



**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**

**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: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

# *Agradecimientos*

*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).*

---

## 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- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ . 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  $\alpha$  and interleukin 6 and 1 $\beta$  (TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$ , 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.



# *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).

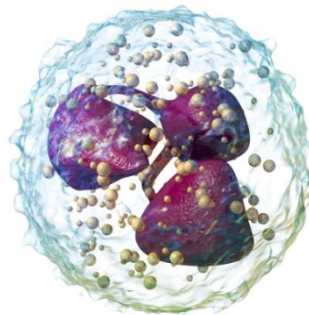
Estas células se originam na medula óssea e, quando totalmente diferenciadas e maduras, são liberadas na corrente sanguínea, onde constituem de 50 a 70% do total de leucócitos circulantes e possuem um tempo de vida médio de 8 a 12 horas (Mantovani et al., 2011; Kolaczkowska; Kubes, 2013; Nauseef; Borregaard,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

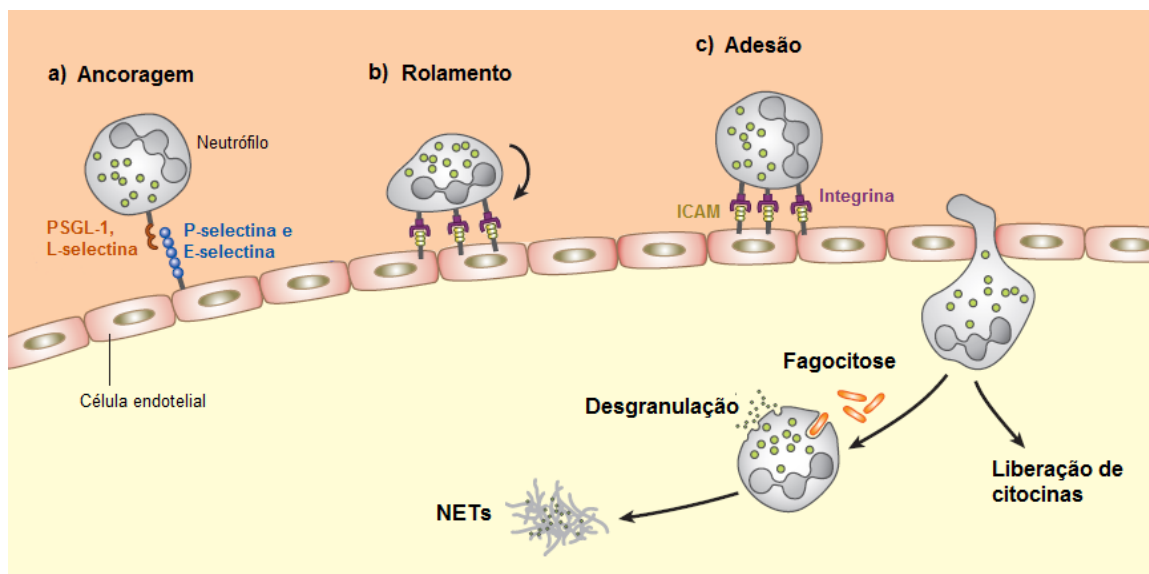
Para atingir os sítios de inflamação ou injúria, os neutrófilos circulantes devem deixar a corrente sanguínea através do endotélio e migrar, ao longo de um gradiente químico, para o local da lesão nos tecidos, processo este chamado de quimiotaxia (Zachariae, 1993).

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).

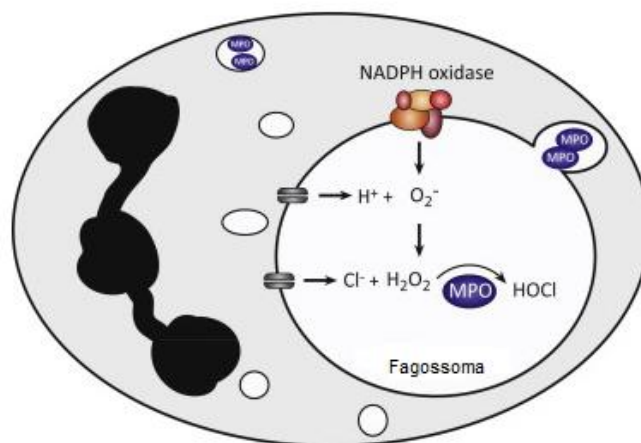
Entretanto, em processos inflamatórios crônicos como em glomerulonefrite, doenças pulmonares e artrite reumatoide, a elastase favorece a inflamação e é considerada uma das principais enzimas responsáveis pela destruição tecidual. Desta forma, esta enzima parece ser um importante alvo para a terapia de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



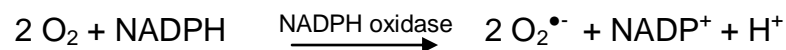
**Figura 3:** Representação esquemática da produção de ERO no fagolisossoma de neutrófilos. A MPO é armazenada dentro dos grânulos azurófilos do neutrófilo. Depois da fagocitose, os grânulos fundem-se com o fagossoma e liberam a MPO. O complexo enzimático da NADPH oxidase gera o superóxido que é convertido 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

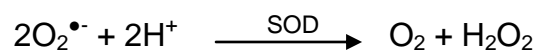


após estimulação das células com componentes bacterianos ou com alguns estímulos imunes, tais como o agente promotor de tumores PMA (do inglês, “Phorbol 12-myristate 13-acetate”), o potente peptídeo quimiotático fMLP (N-formilmetionil-leucil-fenilalanina), ácido araquidônico (AA), concanavalina A, complexos 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).

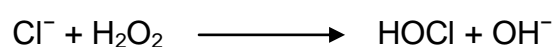
A NADPH oxidase reduz o oxigênio molecular presente no meio a ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), que é a primeira ERO formada e a precursora de todas as demais produzidas durante o metabolismo oxidativo (Freitas et al., 2009; Bardoel et al., 2014).



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- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  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 carregamento 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.

## *4. 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](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 CO<sub>2</sub>, 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- $\alpha$ ), IL-6 and IL-1 $\beta$  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.

