UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

Andréa Silva Garcia de Figueiredo

Ribeirão Preto
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

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

Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos

Orientada: Andréa Silva Garcia de Figueiredo

Orientadora: Prof(a). Dra. Yara Maria Lucisano Valim

Ribeirão Preto
2010

RESUMO

FIGUEIREDO, A. S. G. **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.** 2010. 96f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Os neutrófilos ou leucócitos polimorfonucleares (PMNs) são células fagocíticas com funções bactericida e fungicida altamente potentes. A destruição dos microrganismos invasores é realizada através da liberação de substâncias tóxicas presentes em seus grânulos e das espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas durante o metabolismo oxidativo dessas células. Apesar dos benefícios da atividade antimicrobiana, em situações de intensa ativação celular, a grande produção e liberação de compostos citotóxicos podem causar efeitos deletérios sobre os tecidos do hospedeiro, como parece ocorrer em doenças por imunocomplexos. O grande potencial dos antioxidantes para o tratamento e prevenção dessas doenças tem levado à pesquisa de novos compostos que atuam no processo inflamatório em que estão envolvidos os neutrófilos ativados. Dentre estes, destacam-se os naturais, em que se encontra a planta *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae), principal fonte botânica da própolis verde, sendo que a própolis possui diversas atividades biológicas conhecidas. Entretanto, a produção de metabólitos secundários pelas plantas pode ser modificada de acordo com fatores sazonais o que dificulta os estudos e pode acarretar em alterações de atividade biológica. Desta forma, este trabalho avaliou o efeito da sazonalidade no perfil químico de *B. dracunculifolia* e na atividade desta planta sobre o metabolismo oxidativo de PMNs. Para isso, extratos etanólicos brutos das folhas de *B. dracunculifolia* (EEBBd), colhidas mensalmente durante 14 meses foram submetidos à ensaios de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), e avaliados quanto à capacidade de inibir a quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) e de lucigenina (QLluc) produzida por PMNs estimulados. Além disso, para desvendar o(s) possível(is) mecanismo(s) de ação responsável(is) pela atividade antioxidante, foram realizados, com a amostra mais ativa em inibir a QL, ensaios para avaliar a citotoxicidade, a atividade “scavenger” de radicais livres (DPPH[•]) e a ação sobre a atividade da enzima NADPH oxidase. Os resultados mostraram que todos os EEBBd inibiram tanto a QLlum quanto a QLluc de forma dependente da concentração e que para ambos os ensaios houve variação na eficiência deste efeito biológico ao longo do período de tempo estudado, demonstrando que a sazonalidade desempenhou um papel importante na intensidade da atividade antioxidante dos extratos. O ensaio de CLAE permitiu análise dos seguintes compostos: ácido caféico, ácido *p*-cumárico, aromadendrina-4'-metil éter, isosakuranetina e artepilin C, e revelaram que apesar de não haver notória variação qualitativa entre os componentes, foi observada grande diferença quantitativa. As análises com a amostra do mês de maior atividade antioxidante (Maio/07) revelou que esta foi colhida durante um período de baixo índice pluviométrico, temperaturas amenas e apresentou a menor concentração da maioria dos compostos fenólicos estudados, evidenciando que tais compostos não foram os maiores responsáveis pela atividade biológica da amostra e que alguns desses compostos podem ter atuado como pró-oxidantes. Além disso, foi verificado que esta amostra atuou de forma não tóxica sobre as células, através da captação de parte das EROs geradas no meio reacional e de inibição parcial da atividade da NADPH oxidase.

Palavras-chave: *Baccharis dracunculifolia*; Atividade antioxidante; Neutrófilos.

1. Introdução

1.1 Neutrófilos

1.1.1 Aspectos gerais

Os neutrófilos ou leucócitos polimorfonucleares (PMNs) foram descobertos por Paul Ehrlich em 1956, quando as técnicas de fixação e coloração celulares tornaram possíveis identificar os núcleos lobulados e os grânulos citoplasmáticos característicos de tais células. A granulação neutrofílica, que se refere à coloração dos grânulos através da utilização de corantes neutros, deu origem ao nome “neutrófilo” (BORREGAARD, COWLAND, 1997).

Os neutrófilos são células que compõem o sistema imune inato de humanos operando como fagócitos profissionais. Originam-se na medula óssea e, quando maduros, são liberados na corrente sanguínea com funções bactericida e fungicida altamente potentes. (KUIJPERS, 2002; NAGATOMI, 2006).

Estas células possuem um tempo de vida médio bastante curto de cerca de 6 a 7 horas, constituem de 50 a 70% do total de leucócitos e são considerados os componentes majoritários dentre os granulócitos no sangue. Além disso, são as primeiras células a serem recrutadas da corrente sanguínea para os sítios de inflamação, sendo, por esta razão, consideradas a primeira linha de defesa do organismo (JOHNSON, VARANI, SMOLEN, 1992; LUSTER, ALON, VON ANDRIAN, 2005).

Além da atividade microbicida, os PMNs produzem mediadores pró-inflamatórios que contribuem para o recrutamento de novas células, auxiliam na remoção de células mortas, de corpos celulares gerados por apoptose e de outros “debris” celulares, e contribuem na remodelação de tecidos (JOHNSON, VARANI, SMOLEN, 1992; CHAVRIER, 2001).

Morfologicamente, os neutrófilos são distinguidos das outras células sanguíneas por possuírem: formato esférico com cerca de 12 a 15µm de diâmetro, um núcleo multilobulado apresentando de 3 a 5 lóbulos e grânulos em abundância no citoplasma, os quais contêm diferentes grupos de moléculas citotóxicas (**Figura 1**). Tais grânulos são classificados em azurófilos (ou primários), específicos (ou secundários), de gelatinase (ou terciários) e vesículas secretórias (BORREGAARD, COWLAND, 1997; ABBAS, LICHTMAN, 2005; MAYER-SCHOL, AVERHOFF, ZYCHLINSKY, 2004).

Os grânulos citoplasmáticos dos PMNs são produzidos em sequência, sendo que durante o estágio de promielócito surgem os primeiros (grânulos primários) os quais contêm mieloperoxidase e defensinas e são denominados de azurófilos devido a sua afinidade pelo corante azul. Posteriormente, durante a maturação dos neutrófilos (estágio de metamielócito)

são formados os grânulos secundários ou específicos, os quais contêm collagenase, lactoferrina e gelatinase entre outras proteínas. Os grânulos terciários ou de gelatinase assemelham-se aos secundários, porém possuem altas concentrações de gelatinase. Quando maduros, os neutrófilos desenvolvem vesículas secretórias altamente mobilizáveis ricas em citocromo b558, receptores, proteínas sinalizadoras e moléculas de adesão em sua superfície, além de proteínas plasmáticas como albumina, imunoglobulina e transferrina na matriz (BAINTON, ULLYOT, FARQUHAR, 1971; BORREGAARD, COWLAND, 1997; DALE, BOXER, LILES, 2008; FREITAS, LIMA, FERNANDES, 2009).

Figura 1 – Imagem representativa de um neutrófilo (N).

