutrófilos humanos (1×10^6 células/mL), estimulados com 1 mg/mL de zimosan opsonizado. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de sete experimentos realizados em duplicata. Abreviaturas: QLIum: quimioluminescência dependente de luminol; AME: aromadendrina-4'-metil-éter, EEBd: extrato etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia*. Análise estatística: amostras que não compartilham a mesma letra (a, b, c) são significativamente diferentes umas das outras; ANOVA seguido de Tukey's Multiple Comparison test ($p < 0,05$).

Pela análise dos valores de Cl₅₀, pode-se observar que os flavonoides apresentaram valores semelhantes entre si e menores que os valores dos fenilpropanoides. Dentre os fenilpropanoides pode-se observar que os ácidos cumárico e ferúlico não apresentaram diferenças entre si e que o ácido cafeico apresentou valor de Cl₅₀ expressivamente menor que os demais compostos.

Os valores de Cl₅₀ dos fenilpropanoides foram: $38,18 \pm 9,5$ µM para o ácido cafeico, $128,1 \pm 27,82$ µM para o ácido cumárico, $118,0 \pm 20,88$ µM para o ácido ferúlico e $890,4 \pm 140,6$ µM para o ácido cinâmico. Já os valores de Cl₅₀ dos flavonoides foram: $8,49 \pm 3,9$ µM para a AME; $10,43 \pm 2,4$ µM para a isosacuranetina e $8,16 \pm 1,1$ µM para a hispidulina.

4.5.2 Quimioluminescência dependente de Lucigenina (QLLuc)

O ensaio de QLLuc avaliou a capacidade das amostras de reduzir a quantidade de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) presente no meio.

Através dos resultados de porcentagem de inibição da QLLuc, observou-se que, para todos os compostos analisados, a quantidade de $O_2^{\bullet-}$ presente no meio foi reduzida com o aumento das concentrações das amostras (**Figura 28**).

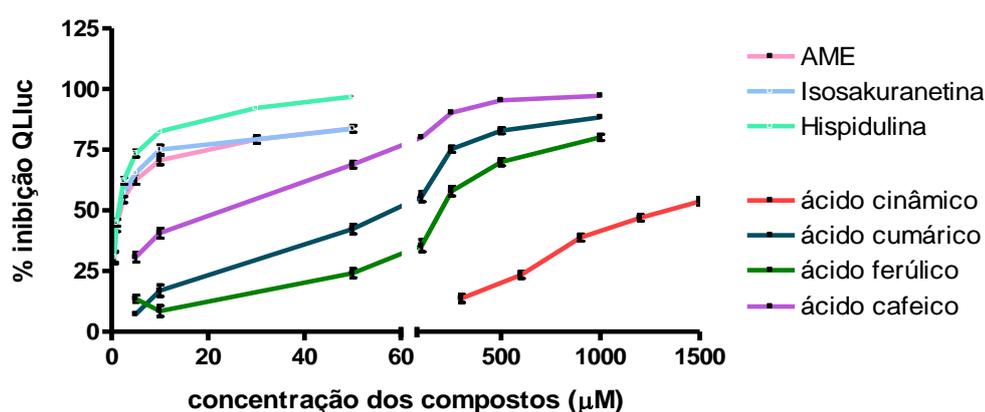


Figura 28: Efeito inibitório das diferentes concentrações de flavonoides (AME, isosakuranetina e hispidulina) e de fenilpropanoides (ácidos cinâmico, cumárico, cafeico e ferúlico) sobre a QLLuc, produzida por neutrófilos humanos (1×10^6 células/mL) estimulados com 1 mg de zimosan opsonizado. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de sete experimentos realizados em duplicata. Abreviaturas: QLLuc: quimioluminescência dependente de lucigenina; AME: aromadendrina-4'-metil-éter.

Por fim, para comparar a atividade inibitória da QLLuc dos diferentes compostos, foram calculados os valores de CI_{50} de cada amostra (**Figura 29**).

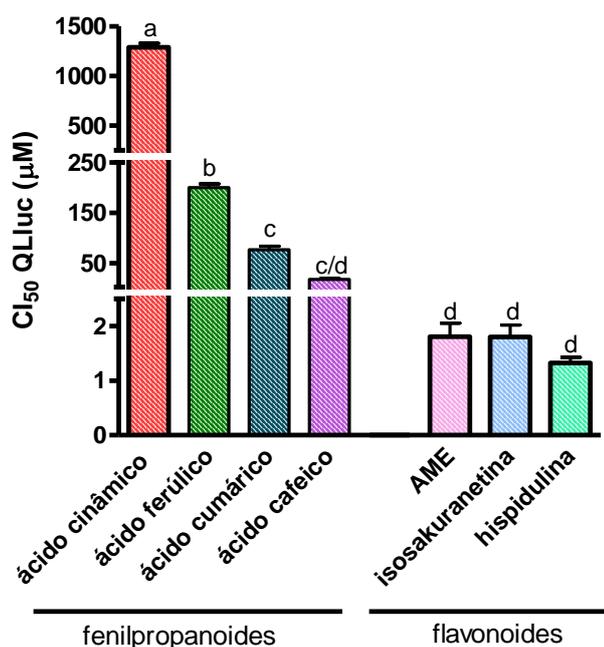


Figura 29: Valores de Cl₅₀ (concentração capaz de inibir 50% da QLLuc) dos diferentes compostos presentes no EEBd (ácido cafeico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido cinâmico, AME, isosacuranetina e hispidulina) sobre a QLLuc, produzida por neutrófilos humanos (1×10^6 células/mL) estimulados com 1 mg/mL de zimosan opsonizado. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de sete experimentos realizados em duplicata. Abreviaturas: QLLuc: quimioluminescência dependente de lucigenina; AME: aromadendrina-4'-metil-éter, EEBd: extrato etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia*. Análise estatística: amostras que não compartilham a mesma letra (a, b, c, d) são significativamente diferentes umas das outras; ANOVA seguido de Tukey's Multiple Comparison test ($p < 0,05$).

Os resultados de QLLuc mostraram que os flavonoides apresentaram uma maior inibição dos radicais ânions superóxidos presentes no meio em relação aos fenilpropanoides, e não houve diferença significativa entre os primeiros. Ainda, a análise estatística apontou que o ácido cafeico apresentou uma redução da QLLuc semelhante a apresentada pelos flavonoides. Dentre os fenilpropanoides verificou-se que o ácido cafeico apresentou a maior inibição, seguida pelos ácidos cumárico, ferúlico e cinâmico.

Os valores de Cl₅₀ para QLLuc dos compostos analisados foram: $18,08 \pm 6,4 \mu\text{M}$ para o ácido cafeico; $76,88 \pm 26,0 \mu\text{M}$ para o ácido cumárico; $200,4 \pm 22,2 \mu\text{M}$ para o ácido ferúlico; $1287 \pm 140,0 \mu\text{M}$ para o ácido cinâmico; $1,47 \pm 0,4 \mu\text{M}$ para a AME; $1,54 \pm 0,4 \mu\text{M}$ para a isosacuranetina e $1,19 \pm 0,1 \mu\text{M}$ para a hispidulina.

Tanto para a QLLum quanto para a QLLuc, o fenilpropanoide que mais se aproximou das atividades antioxidantes dos flavonoides foi o ácido cafeico, o qual foi utilizado para dar continuidade aos estudos.

A **Tabela 1** mostra os valores de CI_{50} de todos os compostos isolados avaliados tanto para QLLum quanto para QLLuc.

Tabela 1 – Atividade antioxidante de compostos isolados presentes no extrato etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia*, avaliada através de quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) e de lucigenina (QLluc). Os resultados estão expressos na forma de CI_{50} (concentração capaz de inibir em 50% a quimioluminescência).

Composto	QLlum (μM)	QLluc (μM)
Ácido cafeico	38,18 \pm 9,5	18,08 \pm 6,4
Ácido <i>p</i> -cumárico	128,1 \pm 27,8	76,88 \pm 26,0
Ácido ferúlico	118,0 \pm 20,9	200,4 \pm 22,2
Ácido cinâmico	890,4 \pm 140,6	1287 \pm 140,0
Aromadendrina-4'-metil éter	8,49 \pm 3,9	1,47 \pm 0,4
Isosacuranetina	10,43 \pm 2,4	1,54 \pm 0,4
Hispidulina	8,16 \pm 1,1	1,19 \pm 0,1

4.6 Incorporação do EEBd e do ácido cafeico em vesículas lipossômicas e avaliação de suas atividades antioxidantes

4.6.1 Preparo e caracterização dos lipossomas contendo EEBd e ácido cafeico

Foi realizada a incorporação do EEBd e do ácido cafeico em sistemas vesiculares lipossômicos através do método de injeção etanólica e, posteriormente, foi determinada a eficiência de incorporação das amostras. A eficiência de incorporação foi realizada através de análise espectrofotométrica, comparando-se a absorvância da preparação de lipossomas antes da ultracentrifugação (100% dos compostos adicionados no meio) com a absorvância da preparação após a ultracentrifugação e retirada dos compostos não encapsulados (sobrenadante). Com isso, foi constatado

que os lipossomas preparados apresentaram uma eficiência de incorporação do EEBd de $33,13 \pm 13,9\%$ e do ácido cafeico de $7,4 \pm 1,9\%$. Além da eficiência de incorporação, também foram confeccionadas curvas padrão para cada composto (Apêndice D), de modo que foi possível determinar a concentração dos compostos presentes nos lipossomas formados, sendo a média destes valores de $188,4 \pm 45,4$ $\mu\text{g/mL}$ para o EEBd e de $326,7 \pm 30,55$ μM ($58,9 \pm 5,5$ $\mu\text{g/mL}$) para o ácido cafeico.

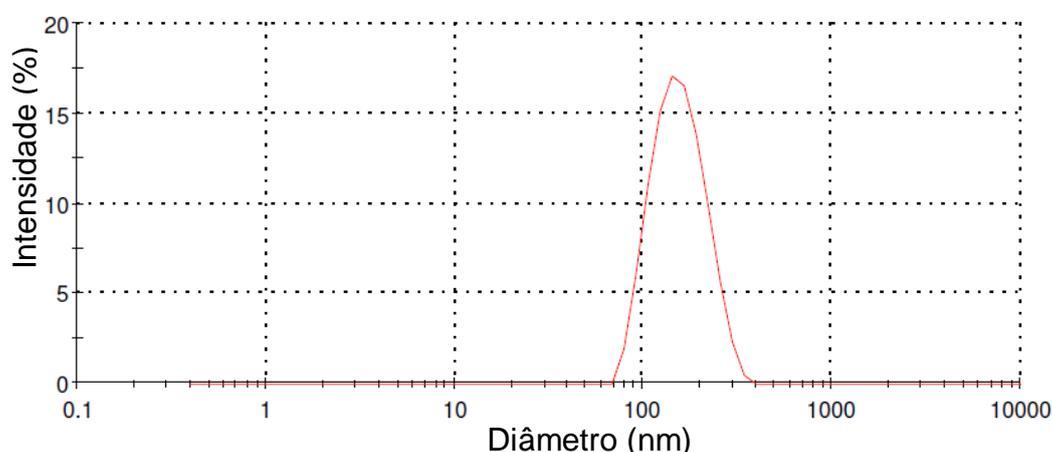
A caracterização físico-química dos lipossomas foi realizada a fim de se determinar se as vesículas formadas estavam adequadas para a utilização em meio biológico. Para isso, a preparação de lipossomas foi avaliada quanto ao tamanho das vesículas, índice de polidispersão e potencial zeta, cujos resultados estão apresentados na **Tabela 2** e na **Figura 30**.

Tabela 2: Caracterização físico-química dos lipossomas contendo EEBd, ácido cafeico e o solvente das amostras (DMSO)

Parâmetros	Lipossomas		
	DMSO	EEBd	Ácido cafeico
Diâmetro das vesículas (nm)	$117,9 \pm 8,9$	$182,5 \pm 9,2$	$135,3 \pm 8,5$
Índice de polidispersão	$0,216 \pm 0,03$	$0,129 \pm 0,05$	$0,366 \pm 0,09$
Potencial Zeta (mV)	$-0,375 \pm 0,31$	$-0,08 \pm 0,26$	$0,049 \pm 0,25$

Resultados expressos como média \pm desvio padrão de seis experimentos. Abreviaturas: DMSO: dimetilsulfóxido; EEBd: Extrato Etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia*.

A Distribuição do tamanho pela intensidade – lipossomas com DMSO



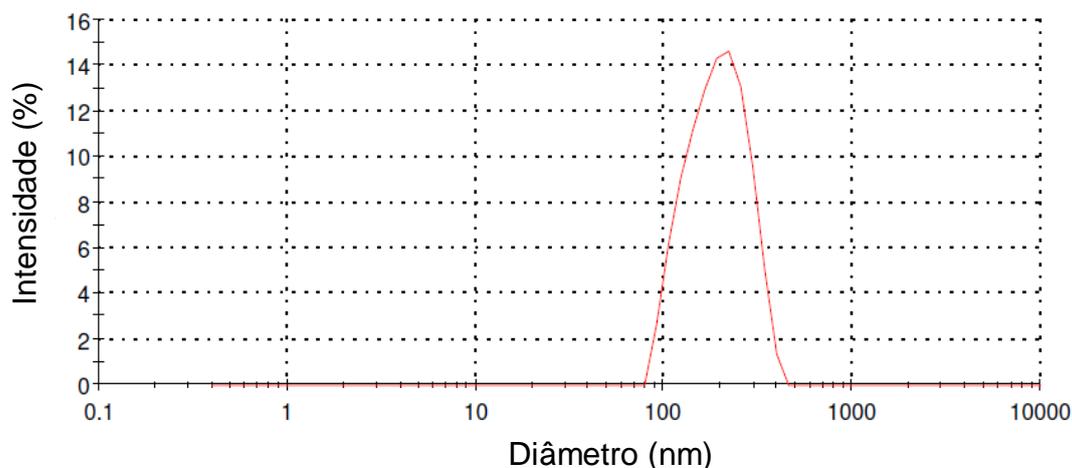
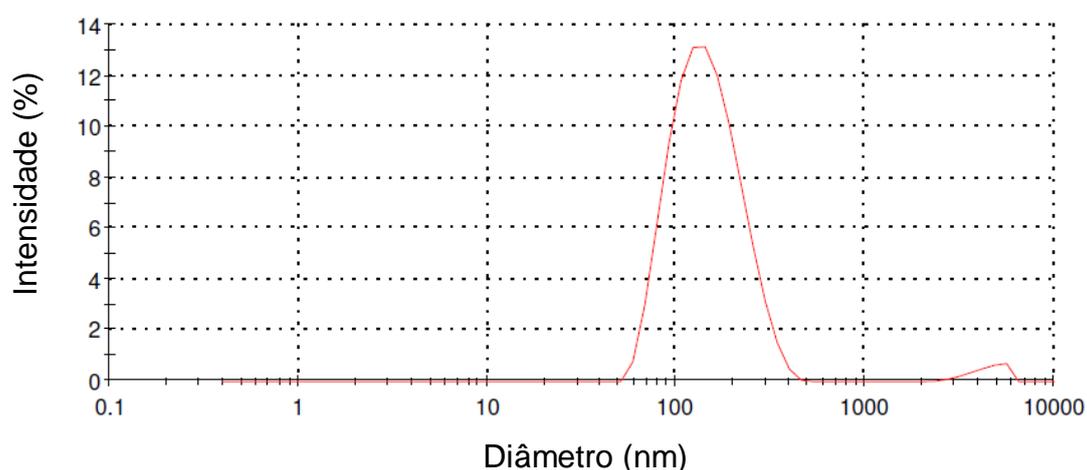
B Distribuição do tamanho pela intensidade – lipossomas com EEBd**C** Distribuição do tamanho pela intensidade – lipossomas com Ácido cafeico

Figura 30: Gráficos representativos da caracterização físico-química dos lipossomas quanto à distribuição do tamanho, após a etapa de ultracentrifugação e retirada dos compostos não encapsulados. **A-** lipossomas preparados apenas com o solvente das amostras – DMSO; **B-** lipossomas incorporados com EEBd e **C-** lipossomas incorporados com ácido cafeico. A determinação do diâmetro das partículas foi realizada através de medidas de espalhamento de luz (Laser Light Scattering). Abreviaturas: DMSO: dimetilsulfóxido; EEBd: Extrato Etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia*.

Os resultados mostraram que as características físico-químicas dos lipossomas, contendo o EEBd e o ácido cafeico, ficaram adequadas para a utilização em meio biológico uma vez que as vesículas apresentaram um baixo diâmetro, uma distribuição de tamanho homogênea (caracterizada pelo baixo índice de polidispersão) e uma carga superficial neutra (caracterizada pelo baixo valor do potencial zeta).

De posse destes resultados foram iniciados os ensaios de avaliação da

atividade antioxidante dos lipossomas contendo o EEBd e o ácido cafeico sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos estimulados.

4.6.2 Avaliação da atividade antioxidante dos lipossomas contendo EEBd e ácido cafeico sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos: ensaios de QL

Depois de preparar os lipossomas com características físico-químicas adequadas para utilização em meio biológico, as preparações foram diluídas de forma que as concentrações dos compostos incorporados ficassem próximas das concentrações dos compostos livres utilizadas nos ensaios de QL. Foram então realizados os ensaios de QL nas mesmas condições utilizadas para o EEBd e o ácido cafeico livres. Como controles dos ensaios foram utilizados os lipossomas preparados com o solvente das amostras, os quais não apresentaram atividade inibitória da QL.

4.6.2-1 Atividade antioxidante dos lipossomas contendo EEBd

Foi avaliado o efeito dos lipossomas, contendo o EEBd, sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos através dos ensaios de QLlum e QLLuc (**Figura 31**).

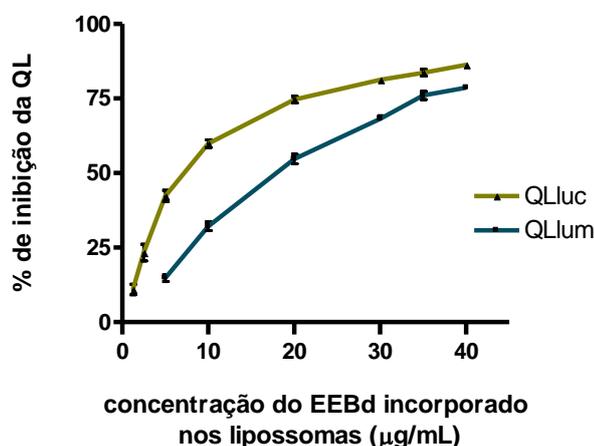


Figura 31: Efeito inibitório de diferentes concentrações do EEBd incorporados em lipossomas sobre a QLLuc e a QLlum, produzida por neutrófilos humanos (1×10^6 células/mL) estimulados com 1 mg de zimosan opsonizado. Os lipossomas contendo apenas o solvente do extrato (DMSO) foram empregados como controle. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de seis experimentos realizados em duplicata. Abreviaturas: QL: quimioluminescência; QLlum: quimioluminescência dependente de luminol; QLLuc: quimioluminescência dependente de lucigenina; DMSO: dimetilsulfóxido; EEBd: Extrato Etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia*.

Através dos resultados de porcentagem de inibição, foram calculados os valores de CI_{50} do EEBd incorporado para a QLLum e para a QLLuc, sendo estes valores de $16,38 \pm 1,4$ e $6,35 \pm 1,2$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Quando estes valores são comparados com os CI_{50} do EEBd livre ($14,18 \pm 1,4$ $\mu\text{g/mL}$ para QLLum e $6,38 \pm 1,4$ $\mu\text{g/mL}$ para QLLuc – Apêndice A) constatou-se que, para a QLLum, houve uma pequena redução da atividade antioxidante, o que não ocorreu com a QLLuc (**Figura 32**).

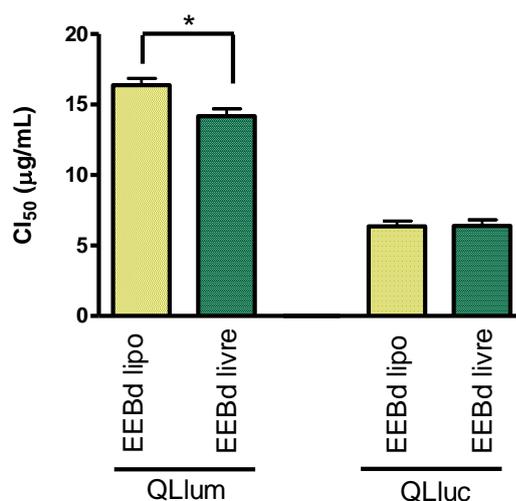


Figura 32: Comparação entre os valores de CI_{50} (concentração capaz de inibir 50% da QL) do EEBd nas formas livres e incorporados em lipossomas, sobre a QLLum e a QLLuc produzida por neutrófilos humanos (1×10^6 células/mL), estimulados com 1 mg de zimosan opsonizado. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de cinco experimentos realizados em duplicata. Abreviaturas: QL: quimioluminescência; QLLum: quimioluminescência dependente de luminol; QLLuc: quimioluminescência dependente de lucigenina; EEBd: Extrato Etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia*. Análise estatística: *amostras estatisticamente diferentes, ANOVA seguido de Bonferroni's Multiple Comparison Test ($p < 0,05$).

4.6.2-2 Atividade antioxidante dos lipossomas contendo ácido cafeico

Da mesma forma que para o EEBd, foi avaliado o efeito dos lipossomas contendo o ácido cafeico sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos, através dos ensaios de QLLum e QLLuc (**Figura 33**).

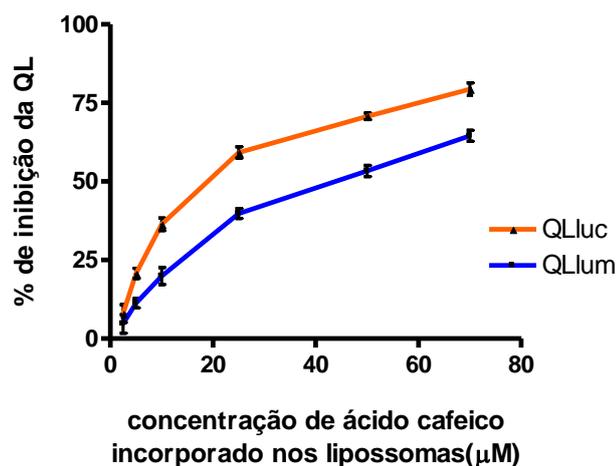


Figura 33: Efeito inibitório de diferentes concentrações de ácido cafeico incorporados em lipossomas sobre a QLluc e a QLlum produzida por neutrófilos humanos (1×10^6 células/mL), estimulados com 1 mg de zimosan opsonizado. Os lipossomas contendo apenas o solvente do extrato (DMSO) foram empregados como controle. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de seis experimentos realizados em duplicata. Abreviaturas: QL: quimioluminescência; QLlum: quimioluminescência dependente de luminol; QLluc: quimioluminescência dependente de lucigenina; DMSO: dimetilsulfóxido.

Com os resultados de porcentagem de inibição foram calculados os valores de CI_{50} (concentração que inibe 50 % da QL) iguais a $37,33 \pm 7,1 \mu\text{M}$ (ou $6,73 \pm 1,3 \mu\text{g/mL}$) para QLlum e $16,14 \pm 3,4 \mu\text{M}$ (ou $2,91 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$) para QLluc. Estes resultados mostraram que valores de CI_{50} para os lipossomas contendo o ácido cafeico foram muito próximos aos valores de CI_{50} de QLlum e QLluc do composto livre, os quais foram de $38,18 \pm 9,5 \mu\text{M}$ (ou $6,88 \pm 1,7 \mu\text{g/mL}$) para QLlum e $18,08 \pm 6,4 \mu\text{M}$ (ou $3,26 \pm 1,1 \mu\text{g/mL}$) para QLluc, indicando que a incorporação do ácido cafeico nas vesículas lipossômicas não alterou sua atividade antioxidante frente aos neutrófilos estimulados (**Figura 34**).

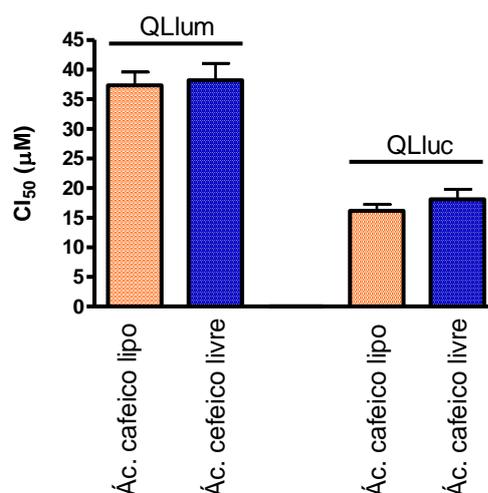


Figura 34: Comparação entre os valores de CI_{50} (concentração capaz de inibir 50% da QL) do ácido cafeico nas formas livres e incorporados em lipossomas, sobre a QLLum e a QLLuc produzida por neutrófilos humanos (1×10^6 células/mL), estimulados com 1 mg de zimosan opsonizado. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de cinco experimentos realizados em duplicata. Abreviaturas: QL: quimioluminescência; QLLum: quimioluminescência dependente de luminol; QLLuc: quimioluminescência dependente de lucigenina; Ác. cafeico lipo: ácido cafeico incorporado em lipossomas. Análise estatística: não houve diferença significativa entre as amostras de QLLum e de QLLuc, ANOVA seguido de Bonferroni's Multiple Comparison Test ($p > 0,05$).

4.7 Efeito terapêutico do EEBd e do ácido cafeico em modelo animal de artrite

Após a verificação das atividades antioxidantes do EEBd e do ácido cafeico (tanto nas formas livres como incorporados nos lipossomas) sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos, foram realizados ensaios com modelo animal para verificar se estes compostos podem apresentar algum efeito benéfico no processo inflamatório desenvolvido no quadro da artrite reumatoide.

Para isso, os animais receberam os tratamentos com as amostras ou controles e, após 1 hora, foi induzida a artrite. Depois de 6 horas os animais foram eutanasiados, foi medido o edema das articulações e o líquido sinovial foi coletado para análise dos parâmetros inflamatórios: presença de células totais e de neutrófilos, e presença das citocinas inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL1 β .

4.7.1 Efeito do EEBd e do ácido cafeico sobre o modelo animal de artrite

Neste ensaio, os animais foram tratados com 50 ou 100 mg/Kg de EEBd ou com 50 mg/Kg de ácido cafeico. Como controles desses ensaios alguns animais foram tratados apenas com o solvente das amostras (DMSO) ou com a droga padrão (dexametasona 4 mg/Kg). Após 6 horas da indução da artrite foram analisados os parâmetros inflamatórios dos animais. Os resultados a seguir mostram o edema desenvolvido nas articulações (**Figura 35**) e a quantidade de células totais e de neutrófilos presentes na sinóvia (**Figura 36**).

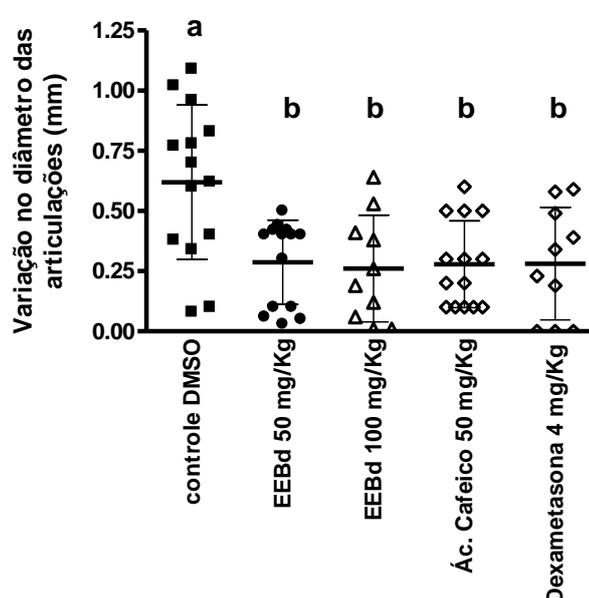


Figura 35: Variação no diâmetro das articulações dos animais tratados com os diferentes compostos. Os diâmetros das articulações foram medidos antes e após seis horas da indução da artrite com 300 μ g de zimosan. Resultados expressos como média \pm desvio padrão. Cada ponto do gráfico representa a medida de uma articulação. Abreviaturas: DMSO: dimetilsulfóxido; EEBd: Extrato Etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia*. Análise estatística: amostras que não compartilham a mesma letra (a, b) são significativamente diferentes umas das outras; ANOVA seguido de Tukey's Multiple Comparison test ($p < 0,05$).

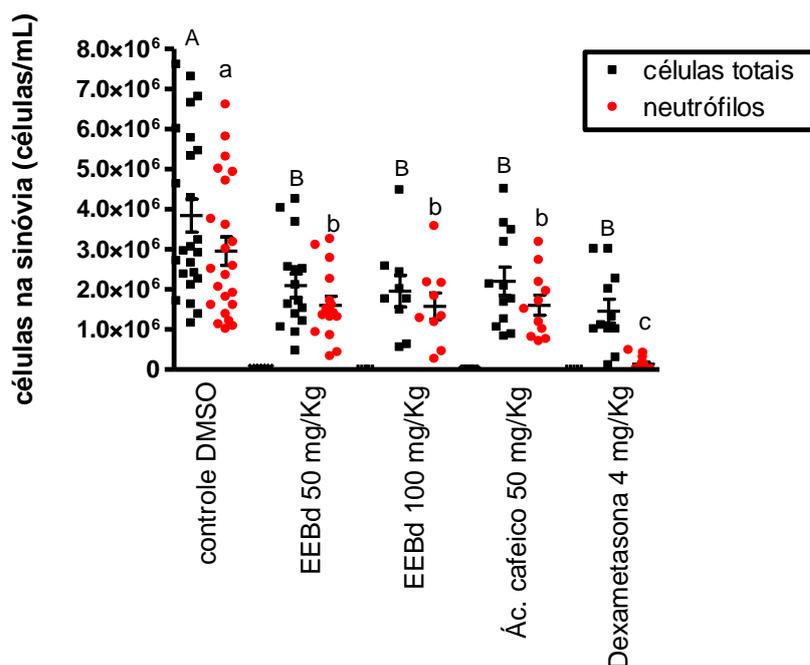


Figura 36: Migração de células totais e de neutrófilos para o local da inflamação (sinóvia) 6 horas após a indução da artrite com 300 µg de zimosan. Resultados expressos como média \pm desvio padrão. Cada ponto do gráfico representa a quantidade de células de uma articulação. Abreviaturas: DMSO: dimetilsulfóxido; EEBd: Extrato Etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia*. Análise estatística: amostras que não compartilham a mesma letra (a, b, c / A, B) são significativamente diferentes umas das outras, sendo as letras maiúsculas referentes às células totais enquanto as letras minúsculas são referentes aos neutrófilos; ANOVA seguido de Tukey's Multiple Comparison test ($p < 0,05$).

Pode-se verificar que todos os tratamentos reduziram, de forma significativa, tanto o edema das articulações dos animais quanto a migração de células totais e de neutrófilos para a sinóvia e que tanto o EEBd (nas diferentes concentrações) quanto o ácido cafeico apresentaram efeitos semelhantes entre si e semelhantes à droga padrão, com exceção da migração de neutrófilos, em que a dexametasona apresentou uma inibição mais acentuada em relação a todas as amostras.

Além desses parâmetros, também foi analisada a presença das citocinas inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL1- β no líquido sinovial dos animais (**Figura 37**).

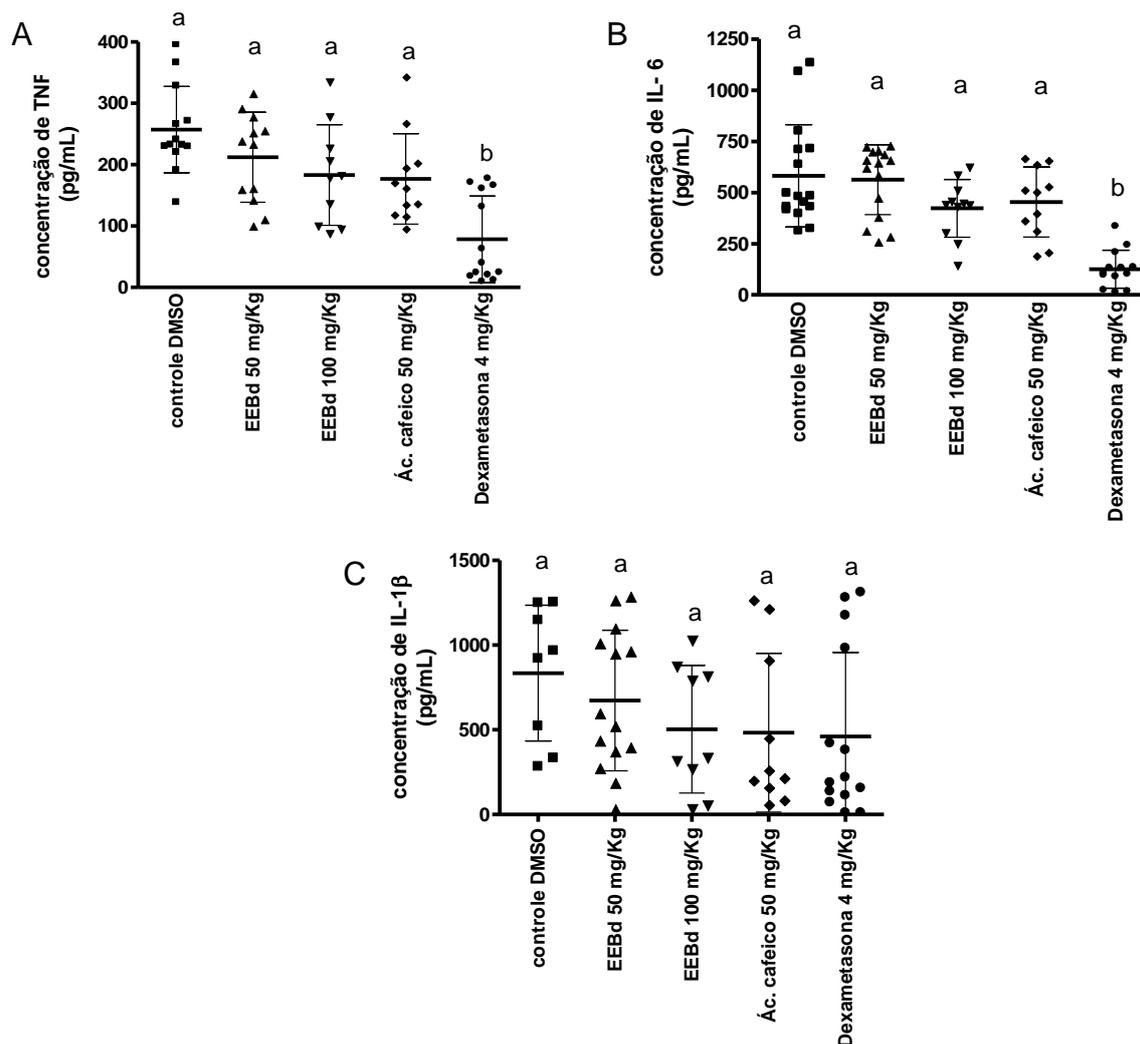


Figura 37: Concentração das citocinas inflamatórias A) TNF- α , B) IL-6 e C) IL1- β , presentes no líquido sinovial dos animais tratados com os diferentes compostos seis horas após a indução da artrite com 300 μ g de zimosan. Resultados expressos como média \pm desvio padrão. Cada ponto do gráfico representa a concentração de citocina em uma articulação. Abreviaturas: DMSO: dimetilsulfóxido; EEBd: Extrato Etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia*. Análise estatística: amostras que não compartilham a mesma letra (a, b) são significativamente diferentes umas das outras. ANOVA seguido de Tukey's Multiple Comparison test ($p < 0,01$).

Os resultados mostraram que, embora não se tenha verificado uma diferença estatística entre o controle do solvente e as amostras, é possível observar um efeito biológico das amostras em reduzir as citocinas inflamatórias presentes no líquido sinovial dos animais. Além disso, verifica-se que essa tendência de redução aumenta com o aumento da concentração do EEBd e que o ácido cafeico parece ter um efeito bastante semelhante ao do EEBd na concentração de 100 mg/Kg.

4.7.2 Efeito do EEBd e do ácido cafeico incorporados em lipossomas sobre o modelo animal de artrite

Após verificar o efeito do EEBd e do ácido cafeico livres no modelo animal de artrite, foi averiguado se a incorporação em lipossomas poderia aumentar a eficácia desses compostos na redução do processo inflamatório desenvolvido neste modelo.

Para isso, os animais foram tratados com 9 mg/Kg de EEBd ou com 3,0 mg/Kg de ácido cafeico incorporados nos lipossomas. Como controles desses ensaios alguns animais foram tratados apenas com o meio dos lipossomas (salina), com lipossomas contendo apenas o solvente das amostras (DMSO) e com lipossomas contendo quercetina (1,5 mg/Kg). Após 6 horas da indução da artrite, foram analisados os parâmetros inflamatórios dos animais. A **Figura 38** demonstra o edema desenvolvido nas articulações dos animais tratados e dos animais controles, enquanto a **Figura 39** exhibe a quantidade de células totais e de neutrófilos que migraram para a sinóvia desses animais.

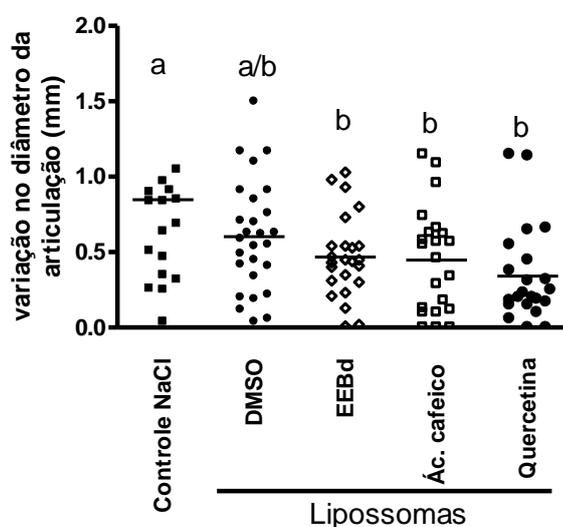


Figura 38: Variação no diâmetro das articulações dos animais tratados com controles e com diferentes compostos incorporados nos lipossomas (EEBd 9,0 mg/Kg, Ácido cafeico 3,0 mg/Kg e Quercetina 1,5 mg/Kg). Os diâmetros foram medidos antes e após seis horas da indução da artrite com 300 µg de zimosan. Resultados expressos como média dos valores. Cada ponto do gráfico representa a medida de uma articulação. Abreviaturas: DMSO: dimetilsulfóxido; EEBd: Extrato Etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia*. Análise estatística: amostras que não compartilham a mesma letra (a, b) são significativamente diferentes umas das outras. ANOVA seguido de Tukey's Multiple Comparison test ($p < 0,05$).

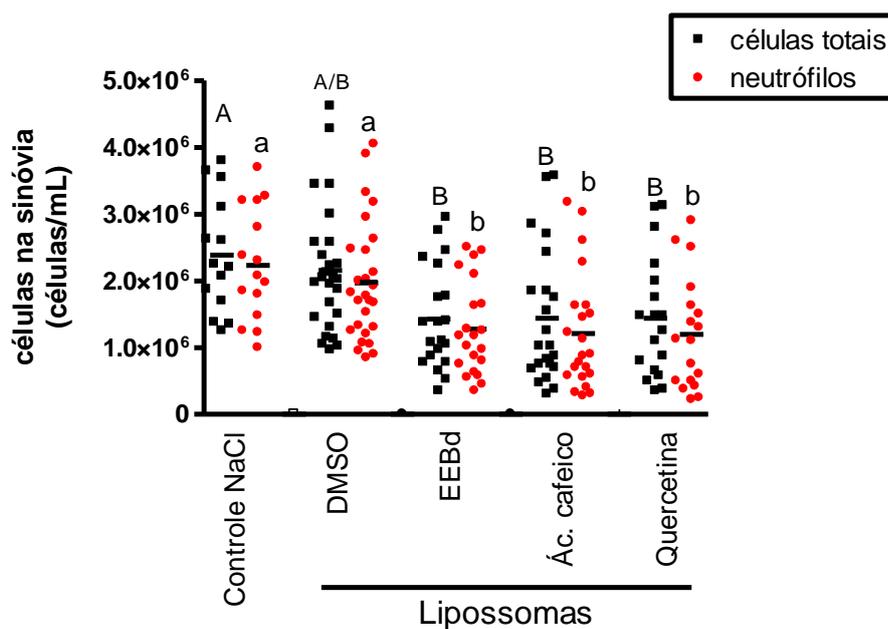


Figura 39: Migração de células totais e de neutrófilos para o local da inflamação (sinóvia) dos animais tratados com os controles e com os diferentes compostos incorporados nos lipossomas (EEbD 9,0 mg/Kg, Ácido cafeico 3,0 mg/Kg e Quercetina 1,5 mg/Kg). A análise foi realizada 6 horas após a indução da artrite com 300 µg de zimosan. Abreviaturas: DMSO: dimetilsulfóxido; EEbD: Extrato Etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia*. Resultados expressos como média ± desvio padrão. Análise estatística: amostras que não compartilham a mesma letra (a, b) são significativamente diferentes umas das outras. ANOVA seguido de Tukey's Multiple Comparison test ($p < 0,05$).

Os resultados mostram que o tratamento dos animais com o EEbD e com o ácido cafeico conseguiram reduzir o edema nas articulações dos animais em relação aos animais tratados apenas com solução fisiológica. Além disso, não houve diferença significativa entre o EEbD, o ácido cafeico e o padrão de quercetina.