Os PMNs possuem como principais atividades funcionais a migração orientada para o local da infecção (quimiotaxia), aderência e englobamento do patógeno (fagocitose), e destruição dos microrganismos invasores através da liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e das substâncias tóxicas presentes nos grânulos como enzimas hidrolíticas e catiônicas (KUIJPERS, 2002).

I – Quimiotaxia

Para atingir os sítios de inflamação ou injúria, os PMNs circulantes devem deixar a corrente sanguínea através do endotélio e migrar para os tecidos seguindo em direção ao local da lesão por um processo chamado de quimiotaxia, cuja definição mais simples é a locomoção direcional dos PMNs ao longo de um gradiente químico (ZIGMOND, 1977; KUIJPERS, 2002; ZACHARIAE, 1993).

As sequências de eventos da jornada dos PMNs do lúmen vascular para o tecido intersticial podem ser divididas nas seguintes etapas: no lúmen ocorre marginação, rolamento, ativação, adesão ao endotélio, transmigração através do endotélio (diapedese) e a migração nos tecidos intersticiais em direção ao estímulo quimiotático (**Figura 2**) (MURDOCH, FINN, 2000; KUMAR et al, 2005).

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, interleucinas e produtos do metabolismo fosfolipídico (ZACHARIAE, 1993; CICCHETTI, ALLEN, GLOGAUER, 2002; KUIJPERS, 2002).

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 da maquinaria citoesquelética dessas células, permitindo assim a migração dos PMNs para o tecido alvo e a efetuação da fagocitose (DALE, BOXER, LILES, 2008; CICCHETTI, ALLEN, GLOGAUER, 2002).

Figura 2 – Representação esquemática das principais etapas do recrutamento de PMNs da circulação sanguínea para o local da inflamação e indicação da duração dos processos. Cada etapa envolve diferentes interações entre os fatores quimiotáticos e os receptores dos PMNs (não demonstradas). Figura modificada de JOHNSTON, BUTCHER, 2002

II – Fagocitose

Em 1880, Elie Metchnikoff observou a ingestão de bactérias por fagócitos profissionais e reconheceu a importância do processo de fagocitose como um mecanismo de defesa em organismos multicelulares (HAMPTON, KETTLE, WINTERBOURN, 1998).

Orientados por fatores quimiotáticos e pela presença em suas membranas de receptores para tais fatores, os neutrófilos atingem o local da lesão e atuam na defesa do organismo através do processo de fagocitose, que inclui: a adesão dessas células com o

agente patogênico, que é facilitada quando esse agente encontra-se opsonizado (JONES, LINDBERG, BROWN, 1999); *a ingestão* de tal agente através da emissão de pseudópodes ao seu redor com formação de um vacúolo chamado fagossoma (DALE, BOXER, LILES, 2008); *a desgranulação*, ou seja, descarregamento do conteúdo dos grânulos, que pode ocorrer no interior dos fagossomas, formando os fagolisossomos, ou no meio extracelular e *a destruição* do agente patogênico, que pode ocorrer por mecanismos independentes de oxigênio, através da ação das substâncias contidas nos grânulos, ou através de mecanismos dependentes de oxigênio, pela geração de radicais de oxigênio com grande potencial microbicida (**Figura 3**) (ZAGO, FALCÃO, PASQUINI, 2001).

Figura 3 – Representação esquemática dos mecanismos de defesa dependentes e independentes de oxigênio durante a fagocitose de bactéria pelo neutrófilo. Os mecanismos independentes de oxigênio abrangem três subconjuntos de grânulos citoplasmáticos: azurófilos, específicos e de gelatinase, os quais contêm proteases, proteínas e peptídeos antimicrobianos e enzimas características. A lisozima, por exemplo, rompe a superfície aniônica bacteriana, tornando a bactéria mais permeável. Já os mecanismos dependentes de oxigênio contam com a formação das espécies reativas de oxigênio (EROs). A formação das EROs é iniciada pela NADPH oxidase, que produz o radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$), o qual é rapidamente convertido à peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Por sua vez, a enzima mieloperoxidase, um dos constituintes do grânulo azurófilo, utiliza o H_2O_2 para produção de ácido hipocloroso (HOCl), um potente agente microbicida. Figura modificada de MAYER-SCHOL, AVERHOFF, ZYCHLINSKY, 2004.

III – O processo de desgranulação neutrofílica.

Como apresentado na **Figura 3**, 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 nos fagossomas é seguida pela liberação de substâncias microbidas dentro dos mesmos, causando a morte do patógeno. Tais substâncias microbidas são, principalmente, proteínas antimicrobianas como a defensina e a lisozima (que funcionam rompendo a superfície aniônica bacteriana), e proteases (que degradam proteínas bacterianas) (MAYER-SCHOL, AVERHOFF, ZYCHLINSKY, 2004; PHAM, 2006).

Dentre as diversas enzimas presentes nos grânulos, a enzima elastase neutrofílica é uma serinoprotease presente nos grânulos primários do neutrófilo 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 (BELAAOUAJ et al., 1998; TKALCEVIC et al., 2000; BRINKMANN et al., 2004).

Sob intensa ativação celular, a elastase é rapidamente liberada no espaço extracelular, onde além de matar os patógenos ali presentes, pode degradar fatores de virulência bacterianos (BRINKMANN et al., 2004). A elastase secretada também é responsável pela degradação das proteínas da matriz extracelular local, remodelação do tecido danificado, e facilitação da migração do neutrófilo através do tecido, durante a diapedese, em direção ao sítio de inflamação (DALLEGRI; OTTONELLO, 1997).

Dentre os componentes da matriz extracelular que podem ser alvos da atividade enzimática da elastase neutrofílica, estão uma variedade de ligantes de superfície celular, proteínas solúveis e um grande número de importantes moléculas de adesão. Esta enzima é capaz de digerir praticamente todos os tipos de proteínas da matriz, incluindo alguns tipos de colágeno fibronectina, proteoglicanas e fibras de elastina (CHUA, LAURENT, 2006; SCHORR et al., 2005).

Entretanto, em processos inflamatórios crônicos como em enfisema pulmonar, glomerulonefrite e artrite reumatóide, 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 (SMEDLY et al., 1986; BEYER, MELZIG, 2005).

IV – Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

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, pela produção de grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) (**Figura 3**) (BABIOR, 1999; MAYER-SCHOL, AVERHOFF, ZYCHLINSKY, 2004).

As EROs são moléculas altamente reativas devido à presença de um par de elétrons não pareados na última camada. Esta característica torna essas moléculas potentes agentes oxidantes, que atuam em conjunto com os constituintes dos grânulos para matar e digerir os agentes fagocitados (ZYCHLINSKY et al., 2003).

A produção das EROs através do metabolismo oxidativo pode ser desencadeada quando as células fagocíticas são expostas a alguns estímulos, como o agente promotor de tumores PMA (“Phorbol Myristate Acetate”), o potente peptídeo quimiotático fMLP (“n-Formil-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine”), ácido araquidônico (AA), concanavalina A, ionóforos, complexos imunes e ainda partículas antigênicas (zimosan, látex) opsonizadas com anticorpos e componentes do sistema complemento (BROWN, 1995).