Em relação à migração de células para o local da inflamação, nota-se que a grande maioria das células presentes no líquido sinovial após o desenvolvimento da inflamação são neutrófilos. Além disso, todas as amostras avaliadas foram capazes de reduzir a migração dos neutrófilos em relação aos controles (salina e lipossoma contendo o solvente).

Também foram analisadas as quantidades de citocinas inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL1- β , presentes no líquido sinovial dos animais após a indução da artrite (**Figura 40**) e observou-se que não houve redução das citocinas inflamatórias por nenhum dos compostos incorporados nos lipossomas.

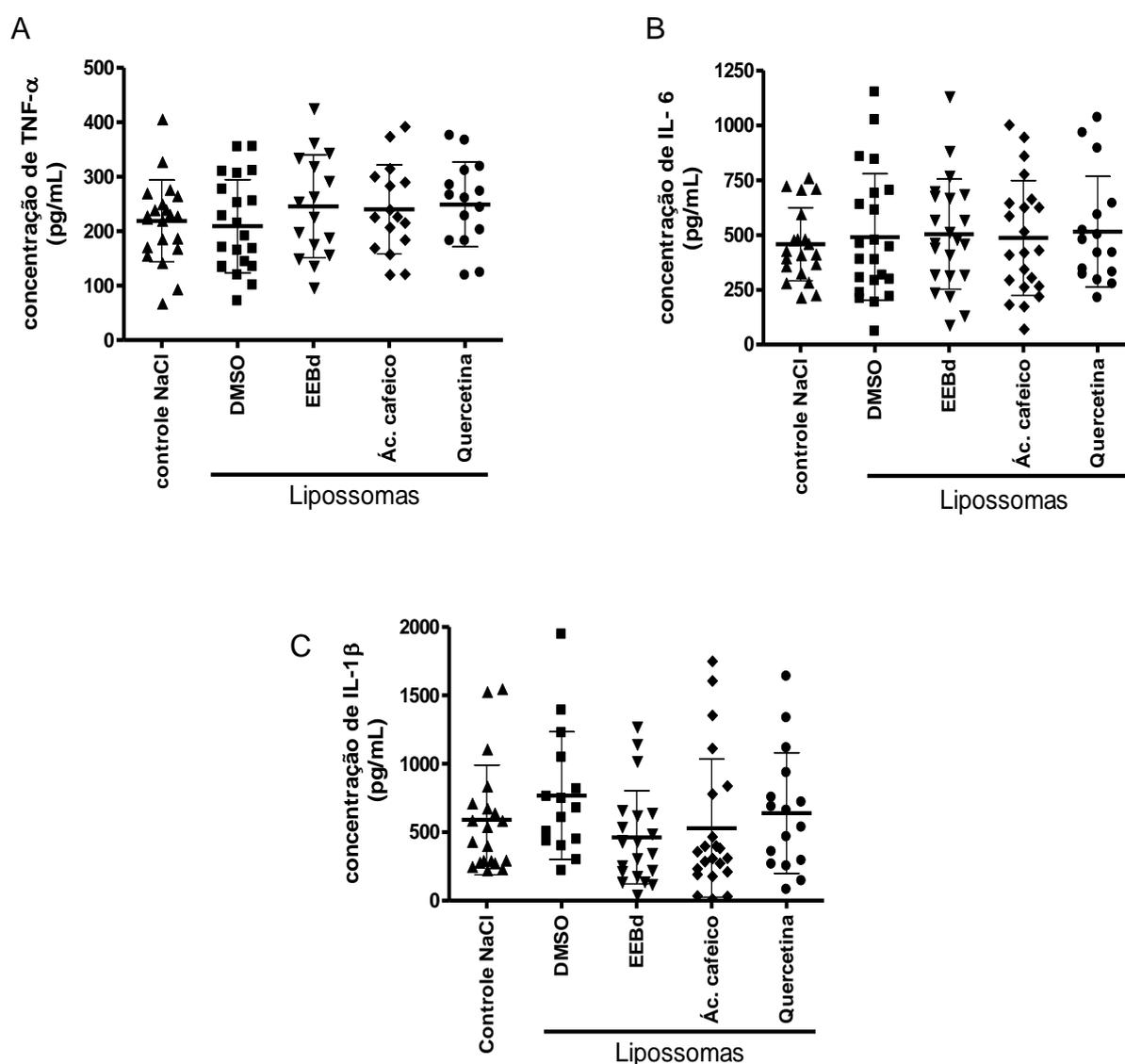


Figura 40: Concentração das citocinas inflamatórias A- TNF- α , B- IL-6 e C- IL1- β , presentes no líquido sinovial dos animais tratados com os diferentes compostos incorporados nos lipossomas (EEBd 9,0 mg/Kg, Ácido cafeico 3,0 mg/Kg e Quercetina 1,5 mg/Kg). A análise foi realizada seis horas após a indução da artrite com 300 μ g de zimosan. Resultados expressos como média \pm desvio padrão. Cada ponto do gráfico representa a concentração de citocina em uma articulação. Abreviaturas: DMSO: dimetilsulfóxido; EEBd: Extrato Etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia*. Análise estatística: não houve diferença significativa entre as amostras; ANOVA seguido de Tukey's Multiple Comparison test ($p > 0,05$).

5. Discussão

Os neutrófilos são células dotadas de um grande número de moléculas tóxicas que são mobilizadas em respostas imunes, principalmente no combate a infecções. Nos seres humanos, uma ausência total destas células ou uma redução significativa no seu número conduz à morte ou a imunodeficiências severas, o que ressalta a importância destas células na defesa imunológica (Kolaczkowska; Kubes, 2013; Bardoel et al., 2014).

Embora o recrutamento de neutrófilos, durante uma infecção, seja essencial para a proteção do organismo, estas células nem sempre agem de forma benéfica para o hospedeiro, uma vez que a ativação inadequada ou excessiva de neutrófilos resulta na intensa liberação de ERO, proteases e proteínas antimicrobianas que podem causar danos nos tecidos do hospedeiro, podendo agravar e até causar doenças autoimunes e inflamatórias (Amulic et al., 2012; Kolaczkowska; Kubes, 2013; Bardoel et al., 2014). Portanto, a inibição da ativação anormal dos neutrófilos e da produção excessiva de ERO pode fornecer uma possível abordagem terapêutica para estas doenças (Liao et al., 2015).

Neste contexto, os produtos naturais têm recebido grande destaque nos últimos anos, uma vez que diversos estudos têm buscado substâncias naturais com efeito sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos (Simões et al., 2004; Zekonis et al., 2008; Amaral et al., 2009; Paula et al., 2009; Simões-Ambrosio et al., 2010; Andrade et al., 2013; Barioni et al., 2013; Figueiredo-Rinhel et al., 2013; Flores et al., 2013; Kabeya et al., 2013; Denev et al., 2014; Figueiredo-Rinhel et al., 2014; Ren et al., 2014; Santos et al., 2014; Wang et al., 2014; Wickramasinghe et al., 2014; Liao et al., 2015).

Dentre os produtos naturais estudados, o extrato de *Baccharis dracunculifolia* tem se mostrado um bom candidato a agente terapêutico nas doenças que envolvem a ativação excessiva dos neutrófilos, uma vez que estudos prévios revelaram que o extrato etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia* (EEBd) possui expressiva atividade antioxidante sobre o metabolismo oxidativo destas células (Figueiredo-Rinhel et al., 2013).

A partir da verificação de que o EEBd é capaz de modular negativamente a quantidade de ERO produzida pelos neutrófilos, este trabalho avaliou se este extrato também poderia interferir em outras funções do neutrófilo, essenciais para a célula desempenhar suas funções de proteção do nosso organismo, como a fagocitose, a desgranulação, o efeito sobre enzimas chaves do metabolismo oxidativo e a atividade microbicida.

Os resultados obtidos mostraram que a incubação dos neutrófilos com o EEBd não alterou, nas condições experimentais avaliadas, a capacidade das células de reconhecer e englobar as partículas opsonizadas (Figuras 6, 7 e 8), não comprometendo portanto o processo de fagocitose destas células e que representa uma das primeiras etapas envolvidas na defesa do nosso organismo contra os micro-organismos invasores. Contrariamente, alguns produtos naturais embora sejam capazes de modular o metabolismo oxidativo dos neutrófilos também inibem o processo de fagocitose destas células, podendo comprometer as funções defensivas dos mesmos e afetar a saúde do hospedeiro (Lee et al., 2014; Wickramasinghe et al., 2014).

Após fagocitar os agentes invasores, as células mobilizam seus grânulos em direção ao fagossoma formado, a fim de descarregar seus conteúdos e destruir o patógeno (Amulic et al., 2012). Para verificar se o EEBd poderia interferir na etapa de desgranulação, foi avaliado o efeito do extrato sobre as atividades das enzimas elastase e lisozima, sendo a primeira encontrada especificamente nos grânulos azurófilos e a segunda em praticamente todos os grânulos dos neutrófilos, com maiores concentrações nos grânulos específicos (Faurischou; Borregaard, 2003). Além disso, também foram realizados estudos para verificar se o EEBd poderia interferir diretamente na atividade das enzimas já liberadas no meio.

Os resultados mostraram que, para a enzima elastase, houve uma inibição da atividade de forma dependente da concentração, sendo necessária uma concentração menor de extrato para inibir a atividade da enzima liberada pelas células ($CI_{50}^{\text{elastase liberada}} = 25,87 \pm 4,14 \mu\text{g/mL}$) do que para inibir a sua atividade quando presente no meio extracelular ($CI_{50}^{\text{atividade elastase}} = 34,34 \pm 3,50 \mu\text{g/mL}$), sugerindo que, além de interferir no processo da desgranulação, o EEBd, em maiores concentrações, também é capaz de reduzir a atividade da elastase presente no meio extracelular.

Apesar de a elastase ser considerada uma enzima importante no processo de morte dos micro-organismos fagocitados (Belaouaj et al., 1998), ela é a principal protease envolvida na degradação da matriz extracelular mediada por neutrófilos e está envolvida em várias doenças inflamatórias (incluindo a doença pulmonar obstrutiva crônica, enfisema pulmonar e artrite) (Heinz et al., 2012). Então, a modulação da atividade desta enzima no meio extracelular, seja através de redução na sua desgranulação ou através de ação sobre a própria enzima, representa um alvo

interessante para o desenvolvimento de fármacos que controlem o processo inflamatório em doenças autoimunes (Simard et al., 2010; Tsai et al., 2015).

Já para a enzima lisozima, foi observada também uma inibição da atividade de forma dependente da concentração, porém os perfis de inibição tanto da atividade da enzima liberada pelas células ($CI_{50}^{\text{lisozima liberada}} = 82,82 \pm 7,99 \mu\text{g/mL}$) quanto da atividade da enzima isolada ($CI_{50}^{\text{atividade lisozima}} = 83,85 \pm 10,91 \mu\text{g/mL}$) foram bastante semelhantes, indicando que o EEBd provavelmente não está interferindo no seu processo de desgranulação. Além disso, os altos valores de CI_{50} mostram que o EEBd apresentou um efeito muito pequeno sobre a atividade catalítica da lisozima, o que é bastante satisfatório uma vez que a atividade antimicrobiana é sua função principal nas células (Faurischou; Borregaard, 2003).

Contudo, observa-se que, apesar do EEBd ter apresentado um efeito inibitório maior sobre a enzima elastase (menores valores de CI_{50}), a inibição significativa da atividade de ambas as enzimas liberadas pelos neutrófilos (acima de $20 \mu\text{g/mL}$ para elastase e acima de $25 \mu\text{g/mL}$ para a lisozima) ocorre em concentrações acima das concentrações necessárias para modular o metabolismo oxidativo dos neutrófilos ($CI_{50}^{\text{QLlum}} = 14,18 \pm 1,4 \mu\text{g/mL}$ e $CI_{50}^{\text{QLiuc}} = 6,38 \pm 1,4 \mu\text{g/mL}$). Desta forma, embora concentrações mais elevadas do EEBd possam ser utilizadas para inibir a atividade da enzima elastase em processos inflamatórios, concentrações do EEBd próximas dos CI_{50}^{QL} são capazes de modular o metabolismo oxidativo dos neutrófilos, sem interferir de forma significativa nos processos de desgranulação e nas atividades das enzimas elastase e lisozima liberadas na matriz extracelular.

Durante o processo de desgranulação, juntamente com a fusão dos grânulos com as membranas plasmática e do fagossoma e liberação de seus conteúdos, ocorre a montagem e ativação da enzima NADPH oxidase, iniciando-se também a produção das ERO (Amulic et al., 2012). Após verificar, em estudo prévio, que o EEBd não interfere de forma significativa na atividade da enzima NADPH oxidase nas concentrações próximas do CI_{50}^{QL} , tendo um valor de CI_{50}^{NADPHox} acima de $80 \mu\text{g/mL}$ (Figueiredo, 2010), este trabalho avaliou se o extrato possuía algum efeito sobre a mieloperoxidase, considerada a segunda enzima-chave do metabolismo oxidativo dos neutrófilos.

A mieloperoxidase é liberada dos grânulos azurófilos e tem como principal reação a conversão de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ao ácido hipocloroso (HOCl), que é considerado o oxidante microbicida mais forte produzido pelos neutrófilos.

Além de reagir com as bactérias ingeridas, grande parte do HOCl formado também reage com moléculas presentes no meio reacional (Klebanoff et al., 2013; Winterbourn; Kettle, 2013). A taurina (ácido 2-aminoetanosulfônico) é um dos aminoácidos livres mais abundantes em humanos, atingindo concentrações muito altas nos tecidos expostos a níveis elevados de oxidantes. No local da inflamação, o HOCl formado pela MPO, além de reagir com os micro-organismos, pode reagir com a taurina presente no meio e produzir a taurina cloramina (taurina-Cl), que é mais estável e menos tóxica (Marcinkiewicz; Kontny, 2014).

Para avaliar o efeito do EEBd sobre a enzima mieloperoxidase, este foi incubado com as células em um meio enriquecido com taurina e, após estimulação, foi avaliada de forma indireta a produção do HOCl (através da oxidação do TMB pela taurina-Cl formada no meio). Os resultados mostraram que o EEBd inibiu a oxidação do TMB de forma dependente da concentração, indicando que o EEBd poderia estar interferindo na MPO das células de forma a reduzir a formação do HOCl e de seus derivados ($CI_{50}^{MPO} = 26,64 \pm 3,24 \mu\text{g/mL}$). Contudo, além de poder atuar sobre a enzima MPO, o EEBd também poderia estar atuando sobre o HOCl produzido pela enzima ou sobre a taurina-Cl formada no meio, não permitindo que fosse realizada a oxidação do TMB. Para verificar se o extrato possuía ação sequestradora do HOCl ou da taurina-Cl, além dos ensaios com células, o EEBd também foi incubado apenas com HOCl ou com taurina-Cl e posteriormente foi avaliada a capacidade destes compostos de oxidar o TMB. Estes resultados revelaram que o EEBd foi capaz de sequestrar tanto o HOCl quanto a taurina-Cl ($CI_{50}^{HOCl} = 4,0 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ e $CI_{50}^{tau-Cl} = 12,78 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$) e os baixos valores de CI_{50} indicaram que o EEBd possui uma elevada atividade “scavenger” sobre esses compostos. Quando se compara os valores de CI_{50}^{HOCl} e de CI_{50}^{tau-Cl} ao CI_{50}^{MPO} pode-se inferir que grande parte da atividade inibitória verificada na oxidação do TMB, nos ensaios com células, pode ser atribuída ao sequestro dos intermediários da reação pelo EEBd. Os resultados obtidos não permitem afirmar que o EEBd tenha algum efeito inibitório sobre a enzima MPO, pois a atividade “scavenger” do extrato sobre o HOCl e sobre a taurina-Cl foram muito mais expressivos que a atividade apresentada nos ensaios com as células.

De acordo com o exposto, pode-se considerar que o efeito inibitório do EEBd sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos pode ser devido principalmente à sua atividade “scavenger”, uma vez que nas concentrações próximas dos CI_{50}^{QL} , o EEBd, além de apresentar uma grande atividade “scavenger” sobre o HOCl, parece

não possuir efeito inibitório sobre as duas enzimas-chaves envolvidas no metabolismo oxidativo dos neutrófilos.

Após verificar que provavelmente a atividade antioxidante do EEBd sobre os neutrófilos foi mediada principalmente pelo efeito “scavenger” de ERO, este trabalho também avaliou se a redução dessas ERO durante o metabolismo oxidativo dos neutrófilos (verificada nos ensaios de QL) teria alguma influência na capacidade de destruir os micro-organismos fagocitados. Isso foi realizado porque nos últimos 50 anos a produção de ERO pelos fagócitos tem sido apontada como um dos principais agentes responsáveis pela morte de patógenos (Dupre-Crochet et al., 2013). De fato, as ERO podem matar diretamente os patógenos (causando dano oxidativo aos biocompostos), ou de forma indireta estimulando a eliminação de patógenos por vários mecanismos não oxidativos (agindo como agentes sinalizadores, como por exemplo, na liberação das NETs e modulando diretamente a fagocitose) (Vernon; Tang, 2013; Paiva; Bozza, 2014).

Então, foi averiguado se o EEBd poderia interferir na atividade microbicida dos neutrófilos frente à *Candida albicans*.

Infecções causadas pela *C. albicans* têm uma alta taxa de incidência e várias manifestações clínicas, podendo afetar a pele, cavidade oral e do esôfago, trato gastrointestinal, vagina e sistema vascular do ser humano. A transformação da levedura de comensal a importante agente de infecções ocorre principalmente em pacientes imunocomprometidos e com câncer, nos quais pode provocar doença grave (Dimitrova et al., 2012).

Dentro deste contexto, os neutrófilos foram incubados com diferentes concentrações do EEBd, adicionados em um meio contendo *C. albicans* e, em seguida, foi avaliada a viabilidade das leveduras. Os resultados mostraram que a porcentagem de morte do fungo foi diminuída com o aumento da concentração do extrato, sendo que na concentração de 50 µg/mL (concentração máxima utilizadas nos ensaios de QL) houve uma inibição significativa na capacidade das células de matar a *C. albicans* (Figura 24). Uma vez que, nos ensaios de QL, observou-se que a concentração de 50 µg/mL foi capaz de reduzir em cerca de 80% as ERO presentes no meio (Apêndice A), estes resultados ressaltam a importância das ERO no processo de morte deste micro-organismo. Tal importância também pode ser observada quando os neutrófilos foram previamente incubados com DPI 1 µM, um inibidor irreversível do complexo enzimático da NADPH oxidase, provocando uma

ampla inibição da formação das ERO e reduzindo significativamente a porcentagem de morte do patógeno. Os resultados obtidos estão de acordo com diversos trabalhos da literatura que relatam que, de fato, as ERO são muito importantes para a atividade antimicrobiana de neutrófilos frente a alguns patógenos, o que fica bastante evidente em pacientes com doença granulomatosa crônica (com deficiências na enzima NADPH oxidase) cujos neutrófilos possuem dificuldade de matar os micro-organismos, tornando estes pacientes suscetíveis a muitas infecções (Amulic et al., 2012).

Em relação à *C. albicans*, pesquisas relatam que neutrófilos deficientes em MPO exibem uma grande redução na capacidade de matar esta levedura (Klebanoff et al., 2013), e em um estudo, as células deficientes em MPO foram capazes de matar apenas 0,1% das *C. albicans* sob as mesmas condições nas quais os neutrófilos normais mataram 30% (Lehrer; Cline, 1969). Visto que as cepas de *C. albicans* são altamente susceptíveis à presença das ERO formadas pelos neutrófilos (Paiva; Bozza, 2014), a intensa redução dessas ERO pelo EEBd na concentração de 50 µg/mL, foi capaz de reduzir a atividade microbicida das células. Contudo, na concentração de 10 µg/mL (concentração próxima ao CI_{50}^{QL}) o EEBd não apresentou redução significativa nesta capacidade das células, não afetando portanto a sua atividade microbicida frente a este micro-organismo.

Este estudo também verificou se, nas condições experimentais utilizadas, o extrato poderia ter algum efeito tóxico diretamente sobre a *C. albicans*, uma vez que há relatos na literatura mostrando que a *Baccharis dracunculifolia* possui atividade fungicida (da Silva Filho et al., 2008; Johann et al., 2010; Pereira et al., 2011; Johann et al., 2012). Porém, os resultados mostraram que, nas condições utilizadas nos ensaios, o EEBd não interferiu na viabilidade da *C. albicans* (Figura 23), mostrando que toda a atividade microbicida observada nos ensaios foi devido à ação das células sobre a levedura.

Desta forma, todos os resultados obtidos até o momento satisfazem o pressuposto por Nathan (2006), que relata que uma estratégia terapêutica interessante para o controle do processo inflamatório mediado por neutrófilos é a inibição parcial do seu metabolismo oxidativo, de forma que a capacidade de geração das ERO e a atividade microbicida da célula não sejam comprometidas. Ainda, segundo esse autor, a inibição total do metabolismo oxidativo levaria à imunossupressão e ao consequente aumento da susceptibilidade do hospedeiro a infecções.

Depois de verificar que o EEBd foi capaz de modular o metabolismo oxidativo dos neutrófilos sem afetar de forma significativa diversas funções essenciais para a defesa do organismo, foram avaliadas as atividades antioxidantes de alguns compostos isolados do EEBd para tentar propor alguns marcadores químicos para este extrato.

A identificação de marcadores químicos é importante uma vez que as plantas contêm várias centenas de constituintes e vários fatores podem provocar a variação destes constituintes, prejudicando a ação biológica da planta e o controle de agentes fitoterápicos de qualidade (Calixto, 2000). A definição de marcadores químicos é, portanto, indispensável para validação de plantas medicinais, para usos populares mais seguros e para testes de qualidade e integridade de fitoterápicos, visando garantir o efeito terapêutico desejado (Bessa et al., 2013). Contudo, nos casos em que os princípios ativos das plantas não são conhecidos, geralmente é(são) estabelecida(s) substância(s) marcadora(s) apenas para fins analíticos e, na maioria dos casos, estes marcadores nunca foram testados para saber se realmente representam a ação terapêutica relatada para as plantas (Calixto, 2000).

Já foi constatado, em estudos prévios, que fatores sazonais alteram a concentração dos compostos presentes no extrato de *Baccharis dracunculifolia* e que estas alterações refletem em variações na atividade antioxidante deste extrato sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos (Figueiredo-Rinhel et al., 2013). A avaliação do efeito dos compostos isolados sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos foi realizada para tentar estimar a importância relativa destes compostos na atividade antioxidante total do extrato e, então, poder propor alguns marcadores químicos que representam esta atividade biológica. Para isso, foram avaliados os seguintes compostos conhecidamente presentes no extrato de *Baccharis dracunculifolia*: ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido cinâmico, aromadendrina-4'-metil éter (AME), isosacuranetina e hispidulina (de Sousa et al., 2011). A atividade antioxidante destes compostos foi avaliada por meio de ensaios de QLLum e QLLuc nas mesmas condições realizadas para o EEBd. Pelos resultados obtidos (Figuras 27 e 29) foi possível verificar que, tanto nos ensaios de QLLum quanto nos ensaios de QLLuc, os flavonoides AME, isosacuranetina e hispidulina apresentaram uma atividade antioxidante superior às encontradas pelos fenilpropanoides (ácidos cafeico, cumárico, ferúlico e cinâmico).

Apesar de os flavonoides estudados terem apresentado uma atividade antioxidante bastante expressiva e semelhante entre si, não é adequado generalizar

esta atividade biológica para toda a classe de flavonoides, pois já se observou que a quantidade de flavonoides totais presente no EEBd não está diretamente relacionada com a inibição da QLLum e da QLLuc produzida pelos neutrófilos estimulados (Figueiredo-Rinhel et al., 2013). Este mesmo estudo também verificou que, quando analisados separadamente, as concentrações dos flavonoides presentes no EEBd não apresentaram relação direta com as atividades antioxidantes apresentadas por estes extratos. Desta forma, não parece apropriado considerar nem a presença dos flavonoides totais, nem a presença de apenas um destes compostos como marcador químico para a atividade antioxidante do EEBd sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos.

Em relação aos fenilpropanoides, observou-se que, tanto nos ensaios de QLLum quanto nos ensaios de QLLuc, as atividades antioxidantes desses compostos estavam relacionadas à quantidade de hidroxilas livres presentes nas moléculas, evidenciando a importância deste grupo funcional para a atividade inibitória sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos. Dentre os compostos fenilpropanóides estudados, o ácido cafeico foi a amostra que apresentou a melhor atividade biológica.

Além disso, é importante ressaltar que estudos anteriores apontaram uma correlação positiva entre a quantidade relativa do ácido cafeico, presente em diferentes extratos de *Baccharis dracunculifolia*, e suas respectivas atividades antioxidantes sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados (Figueiredo-Rinhel et al., 2013). Estes fatos permitem considerar o ácido cafeico como um bom marcador químico para esta atividade biológica do EEBd.

Apesar de o EEBd apresentar um grande potencial para se tornar um agente terapêutico, é relatado que diversos extratos de plantas, apesar de terem excelente atividade biológica “in vitro”, demonstram menor ou nenhuma ação “in vivo”. Isto ocorre principalmente devido a baixa biodisponibilidade da maioria dos componentes biologicamente ativos de plantas, fazendo com que diversos extratos padronizados, com ações terapêuticas já estabelecidas, tenham suas utilidades clínicas limitadas. No entanto, verificou-se que a incorporação destes extratos em sistemas carreadores melhora substancialmente a biodisponibilidade de tais extratos e de seus constituintes individuais (Ajazuddin; Saraf, 2010).

Dentre os veículos carreadores conhecidos, os lipossomas, essencialmente biodegradáveis e não tóxicos, podem encapsular tanto compostos hidrofílicos quanto

anfífilos e lipofílicos, melhorando a biodisponibilidade e aumentando a segurança e a eficiência de diversas formulações fitoterápicas (Ajazuddin; Saraf, 2010).

A partir destas observações, este estudo realizou a incorporação do EEBd e do ácido cafeico (possível marcador químico do EEBd) em sistemas carreadores lipossômicos na tentativa de melhorar a solubilidade dos componentes e de protegê-los da degradação. Estes fatores são de extrema importância principalmente quando pensamos na administração “in vivo” do EEBd, pois os lipossomas podem favorecer a absorção dos componentes do EEBd e protegê-los da metabolização, reduzindo possíveis problemas de biodisponibilidade e possibilitando que os compostos atinjam o local de ação e atuem com mais eficiência no organismo (Ajazuddin; Saraf, 2010).

Depois de realizada a incorporação dos compostos, foi feita a caracterização físico-química dos lipossomas formados. Os resultados mostraram (Tabela 2) que as características físico-químicas dos lipossomas, contendo tanto o EEBd quanto o ácido cafeico, são adequadas para a utilização em meio biológico, uma vez que as vesículas apresentaram um baixo diâmetro (abaixo de 800 nm), uma distribuição de tamanho homogênea (caracterizada pelo baixo índice de polidispersão) e uma carga superficial neutra (caracterizada pelo baixo valor do potencial zeta). Tais parâmetros aumentam o tempo de permanência dos lipossomas na circulação sanguínea, uma vez que, nestas condições, há um menor reconhecimento das vesículas pelo sistema imunológico e uma menor depuração dos lipossomas, permitindo que o carreador atinja o sítio de ação desejado (Devine; Bradley, 1998; Huong et al., 2001; Landi-Librandi et al., 2012a).

Além disso, foi verificado, também, que as atividades antioxidantes do EEBd e do ácido cafeico, incorporados nos lipossomas, sobre o metabolismo dos neutrófilos foram semelhantes àquelas apresentadas pelos compostos na forma livre (Figuras 32 e 34).

Após a realização dos ensaios “in vitro” para avaliar o efeito do EEBd sobre as funções efectoras e sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos, observou-se que o EEBd possuía um grande potencial para ser utilizado em processos inflamatórios que envolvem a estimulação exacerbada dessas células. Para legitimar esta hipótese foram realizados ensaios “in vivo” em modelo animal de artrite, uma vez que diversos estudos mostram que os neutrófilos são as células predominantes na sinóvia desta artropatia inflamatória (Bezerra et al., 2007; Carlos et al., 2014).

A artrite reumatoide (AR) é uma doença articular inflamatória bastante comum que afeta um grande número de pessoas em todo o mundo. Diversos estudos têm

destacado a contribuição de neutrófilos na fisiopatologia das primeiras fases desta doença (Cascao et al., 2010; Kundu et al., 2012). Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes presentes no fluido sinovial de pacientes com AR, sendo que a mobilização dessas células é mediada por diversas citocinas (Amulic et al., 2012; Carlos et al., 2014). Uma vez na articulação, a ativação dessas células provoca a liberação de citocinas pró-inflamatórias, além de substâncias tóxicas e de ERO que produzem aumento da resposta inflamatória, danos nas membranas celulares e destruição tecidual (Abramson et al., 1983; Wright et al., 2010). Embora a base fisiopatológica desta condição ainda não seja totalmente conhecida, é sabido que a presença dos neutrófilos e a produção das ERO estão envolvidas nos mecanismos que impulsionam o início da AR (Biernacki et al., 1984; Cascao et al., 2010).

Considerando que os estudos em seres humanos são significativamente limitados devido às restrições na realização de análises cinéticas e à grande dificuldade de acesso aos tecidos-alvos, os modelos animais de AR têm sido essenciais para facilitar a compreensão dos mecanismos da doença e para o avanço no desenvolvimento de novas terapias (Asquith et al., 2009; Caplazi et al., 2015). Dentre os modelos animais estudados, o modelo de artrite induzida por zimosan tem sido amplamente utilizado para a avaliação do efeito anti-inflamatório de diversos produtos naturais (Penido et al., 2006; Paiva et al., 2011; Yamada et al., 2013). Neste modelo o zimosan induz um processo inflamatório agudo nas articulações e, poucas horas após a aplicação intra-articular deste estímulo, são encontrados parâmetros inflamatórios semelhantes aos da AR, com formação de edema, infiltração maciça de leucócitos (principalmente neutrófilos) nos tecidos e fluidos sinoviais e liberação de citocinas pró-inflamatórias (Penido et al., 2006; Takahashi et al., 2011).

Neste trabalho foi avaliado o efeito anti-inflamatório do EEBd e do ácido cafeico, tanto nas formas livres como incorporados nos lipossomas, sobre o modelo animal de artrite induzida por zimosan. Para isso, foram utilizados como parâmetros inflamatórios: a formação de edema nas articulações e a presença, nos líquidos sinoviais de células totais, de neutrófilos e de algumas citocinas pró-inflamatórias relacionadas com o processo inflamatório agudo (TNF- α , IL-6 e IL-1 β).

Na avaliação em suas formas livres, tanto o EEBd (nas doses de 50 e de 100 mg/Kg) quanto o ácido cafeico (na dose de 50 mg/Kg) reduziram, de forma significativa, o edema das articulações e a migração de células totais e de neutrófilos para a sinóvia em relação ao controle do solvente (Figuras 35 e 36). É importante

salientar que o influxo de células inflamatórias para a sinóvia é um fator importante na determinação do curso de artrite (Carlos et al., 2014). Além disso, a gravidade do quadro clínico desta doença está intimamente associada ao influxo de neutrófilos para o local da inflamação (Bezerra et al., 2007). Portanto, as reduções dos números de células totais e de neutrófilos no lavado sinovial dos animais pode representar uma grande melhora no prognóstico desta doença.

Através da utilização de outros modelos animais de inflamação aguda, pesquisas mostraram que, além do ácido cafeico, outros compostos presentes no extrato da *Baccharis dracunculifolia* como a artepelina C, ácido p-cumárico e o ácido ferúlico também foram capazes de reduzir o edema e a migração de neutrófilos para o local da inflamação (Fernández et al., 1998; Paulino et al., 2008), podendo contribuir para o efeito anti-inflamatório apresentado pelo EEBd.

A avaliação da concentração das citocinas inflamatórias no líquido sinovial dos animais mostrou que, apesar de não ter apresentado diferença significativa entre o controle e as amostras, foi possível verificar uma tendência das amostras (principalmente para o EEBd na dose de 100 mg/Kg e para o ácido cafeico na dose de 50 mg/Kg) em reduzir a concentração das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-1 β presentes no líquido sinovial dos animais (Figura 37). Além disso, outros estudos já mostraram que o ácido cafeico foi capaz de reduzir as concentrações de TNF- α , IL-6 e IL-1 β em modelo de inflamação cutânea em camundongos (Zhang et al., 2014), indicando a capacidade deste composto em atuar sobre a liberação destas citocinas em processos inflamatórios agudos. Tais citocinas são mediadores intimamente envolvidos na patogênese da artrite e níveis aumentados destes mediadores são encontrados nas articulações de pacientes com AR, o que contribui para o recrutamento de mais células para o local da inflamação, além de danos nas articulações (Penido et al., 2006).

Então, a análise de todos os parâmetros do ensaio animal (redução do edema, redução da migração de células totais e de neutrófilos para a sinóvia e tendência na redução das citocinas pró-inflamatórias) apoia a hipótese de que tanto o EEBd quanto o ácido cafeico possuem uma potencial atividade anti-inflamatória sobre a inflamação articular.

Tendo em vista os possíveis benefícios da incorporação de produtos naturais em vesículas lipossômicas, também foi avaliado se a incorporação do EEBd e do ácido cafeico nestas vesículas poderia melhorar a atividade anti-inflamatória

apresentada pelos compostos livres. Os resultados mostraram que os tratamentos dos animais com os lipossomas incorporados tanto com o EEBd (na dose de 9 mg/Kg) como com o ácido cafeico (na dose de 3,0 mg/Kg) foram capazes de reduzir, de forma significativa, o edema, o número de células totais e o número de neutrófilos presentes na sinóvia, quando comparados com os animais não tratados (com administração de salina) (Figuras 38 e 39). Embora os lipossomas contendo os compostos tenham reduzido a migração de neutrófilos para o local da inflamação, nenhuma das amostras foi capaz de reduzir as concentrações das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-1 β presentes no líquido sinovial (Figura 40), indicando que as amostras podem estar interferindo principalmente no processo de migração dos neutrófilos e não na produção dos mediadores químicos, os quais também podem ser produzidos por outras células presentes no local da inflamação.

Embora a análise da concentração das citocinas não tenha apresentado nenhuma diferença dos compostos em relação aos controles, os outros parâmetros inflamatórios avaliados (formação de edema e migração de células totais e de neutrófilos para a sinóvia) apontam uma moderada melhora no quadro inflamatório dos animais tratados com os lipossomas incorporados com as amostras.

Além dos lipossomas contendo o EEBd e o ácido cafeico, também foi avaliado o efeito anti-inflamatório de lipossomas incorporados com o flavonoide quercetina, visto que este flavonoide já foi extensivamente estudado e apresenta grande efeito antioxidante/anti-inflamatório, tanto na forma livre quanto incorporada em lipossomas, apresentando inclusive potencial para se tornar um fármaco adjuvante no tratamento da AR (Landi-Librandi et al., 2012a,b; Ji et al., 2013; Rezaei-Sadabady et al., 2014). Observou-se que, nas condições experimentais utilizadas, tanto os lipossomas incorporados com o EEBd quanto os incorporados com o ácido cafeico apresentaram a mesma atividade que os lipossomas incorporados com o padrão de quercetina em todos os parâmetros avaliados.

É importante salientar que nos ensaios “in vivo” as concentrações dos compostos que foram incorporados nos lipossomas e administradas nos animais foram muito menores que as concentrações administradas dos compostos livres (mais de 5 vezes menor para o EEBd e mais de 15 vezes menor para o ácido cafeico) e mesmo assim os compostos incorporados nos sistemas lipossômicos apresentaram redução de alguns parâmetros inflamatórios. Esses resultados indicam que a incorporação destes compostos nos lipossomas pode reduzir as concentrações necessárias para a

obtenção do efeito terapêutico desejado, podendo aumentar a eficiência e reduzir possíveis efeitos colaterais indesejados. Tal proposição está em consenso com trabalhos que relatam que os lipossomas favorecerem a atividade terapêutica de diversos fitoterápicos (Ajazuddin; Saraf, 2010). Além disso, estudos revelam que, em virtude de seu tamanho e composição química, os lipossomas tem se mostrado muito eficazes para reter o fármaco no interior da cavidade sinovial, podendo aumentar o tempo de permanência do fármaco na sinóvia em mais de 40 horas, sendo um excelente carreador para fármacos utilizados no tratamento da AR (Edwards et al., 2007; Kapoor et al., 2014). Porém, estudos adicionais devem ser realizados a fim de aperfeiçoar as condições de incorporação do EEBd ou do ácido cafeico, ou de uma combinação desses compostos, para se obter vesículas lipossômicas com concentrações dos compostos capazes de atingir um efeito terapêutico adequado ou, ainda, utilizar outras vias de administração dessas substâncias incorporadas para aumentar a eficácia do efeito anti-inflamatório.

Como a AR é uma doença que ainda não tem cura, atualmente o tratamento é realizado principalmente por drogas sintéticas antirreumáticas modificadores da doença (como o metotrexato), imunossupressores (como a ciclofosfamida e azatioprina), anti-inflamatórios não esteroidais, anti-maláricos, sulfassalazina e agentes biológicos (como rituximab, tocilizumab e outros antagonistas de TNF). Os objetivos dos métodos atuais de tratamento são os de aliviar a dor, reduzir a inflamação, evitar ou reduzir os danos nas articulações e melhorar a função e o bem estar do paciente. Porém, a maioria dos fármacos utilizados para o tratamento da AR pode reduzir o número de neutrófilos nos pacientes, submetendo-os a grande risco de infecção (Lazaro; Morel, 2015). A utilização de tratamentos adjuvantes, que não influenciem nas funções de defesa dos neutrófilos, poderia auxiliar no tratamento da AR, podendo reduzir as concentrações dos fármacos utilizados no tratamento e contribuindo na diminuição de possíveis efeitos colaterais.

Segundo estimativa da Pesquisa Nacional de Saúde de 2013, das 200,6 milhões de pessoas residentes no Brasil, 3,8% (7,6 milhões) utiliza alguma prática integrativa e complementar aos demais tratamentos de saúde, que consiste em tratamentos como acupuntura, homeopatia e, principalmente, o uso de plantas medicinais e de fitoterápicos (IBGE, 2015). Como o EEBd tem a capacidade de melhorar alguns parâmetros inflamatórios da doença sem prejudicar as funções de defesa dos neutrófilos, verifica-se um grande potencial para a *Baccharis*

dracunculifolia se tornar um agente terapêutico adjuvante no tratamento da AR. Além disso, como o ácido cafeico, presente no extrato, teve relação direta com a função antioxidante sobre as células e apresentou os mesmos efeitos anti-inflamatórios que o EEBd nos modelos animais de AR, este composto poderia ser utilizado como principal marcador químico do EEBd para avaliação do controle de qualidade deste fitoterápico.

6. Conclusões

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- O extrato de *Baccharis dracunculifolia*, nas condições avaliadas, pode modular o metabolismo oxidativo dos neutrófilos sem afetar a capacidade das células de reconhecer e fagocitar os patógenos;
- Concentrações elevadas do EEBd podem ser utilizadas para inibir a atividade da enzima elastase em processos inflamatórios que envolvem a estimulação exacerbada de neutrófilos; porém, nas concentrações capazes de modular o metabolismo oxidativo dos neutrófilos (próximas ao CI_{50}^{QL}), o EEBd parece não alterar nem o processo de desgranulação, nem as atividades catalíticas das enzimas elastase e lisozima liberadas na matriz extracelular;
- Em relação ao efeito do EEBd sobre a MPO dos neutrófilos, foi observada uma redução na quantidade de HOCl presente no meio. Apesar de o EEBd poder atuar sobre a atividade da enzima MPO (reduzindo a produção do HOCl), observou-se que o extrato possui uma grande atividade sequestradora do HOCl. Esta observação indica ser esta atividade um dos principais mecanismos da ação antioxidante do EEBd sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos, nas concentrações avaliadas;
- Concentrações do EEBd próximas ao CI_{50}^{QL} não interferem na capacidade dos neutrófilos de matar a *C. albicans* presentes no meio, não alterando portanto a capacidade microbicida dos neutrófilos frente a este micro-organismo;
- Dentre os compostos isolados estudados, o ácido cafeico, além de ter apresentado uma correlação positiva entre a sua quantidade relativa no EEBd e a atividade antioxidante total do extrato, também apresentou uma expressiva atividade antioxidante sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos, podendo ser considerado um bom marcador químico para esta atividade biológica do EEBd;
- A incorporação do EEBd e do ácido cafeico nos sistemas carreadores lipossômicos, além de ter formado vesículas com características físico-químicas adequadas para a utilização em meio biológico, também manteve as atividades antioxidantes semelhantes às apresentadas pelos compostos na forma livre;
- A avaliação do efeito anti-inflamatório do EEBd e do ácido cafeico (tanto nas formas livres como incorporados nos lipossomas) sobre o modelo animal de artrite revelaram que, tanto o extrato quanto o ácido cafeico, apresentam uma potencial

atividade anti-inflamatória sobre a inflamação articular e que a incorporação destes compostos nos lipossomas pode reduzir as concentrações necessárias para se atingir os resultados desejados.

Em suma, o presente trabalho mostrou que o EEBd foi capaz de modular o metabolismo oxidativo dos neutrófilos sem alterar diversas funções efetoras das células responsáveis pela capacidade de detectar e destruir agentes invasores. Observou-se, também, que o EEBd e o ácido cafeico apresentaram um efeito anti-inflamatório em modelo animal de artrite e que a incorporação desses compostos nos sistemas lipossômicos, além de não alterar suas atividades antioxidantes frente aos neutrófilos, pode reduzir as concentrações necessárias para atingir o efeito terapêutico desejado “in vivo”.