O metabolismo oxidativo se inicia com o complexo enzimático localizado na membrana plasmática e fagossomal dos PMNs, denominado NADPH oxidase, o qual permanece inativo nas células em repouso, tornando-se ativado após a interação com patógenos (BABIOR, 1999; GROEMPING, RITTINGER, 2005).

Este complexo aceita elétrons de NADPH no citosol, gerado pela via de hexose monofosfato, e os transfere para o oxigênio molecular (O_2) presente no outro lado da membrana (tanto fora das células quanto dentro de fagossomas contendo microrganismos ingeridos), formando o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) que é a primeira espécie reativa de oxigênio formada e a fonte de todas as demais EROs produzidas durante a fagocitose (LEUSEN, VERHOEVEN, ROOS, 1999):

O superóxido produzido pode ser dismutado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) espontaneamente ou através da enzima superóxido dismutase. O H_2O_2 formado interage com a enzima mieloperoxidase (presente nos grânulos azurófilos dos PMNs) e com um haleto

(predominantemente o cloro) para produzir, dentro dos fagolisossomos, o ácido hipocloroso (HOCl), uma potente substância antibacteriana. Além dessas substâncias, uma grande variedade de outras EROs são produzidas durante o “burst” respiratório, como o oxigênio singlete, radicais hidroxilas e outros produtos microbicidas (VAN HEEREBEEK, et al., 2002; DALE, BOXER, LILES, 2008).

Apesar dos fagócitos possuírem outros mecanismos microbicidas, como os peptídeos e enzimas antimicrobianas, a geração das EROs e do ácido hipocloroso durante a fagocitose é considerado o mecanismo crítico na destruição da maioria dos patógenos invasores (DALE, BOXER, LILES, 2008). Tal fato é comprovado pela grande frequência de infecções fúngicas e bacterianas em indivíduos com doença granulomatosa crônica (CGD), uma doença genética caracterizada pela inativação da NADPH oxidase com consequente restrição na produção de agentes oxidantes microbicidas (FREITAS, LIMA, FERNANDES, 2009).

Para prevenir destruição dos tecidos com a produção das EROs, a atividade da NADPH oxidase deve se manifestar, preferencialmente, de forma regional, temporária e restrita ao interior do fagossoma. Um tipo de regulação da atividade enzimática que evita o aparecimento desses danos colaterais é a separação das subunidades da enzima em diferentes compartimentos subcelulares (citossol e membrana plasmática) durante o estado de repouso das células fagocíticas (GROEMPING, RITTINGER, 2005).

O centro enzimático da NADPH oxidase consiste em cinco componentes: $p40^{phox}$, (*PHOX* de Phagocyte Oxidase), $p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p22^{phox}$ e $gp91^{phox}$. Nas células em repouso, três desses componentes – $p40^{phox}$, $p47^{phox}$ e $p67^{phox}$ – se localizam no citossol na forma de um complexo. Os outros dois componentes – $p22^{phox}$ e $gp91^{phox}$ – são proteínas integrais de membrana e estão localizados na membrana de vesículas secretórias e grânulos específicos, onde se encontram como uma flavohemoproteína heterodimérica conhecida como citocromo b558 (chamado assim devido ao seu pico de absorbância em 558nm) (**Figura 4a**).

Quando as células em repouso são expostas a estímulos, o complexo citossólico é fosforilado e migra para a membrana, onde se associa com o citocromo b558. A ativação do complexo enzimático requer ainda a participação de uma proteína de baixo peso molecular (Rac1 ou Rac2), que nas células em repouso se localiza no citoplasma em um complexo dimérico com Rho-GDI (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor). Durante a ativação a Rac se dissocia de Rho-GDI, liga-se à guanosina trifosfato (GTP), e migra para a membrana onde participa da montagem e completa ativação da NADPH oxidase, tornando-a capaz de transferir os elétrons do substrato para o oxigênio (BABIOR, 1999) (**Figura 4b**).

Figura 4 – A- Ilustração dos componentes pertencentes a NADPH oxidase na célula em repouso. **B-** Ilustração dos processos de ativação do complexo enzimático após interação com o estímulo zimosan opsonizado (ZIops). Figura modificada de CATHCART, 2006.

Estudos indicam ainda que a regulação da montagem e estabilização da NADPH oxidase presente nos PMNs depende do citoesqueleto de actina de forma que os processos de polimerização e despolimerização da actina possuem um papel importante na ativação deste complexo enzimático (BENGTSSON, ORSELIUS, WETTERÖ; 2006).

A produção de EROs pelas células fagocíticas estimuladas pode ser medida por vários métodos, dentre eles: o espectrofotométrico (redução do ferricitocromo c) e a medida de quimioluminescência (QL) (LI, 1999; VAN DYKE; CASTRANOVA, 1987).

1.1.2 Quimioluminescência

As células fagocíticas emitem luz enquanto ingerem microrganismos e outras partículas. Este fenômeno, denominado quimioluminescência (QL), foi primeiramente descrito em 1972, sendo um indicador sensível da ativação metabólica dessas células. Desde a descoberta de que durante o “burst” respiratório os neutrófilos ativados geram luz, a técnica de QL tem sido largamente utilizada para medir a produção de EROs (EASMON et al., 1980; VAN DYKE; CASTRANOVA, 1987).

No entanto, a medida da QL nativa das células requer um grande número de PMNs e um detector altamente sensível a luz. Para contornar este problema, são utilizadas sondas quimioluminescentes, as quais são oxidadas pelas EROs produzidas durante a fagocitose e aumentam a quantidade de luz detectável. Tais sondas ampliam a eficiência de detecção dos fótons e a sensibilidade do método, além de reduzir o número de células necessárias nos ensaios (EASMON et al., 1980).

Nos métodos de QL, podem-se utilizar diversas sondas quimioluminescentes, dentre elas o luminol (5-amino-2,3-diidro-1,4-ftalazinediona) e a lucigenina (bis-N- metilacridinium) (LI, 1999; VAN DYKE, CASTRANOVA, 1987; FREITAS, LIMA, FERNANDES, 2009).

O luminol foi o primeiro agente amplificador de QL usado para estudo da atividade oxidativa de fagócitos maduros. Durante a QL dependente de luminol (QLlum) é medida a produção de todos os radicais com sensibilidade variada, em particular aqueles produzidos pelo sistema da mieloperoxidase (VAN DYKE; CASTRANOVA, 1987) (**Figura 5**). Devido a fatores como estrutura química, pequeno tamanho molecular e lipofilicidade, o luminol possui a capacidade de se difundir através de membranas biológicas, permitindo a detecção das EROS intra e extracelulares (BRIHEIM, STENDAHL, DAHLGREN, 1984; FREITAS, LIMA, FERNANDES, 2009).

A lucigenina mede especificamente o primeiro radical gerado, o ânion superóxido, presente no meio extracelular, uma vez que esta sonda não possui a capacidade de permear a membrana das células (KOPPRASCH, PIETZSCH, GRAESSLER, 2003; FREITAS, LIMA, FERNANDES, 2009). O mecanismo bioquímico proposto para a produção de QL dependente de lucigenina (QLluc) por ânions superóxidos envolve a dioxigenação redutiva desta sonda (**Figura 5**) (VAN DYKE; CASTRANOVA, 1987).