Pode-se, então, inferir que o EEBd tem um grande potencial para se tornar um agente terapêutico adjuvante para o tratamento da AR e de outros processos inflamatórios mediados por neutrófilos, sendo o ácido cafeico um bom marcador químico para a atividade anti-inflamatória do extrato.

Referências

Abdallah DSA, Egan CE, Butcher BA, Denkers EY. Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct T(h)1 and T(h)17 T-cell differentiation. *International Immunology*. 2011;23(5):317-26.

Abramson S, Edelson H, Kaplan H, Given W, Weissmann G. The neutrophil in rheumatoid-arthritis - its role and the inhibition of its activation by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 1983;13(1):148-53.

Ajazuddin, Saraf S. Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. *Fitoterapia*. 2010;81(7):680-9.

Amaral S, Mira L, Nogueira JM, da Silva AP, Helena Florêncio M. Plant extracts with anti-inflammatory properties--a new approach for characterization of their bioactive compounds and establishment of structure-antioxidant activity relationships. *Bioorg Med Chem*. 2009;17(5):1876-83.

Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. *Annual Review of Immunology*, Vol 30. 2012;30:459-89.

Andrade MF, Kabeya LM, Azzolini AECS, Santos EOL, Figueiredo-Rinhel ASG, Paris MRP, et al. 3-Phenylcoumarin derivatives selectively modulate different steps of reactive oxygen species production by immune complex-stimulated human neutrophils. *International Immunopharmacology*. 2013;15(2):387-94.

Asquith DL, Miller AM, McInnes IB, Liew FY. Animal models of rheumatoid arthritis. *European Journal of Immunology*. 2009;39(8):2040-4.

Babior BM. NADPH oxidase: An update. *Blood*. 1999;93(5):1464-76.

Bachiega TF, de Sousa JP, Bastos JK, Sforcin JM. Immunomodulatory/anti-inflammatory effects of *Baccharis dracunculifolia* leaves. *Nat Prod Res*. 2013;27(18):1646-50.

Bankova V, Boudourova-Krasteva G, Sforcin JM, Frete X, Kujumgiev A, Maimoni-Rodella R, et al. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from Sao Paulo state. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences*. 1999;54(5-6):401-5.

Bankova VS, de Castro SL, Marcucci MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*. 2000;31(1):3-15.

Bardoel BW, Kenny EF, Sollberger G, Zychlinsky A. The Balancing Act of Neutrophils. *Cell Host & Microbe*. 2014;15(5):526-36.

Barioni ED, Santin JR, Machado ID, Rodrigues SF, Ferraz-de-Paula V, Wagner TM, et al. *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. Hydroalcoholic Extract Inhibits Neutrophil Functions Related to Innate Host Defense. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:787916.

Bastos EM, Santana RA, Calaça-Costa AG, Thiago PS. Interaction between *Apis mellifera* L. and *Baccharis dracunculifolia* DC, that favours green propolis production in Minas Gerais. *Braz J Biol.* 2011;71(3):727-34.

Bastos EMAF, Santana RA, Calaca-Costa AGF, Thiago PS. Interaction between *Apis mellifera* L. and *Baccharis dracunculifolia* DC, that favours green propolis production in Minas Gerais. *Brazilian Journal of Biology.* 2011;71(3):727-34.

Belaouaj A, McCarthy R, Baumann M, Gao ZM, Ley TJ, Abraham SN, et al. Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nature Medicine.* 1998;4(5):615-8.

Bernardes CTV, de Carvalho TC, Furtado NAJC, Bastos JK. Antimicrobial and sanitizer activity of *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae) extract. *Planta Medica.* 2012;78(11):1207-.

Bessa NGFd, Borges JCM, Beserra FP, Carvalho RHA, Pereira MAB, Fagundes R, et al. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde - Tocantins. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.* 2013;15(4):15.

Beyer G, Melzig MF. Effects of propolis on hypoxanthine-xanthine oxidase-induced toxicity in cultivated human cells and on neutrophil elastase activity. *Biological & Pharmaceutical Bulletin.* 2005;28(7):1183-6.

Bezerra MM, Brain SD, Girão VC, Greenacre S, Keeble J, Rocha FA. Neutrophils-derived peroxynitrite contributes to acute hyperalgesia and cell influx in zymosan arthritis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2007;374(4):265-73.

Biamond P, Swaak AJ, Koster JF. Protective factors against oxygen free radicals and hydrogen peroxide in rheumatoid arthritis synovial fluid. *Arthritis Rheum.* 1984;27(7):760-5.

Blausen.com staff. "Blausen gallery 2014". *Wikiversity Journal of Medicine.* 2014;1(2). Disponível em: https://en.wikipedia.org/wiki/Neutrophil_granulocyte
Borregaard N, Sorensen OE, Theilgaard-Wnchl K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends in Immunology.* 2007;28(8):340-5.

Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1532-5.

Brown EJ. PHAGOCYTOSIS. *Bioessays*. 1995;17(2):109-17.

Bufalo MC, Candeias JMG, Sousa JPB, Bastos JK, Sforcin JM. In vitro cytotoxic activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis against HEP-2 cells. *Natural Product Research*. 2010;24(18):1710-8.

Bufalo MC, Figueiredo AS, de Sousa JPB, Candeias JMG, Bastos JK, Sforcin JM. Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis by cell viability determination and real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*. 2009;107(5):1669-80.

Burgos RA, Hidalgo MA, Figueroa CD, Conejeros I, Hancke JL. New potential targets to modulate neutrophil function in inflammation. *Mini Rev Med Chem*. 2009;9(2):153-68.

Calixto JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol Res*. 2000;33(2):179-89.

Caplazi P, Baca M, Barck K, Carano RA, DeVoss J, Lee WP, et al. Mouse Models of Rheumatoid Arthritis. *Vet Pathol*. 2015.

Cardoso ML, Xavier CA, Bezerra MB, Paiva AO, Carvalho MF, Benevides NM, et al. Assessment of zymosan-induced leukocyte influx in a rat model using sulfated polysaccharides. *Planta Med*. 2010;76(2):113-9.

Carlos FP, de Paula Alves da Silva M, de Lemos Vasconcelos Silva Melo E, Costa MS, Zamuner SR. Protective effect of low-level laser therapy (LLLT) on acute zymosan-induced arthritis. *Lasers Med Sci*. 2014;29(2):757-63.

Cascao R, Rosario HS, Souto-Carneiro MM, Fonseca JE. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. *Autoimmunity Reviews*. 2010;9(8):531-5.

Cestari SH, Bastos JK, Di Stasi LC. Intestinal Anti-Inflammatory Activity of *Baccharis dracunculifolia* in the Trinitrobenzenesulphonic Acid Model of Rat Colitis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011;2011:524349.

Chang R, Pilo-Veloso D, Morais SAL, Nascimento EA. Analysis of a Brazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia* by HPLC-APCI-MS and GC-MS. *Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2008;18(4):549-547.

Czerwińska ME, Granica S, Kiss AK. Effects of an aqueous extract from leaves of *Ligustrum vulgare* on mediators of inflammation in a human neutrophils model. *Planta Med*. 2013;79(11):924-32.

da Silva Filho AA, de Sousa JP, Soares S, Furtado NA, Andrade e Silva ML, Cunha WR, et al. Antimicrobial activity of the extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). *Z Naturforsch C*. 2008;63(1-2):40-6.

Dale DC, Boxer L, Liles WC. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*. 2008;112(4):935-45.

Dallegri F, Ottonello L. Tissue injury in neutrophilic inflammation. *Inflamm Res*. 1997;46(10):382-91.

de Alencar SM, de Aguiar CL, Paredes-Guzmán J, Park YK. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. *Ciência Rural*. 2005;35(4):7.

de Assis Lage TC, Montanari RM, Fernandes SA, de Oliveira Monteiro CM, de Oliveira Souza Senra T, Zeringota V, et al. Chemical composition and acaricidal activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* De Candolle (1836) and its constituents nerolidol and limonene on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Exp Parasitol*. 2015;148:24-9.

de Moraes NC, Barbosa AM, Vale ML, Villaverde AB, de Lima CJ, Cogo JC, et al. Anti-inflammatory effect of low-level laser and light-emitting diode in zymosan-induced arthritis. *Photomed Laser Surg*. 2010;28(2):227-32.

de Oliveira PF, de Souza Lima IM, Munari CC, Bastos JK, da Silva Filho AA, Tavares DC. Comparative evaluation of antiproliferative effects of Brazilian green propolis, its main source *Baccharis dracunculifolia*, and their major constituents artepillin C and baccharin. *Planta Med*. 2014;80(6):490-2.

de Sousa JP, Leite MF, Jorge RF, Resende DO, da Silva Filho AA, Furtado NA, et al. Seasonality Role on the Phenolics from Cultivated *Baccharis dracunculifolia*. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011;2011:464289.

de Sousa JPB, da Silva Filho AA, Bueno PCP, Gregorio LE, Furtado NAJC, Jorge RF, et al. A Validated Reverse-phase HPLC Analytical Method for the Quantification of Phenolic Compounds in *Baccharis dracunculifolia*. *Phytochemical Analysis*. 2009;20(1):24-32.

Denev P, Kratchanova M, Ciz M, Lojek A, Vasicek O, Blazheva D, et al. Antioxidant, antimicrobial and neutrophil-modulating activities of herb extracts. *Acta Biochim Pol*. 2014;61(2):359-67.

Devine DV, Bradley AJ. The complement system in liposome clearance: Can complement deposition be inhibited? *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1998;32(1-2):19-29.

Dimitrova P, Danova S, Ivanovska N. Pro-inflammatory action of *Candida albicans* DNA in zymosan-induced arthritis. *Inflamm Res*. 2012;61(6):649-56.

dos Santos DA, Fukui MeJ, Dhammika Nanayakkara NP, Khan SI, Sousa JP, Bastos JK, et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) in different experimental models. *J Ethnopharmacol*. 2010;127(2):543-50.

Dupre-Crochet S, Erard M, Nuess O. ROS production in phagocytes: why, when, and where? *Journal of Leukocyte Biology*. 2013;94(4):657-70.

Edwards SHR, Cake MA, Spoelstra G, Read RA. Biodistribution and clearance of intra-articular Liposomes in a large animal model using a radiographic marker. *Journal of Liposome Research*. 2007;17(3-4):249-61.

Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection*. 2003;5(14):1317-27.

Fernandes MR, Azzolini AE, Martinez ML, Souza CR, Lucisano-Valim YM, Oliveira WP. Assessment of antioxidant activity of spray dried extracts of *Psidium guajava* leaves by DPPH and chemiluminescence inhibition in human neutrophils. *Biomed Res Int*. 2014;2014:382891.

Fernández MA, Sáenz MT, García MD. Anti-inflammatory activity in rats and mice of phenolic acids isolated from *Scrophularia frutescens*. *J Pharm Pharmacol*. 1998;50(10):1183-6.

Figueiredo ASG. Efeito da sazonalidade no perfil químico e na atividade antioxidante de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) e ação modulatória desta planta sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2010.

Figueiredo-Rinhel AS, Kabeya LM, Bueno PC, Jorge-Tiossi RF, Azzolini AE, Bastos JK, et al. Inhibition of the human neutrophil oxidative metabolism by *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) is influenced by seasonality and the ratio of caffeic acid to other phenolic compounds. *J Ethnopharmacol*. 2013;150(2):655-64.

Figueiredo-Rinhel AS, Santos EO, Kabeya LM, Azzolini AE, Simões-Ambrosio LM, Lucisano-Valim YM. The flavonols quercetin, myricetin, kaempferol, and galangin inhibit the net oxygen consumption by immune complex-stimulated human and rabbit neutrophils. *Z Naturforsch C*. 2014;69(7-8):346-56.

Filippin LI, Vercelino R, Marroni NP, Xavier RM. Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Immunology*. 2008;152(3):415-22.

Fischer G, Conceicao FR, Leivas Leite FP, Dummer LA, Vargas GDA, Hubner SdO, et al. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. *Vaccine*. 2007;25(7):1250-6.

Flannagan RS, Jaumouille V, Grinstein S. The Cell Biology of Phagocytosis. In: Abbas AK, Galli SJ, Howley PM, editors. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, Vol 7. Annual Review of Pathology-Mechanisms of Disease. 7*. Palo Alto: Annual Reviews; 2012. p. 61-98.

Flores FP, Singh RK, Kerr WL, Pegg RB, Kong F. Antioxidant and enzyme inhibitory activities of blueberry anthocyanins prepared using different solvents. *J Agric Food Chem*. 2013;61(18):4441-7.

Fonseca YM, Marquele-Oliveira F, Vicentini F, Furtado N, Sousa JPB, Lucisano-Valim YM, et al. Evaluation of the Potential of Brazilian Propolis against UV-Induced Oxidative Stress. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011.

França FM, Dias DdC, Teixeira PC, Marcantônio AS, De Stéfani MV, Antonucci A, et al. Efeito do probiótico *Bacillus subtilis* no crescimento, sobrevivência e fisiologia de rãs-touro (*Rana catesbeiana*). *Boletim do instituto de Pesca*. 2008;34(3):10.

Freitas M, Lima JLFC, Fernandes E. Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review. *Analytica Chimica Acta*. 2009;649(1):8-23.

Fujie K, Shinguh Y, Inamura N, Yasumitsu R, Okamoto M, Okuhara M. Release of neutrophil elastase and its role in tissue injury in acute inflammation: effect of the elastase inhibitor, FR134043. *European Journal of Pharmacology*. 1999;374(1):117-25.

Fukuda M, Ohkoshi E, Makino M, Fujimoto Y. Studies on the constituents of the leaves of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) and their cytotoxic activity. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 2006;54(10):1465-8.

Ganz T. Defensins: Antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2003;3(9):710-20.

Groemping Y, Rittinger K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochemical Journal*. 2005;386:401-16.

Guimarães NSS, Mello JC, Paiva JS, Bueno PCP, Berretta AA, Torquato RJ, et al. *Baccharis dracunculifolia*, the main source of green propolis, exhibits potent antioxidant activity and prevents oxidative mitochondrial damage. *Food and Chemical Toxicology*. 2012;50(3-4):1091-7.

Heinz A, Jung MC, Jahreis G, Rusciani A, Duca L, Debelle L, et al. The action of neutrophil serine proteases on elastin and its precursor. *Biochimie*. 2012;94(1):192-202.

Henson PM. The immunologic release of constituents from neutrophil leukocytes. I. The role of antibody and complement on nonphagocytosable surfaces or phagocytosable particles. *J Immunol.* 1971;107(6):1535-46.

Hunt L, Emery P. Defining populations at risk of rheumatoid arthritis: the first steps to prevention. *Nature Reviews Rheumatology.* 2014;10(9):521-30.

Huong TM, Ishida T, Harashima H, Kiwada H. The complement system enhances the clearance of phosphatidylserine (PS)-liposomes in rat and guinea pig. *Int J Pharm.* 2001;215(1-2):197-205.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [homepage na internet]. Pesquisa Nacional de Saúd: Acesso e Utilização dos Serviços de Saúde, Acidentes e violências [acesso em 05 junho 2015]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>

Ji J-J, Lin Y, Huang S-S, Zhang H-L, Diao Y-P, Li K. Quercetin: a potential natural drug for adjuvant treatment of rheumatoid arthritis. *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines.* 2013;10(3):418-21.

Johann S, Cisalpino PS, Watanabe GA, Cota BB, de Siqueira EP, Pizzolatti MG, et al. Antifungal activity of extracts of some plants used in Brazilian traditional medicine against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Pharm Biol.* 2010;48(4):388-96.

Johann S, Oliveira FB, Siqueira EP, Cisalpino PS, Rosa CA, Alves TM, et al. Activity of compounds isolated from *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 2012;50(8):843-51.

Johansson S, Goransson U, Luijendijk T, Backlund A, Claeson P, Bohlin L. A neutrophil multitarget functional bioassay to detect anti-inflammatory natural products. *Journal of Natural Products.* 2002;65(1):32-41.

Jorge R, Furtado NAJC, Sousa JPB, da Silva Fiho AA, Gregorio LE, Jr., Martins CHG, et al. Brazilian Propolis: Seasonal Variation of the Prenylated p-Coumaric Acids and Antimicrobial Activity. *Pharmaceutical Biology.* 2008;46(12):889-93.

Kabeya LM, Fuzissaki CN, Taleb-Contini SH, da C Ferreira AM, Naal Z, Santos EO, et al. 7-Hydroxycoumarin modulates the oxidative metabolism, degranulation and microbial killing of human neutrophils. *Chem Biol Interact.* 2013;206(1):63-75.

Kahler CP. Evaluation of the use of the solvent dimethyl sulfoxide in chemiluminescent studies. *Blood Cells Mol Dis.* 2000;26(6):626-33.

Kanashiro A, Andrade DCO, Kabeya LM, Turato WM, Faccioli LH, Uyemura SA, et al. Modulatory effects of rutin on biochemical and hematological parameters in

hypercholesterolemic Golden Syrian hamsters. *Anais Da Academia Brasileira De Ciencias*. 2009;81(1):67-72.

Kanashiro A, Souza JG, Kabeya LM, Azzolini A, Lucisano-Valim YM. Elastase release by stimulated neutrophils inhibited by flavonoids: Importance of the catechol group. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences*. 2007;62(5-6):357-61.

Kapoor B, Singh SK, Gulati M, Gupta R, Vaidya Y. Application of Liposomes in Treatment of Rheumatoid Arthritis: Quo Vadis. *Scientific World Journal*. 2014.

Keystone EC, Schorlemmer HU, Pope C, Allison AC. Zymosan-induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. *Arthritis Rheum*. 1977;20(7):1396-401.

Klebanoff SJ, Kettle AJ, Rosen H, Winterbourn CC, Nauseef WM. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. *Journal of Leukocyte Biology*. 2013;93(2):185-98.

Klüter T, Fitschen-Oestern S, Lippross S, Weuster M, Mentlein R, Steubesand N, et al. The antimicrobial peptide lysozyme is induced after multiple trauma. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:303106.

Kobayashi SD, Voyich JM, DeLeo FR. Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. *Microbes Infect*. 2003;5(14):1337-44.

Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13(3):159-75.

Korkmaz B, Horwitz MS, Jenne DE, Gauthier F. Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases. *Pharmacol Rev*. 2010;62(4):726-59.

Kumar V, Sharma A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *International Immunopharmacology*. 2010;10(11):1325-34.

Kundu S, Ghosh P, Datta S, Ghosh A, Chattopadhyay S, Chatterjee M. Oxidative stress as a potential biomarker for determining disease activity in patients with Rheumatoid Arthritis. *Free Radical Research*. 2012;46(12):1482-9.

Landi-Librandi AP, Azzolini A, de Oliveira CA, Lucisano-Valim YM. Inhibitory activity of liposomal flavonoids during oxidative metabolism of human neutrophils upon stimulation with immune complexes and phorbol ester. *Drug Delivery*. 2012b;19(4):177-87.

Landi-Librandi AP, Chrysostomo TN, Azzolini A, de Oliveira CA, Marzocchi-Machado CM, Lucisano-Valim YM. Study of complement activation by liposomes of different lipid composition as potential drug-carriers. *Molecular Immunology*. 2010;47(13):2278-2289.

Landi-Librandi AP, Chrysostomo TN, Azzolini A, Marzocchi-Machado CM, de Oliveira CA, Lucisano-Valim YM. Study of quercetin-loaded liposomes as potential drug carriers: in vitro evaluation of human complement activation. *Journal of Liposome Research*. 2012a;22(2):89-99.

Lazaro E, Morel J. Management of neutropenia in patients with rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2015.

Lee WL, Harrison RE, Grinstein S. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect*. 2003;5(14):1299-306.

Lee YY, Lin MB, Cheng CF, Chang LY, Liu TY, Hung SL. Inhibitory effects of areca nut extract on expression of complement receptors and fc receptors in human neutrophils. *J Periodontol*. 2014;85(8):1096-106.

Lehrer RI, Cline MJ. Leukocyte myeloperoxidase deficiency and disseminated candidiasis: the role of myeloperoxidase in resistance to *Candida* infection. *J Clin Invest*. 1969;48(8):1478-88.

Leitão DPD, da Silva AA, Polizello ACM, Bastos JK, Spadaro ACC. Comparative evaluation of in-vitro effects of Brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2004;27(11):1834-9.

Lemos M, de Barros MP, Barreto Sousa JP, da Silva Filho AA, Bastos JK, de Andrade SF. *Baccharis dracunculifolia*, the main botanical source of Brazilian green propolis, displays antiulcer activity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2007;59(4):603-8.

Liao HR, Chien CR, Chen JJ, Lee TY, Lin SZ, Tseng CP. The anti-inflammatory effect of 2-(4-hydroxy-3-prop-2-enyl-phenyl)-4-prop-2-enyl-phenol by targeting Lyn kinase in human neutrophils. *Chem Biol Interact*. 2015;236:90-101.

Lucisano YM, Mantovani B. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and of IgG. *J Immunol*. 1984;132(4):2015-20.

Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2011;11(8):519-31.

Marcinkiewicz J, Kontny E. Taurine and inflammatory diseases. *Amino Acids*. 2014;46(1):7-20.

Marostica MR, Jr., Dausch A, Moraes CS, Queiroga CL, Pastore GM, Park YK. Comparison of volatile and polyphenolic compounds in Brazilian green propolis and its botanical origin *Baccharis dracunculifolia*. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*. 2008;28(1):178-81.

Martinez-Correa HA, Cabral FA, Magalhaes PM, Queiroga CL, Godoy AT, Sanchez-Camargo AP, et al. Extracts from the leaves of *Baccharis dracunculifolia* obtained by a combination of extraction processes with supercritical CO₂, ethanol and water. *Journal of Supercritical Fluids*. 2012;63:31-9.

Mayer-Scholl A, Averhoff P, Zychlinsky A. How do neutrophils and pathogens interact? *Current Opinion in Microbiology*. 2004;7(1):62-6.

Missima F, da Silva Filho AA, Nunes GA, Pires Bueno PC, de Sousa JPB, Bastos JK, et al. Effect of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) extracts and its isolated compounds on macrophage activation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2007;59(3):463-8.

Munari CC, Furtado RA, Santiago ML, Manhas SS, Bastos JK, Tavares DC. Inhibitory effects of *Baccharis dracunculifolia* on 1,2-dimethylhydrazine-induced genotoxicity and preneoplastic lesions in rat colon. *Eur J Cancer Prev*. 2014;23(4):240-5.

Nascimento EA, Chang R, Morais SAL, Pilo-Veloso D, Reis DC. An easily detectable chemical marker for the *Baccharis dracunculifolia* propolis. *Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2008;18(3):379-86.

Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(3):173-82.

Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work. *Nat Immunol*. 2014;15(7):602-11.

Nemeth T, Mocsai A. The role of neutrophils in autoimmune diseases. *Immunology Letters*. 2012;143(1):9-19.

Oliveira CA, Machado AE, Pessine FB. Preparation of 100 nm diameter unilamellar vesicles containing zinc phthalocyanine and cholesterol for use in photodynamic therapy. *Chem Phys Lipids*. 2005;133(1):69-78.

Oliveira PF, Monteiro Neto MAB, Leandro LF, Bastos JK, da Silva Filho AA, Tavares DC. In Vivo Antigenotoxicity of Baccharin, an Important Constituent of *Baccharis*

dracunculifolia DC (Asteraceae). Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. 2011;109(1):35-41.

Paiva AA, Castro AJ, Nascimento MS, Will LS, Santos ND, Araújo RM, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effect of polysaccharides from *Lobophora variegata* on zymosan-induced arthritis in rats. Int Immunopharmacol. 2011;11(9):1241-50.

Paiva CN, Bozza MT. Are Reactive Oxygen Species Always Detrimental to Pathogens? Antioxidants & Redox Signaling. 2014;20(6):1000-37.

Park YK, Alencar SM, Aguiar CL. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2002;50(9):2502-6.

Park YK, Paredes-Guzman JF, Aguiar CL, Alencar SM, Fujiwara FY. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian Propolis. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2004;52(5):1100-3.

Parreira NA, Magalhães LG, Morais DR, Caixeta SC, de Sousa JP, Bastos JK, et al. Antiprotozoal, schistosomicidal, and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. Chem Biodivers. 2010;7(4):993-1001.

Paula FS, Kabeya LM, Kanashiro A, de Figueiredo ASG, Azzolini A, Uyemura SA, et al. Modulation of human neutrophil oxidative metabolism and degranulation by extract of *Tamarindus indica* L. fruit pulp. Food and Chemical Toxicology. 2009;47(1):163-70.

Paulino N, Abreu SR, Uto Y, Koyama D, Nagasawa H, Hori H, et al. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. Eur J Pharmacol. 2008;587(1-3):296-301.

Pedrazzi V, Leite MF, Tavares RC, Sato S, do Nascimento GC, Issa JP. Herbal mouthwash containing extracts of *Baccharis dracunculifolia* as agent for the control of biofilm: clinical evaluation in humans. ScientificWorldJournal. 2015;2015:712683.

Penido C, Conte FP, Chagas MS, Rodrigues CA, Pereira JF, Henriques MG. Antiinflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on zymosan-induced arthritis in mice. Inflamm Res. 2006;55(11):457-64.

Pereira CA, da Costa AC, Machado AK, Beltrame Júnior M, Zöllner MS, Junqueira JC, et al. Enzymatic activity, sensitivity to antifungal drugs and *Baccharis dracunculifolia* essential oil by *Candida* strains isolated from the oral cavities of breastfeeding infants and in their mothers' mouths and nipples. Mycopathologia. 2011;171(2):103-9.

Pham CTN. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nature Reviews Immunology*. 2006;6(7):541-50.

Prasad LK, O'Mary H, Cui Z. Nanomedicine delivers promising treatments for rheumatoid arthritis. *Nanomedicine (Lond)*. 2015:1-12.

Ren G, Xiang HY, Hu ZC, Liu RH, Yi WF, Peng JB, et al. Inhibitory effects of phenolic compounds from *Artocarpus styracifolius* on respiratory burst of rat neutrophils. *Pharm Biol*. 2014;52(8):944-50.

Resende FA, Munari CC, de Azevedo Bentes Monteiro Neto M, Tavares DC, Bastos JK, da Silva Filho AA, et al. Comparative Studies of the (Anti) Mutagenicity of *Baccharis dracunculifolia* and Artepillin C by the Bacterial Reverse Mutation Test. *Molecules*. 2012;17(3):2335-50.

Rezaei-Sadabady R, Eidi A, Zarghami N, Barzegar A. Intracellular ROS protection efficiency and free radical-scavenging activity of quercetin and quercetin-encapsulated liposomes. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2014:1-7.

Rezende TP, do A Corrêa JO, Aarestrup BJ, Aarestrup FM, de Sousa OV, da Silva Filho AA. Protective effects of *Baccharis dracunculifolia* leaves extract against carbon tetrachloride- and acetaminophen-induced hepatotoxicity in experimental animals. *Molecules*. 2014;19(7):9257-72.

Sandhaus RA, Turino G. Neutrophil Elastase-Mediated Lung Disease. *Copd-Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. 2013;10:60-3.

Santos EO, Kabeya LM, Figueiredo-Rinhel AS, Marchi LF, Andrade MF, Piatosi F, et al. Flavonols modulate the effector functions of healthy individuals' immune complex-stimulated neutrophils: a therapeutic perspective for rheumatoid arthritis. *Int Immunopharmacol*. 2014;21(1):102-11.

Silva NCC, Barbosa L, Seito LN, Fernandes Junior A. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of crude extracts and essential oils from medicinal plants. *Natural Product Research*. 2012;26(16):1510-4.

Simard J-C, Girard D, Tessier PA. Induction of neutrophil degranulation by S100A9 via a MAPK-dependent mechanism. *Journal of Leukocyte Biology*. 2010;87(5):905-14.

Simões LMC, Gregorio LE, Da Silva AA, de Souza ML, Azzolini A, Bastos JK, et al. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004;94(1):59-65.

Simões-Ambrosio LMC, Gregorio LE, Sousa JPB, Figueiredo-Rinhel ASG, Azzolini A, Bastos JK, et al. The role of seasonality on the inhibitory effect of Brazilian green propolis on the oxidative metabolism of neutrophils. *Fitoterapia*. 2010;81(8):1102-8.

Smith JA, Weidemann MJ. Further characterization of the neutrophil oxidative burst by flow-cytometry. *Journal of Immunological Methods*. 1993;162(2):261-8.

Smolelis AN, Hartsell SE. The determination of lysozyme. *Journal of Bacteriology*. 1949;58(6):731-6.

Souabni H, Thoma V, Bizouarn T, Chatgialiloglu C, Siafaka-Kapadai A, Baciou L, et al. trans Arachidonic acid isomers inhibit NADPH-oxidase activity by direct interaction with enzyme components. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*. 2012;1818(9):2314-24.

Takahashi T, Muneta T, Tsuji K, Sekiya I. BMP-7 inhibits cartilage degeneration through suppression of inflammation in rat zymosan-induced arthritis. *Cell Tissue Res*. 2011;344(2):321-32.

Takeuchi H, Gomi T, Shishido M, Watanabe H, Suenobu N. Neutrophil elastase contributes to extracellular matrix damage induced by chronic low-dose UV irradiation in a hairless mouse photoaging model. *Journal of Dermatological Science*. 2010;60(3):151-8.

Tsai YF, Yu HP, Chang WY, Liu FC, Huang ZC, Hwang TL. Sirtinol inhibits neutrophil elastase activity and attenuates lipopolysaccharide-mediated acute lung injury in mice. *Sci Rep*. 2015;5:8347.

van der Veen BS, de Winther MPJ, Heeringa P. Myeloperoxidase: Molecular Mechanisms of Action and Their Relevance to Human Health and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2009;11(11):2899-937.

Vernon PJ, Tang D. Eat-Me: Autophagy, Phagocytosis, and Reactive Oxygen Species Signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2013;18(6):677-90.

Vongsak B, Gritsanapan W, Wongkrajang Y, Jantan I. In vitro inhibitory effects of *Moringa oleifera* leaf extract and its major components on chemiluminescence and chemotactic activity of phagocytes. *Nat Prod Commun*. 2013;8(11):1559-61.

Wang R, Liu YQ, Ha W, Shi YP, Hwang TL, Huang GJ, et al. In vitro anti-inflammatory effects of diterpenoids and sesquiterpenoids from traditional Chinese medicine *Siegesbeckia pubescens*. *Bioorg Med Chem Lett*. 2014;24(16):3944-7.

Wickramasinghe R, Kumara RR, De Silva ED, Ratnasooriya WD, Handunnetti S. Inhibition of phagocytic and intracellular killing activity of human neutrophils by

aqueous and methanolic leaf extracts of *Ixora coccinea*. *J Ethnopharmacol.* 2014;153(3):900-7.

Winterbourn CC, Kettle AJ. Redox Reactions and Microbial Killing in the Neutrophil Phagosome. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2013;18(6):642-60.

Woeber KA, Ingbar SH. Metabolism of L-thyroxine by phagocytosing human leukocytes. *J Clin Invest.* 1973;52(8):1796-803.

Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology.* 2010;49(9):1618-31.

Yamada AN, Grespan R, Yamada Á, Silva EL, Silva-Filho SE, Damião MJ, et al. Anti-inflammatory activity of *Ocimum americanum* L. essential oil in experimental model of zymosan-induced arthritis. *Am J Chin Med.* 2013;41(4):913-26.

Zachariae COC. Chemotactic cytokines and inflammation - biological properties of the lymphocyte and monocyte chemotactic factors elcf, mcaf and IL-8. *Acta Dermato-Venereologica.* 1993:1-37.

Zekonis G, Zekonis J, Sadzeviciene R, Simoniene G, Kevelaitis E. Effect of *Perilla frutescens* aqueous extract on free radical production by human neutrophil leukocytes. *Medicina (Kaunas).* 2008;44(9):699-705.

Zhang M, Zhou J, Wang L, Li B, Guo J, Guan X, et al. Caffeic acid reduces cutaneous tumor necrosis factor alpha (TNF- α), IL-6 and IL-1 β levels and ameliorates skin edema in acute and chronic model of cutaneous inflammation in mice. *Biol Pharm Bull.* 2014;37(3):347-54.

Zielinska M, Kostrzewa A, Ignatowicz E. Antioxidative activity of flavonoids in stimulated human neutrophils. *Folia Histochemica Et Cytobiologica.* 2000;38(1):25-30.

Apêndices

Apêndice A - Avaliação da manutenção do perfil químico e da atividade biológica do EEBd

Para verificar se o EEBd de maio/07, selecionado de estudos anteriores, mantinha o perfil químico e a atividade biológica de quando foi inicialmente preparado, foi avaliada a manutenção de seu perfil cromatográfico após estocagem e comparada a sua atividade antioxidante com a de um novo extrato recém preparado.

- *Manutenção do perfil químico*

A estabilidade química dos compostos do extrato foram avaliados através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em condições semelhantes às realizadas no início dos trabalhos com o EEBd, a fim de se comparar os perfis cromatográficos do EEBd antes e após o período de estocagem.

No início dos estudos com o EEBd, a análise cromatográfica do EEBd foi realizada em colaboração com a empresa Apis Flora[®]. Para isso, o EEBd foi solubilizado em metanol:água deionizada na proporção de 1:1 v/v. Após completa solubilização do extrato, uma alíquota de 1 mL da solução foi filtrada em membrana de 0,45 µm e 10 µL de cada amostra foi injetada no equipamento de CLAE através de injetor automático.

A separação dos compostos foi realizada em cromatógrafo de fase líquida da Marca Shimadzu equipado com coluna Shimpack, CLC ODS C18 25 X 4,6 (pré coluna C18). O aparelho era composto de uma bomba de alta pressão modelo LC-20AT com válvula de gradiente quaternário, detector espectrofotométrico de Arranjo de Diodos modelo SPD-M20A, forno de coluna modelo CTO-10-ASVT, conjunto de lavagem automática de pistão, câmara de mistura para alta e baixa pressão, degaseificador de membrana on line modelo DGU-20 A5, sistema controlador CBM-20A e amostrador automático modelo SIL-20A.

Os parâmetros cromatográficos utilizados na separação dos compostos presentes no EEBd no início dos estudos estão relacionados na **Tabela A1**.

Tabela A1 – Parâmetros utilizados na separação dos compostos presentes no extrato etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia* através de cromatografia líquida de alta eficiência antes do período de estocagem.

Parâmetros	Especificações
Fase estacionária	C18 (25 x 4,6 cm)
Fase móvel	Gradiente Metanol / Água acidificada
Fluxo da fase móvel	0,8 mL/min
Volume de amostra injetado	10 µL
Temperatura do forno	40°C
Tempo de corrida	75 minutos
Comprimento de onda do Detector	275 nm

O gradiente de solventes utilizado como fase móvel foi desenvolvido conforme ilustrado a seguir (**Tabela A2**):

Tabela A2 – Gradiente da fase móvel utilizado na separação cromatográfica dos compostos presentes nos extratos de *Baccharis dracunculifolia* antes da estocagem.

Tempo (min)	Solvente (%)	
	Metanol	Água Acidificada
0	20	80
70	95	5
75	20	80
77	20	80

A análise qualitativa dos picos foi realizada através da avaliação dos tempos de retenção e espectros de absorção do ultravioleta das amostras em comparação aos obtidos para os padrões cromatográficos sob as mesmas condições cromatográficas. Os padrões utilizados foram: ácido caféico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido cinâmico, aromadendrina-4'-metil éter (AME), isosacuranetina, artepelina C e bacarina; e como padrão interno foi utilizado o ácido gálico.

Já a avaliação do EEBd após o período de estocagem foi realizada junto ao laboratório de Farmacognosia da FCFRP-USP, uma vez que não foi possível ter acesso à empresa e ao mesmo equipamento utilizado inicialmente. Então, foram utilizadas condições cromatográficas bastante semelhantes às utilizadas inicialmente, tentando reproduzir ao máximo as condições iniciais. Para isso as

leituras cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo analítico da marca Shimadzu com controlador do modelo SLC-10 Avp, detector de arranjo de diodos Shimadzu (UV-DAD) do modelo SPD-M10 Avp, auto-injetor do modelo SIL-10 Avp e degaseificador do modelo DGU-14 A. O cromatógrafo é acoplado a um computador contendo o software ClassVP versão 5.02. Para as análises empregou-se coluna analítica de fase reversa C18 shim-pack ODS (H) (4,6mm ID x 25mm L). Para eluição aplicou-se um gradiente contendo os solventes metanol:água da mesma forma que apresentado na **Tabela A2**, fluxo de 0,8 mL/min e tempo de eluição de 75 min. Como o cromatógrafo disponível não dispunha de forno, não foi possível reproduzir o controle de temperatura da corrida (40°C) e a água deionizada utilizada na fase móvel não foi acidificada (5% de acetonitrila).

Os perfis cromatográficos do EEBd obtidos antes e após o período de estocagem foram comparados para verificar se houve grande alteração da composição química do extrato (**Figuras A1 e A2**).

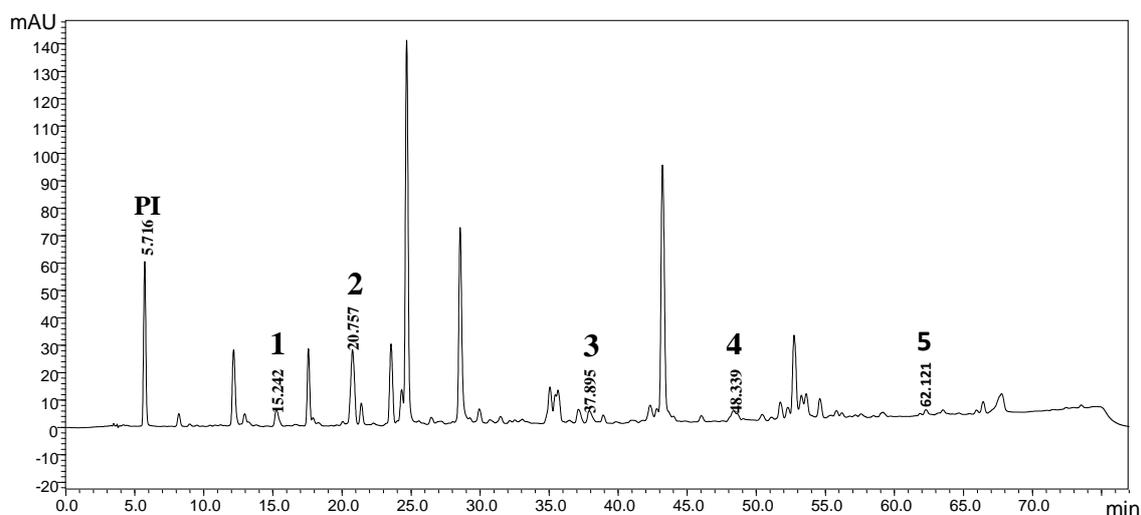


Figura A1: Cromatograma do Extrato Etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia* recém preparado (início dos estudos com o EEBd). A análise foi feita em coluna Shim pack, CLC ODS C18 25 X 4,6 (pré coluna C18), a 40°C com fase móvel constituída de gradiente de metanol e água ácida e com fluxo de 0,8 mL/min. Marcadores: 1: ácido cafeico; 2: ácido *p*-cumárico; 3: aromadendrina-4'-metil éter (AME); 4: isosacuranetina e 5: artepelina C. PI = padrão interno (ácido gálico). Os valores menores acima dos picos correspondem aos tempos de retenção dos respectivos marcadores. mAU = mili absorvância.

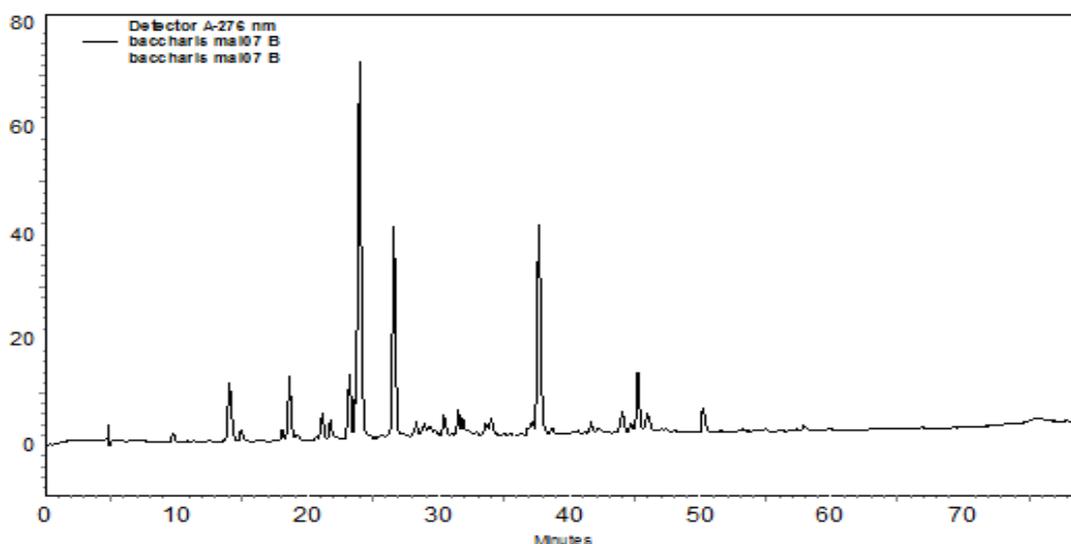


Figura A2: Cromatograma do Extrato Etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia* estocado durante o andamento dos estudos de doutorado. A análise foi feita em coluna analítica de fase reversa C18 Shim Pack ODS (H) (4,6mm ID x 25mm L) a temperatura ambiente, com fase móvel constituída de gradiente de metanol e água e com fluxo de 0,8 mL/min.