Figura 5 – Ilustração do mecanismo de ação das sondas quimioluminescentes luminol e lucigenina. Enquanto o luminol detecta a produção de todas as EROs, a lucigenina detecta especificamente a produção do ânion superóxido.

Procedimentos analíticos baseados em medidas de QL caracterizam-se por apresentar alta sensibilidade e ampla faixa de resposta linear (LEITE, FATIBELLO-FILHO, ROCHA, 2004). Como a produção de QL é dependente de EROs, os ensaios de QL dependente de luminol (QLlum) e de lucigenina (QLluc) têm sido empregados para o estudo de substâncias com atividade antioxidante (LIMASSET et al., 1999). Tais métodos estão entre os mais utilizados para a verificação da atividade antioxidante de diversos produtos naturais em leucócitos (ZIELINSKA, KOSTRZENZ, IGNATOWICZ, 2000; KANASHIRO, 2004; SIMÕES et. al., 2004; PAULA, et al., 2009).

1.1.3 Envolvimento de neutrófilos em doenças

Apesar dos benefícios da atividade antimicrobiana, a produção excessiva dos radicais livres pode atrair vários mediadores inflamatórios, contribuindo para geração de efeitos deletérios sobre os tecidos do hospedeiro localizados ao redor do foco de infecção (NIJVELDT et al., 2001).

A inflamação neutrofílica é uma resposta caracterizada pela infiltração de neutrófilos no tecido inflamado. A infecção do tecido por bactérias extracelulares representa o protótipo desta resposta inflamatória, porém várias doenças não infecciosas são caracterizadas pelo recrutamento extravascular de neutrófilos (MALECH;GALLIN, 1987).

Durante a fagocitose, processos citotóxicos são ativados e seus produtos liberados dentro dos fagossomas sendo que, geralmente, há pouca ou nenhuma liberação extracelular desses agentes. Entretanto, em contraste com esta produção intracelular e moderada das moléculas tóxicas, em algumas condições, principalmente em situações de intensa ativação celular, os neutrófilos podem liberar ativamente grandes quantidades de EROs e os conteúdos dos grânulos no espaço extracelular (DALLEGRI, OTTONELLO, 1997; FOSSATI, BUCKNALL, EDWARDS, 2007).

Embora as EROs e a elastase sejam importantes para a resposta imune inata, a excessiva liberação desses compostos citotóxicos 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 a saber: inflamatórias crônicas (artrite reumatóide, vasculite, glomerulonefrite, outras doenças auto-imunes), cardiovasculares (aterosclerose, isquemia miocárdica, lesão induzida por reperfusão, alguns tipos de alveolite por complexo imune), neurodegenerativas (esclerose múltipla, mal de Parkinson, Alzheimer), lesão hepática, doença pulmonária obstrutiva crônica e o câncer (DALLEGRI, OTTONELLO, 1997; KOBAYASHI et al., 2003; FITCH et al., 2006).

O organismo humano possui diversas moléculas antioxidantes e inibidoras de proteases endógenas, as quais têm a função de neutralizar as EROs e as proteases presentes no espaço extracelular. Apesar disso, um grande acréscimo na produção dos oxidantes e proteases nos sítios de inflamação resulta em consumo e depleção desses inibidores, bem como inativação dos mesmos (NIJVELDT et al., 2001).

Diante dos problemas causados pela produção e liberação excessiva de moléculas citotóxicas pelos neutrófilos, 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 liberação da elastase já foram identificadas (SIMÕES et. al., 2004; PAULA et al., 2009). Os efeitos dessas substâncias podem estar relacionados com vários mecanismos, como sequestro (“scavenger”) de radicais livres, inibição da produção de EROs, inibição de proteases, entre outros (BERGENDI et al., 1999).

1.2 A espécie *Baccharis dracunculifolia* De Candolle

Baccharis dracunculifolia DC (família Asteraceae), conhecida popularmente como “alecrim-do-campo”, “alecrim-de-vassoura”, “vassoureira”, “vassourinha” e “vassoura”, é uma espécie brasileira, com registros de ocorrência nas regiões sul, sudeste e centro-oeste, principalmente nas áreas de cerrado (**Figura 6**) (FERRACINI et al., 1995; BASTOS, 2001; BUDEL, et al., 2004).

Figura 6 – Ramo exemplar de *Baccharis dracunculifolia*.

Considerando seu emprego na medicina popular, é relatado o uso dos ramos e folhas desta espécie para combater distúrbios gástricos, cansaço físico, inapetência, afecções febris e debilidade orgânica, além de ser utilizada no tratamento de feridas e processos inflamatórios (SHUHAMA, 1988; BUDEL, et al., 2004).

Estudos revelaram que o óleo essencial de *B. dracunculifolia*, também conhecido como “óleo de vassoura”, além de ser utilizado na indústria de perfumaria (proporcionando um aroma exótico a diversos perfumes), possui expressiva atividade antioxidante, podendo inibir a formação de EROs em até 65% (FERRONATTO et al., 2006; FERRONATTO et al., 2007).

A utilização de *B. dracunculifolia* pelas indústrias é possível, pois pesquisas demonstraram que o cultivo desta planta e a sua produção em larga escala para fins comerciais são economicamente viáveis (DE SOUSA et al., 2009B)

Com relação ao metabolismo secundário, as espécies do gênero *Baccharis* são caracterizadas pela presença de diterpenos dos tipos clerodano e labdano, inclusive lactonas diterpênicas, além de suas substâncias aromáticas, como flavonóides e derivados do ácido cumárico (BOHLMANN; ZDERO, 1990). 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 (BAUER, TITTLEL, 1996; HOGEDAL, MOLGAARD, 2000).

A *B. dracunculifolia* possui folhas e principalmente ápices foliares densamente pontuados por tricomas glandulares, os quais sintetizam e acumulam micromoléculas e são de enorme importância na interação dessa espécie com insetos especialmente com as abelhas. Tal característica fez de *B. dracunculifolia* objeto de estudos entomológicos e despertou nos pesquisadores o interesse pela interação desta planta com as abelhas *Apis mellifera* na produção da própolis verde. Um aspecto interessante e muito importante desta interação é que as abelhas não coletam o material resinoso quando a planta está na época da floração e sim, durante seu período de crescimento (ESPÍRITO-SANTO, FARIA, FERNANDES, 1998; SPRING, 2000; BASTOS, 2001).

Baccharis dracunculifolia é considerada a principal fonte botânica da própolis verde, sendo que a própolis é um produto altamente valorizado e utilizado pela indústria farmacêutica e tem sido alvo de inúmeros estudos farmacológicos, que demonstram atividades: antitumoral, antimicrobiana, anti-inflamatória, tripanocida, imunomodulatória antioxidante e sequestradora de radicais livres (DIMOV et al., 1991; BASTOS, 2001; MARCUCCI et al., 2001; BANKOVA et al., 2000; PARK, ALENCAR, AGUIAR, 2002; SFORCIN, ORSI, BANKOVA, 2005).

Segundo estudos de Simões-Ambrósio (2005), foi demonstrado que a própolis verde, na forma de extrato etanólico bruto, inibe o “burst” respiratório de PMNs estimulados com zimosan opsonizado, o que foi verificado através da medida da quimioluminescência. Foi revelado também que este efeito foi influenciado por fatores sazonais e que não estava relacionado a eventos tóxicos sobre as células.

Estudos demonstram que a *Baccharis dracunculifolia* e a própolis verde brasileira possuem diversos compostos químicos em comum como o ácido cafeico, ácido *p*-coumárico,

ácido ferúlico, ácido cinâmico, aromadendrina-4'-metil éter (AME), artemillin C, baccharina, entre outros. (DE SOUSA, et al., 2009A).

Devido à grande semelhança entre os perfis químicos da própolis verde e da *Baccharis dracunculifolia*, esta planta tem sido alvo de inúmeros estudos nos últimos anos, os quais evidenciaram que a *B. dracunculifolia*, assim como a própolis, possui diversas atividades biológicas como: sequestradora de radicais livres, anticariogênica, antimicrobiana, anti-úlceras, imunomodulatória e anti-inflamatória (LEITÃO et al., 2004; PARK et al., 2005; LEMOS et al., 2007; MISSIMA et al., 2007; DA SILVA FILHO et al., 2009; DOS SANTOS et al., 2010).

Apesar das diversas atividades apresentadas pela *Baccharis dracunculifolia*, a influência da sazonalidade sobre sua constituição química pode alterar a amplitude das ações biológicas desempenhadas por seus extratos e frações, o que representa um fator que dificulta a padronização dos efeitos da planta (GOBBO-NETO, LOPES, 2007).

Frente ao exposto, verifica-se a importância do estudo da influência da sazonalidade na composição química de *B. dracunculifolia* e no seu efeito sobre o metabolismo oxidativo de PMNs. Além disso, torna-se interessante a pesquisa dos mecanismos de ação responsáveis por este efeito. Sendo assim, a avaliação desses fatores é de fundamental importância para o reconhecimento de *B. dracunculiolia*, como um potencial agente terapêutico brasileiro.

4. Conclusões

Os resultados deste trabalho demonstram que os EEBBd possuem atividade inibitória da QL em PMNs estimulados de maneira dependente da concentração e que esta atividade varia ao longo do período de tempo estudado devido à influência da sazonalidade. Foi verificado também que fatores climáticos, como índice pluviométrico e temperatura, podem estar relacionados com esta atividade biológica.

As análises cromatográficas dos compostos avaliados (ácido caféico, ácido *p*-cumárico, aromadendrina-4'-metil éter, isosakuranetina e artepilin C) revelaram que não houve evidente variação qualitativa entre os extratos dos diferentes meses, porém foi observada grande diferença quantitativa dos compostos majoritários que compõem os extratos.

A correlação entre a atividade antioxidante apresentada pelos EEBBd com os compostos fenólicos avaliados e as concentrações de fenóis e flavonóides totais presentes nas amostras sugerem que alguns desses compostos fenólicos podem estar agindo como compostos pró-oxidantes, diminuindo assim o efeito antioxidante final apresentado por todos os extratos.

Apesar do efeito sinérgico das diversas substâncias dos EEBBd ser relevante, não se pode deixar de ressaltar a presença de um pico proeminente com tempo de retenção próximo à 43 min. (Figura 31) na amostra de maior atividade biológica e com área significativamente superior às encontradas nos cromatogramas das demais amostras para o mesmo tempo de retenção. Pode ser que o composto referente a este pico esteja influenciando na elevada atividade antioxidante da amostra.

A pesquisa acerca dos possíveis mecanismos de ação responsáveis pela atividade antioxidante dos EEBBd, efetuada através de ensaios com a amostra de maior atividade, demonstrou que a capacidade da amostra em inibir a QL produzida por PMNs estimulados não estava relacionada com a toxicidade direta do extrato sobre tais células.

Foi verificado também que o EEBBd apresentou atividade “scavenger” e modulou negativamente a atividade do complexo enzimático da NADPH oxidase de forma dependente da concentração. No entanto, altas concentrações do EEBBd foram necessárias para atingir o CI_{50} de ambos os ensaios, quando comparada à concentração do EEBBd necessária para a inibição de 50% da QLluc, evidenciando que os dois mecanismos de ação avaliados contribuem parcialmente para a modulação negativa do metabolismo oxidativo dos PMNs estimulados com zimosan opsonizado. Portanto, outros mecanismos moleculares devem estar envolvidos neste processo.

Referências

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. *Imunologia celular e molecular*. 5ª ed, Rio de Janeiro: Elsevier editora, 2005.

AGRITEMPO - Sistema de Monitoramento Agrometeorológico do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agritempo.gov.br>>. Acesso em 15 mai. 2009.

ALLEN, R.C.; STJERNHOLM, R.L.; STEELE, R.H. Evidence for the generation of an electronic excitation state(s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.47, n.4, p.679-684, 1972.

AMARAL, S.; MIRA, L.; NOGUEIRA, J.M.; DA SILVA, A.P.; 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. **Bioorganic & medicinal chemistry**, London, v.17, n.5, p.1876-1883, 2009.

BABIOR, B.M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, New York, v.93, n.5, p.1464-1476, 1999.

BABIOR, B.M. Phagocytes and oxidative stress. **American Journal of Medicine**, Marion, v.109, n.1, p.33-44, 2000.

BAINTON DF, ULLYOT JL, FARQUHAR MG. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. **The Journal of experimental medicine**, New York, v.134, n.4, p.907-134, 1971.

BANKOVA, V. S. ; CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M.C.. Própolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, p.3-15, 2000.

BASTOS, E. M. **Origem botânica e indicadores de qualidade da "própolis verde" produzida no estado de Minas Gerais, Brasil**. 137f. Tese de doutorado - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP. 2001.

BAUER, R.; TITTEL, G. Quality assessment of herbal preparations as a preconization of pharmacological and clinical studies. **Phitomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, Stuttgart, v.2, n.3, p.193-198, 1996.

BELAAOUAJ, A.A.; MCCARTHY, R.; BAUMANN,M.; GAO,Z.; LEY, T.J.; ABRAHAM,S.N.; SHAPIRO,S.D. Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. **Nature Medicine**, New York, v.4, n.5, p.615-618, 1998.

BENGTTSSON T, ORSELIUS K, WETTERÖ J. Role of the actin cytoskeleton during respiratory burst in chemoattractant-stimulated neutrophils. **Cell biology international**, London, v.30, n.2, p.154-163, 2006.

BERGENDI, L.; BENES, L.; DURACKOVA, Z., FERENCIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life Sciences**, Berlin, v.65, n.18, p.1865-1874, 1999.

- BEYER, G.; MELZIG, M.F. Effects of propolis on hypoxanthine-xanthine oxidase-induced toxicity in cultivated human cells and on neutrophil elastase activity. **Biological & pharmaceutical bulletin**, Japan, v.28, n.7, p.1183-1186, 2005.
- BLOIS, MS Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, v.181, p.1199-1200, 1958.
- BOHLMANN, F.; ZDERO, C. Systematics and evolution within the Compositae seen with the eyes of a chemist. **Plant Systematics and Evolution**, Wien, v.171, p.1-14, 1990.
- BORREGAARD, N.; COWLAND, J.B. Granules of the Human Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocyte. **Blood**, New York, v.89, n.10, p.3503-3521, 1997.
- BRIHEIM, G.; STENDAHL, O.; DAHLGREN C. Intra- and extracellular events in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. **Infection and immunity**, Bethesda, v.45, n.1, p.1-5, 1984.
- BRINKMANN, V.; REICHARD, U.; GOOSMANN, C.; FAULER, B.; UHLEMANN, Y.; WEISS, D. S.; WEINRAUCH, Y.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, Washington, v.303, n.5663, p.1532-1535, 2004;
- BROWN, E.J. Phagocytosis. **Bioassays**, New York, v.17, p.109-117, 1995.
- BUDEL, J.M.; DUARTE, M.R.; SANTOS, C.A.M.; FARAGO, P.V. Morfoanatomia Foliar e Caulinar de *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, Buenos Aires, v.23, n.4, p.477-483, 2004.
- CAIN, K.; SKILLETER, D.N. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: Snell, K.; Mullock, B. (Eds.). **Biochemical Toxicology**. Oxford: IRL Press, p.217-254, 1987.
- CATHCART, M.K. Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: contributions to atherosclerosis. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, Dallas, v. 24 n.1, p.23-8, 2004.
- CHANCE, B; WILLIAMS; G. R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. **Adv. Enzymol.** New York, v.17, p.65-134, 1956.
- CHAVRIER, P. Molecular basis of phagocytosis. **Seminars in Immunology**, London, v.13, n.6, p.337-338, 2001.
- CHUA, F.; LAURENT, G.J.; Neutrophil elastase mediator of extracellular matrix destruction and accumulation . **Proceedings of the American Thoracic Society**, New York, v.3, n.5, p. 424-427, 2006.
- CICCHETTI, G.; ALLEN, P.G.; GLOGAUER, M. Chemotactic signaling pathways in neutrophils: from receptor to actin assembly. **Crit Ver Oral Biol Méd**, London, v.13, p.220, 2002.

- DALE, D.C.; BOXER, L. LILES, W.C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. **Blood**, New York, v.112, n.4, 2008.
- DA SILVA FILHO, A.A.; RESENDE, D.O.; FUKUI, M.J.; SANTOS, F.F.; PAULETTI, P.M.; CUNHA, W.R.; SILVA, M.L.; GREGÓRIO, L.E.; BASTOS, J.K.; NANAYAKKARA, N.P. In vitro antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). **Fitoterapia**, Milano, v.80, n.8, p.478-482, 2009.
- DAVIES, K.J.A. Oxidative stress, antioxidant defense, and damage removal, repair and replacement systems. **IUBMB Life**, London, v.50, n.4/5, p.279-289, 2000.
- DALLEGRI, F.; OTTONELLO, L. Tissue injury in neutrophil inflammation. **Inflammation research**, Basel, v.46, n.10, p.382-391, 1997.
- DE SOUSA, J.P.; DA SILVA-FILHO, A.A.; BUENO, P.C.; GREGÓRIO, L.E.; FURTADO, N.A.; JORGE, R.F.; BASTOS, J.K. A validated reverse-phase HPLC analytical method for the quantification of phenolic compounds in *Baccharis dracunculifolia*. **Phytochemical analysis: PCA**, Chichester, v.20, n.1, p.24-32, 2009 A.
- DE SOUSA, J.P.; LEITE, M.F.; JORGE, R.F.; RESENDE, D.O.; DA SILVA FILHO, A.A.; FURTADO, N.A.; SOARES, A.E.; SPADARO, A.C.; DE MAGALHÃES, P.M.; BASTOS, J.K. Seasonality role on the phenolics from cultivated *Baccharis dracunculifolia*. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, Oxford, doi:10.1093/ecam/nep077, 2009B
- DIMOV, V.; IVAVOWSKA, N.; BANKOVA, V.; POPOV, S. Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against gram-negative infections and adjuvant effect of the water-soluble derivative, **Vaccine**, Amsterdam, v.10, p.817-823, 1992.
- DOS SANTOS, D.A.; FUKUI, M.D.; DHAMMIKA NANAYAKKARA, N.P.; KHAN, S.I.; SOUSA, J.P.; BASTOS, J.K.; ANDRADE, S.F.; DA SILVA FILHO, A.A.; QUINTÃO, N.L. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) in different experimental models. **Journal of ethnopharmacology**, Lausanne, v.127, n.2, p.543-550, 2010.
- DOWD, L.E. Spectrophotometric Determination of Quercetin. **Analytical Chemistry**, Washington, v.31, n.7, p.1184-1187, 1959.
- EASMON, C.S.F.; COLE, P.J.; WILLIAMS, A.J.; HASTINGS, M. The measurement of opsonic and phagocytic function by Luminol-dependent chemiluminescence. **Immunology**, Oxford, v.41, p.67-74, 1980.
- ESPÍRITO-SANTO, M. M.; FARIA, M. L.; FERNANDES, G. W. Parasitoid attack and its consequences to the development of the galling psyllid *Baccharopelma dracunculifoliae*. **Basic Applied Ecology**, v. 5, p. 475-484, 2004.
- FERRACINI, V.L.; PARAÍBA, L.C.; LEITÃO FILHO, H.F.; DA SILVA, A.G.; NASCIMENTO, L.R.; MARSAIOLI, A.J. Essential oils of seven *Baccharis* species. **Journal of the Essential Oil Research**, v.7, p.355-367. 1995.

- FERRONATTO, R.; MARCHESAN, E.D.; BEDNARSKI, F.; ALENCAR, S.M.; ONOFRE, S.B. Antioxidant activity of the essential oils produced by *Baccharis dracunculifolia* d. c. and *Baccharis uncinella* d. c. (asteraceae). **Arquivos de ciências da saúde da UNIPAR**, Umuarama, v.10, n.2, p.67-70, 2006.
- FERRONATTO, R.; MARCHESAN, E.D., PEZENTI, E.; BEDNARSKI, F., ONOFRE, S.B. Antimicrobial activity of essential oils produced by *Baccharis dracunculifolia* D.C. and *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Revista brasileira de farmacognosia**, João Pessoa, v.17, n.2, p. 224-230, 2007.
- FITCH, P.M; ROGHANIAN, A; HOWIE, S.E.M; SALLENAVE, J.M. Human neutrophil elastase inhibitors in innate and adaptative immunity. **Biochemical Society Transactions**, London, v.34, p.279-82, 2006.
- FOSSATI, G.; BUCKNALL, R.C.; EDWARDS, S.W. Insoluble and soluble immune complexes activate neutrophil by distinct activation mechanisms: changes in functional responses induced by priming with cytokines. **Annals of the Rheumatic Diseases**, London, v.61, n.1, p.13-19, 2007.
- FREITAS, M; LIMA, J.L.F.C.; FERNANDES, E. Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.649, p.8 – 23, 2009.
- FRESHNEY, R.I. Measurement of viability and citotoxicity. In:_____. **Culture of animal cells: a manual of basic techniques**. 3 ed. New York: John Wiley & Sons, Cap. 19, p. 287-307, 1994.
- FUKUMOTO LR, MAZZA G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v.48, n.8, p.3597-3604, 2000.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v.30, n.2, p.374-381, 2007.
- GREGÓRIO, L.E., **Influência da sazonalidade na composição polínica, no perfil químico e na atividade antimicrobiana da própolis produzida em Cajuru-SP**. 2003. 174f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração: Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto – SP, 2003
- GROEMPING, Y.; RITTINGER, K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. **The Biochemical journal**, London, v.15, n.386, p.401-416, 2005.
- HAMPTON, M.B.; KETTLE, A.J.; WINTERBOURN, C.C. Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing. **The Journal of The American Society of Hematology**, New York, v.92, n.9, p. 3007-3017, 1998.

HARNAFI, H.; AMRANI, S. Spectrophotometric Methods for Determination of Plant Polyphenols Content and their Antioxidant Activity Assessment: an Overview. **Pharmacognosy Reviews**, Bangalore, v.2, n.3, p.20-22, 2008.

HENSON, P.M. The immunology release of constituents from neutrophils leukocytes. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.107, n.6, p.1535-1546, 1971.

HOGEDAL, B.D.; MOLGAARD, P. HPLC analysis of seasonal and diurnal variation of iridoids in cultivars of *Antirrhinum majus*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v.28, p.929-962, 2000.

JIANG, Q.; HÅKANSSON, M.; SUOMI, J.; ALA-KLEME, T.; KULMALA, S. Cathodic electrochemiluminescence of lucigenin at disposable oxide-coated aluminum electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Lausanne, v.591, n.1, p.85-92, 2006.

JOHNSON, K.J.; VARANI, J.; SMOLEN, J.E. Neutrophil activation and function in health and disease. **Immunology series**, New York, v.57, p.1-46, 1992.

JOHNSTON, B.; BUTCHER, E.C. Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration. **Seminars in immunology**, Philadelphia, v.14, n.2, p.83-92, 2002.

JONES, S.L.; LINDBERG, F.P.; BROWN, E.J. Phagocytosis. In: PAUL, W.E. **Fundamental Immunology**. 4^a. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, Cap.30, p.997-1020. 1999.

KABEYA, L.M. **Estudo do efeito de cumarinas simples no metabolismo oxidativo de neutrófilos de coelho: aspectos metodológicos, avaliação da atividade e da sua relação com a toxicidade e com propriedades físico-químicas dos compostos**. 2002. 140f. dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração: Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2002.

KAHLER, C.P. Evaluation of the Use of the Solvent Dimethyl Sulfoxide in Chemiluminescent Studies. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, Orlando, v.26, n.6, p.626-633, 2000.

KANASHIRO, A.; KABEYA, L.M.; POLIZELLO, A.C.; LOPES, N.P.; LOPES, J.L.; LUCISANO-VALIN, Y.M. Inhibitory activity of flavonoids from *Lychnophora* sp. on generation of reactive oxygen species by neutrophils upon stimulation by immune complexes. **Phytotherapy Research**. London, v.18, p.61-65, 2004.

KOBAYASHI, S.D.; VOYICH, J.M.; DELEO, F.R. Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. **Microbes and Infection**, Paris, v.5, n.14, p.1337-1344, 2003.

KOPPRASCH S, PIETZSCH J, GRAESSLER J. Validation of different chemilumigenic substrates for detecting extracellular generation of reactive oxygen species by phagocytes and endothelial cells. **Luminescence: the journal of biological and chemical luminescence**, Chichester, v. 18, n.5, p.268 -273, 2003.

KUIJPERS, T.W; Clinical symptoms and neutropenia: the balance of neutrophils development, functional activity, and cell death. **European journal of pediatrics**, Berlin, v.161, n.1, p. S75-S78, 2002.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; ROBINS, S.L.; COTRAN, V. **Bases patológicas das doenças**. 7^a. ed, Rio de Janeiro: Elsevier editora, 2005.

LABTEST (Lagoa Santa). **LDH Liquiform**. Lagoa Santa, MG, Brasil. 2000.

LEITÃO, D.P.; FILHO, A.A.; POLIZELLO, A.C.; BASTOS, J.K.; SPADARO, A.C. Comparative evaluation of in-vitro effects of Brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. **Biological & pharmaceutical bulletin**, Tokyo, v.27, n.11, p.1834 – 1839, 2004.

LEITE, O.D.; FATIBELLO-FILHO, O.; ROCHA, F.R.P. Um experimento de análise em fluxo envolvendo reações enzimáticas e quimiluminescência. **Química. Nova**, v.27, n.2, p. 337-341, 2004.

LEMONS, M.; DE BARROS, M.P.; SOUSA, J.P.; DA SILVA FILHO, A.A.; BASTOS, J.K.; DE ANDRADE, S.F. *Baccharis dracunculifolia*, the main botanical source of Brazilian green propolis, displays antiulcer activity. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, London, v.59, n.4, p.603 – 608, 2007.

LEUSEN, J.H.; VERHOEVEN, A.J.; ROOS D. Interactions between the components of the human NADPH oxidase: intrigues in the phox family. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, New York, v.128, n.5, p.461-76. 1999.

LI, Y.; ZHU, H.; TRUSH, M.A . Detection of mitochondria-derived reactive oxygen species production by the chemilumigenic probes lucigenin and luminol. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1428, p.1-12, 1999.

LI, N.; RAGHEB, K.; LAWLER, G.; STURGIS, J.; RAJWA, B.; MELENDEZ, J.A.; ROBINSON, J.P. DPI induces mitochondrial superoxide-mediated apoptosis. **Free radical biology & medicine**. New York, v.34, n.4, p.465-77, 2003.

LIMASSET, B.; OJASOO, T.; LE DOUCEN, C.; DORE, J.C. Inhibition of chemiluminescence in human PMNs by monocyclic phenolic acids and flavonoids. **Planta Medica**, Stuttgart, v.65, n.1, p.23-29, 1999.

LUCISANO, Y.M.; MANTOVANI, B. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and IgG. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.132, p.2015-2020, 1984.

LUSTER A.D., ALON R., VON ANDRIAN U.H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. **Nature immunology**, New York, v.6, n. 12, p. 1182-1190, 2005.

MALECH, H.L.; GALLIN, J.L. Current concepts: Immunology. Neutrophils in human diseases. **The New England Journal of Medicine**, London, v.317, n.11, p.687-694, 1987.

- MARCUCCI, M.C.; FERRERES, F.; GARCIA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S.L.; DANTAS, A. P.; VALENTE, P. H.; PAULINO, N.. Phenolics compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of thnopharmacology**, v.74(2), p.105-112, 2001.
- MAYER-SCHOLL, A.; AVERHOFF, P.; ZYCHLINSKY, A. How do neutrophil and pathoens interact? **Current Opinion in Microbiology**, London, v.7, n.1, p.62-66, 2004.
- MIDDLETON JÚNIOR, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C, The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v.52, n.4, p.673-751, 2000.
- MISSIMA, F.; DA SILVA FILHO, A.A.; NUNES, G.A.; BUENO, P.C.; DE SOUSA, J.P.; BASTOS, J.K.; SFORCIN, J.M. Effect of *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) extracts and its isolated compounds on macrophage activation. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, London, v.59, n.3, p.463-468, 2007.
- MURDOCH C., FINN A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. **Blood**, v.95, n.10, p.3032-3043, 2000.
- NAGATOMI, R.; The implication of alterations in leukocyte subset counts on immune function. **Exercise immunology review**, v.12, p.54-71, 2006.
- NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature Reviews Immunology**, London, v.6, n.3, p.173-182, 2006.
- NIJVELDT, R.J.; VAN NOOD, E.; VAN HOORN, D.E.; BOELEN, P.G.; VAN NORREN, K.; VAN LEEUWEN, P.A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American journal of clinical nutrition**. Bethesda, v.74, n.4, p.418-25, 2001.
- PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.50, n.9, p.2502-2506, 2002.
- PARK, Y.K.; PAREDES-GUZMAN, J.F.; AGUIAR, C.L.; ALENCAR, S.M.; FUJIWARA, F.Y. Chemical Constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the Main Botanical Origin of Southeastern Brazilian Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.52, n.1, p.1100-1103, 2004.
- PARK, Y.K.; FUKUDA, I.; ASHIDA, H.; NISHIUMI, S.; YOSHIDA, K.; DAUGSCH, A.; SATO, H.H.; PASTORE, G.M. Suppressive effects of ethanolic extracts from propolis and its main botanical origin on dioxin toxicity. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v.53, n.26, p.10306 -10309, 2005.
- PAUL, J. Media for culturing cells and tissues II – defined media. In: **Cell and tissue culture**. 4.ed. Edinburg and London, Livingstone, p.91E. 1970.

PAULA, F.S.; KABEYA, L.M.; KANASHIRO, A.; de FIGUEIREDO, A.S.G.; AZZOLINI, A.E.C.S.; UYEMURA, S.A.; LUCISANO-VALIM, Y.M., Modulation of human neutrophil oxidative metabolism and degranulation by extract of *Tamarindus indica* L. fruit pulp. **Food and Chemical Toxicology**, London, v.47 n.1, p.163–170, 2009.

PAYÁ, M.; GOODWIN, P.A.; HERAS, B.; HOULT, J.R.S. Superoxide scavenging activity in leukocytes and absence of cellular toxicity of a series of coumarins. **Biochemical Pharmacology**, Berlin, v.48, n.3, p.445-451, 1994.

PHAM, C.T.N. Neutrophil serine proteases: specific regulator of inflammation. **Nature reviews Immunology**, London, v.6, n.7, p.541-550, 2006.

RODRIGUES, T.; SANTOS, A.C.; PIGOSO, A.A.; MINGATTO, F.E .; UYEMURA, S.A.; CURTI, C. Thioridazine interacts with the membrane of mitochondria acquiring antioxidant activity toward apoptosis - potentially implicated mechanisms. *British Journal of Pharmacology*, v.136, p.136-142, 2002.

SAKIHAMA Y, COHEN MF, GRACE SC, YAMASAKI H. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. **Toxicology**, Amsterdam, v.177, n.1, p.67-80, 2002.

SCHORR, K.; ROTT, A.; DA COSTA, F.B.; MERFORT, I. Optimization of a human neutrophil elastase assay an investigation of the effect of sesquiterpene lactones. **Biologicals**, London, v.33, n.3, p.175-184, 2005

SFORCIN, J. M., ORSI, R. O., BANKOVA, V. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. **Journal of ethnopharmacology**, Ireland, v.98, n.1, p.301-305, 2005.

SHU, Y.Z.; Recent Natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, New York, v.61, p.1053-1071, 1998.

SHUHAMA, I.K. Presença de atividade antiedematogênica no extrato bruto e frações obtidas por purificação parcial de *Baccharis dracunculifolia* DC (alecrim-do-campo). Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 91 p., 1988.

SIMÕES, L.M.C; GREGÓRIO, L.E.; DA SILVA-FILHO, A.A; DE SOUZA, M.L.; AZZOLINI, A.E.C.S.; BASTOS, J.K.; LUCISANO-VALIM, Y.M. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. **Journal of Ethnopharmacology**, Ireland, v.94, n.1, p.59–65, 2004.

SIMÕES-AMBROSIO, L.M.C. Estudo do efeito de extratos de própolis verde sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos: influência da sazonalidade e relação com a composição química. 2005. 119f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração: Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto-SP, 2005.

SMEDLY, L.A.; TONNESEN, M.G.; SANDHAUS, R.A.; HASLETT, C.; GUTHRIE, L.A.; JOHNSTON, R.B.J.; HENSON, P.M.; WORTHEN, G.S. Neutrophil-mediated injury to endothelial cells. Enhancement by endotoxin and essential role of neutrophil elastase. **The Journal of clinical investigation**, New Haven, v.77, n.4, p.1233-1243, 1986.

SPRING, O. Chemotaxonomy based on metabolites from glandular trichomes. **Advances in Botanical Research.**, New York, v.31, p.153-174, 2000.

TKALCEVIC, J.; NOVELLI, M.; PHYLACTIDES, M.; IREDALE, J.P.; SEGAL, A. W.; ROES, J. Impaired immunity and enhanced resistance to endotoxin in the absence of neutrophil elastase and cathepsin G. **Immunity**, Cambridge, v.12, p. 201-210, 2000.

VAN DYKE, K.; CASTRANOVA, V. **Cellular chemiluminescence**. Boca Raton, v.1, p.162-192. 1987.

VAN HEEREBEEK, L.; MEISCHL, C.; STOOKER, W.; MEIJER, C.J., NIESSEN, H.W.; ROOS, D. NADPH oxidase(s): new source(s) of reactive oxygen species in the vascular system?. **Journal of clinical pathology**, London, v.55 n.8 p.561-8, 2002.

ZACHARIAE, C.O. Chemotactic cytokines and inflammation. Biological properties of the lymphocyte and monocyte chemotactic factors ELCF, MCAF and IL-8. **Acta dermatovenereologica. Supplementum**. Stockholm, v.181, n.1, p.1-37, 1993).

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia: Fundamentos e Prática**. 1^a.ed. São Paulo: Atheneu, p.9-43. 2001.

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, Lithuania)**, Lithuania, v.44, n.9, p.699-705, 2008.

ZIELINSKA, M.; KOSTRZENZ, A.; IGNATOWICZ, E. Antioxidative activity of flavonoids in stimulated human neutrophils. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, Warsaw, v.38, n.1, p.25-30, 2000

ZIGMOND, S.H. Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors. **The Journal of cell biology**, New York, v.75, n.1, p.606-616, 1977.

ZYCHLINSKY, A.; WEINRAUCH, Y.; WEISS, J. Forum in immunology. Introduction: Forum in immunology on neutrophils. **Microbes and infection**, Paris, v.5, n.14, p.1289-1291, 2003.

WOEBER, K.A.; INGBAR, S.H. Metabolism of L-thyroxine by phagocytosing human leukocytes. **The Journal of clinical investigation**, New Haven, v.52, n.8, p.1796-1803, 1973.