Pode-se verificar que não houve grande alteração do perfil cromatográfico do EEBd antes e após o período de estocagem com a manutenção da maioria dos picos majoritários. Houve, porém, algumas diferenças quanto à resolução dos picos e tempo de retenção das amostras o que pode, em parte, ser explicado pela utilização de uma coluna diferente da usada no início dos estudos e pelas pequenas diferenças nas condições da separação.

A manutenção do perfil cromatográfico, antes e após o período de estocagem, nos permite concluir que a estocagem do extrato nas condições adequadas (protegido da luz e sob refrigeração) foi capaz de prolongar a estabilidade química do extrato.

- *Manutenção da atividade biológica através de ensaios de quimioluminescência*

A atividade antioxidante foi avaliada através de ensaios de QL dependente de luminol e de lucigenina. Para isso, o EEBd estocado (denominado de EEBd maio/07a) teve sua atividade biológica comparada à de um novo extrato recém preparado com o mesmo material vegetal (denominado EEBd maio/07b).

Para a realização do ensaio, diferentes concentrações das amostras de EEBd de maio/07a e maio/07b (concentrações de 2,5/ 5,0/ 10/ 20/ 35 e 50 $\mu\text{g/mL}$, para QLlum e de 1,25/ 2,5/ 5,0/ 10/ 20 e 50 $\mu\text{g/mL}$ para QLluc) foram incubadas

juntamente com a suspensão de PMNs ($1,0 \times 10^6$ células/mL) e as sondas luminol ou lucigenina ($1,0 \times 10^{-4}$ mol/L). Após incubação durante 3 minutos a 37°C , foi adicionado o estímulo Zlopos (1 mg/mL) ou a solução de Hanks com gelatina a 0,1% (controle sem estímulo - espontâneo) e, imediatamente a seguir, foram medidas as QLLum ou QLluc, como já descrito na metodologia.

A atividade dos EEBd foram avaliadas em cinco experimentos independentes, com medidas em duplicata. Para análise dos resultados empregou-se o software GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software, Inc.).

Foi observado que os extratos inibiram a produção de QLLum e de QLluc de forma dependente da concentração e que as curvas de porcentagem de inibição (**Figura A3**) e os valores de CI_{50} (**Figura A4**) de ambos os extratos foram bastante semelhantes. Para a QLLum os valores de CI_{50} foram $14,18 \pm 1,4$ $\mu\text{g/mL}$ para o EEBd de maio/07a e de $12,89 \pm 2,3$ $\mu\text{g/mL}$ para o de maio/07b; já os valores de CI_{50} para a QLluc foram de $6,38 \pm 1,4$ $\mu\text{g/mL}$ para o EEBd de maio/07a e de $6,03 \pm 0,7$ $\mu\text{g/mL}$ para o de maio/07b. Os resultados permitem afirmar que não houve diferenças significativas entre as atividades inibitórias da QL dos diferentes EEBd, evidenciando a manutenção desta atividade biológica no extrato seco previamente preparado e estocado a 4°C .

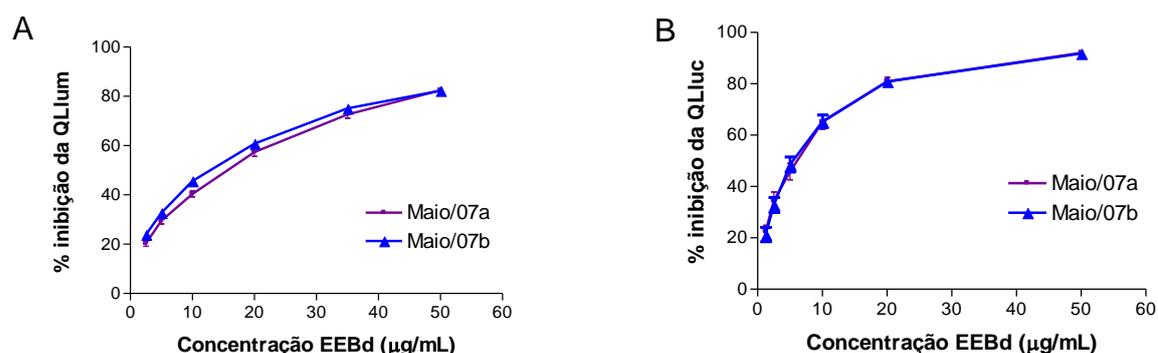


Figura A3: Efeito inibitório das diferentes concentrações dos Extratos Etanólicos das folhas de *Baccharis dracunculifolia* – EEBd ($\mu\text{g/mL}$) de maio/07a e maio/07b sobre: **A-** quimioluminescência dependente de luminol (QLLum) e **B-** quimioluminescência dependente de lucigenina (QLluc), produzidas por PMNs humanos (1×10^6 células/mL) estimulados com 1 mg de zimosan opsonizado.

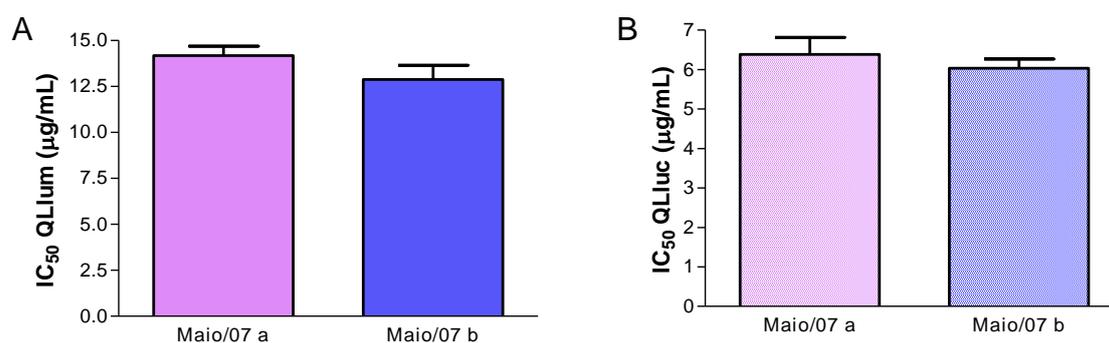


Figura A4: Gráficos de IC_{50} (concentração do EEBd que inibe a QL em 50%) dos Extratos Etanólicos das folhas de *Baccharis dracunculifolia* (EEBd) de maio/07a e maio/07b sobre **A-** quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) e **B-** quimioluminescência dependente de lucigenina (QLluc), produzidas por PMNs humanos (1×10^6 células/mL) estimuladas com 1 mg/mL de zimosan opsonizado.

Desta forma, fica evidente que o EEBd maio/07, armazenado em condições adequadas, manteve tanto o perfil químico quanto a atividade biológica, permitindo portanto sua utilização nos ensaios subsequentes para a avaliação de seu efeito sobre algumas importantes funções efetoras dos neutrófilos.

Apêndice B – Padronização de parâmetros experimentais para avaliação do efeito do EEBd sobre a atividade da enzima lisozima

- *Curva padrão de Lisozima*

Para determinar a quantidade de lisozima liberada pelos PMNs durante o processo de desgranulação, foi realizada uma curva padrão de lisozima (Sigma-Aldrich L 6876), relacionando-se diferentes concentrações desta enzima com a redução da D.O. de uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus*. Para isso, as diferentes concentrações da enzima foram misturadas volume a volume com uma suspensão de *M. lysodeikticus* (Sigma-Aldrich M 3770) 0,40 mg/mL em tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,0. Foi verificada uma D.O. inicial da reação entre 0,6 e 0,8 em 450 nm e a redução desta D.O. foi acompanhada durante 15 minutos a 37°C. As diferenças, entre as densidades ópticas iniciais e finais de cada concentração da enzima, foram utilizadas para a confecção da curva padrão (**Figura A5**).

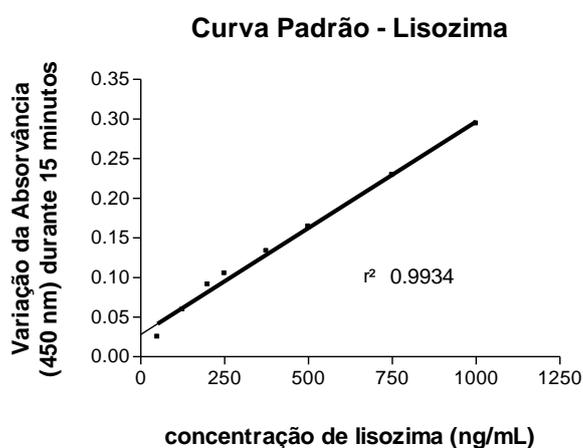


Figura A5: Curva padrão de variação da D.O. (450 nm) em função da concentração de lisozima (ng/mL) presente no meio. A variação da absorvância refere-se à redução da D.O. de uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* a 0,4 mg/mL em tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,0 analisada durante 15 minutos. Curva referente a um experimento e representativa de outros sete com perfis semelhantes.

- *Padronização da concentração de células e de estímulo*

As concentrações de células utilizadas nesta padronização foram 1×10^6 células/mL e 2×10^6 células/mL enquanto a de ZIops foi de 0,5 / 1,0 e 2,0 mg/mL.

Para a realização desta padronização as diferentes concentrações de células (1 e 2×10^6 células/mL) estimuladas com diferentes concentrações do estímulo (0,5 / 1,0 e

2,0 mg/mL de Ziops) foram incubadas em um volume final de 0,5 mL em Hanks contendo gelatina a 0,1%, durante 45 minutos a 37°C. Durante este período ocorre a estimulação das células e a liberação da enzima lisozima para o meio. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 755 x g durante 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes contendo a enzima foram separados e mantidos em banho de gelo para, em seguida, serem testados quanto à capacidade de reduzir a D.O. da suspensão de *M. lysodeikticus* como já descrito anteriormente. Com as diferenças entre as D.O. iniciais e finais e a curva padrão previamente confeccionada, foram calculadas as concentrações de enzima liberadas no meio. Como controle espontâneo, foi verificada a liberação da lisozima na ausência de estímulo. Os resultados foram expressos como ng lisozima liberada/mL (**Figura A6**). Para esta padronização foram realizados cinco experimentos independentes com medidas em duplicata. Para análise dos resultados empregou-se o software GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software, Inc.).

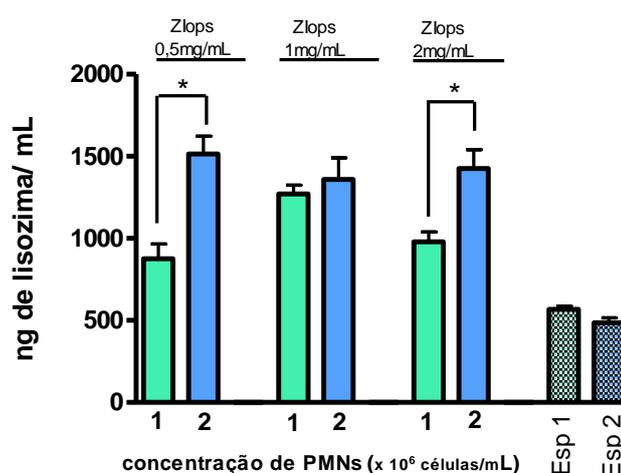


Figura A6: Concentração de lisozima liberada no meio reacional por diferentes concentrações de neutrófilos (PMNs) estimulados com diferentes concentrações de zimosan opsonizado (Ziops). Esp 1 e Esp 2 referem-se respectivamente ao controle espontâneo (células na ausência do estímulo) nas concentrações de 1 e 2 x 10⁶ células/mL. Resultados expressos como média ± desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em duplicata. *amostras estatisticamente diferentes entre si segundo ANOVA seguido de teste Tukey's Multiple Comparison Test (p < 0,01).

Os resultados mostram que as concentrações celulares de 2 x 10⁶ células/mL apresentaram maior liberação da lisozima quando comparadas às liberações por 1 x 10⁶ células/mL. Por outro lado, quando uma mesma concentração de células foi

submetida à estimulação por diferentes concentrações de Ziops não houve alteração estatisticamente significativa sobre a liberação da enzima. Desta forma, foram selecionadas as concentrações de 2×10^6 células/mL e de 0,5 mg/mL de Ziops para dar continuidades aos estudos.

- *Efeito do solvente DMSO no ensaio de liberação da enzima lisozima*

Antes de iniciar os ensaios com o EEBd foi avaliado se o solvente DMSO poderia causar alguma interferência na metodologia. Para isso, diferentes concentrações deste solvente (0,1/ 0,5 / 1,0 e 10%) foram incubadas com as células (2×10^6 células/mL) e o estímulo (Ziops a 0,5 mg/mL) em um volume final de 0,5 mL, durante 45 minutos a 37°C. Como controle positivo do ensaio foi utilizado o tampão Hanks com gelatina a 0,1% no lugar do solvente e como controle espontâneo as células foram avaliadas na ausência do estímulo. Os tubos foram então centrifugados a 755 x g durante 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram separados e mantidos em banho de gelo. Posteriormente, os sobrenadantes foram testados quanto à capacidade de reduzir a D.O. da suspensão de *M. lysodeikticus* como descrito nos itens anteriores. Com as diferenças entre as D.O. iniciais e finais e a curva padrão previamente confeccionada, foram calculadas as concentrações de enzima liberada no meio. Como controle espontâneo, foi verificada a liberação da lisozima na ausência de estímulo. Os resultados foram expressos como ng lisozima liberada/mL (**Figura A7**). Para este ensaio foram realizados três experimentos independentes com medidas em duplicata. Para análise dos resultados empregou-se o software GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software, Inc.).

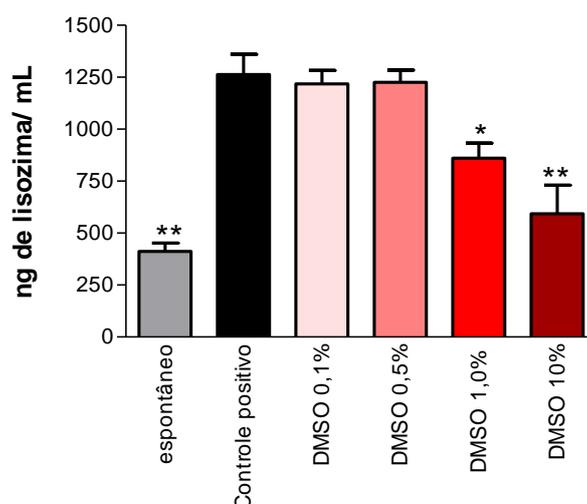


Figura A7: Concentração de lisozima liberada no meio reacional por neutrófilos humanos (2×10^6 células/mL) estimulados com zimosan opsonizado (0,5 mg/mL), após incubação com diferentes concentrações do solvente do EEBd (DMSO). Como controle positivo foi utilizado o tampão Hanks no lugar do solvente, enquanto no controle espontâneo as células foram avaliadas na ausência do estímulo. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata. * ($p < 0,05$) e ** ($p < 0,001$) = amostras estatisticamente diferentes do controle positivo segundo ANOVA seguido de teste Tukey's Multiple Comparison Test ($p < 0,01$). Abreviaturas: DMSO: dimetilsulfóxido.

Estes resultados mostraram que as concentrações de DMSO de 0,1% e 0,5% não interferem na metodologia, pois não possuem diferença significativa do resultado apresentado pelo controle positivo. Já as concentrações de 1% e 10% interferiram na metodologia reduzindo a atividade da lisozima liberada no meio. Desta forma, os EEBd foram diluídos em DMSO de forma que a concentração final deste solvente no meio fosse de 0,1%.

Apêndice C – Padronização de parâmetros experimentais para avaliação do efeito do EEBd sobre a atividade da enzima mieloperoxidase e seus produtos.

- *Padronização da concentração de células e de estímulo*

As concentrações de células utilizadas nesta padronização foram 1, 2 e 4 x 10⁶ células/mL, enquanto as quantidades de Zlops foram de 1,0 e 2,0 mg/mL.

As diferentes concentrações de células foram suspensas em meio contendo Hanks com taurina (5 mM). Posteriormente foram adicionadas as diferentes concentrações do estímulo Zlops (1 e 2 mg/mL) e as amostras foram incubadas durante 30 min a 37°C. A reação foi então interrompida com a adição de catalase (40 µg/mL). Os tubos foram centrifugados 10620 x g durante 5 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram separados e mantidos em banho de gelo. A quantificação da reação foi realizada adicionando-se em placa de 96 poços o sobrenadante da reação juntamente com a solução reveladora contendo TMB (2 mM) e após 5 minutos foi realizada a leitura da absorvância em 630 nm. Foram feitos três experimentos independentes, com medidas em quadruplicata. Para análise dos resultados empregou-se o software GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software, Inc.). Os resultados mostraram que a melhor condição experimental consistia em utilizar 4 x 10⁶ células/mL e 2 mg/mL do estímulo Zlops (**Figura A8**).

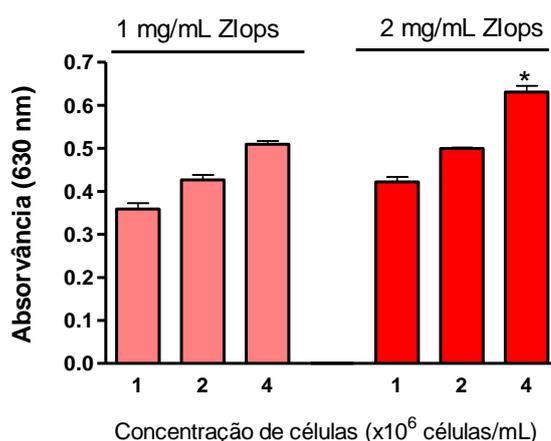


Figura A8: Valores de absorvância referentes à oxidação do TMB por compostos derivados do HOCl, produzidos pela enzima mieloperoxidase de diferentes concentrações de PMNs humanos. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes realizados em quadruplicata. *(p < 0,001) = amostra estatisticamente diferentes das demais segundo ANOVA seguido de teste Tukey's Multiple Comparison Test.

- *Efeito do solvente etanol sobre a atividade da enzima mieloperoxidase: avaliação da produção de HOCl pelos PMNs*

Os ensaios foram realizados com a incubação das células (4×10^6 células/mL) juntamente com diferentes concentrações do solvente etanol (concentrações finais de 0,05/ 0,1/ 0,5 e 1%) em meio contendo Hanks com taurina (5mM). A reação foi iniciada com a adição do estímulo Zlopos (2 mg/mL) em um volume final de 500 μ L. As amostras foram incubadas durante 30 min a 37°C e posteriormente foi adicionado catalase (40 μ g/mL) para interromper a reação. Os tubos foram centrifugados 10620 x g durante 5 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram separados e mantidos em banho de gelo. A quantificação da reação foi realizada adicionando-se em placa de 96 poços o sobrenadante da reação juntamente com a solução reveladora contendo TMB (2 mM) e após 5 minutos foi realizada a leitura da absorvância em 630 nm.

Como controles deste ensaio foram utilizados: o tampão Hanks com gelatina a 0,1% no lugar das amostras (controle positivo), a adição de Hanks com gelatina a 0,1% e catalase no lugar da amostra com manutenção da amostra em banho de gelo (controle negativo) e a adição do tampão Hanks com gelatina a 0,1% no lugar da amostra e do estímulo (espontâneo – contendo apenas as células e o tampão). Também foi preparado um branco (contendo apenas o tampão e o TMB), sendo que os valores de absorvância referentes ao branco foram subtraídos dos valores das demais amostras.

O efeito do solvente etanol sobre a atividade da MPO foi avaliado em oito experimentos independentes, com medidas em quadruplicata. Para análise dos resultados empregou-se o software GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software, Inc.). Os resultados apresentados na **Figura A9** mostraram que as concentrações de etanol de 0,05% e de 0,1% não interferiram significativamente no método, uma vez que não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) em relação ao controle positivo.

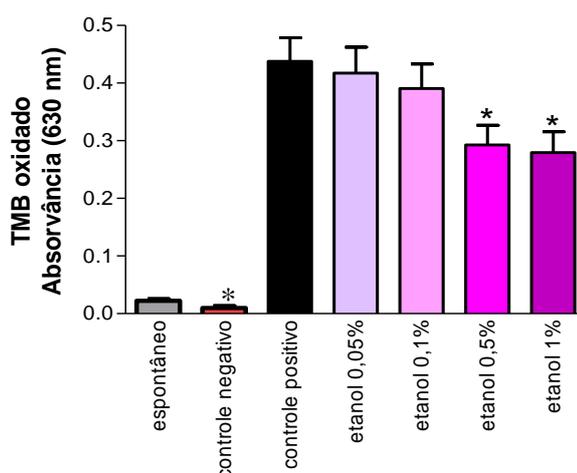


Figura A9: Valores de absorvância referentes à oxidação do TMB por compostos derivados do HOCl produzido pela enzima mieloperoxidase de neutrófilos. As barras representam o efeito de diferentes concentrações de etanol ou controles na produção de HOCl pela mieloperoxidase de neutrófilos humanos (4×10^6 células/mL) estimulados com zimosan opsonizado (2 mg/mL), com exceção do espontâneo no qual não há adição de estímulo (apenas células e tampão Hanks). Controle positivo: adição de Hanks com gelatina a 0,1% no lugar da amostra; controle negativo: igual ao controle positivo com a adição de catalase no início da reação. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de oito experimentos realizados em quadruplicata. *amostras estatisticamente diferentes do controle positivo segundo ANOVA seguido de teste Dunnett's Multiple Comparison ($p < 0,01$).

De posse destes resultados foi utilizado o EEBd solubilizado em etanol de forma que a concentração final do solvente na reação fosse de 0,05%.

- *Quantificação de HOCl na água sanitária comercial e curva padrão da oxidação do TMB por diferentes concentrações de HOCl para avaliar o efeito do EEBd sobre a atividade "scavenger" de HOCl e de Taurina-Cl*

A quantificação do HOCl na água sanitária comercial (ASC) foi realizada através de ensaio espectrofotométrico a 292 nm. Para isso, a ASC foi primeiramente diluída em água deionizada (1:25) e posteriormente diluída em solução de KOH 8 M (1:5). A absorvância foi lida em 292 nm e a concentração do hipoclorito foi calculada considerando-se o coeficiente de extinção (ϵ) igual a $350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Depois de calculada a concentração de hipoclorito na ASC, foi confeccionada uma curva padrão da oxidação do TMB por diferentes concentrações de HOCl (**Figura A10**) para a determinação da melhor concentração a ser utilizada nos ensaios. Para isso, a ASC foi diluída para 0,5 mM em tampão PBS e diferentes volumes de ASC

foram incubados em placa de 96 poços, juntamente com PBS contendo taurina (5 mM), de forma que o volume final fosse de 200 μL e as concentrações de HOCl no meio fossem de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 μM . Foi então adicionado o revelador contendo o TMB e após cinco minutos foi realizada a leitura da absorvância em 630 nm.

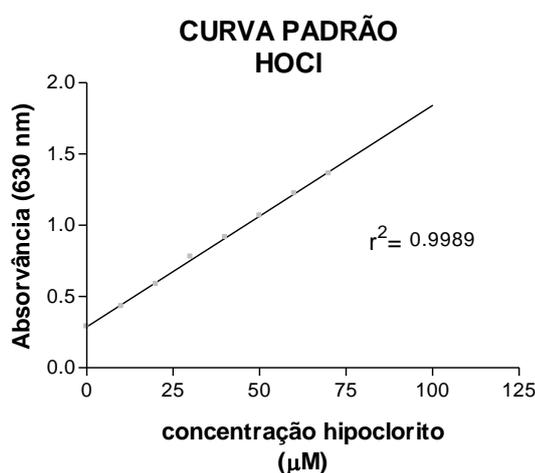


Figura A10: Curva padrão de HOCl incubado com taurina (5mM). A absorvância (630 nm) refere-se à oxidação do TMB pela taurina-Cl formada pela interação do HOCl e da taurina. Curva referente a um experimento e representativa de outros três com perfis semelhantes.

A concentração de HOCl de 50 μM foi a selecionada para ser utilizada nos ensaios de avaliação da atividade “scavenger” do EEBd sobre o HOCl e sobre a taurina-Cl.

Apêndice D – Curvas padrão do EEBd e do ácido cafeico para a determinação das eficiências de incorporação das amostras nos lipossomas

- *Curva padrão do EEBd*

Foi realizada uma varredura espectrofotométrica do EEBd para determinar o melhor comprimento de onda para a realização da curva padrão do extrato (**Figura A11**).

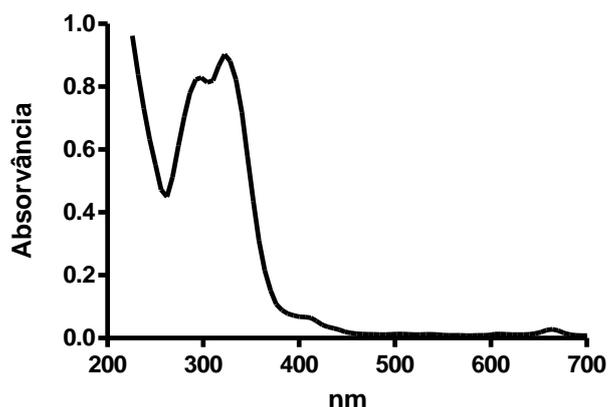


Figura A11: Espectro de varredura de 200 nm a 700 nm do Extrato Etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia* - EEBd (60 µg/mL), com pico de absorvância em 322 nm.

Como os comprimentos de onda próximos a 200 nm sofrem a influência do solvente etanol, utilizado para solubilizar o extrato, foi escolhido o comprimento de onda de 322 nm, que representa o maior pico de absorção do EEBd.

Depois de determinado o comprimento de onda, foram confeccionadas as curvas padrão relacionando a absorvância com as diferentes concentrações do EEBd (**Figura A12**). Para isso, o EEBd foi diluído em etanol de modo que as concentrações finais variassem entre 20 e 125 µg/mL.

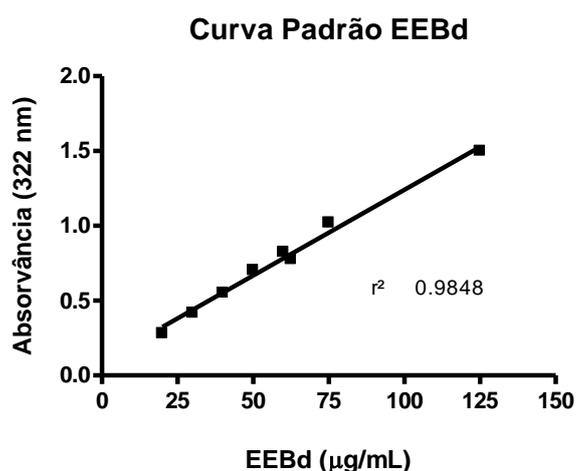


Figura A12: Curva padrão do extrato etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia* (EEBd) relacionando os diferentes valores de absorvância em 322 nm com as respectivas concentrações do EEBd. Curva referente a quatro experimentos realizados em duplicata.

De posse da curva padrão do EEBd, foi possível determinar as concentrações do extrato presentes nas preparações lipossômicas.

- *Curva padrão do ácido cafeico*

Após realizar uma varredura espectrofotométrica do ácido cafeico, foi determinado o melhor comprimento de onda para a realização da curva padrão (**Figura A13**). Uma vez que os comprimentos de onda próximos a 200 nm sofrem a influência do solvente etanol, foi escolhido o comprimento de onda de 324 nm, que representa o maior pico de absorção do ácido cafeico.

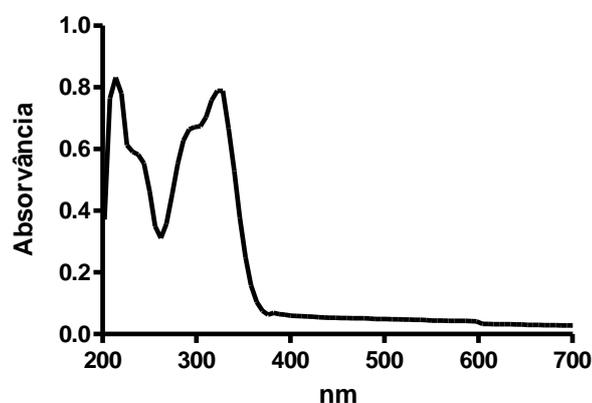


Figura A13: Espectro de varredura de 200 nm a 700 nm do ácido cafeico na concentração de 40 µM em solução etanólica, com pico de absorvância em 324 nm.

A partir da definição do comprimento de onda de análise do ácido cafeico, foi realizada uma curva padrão relacionando os valores de absorvâncias obtidos por este composto com as suas respectivas concentrações (**Figura A14**).

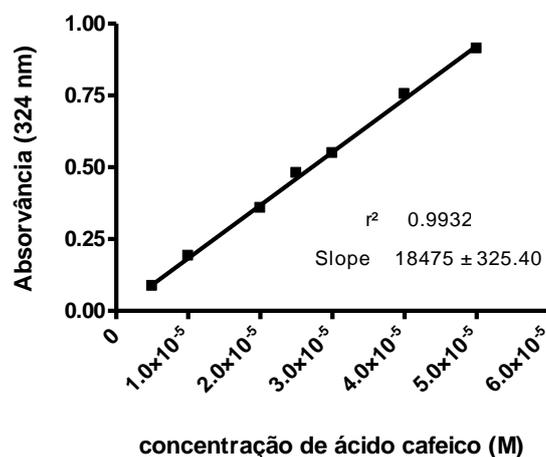


Figura A14: Curva padrão do ácido cafeico relacionando os diferentes valores de absorvância em 324 nm com as respectivas concentrações deste composto. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos.

Através da curva padrão do ácido cafeico foi realizada a determinação do seu coeficiente de extinção molar (ϵ), igual a $18475 \pm 325,40 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Utilizando os valores de absorvância obtidos após o rompimento dos lipossomas contendo ácido cafeico ($\lambda = 324 \text{ nm}$) e o valor do coeficiente de extinção molar deste composto ($\epsilon = 18475$) foi possível calcular as concentrações do ácido cafeico incorporado nos lipossomas.

Apêndice E - Padronização das condições experimentais para avaliação do efeito terapêutico do EEBd e do ácido cafeico em modelo animal de artrite

Os ensaios com modelo animal de artrite se iniciaram com a padronização das condições de indução da artrite e do tempo de tratamento dos animais.

Para verificar qual a melhor condição de indução da artrite, foram injetadas diferentes quantidades de ZI (300, 500 e 1000 μg) na articulação do joelho de ratos e após 6 horas foram examinados os parâmetros inflamatórios (edema formado na articulação e a migração de células totais e de neutrófilos para o local da inflamação). Como controle, foi injetado apenas o solvente do zimosan (NaCl 0,9%) nas articulações. Os resultados obtidos (**Figura A15**) apontam que todas as concentrações de ZI utilizadas foram capazes de promover a indução do processo inflamatório nos animais. Foi, então, escolhida a concentração de 300 μg /articulação.

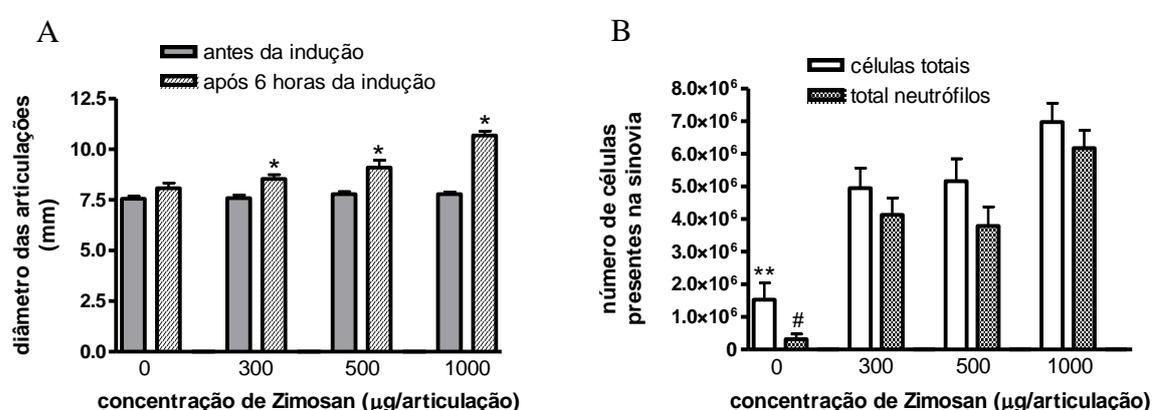


Figura A15: Padronização da quantidade de zimosan utilizada para a indução da artrite nos animais. Foram avaliados: **(A)** o diâmetro da articulação antes e após a indução da artrite; e **(B)** a migração de células totais e de neutrófilos para o local da inflamação (sinóvia) após a injeção de diferentes concentrações de zimosan. Como controle (0 $\mu\text{g}/\text{articulação}$) foi injetado apenas o solvente do zimosan (NaCl 0,9%). Resultados expressos como média \pm desvio padrão de 2 experimentos realizados em quadruplicata (n=4). *p<0,05 para todos os valores após a indução quando comparados às respectivas concentrações antes da indução; * e # representam p<0,001 entre o controle e as diferentes concentrações do estímulo para, respectivamente o total de células e o total de neutrófilos (ANOVA - Bonferroni's Multiple Comparison Test).

O tratamento dos animais com a droga padrão e com as amostras foi realizado na forma de injeção intraperitoneal antes da indução da lesão na articulação. Também

foi padronizado o tempo entre a aplicação do tratamento e a indução da artrite. Para isso o anti-inflamatório padrão dexametasona (4 mg/Kg) foi injetado no peritônio dos animais 30 minutos ou 1 hora antes da indução da artrite com ZI e após 6 horas foram avaliados os parâmetros inflamatórios de edema e migração de células totais e neutrófilos (**Figura A16**). Como controles deste ensaio foi utilizado o tratamento apenas com o solvente da droga (NaCl 0,9%) antes da indução da artrite (artrite não tratada) e o tratamento dos animais com NaCl 0,9% sem a indução da artrite (controle negativo).

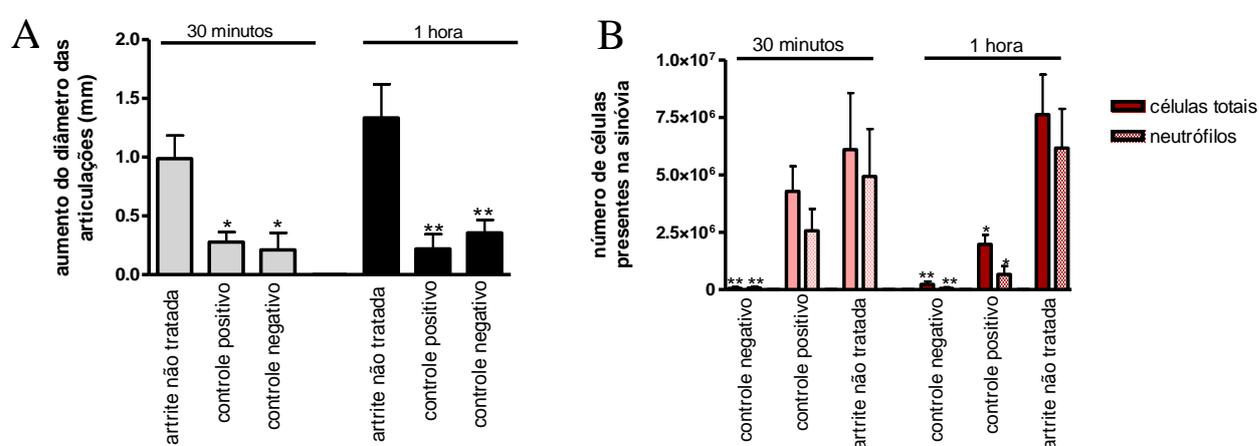


Figura A16: Padronização do intervalo de tempo entre o tratamento dos animais e a indução da artrite. Os animais foram tratados 30 minutos ou 1 hora antes da indução da inflamação. 6 horas após a indução da artrite foi avaliado (**A**) o aumento do diâmetro da articulação. (**B**) a migração de células totais e de neutrófilos para o local da inflamação (sinóvia). *Artrite não tratada*: aplicação intraperitoneal de NaCl 0,9% e indução de artrite com zimosan; *controle positivo*: aplicação intraperitoneal de dexametasona (4 mg/Kg) e indução da artrite com zimosan; *controle negativo*: aplicação intraperitoneal e intra-articular de NaCl 0,9%. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de 2 experimentos realizados em quadruplicata (n=4). *p<0,05 em comparação com a artrite não tratada (30 minutos); **p<0,001 em comparação com a artrite não tratada (1 hora) (ANOVA - Bonferroni's Multiple Comparison Test,).

Os resultados obtidos mostram que a dexametasona impediu a formação do edema na articulação nos dois tempos de tratamento avaliados, porém a redução do edema se mostrou mais pronunciada quando o fármaco foi administrado 1 hora antes da indução da artrite. Já para a migração das células, houve apenas redução significativa de infiltrado celular no foco inflamatório quando a dexametasona foi administrada 1 hora antes da indução da artrite.

Ficou determinado que os animais recebessem o tratamento 1 hora antes da indução da artrite, o que está de acordo com diversos trabalhos da literatura (Cardoso et al., 2010; de Moraes et al., 2010; Carlos et al., 2014).

Anexos

Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto



Of. CEP 58/2007 - FCFRP/USP

rlq

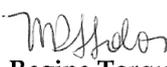
Ribeirão Preto, 01 de novembro de 2007.

Prezada Senhora,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado “*Efeito da sazonalidade no perfil químico e na atividade antioxidante de Baccharis dracunculifolia e estudo da ação modulatória desta planta sobre as funções efetoras de neutrófilos*”, apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº 111, foi analisado e **aprovado** *ad referendum* do Comitê em 01 de novembro de 2007.

Em atendimento à Resolução 196/96 deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seu resultado, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer intercorrência ou interrupção do mesmo.

Atenciosamente,


Prof.ª. Dr.ª. Maria Regina Torqueti Tolo
Vice-Coordenadora do CEP *em exercício*
FCFRP - USP

Ilma. Sra.

Prof.ª. Dr.ª. YARA MARIA LUCISANO VALIM

Departamento de Física e Química

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

Anexo B – Termo de consentimento livre e esclarecido assinado pelos voluntários doadores de sangue

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a) em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra do pesquisador responsável. Em caso de recusa, você não será penalizado(a) de forma alguma. Em caso de dúvida, você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, pelo telefone (16) 3602-4213 ou pelo e-mail: cep@fcrp.usp.br.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do projeto: Estudo do mecanismo da atividade antioxidante de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) em neutrófilos e avaliação deste efeito sobre modelo de artrite reumatóide

Pesquisadora responsável: Andréa Silva Garcia de Figueiredo Rinhel

Telefone para contato: (16) 3602-4212

DESCRIÇÃO DA PESQUISA AO VOLUNTÁRIO SADIO:

Neste trabalho de pesquisa, vamos estudar o efeito de produtos naturais, obtidos de plantas, sobre células do sangue. Isto é importante para entender como esses produtos naturais agem no nosso organismo, se são benéficos ou não para a saúde, e também para descobrir novos medicamentos. Será estudado o extrato da planta *Baccharis dracunculifolia*, também conhecida como “alecrim-do-campo” que é a principal planta usada pelas abelhas para produção de própolis verde. Os neutrófilos são células do nosso corpo que ajudam a combater os microrganismos, porém em algumas doenças inflamatórias essas células podem causar danos no nosso corpo. Desta forma, será avaliada a capacidade dos extratos de “alecrim-do-campo” em controlar a ação prejudicial dos neutrófilos nas inflamações.

Assim, solicitamos a sua permissão para colher sangue a fim de purificar os neutrófilos, que são as células-alvo deste estudo, e para a obtenção do soro, o qual será utilizado para estimular estas células. Os voluntários não poderão estar fazendo uso de medicamentos e deverão doar 20 (vinte) mL de sangue. O sangue será colhido de uma veia do braço, por uma pessoa do laboratório com bastante experiência em tirar sangue de pessoas. Será sempre utilizado material estéril e descartável, isto é, devidamente limpo e livre de contaminação. O desconforto desta coleta está apenas relacionado com um pouco de dor causada pela picada da agulha para tirar o sangue. Algumas vezes, pode ocorrer um pequeno inchaço no local da picada e aparecer manchas roxas em volta dela, mas que desaparecem dentro de alguns dias. Portanto, esses problemas são passageiros e os riscos são mínimos.

Fica expressamente garantida a liberdade de retirar o seu consentimento de participar desta pesquisa a qualquer tempo, não sendo penalizado de forma alguma. Esclarecemos também que você não terá nenhuma despesa ao participar deste estudo. Você também terá a liberdade de procurar os pesquisadores responsáveis a qualquer momento para saber sobre o andamento da pesquisa. Quando a pesquisa terminar, somente os resultados, e nunca a sua identidade, serão divulgados publicamente.

Consentimento da participação da pessoa como sujeito:

Eu, _____, portador do RG _____ e CPF _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo acima descrito, como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido pela pesquisadora Andréa Silva Garcia de Figueiredo Rinhel sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso leve a qualquer penalidade.

Local e data: _____

Nome e assinatura do sujeito: _____

Anexo C: Certificado de aprovação da comissão de ética no uso de animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 10.1.1591.53.5), intitulado "Estudo do Mecanismo da Atividade Antioxidante de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) em Neutrófilos e Avaliação deste Efeito sobre Modelo de Artrite Reumatóide", de autoria de **Andréa Silva Garcia de Figueiredo Rinhel**, e de **Yara Maria Lucisano Valim** por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 06/04/2011.

This is to certify that the work (Protocol number 10.1.1591.53.5), entitled: "Estudo do Mecanismo da Atividade Antioxidante de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) em Neutrófilos e Avaliação deste Efeito sobre Modelo de Artrite Reumatóide", by **Andréa Silva Garcia de Figueiredo Rinhel** and **Yara Maria Lucisano Valim**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, April 06, 2011.

Ribeirão Preto, 9 de abril de 2011.

Presidente da CEUA
Profa.Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro