

MÍRIAN FELICIANO DA COSTA

**EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS FOLHAS DE *EUGENIA AURATA* E DE
EUGENIA PUNICIFOLIA (HBK) INIBE A MIGRAÇÃO NEUTROFÍLICA POR
MECANISMOS DISTINTOS**

ASSIS

2015

MÍRIAN FELICIANO DA COSTA

**EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS FOLHAS DE *EUGENIA AURATA* E DE
EUGENIA PUNICIFOLIA (HBK) INIBE A MIGRAÇÃO NEUTROFÍLICA POR
MECANISMOS DISTINTOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Letras de Assis - UNESP - para obtenção do título de mestre em Biociências (Área de conhecimento: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica).

Orientadora: Dra. Karina Alves de Toledo

Co-orientadora: Dra. Catarina dos Santos

ASSIS

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Biblioteca da F.C.L. – Assis – UNESP

C837e Costa, Mirian Feliciano da
Extrato hidroetanólico das folhas de *Eugenia aurata* e de *Eugenia punicifolia* HBK inibe a migração neutrofílica por mecanismos distintos / Mirian Feliciano da Costa. Assis, 2015
70 f. : il.

Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências e Letras de Assis - Universidade Estadual Paulista.
Orientador: Dr^a Karina Alves de Toledo

Co-orientador: Dr^a Catarina dos Santos

1.Inflamação. 2. Mirtaceae. 3. *Eugenia* (Planta). 4. Neutrófilos. I. Título.

CD 616.072

FOLHA DE APROVAÇÕES

Dedico este trabalho à Deus, aos meus pais, família, e orientadoras, os quais me possibilitaram enxergar o viver de uma forma mais esperançosa e encorajadora, e cujo apoio foi essencial para tornar este trabalho possível.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, pela fé, pela provisão, proteção e cuidado e pela capacidade de compreensão e deslumbramento frente à beleza de sua criação nas mais diversas formas e esferas do conhecimento, dentre as quais o incrível universo abarcado pela Imunologia.

Às pessoas - sempre as pessoas! - com as quais Deus me presenteou e me agracia dia a dia. Ninguém é uma ilha e todo dia aprendo isso. Dentre tantas pessoas, há aquelas que se destacam, não só pelo que representam pra mim, como também pelo que foram e que são propriamente, e que por isso as menciono aqui.

Aos meus pais - Anselmo e Edna, pelo exemplo, garra, apoio, investimento, e por terem acreditado, mais uma vez, em meu potencial e terem vivenciado e lutado comigo em mais esta etapa.

À minha mãe - Edna, pelo encorajamento constante e por sua fé inabalável, a qual, mesmo em face das adversidades, não mostrou sinais de abatimento nem tampouco desânimo, permanecendo sempre temperante.

À minha família como um todo pelo apoio e, em especial, às minhas irmãs - Débora e Priscila - as quais também me deram ânimo e suporte pra continuar, sempre.

Aos meus avós - maternos Laurinda e José Feliciano (*in memoriam*) -, e a minha avó paterna - Alice (*in memoriam*) – pela persistência na fé e pela coragem, (ainda que, por ora, não estejam presentes fisicamente) suas memórias, exemplos e ajudas, contribuíram para concretização deste passo.

Aos meus sobrinhos - Maria Eduarda e Miguel - em cujos olhares enxergo a ternura, simplicidade, inocência e beleza da vida e que me animam, continuamente, a prosseguir.

À minha orientadora - Karina, primeiramente pela confiança, paciência no lidar e na transferência de conhecimento. Além disso, agradeço pelo exemplo pessoal de superação e de persistência, amizade, “puxões de orelha” necessários ao longo do processo, apoio e encorajamentos constantes no decorrer de todo o mestrado.

À minha co-orientadora - Catarina, por mais uma vez, ter confiado e apostado em mim na execução de mais uma pesquisa. Agradeço por mais uma vez ter sido paciente, ter compartilhado seus conhecimentos, sua amizade e seu apoio durante todo esse tempo, e por ter me apresentado à professora Karina, possibilitando esse trabalho em conjunto.

Ao professor Rondinelli, pela solicitude em disponibilizar uma vaga no processo seletivo, para que eu pudesse concorrer, e assim entrar no programa de pós-graduação em Biociências.

Às amigas, companheiras de turma - Graciele, Vanessa - pela companhia, boas risadas, sangue doado inúmeras vezes (o que colaborou demasiadamente na realização desse trabalho!), fé partilhada nos momentos difíceis, trabalhos em grupo e encorajamento mútuo e amizade, que a levemos pra vida!

À Igreja Batista e, em especial, ao pastor Gilsomar e sua esposa Fabiana, pelo exemplo, acolhimento, conselhos, fé partilhada e amizade.

Aos colegas de laboratório pela convivência e aprendizados enquanto grupo de pesquisa, e, em especial, à Taís, pela colaboração essencial neste trabalho.

Às enfermeiras Luzia Rosa da Silva e Roseli Aparecida Vezanfard Soto, bem como ao biomédico Ivan Vicente Nascimento, pela inestimável colaboração na coleta de sangue para os experimentos.

Aos funcionários da Unesp - Sivaldo, Alessandro, Giba, Alan, Natália, Marcos, e Ricardo - os quais me auxiliaram, seja na realização direta da parte prática ou

teórica deste trabalho, como também me possibilitando a entrada na universidade mesmo nos finais de semana e feriados.

À Capes pelo fomento ao trabalho.

E a todos que, ainda que minha memória me oculte os nomes por ora, colaboraram de alguma forma para concretização deste trabalho.

“O seu tempo é a sua vida (...) e por isso o melhor presente que você pode dar a alguém é o seu tempo...” Rick Warren

Minha eterna gratidão aos que vivenciaram comigo mais esta etapa... Muito obrigada!

“As perfeições de Deus são tão grandes e tão admiráveis que,
se o mundo estivesse cheio de livros,
se todas as criaturas fossem outros tantos escritores
e se toda a água dos mares se convertesse em tinta,
primeiro se encheriam todos os livros,
se cansariam todos os escritores e se
esgotariam os mares, e ainda se não teria
explicado uma só de suas perfeições”.

(Santo Agostinho)

“Tal conhecimento é maravilhoso
demais e está além do meu alcance;
É tão elevado que não o posso atingir.”

(Salmo 139:6)

Costa, M.F. **Extrato hidroetanólico das folhas de *Eugenia aurata* e de *Eugenia punicifolia* (HBK) inibe a migração neutrofílica por mecanismos distintos.** 2015. 70 f.: il. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências e Letras de Assis - Universidade Estadual Paulista. Assis, 2015.

RESUMO

A família Myrtaceae vem sendo estudada quanto ao seu potencial na regulação da menstruação, dor, distúrbios intestinais, infertilidade, nas suas atividades antifúngica, purgativa e anticâncer, no tratamento de resfriados, tosse e em outras afecções do trato respiratório. Em meio a seus membros, as espécies de *Eugenia* spp., ricas em compostos fenólicos, parecem apresentar efeitos pró e anti-inflamatórios quando testados *in vivo* e *in vitro*. Dentre as células atuantes de forma pioneira na inflamação, estão os neutrófilos. Eles são um alvo de estudo no controle de processos inflamatórios agudos e crônicos, por meio da elucidação de como substâncias agem, por exemplo, nas diferentes etapas de seu recrutamento. Assim, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar o potencial efeito anti-inflamatório do extrato hidroetanólico de folhas de *Eugenia aurata* - EA e *Eugenia punicifolia* – EP, sobre atividades neutrofílicas. Foram avaliados os processos de adesão e desgranulação celular e a geração das armadilhas extracelulares neutrofílicas (NETs- ***Neutrophil Extracellular Traps***) em neutrófilos humanos. Os resultados mostram que o EA inibe o processo de adesão, enquanto que o EP, a desgranulação, e, ademais, ambos inibem a liberação de DNA (NET), na ausência de efeito citotóxico. Tais resultados corroboram o uso desses extratos na medicina popular. Além disso, sugerem seu potencial no desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos com propriedades anti-inflamatórias.

Palavras-chave: Inflamação. Myrtaceae. *Eugenia*. Neutrófilos.

Costa, M.F. **Hydroethanolic extract from the leaves of *Eugenia aurata* and *Eugenia punicifolia* (HBK) inhibit neutrophil migration by different mechanisms**. 2015. 70 f.: il. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências e Letras de Assis - Universidade Estadual Paulista. Assis, 2015.

ABSTRACT

Myrtaceae family has been studied for its potential in regulating menstruation, pain and intestinal disorders, infertility, as well as antifungal, purgative and anticancer agent, and in addition to treat colds, cough and other respiratory ailments. Amid its members, *Eugenia* spp species appear to have pro and anti-inflammatory effect once examined in vivo and in vitro. Among the first cells which act on inflammation site, there are the neutrophils. They are a matter of study in the controlling of acute and chronic inflammatory processes, through elucidation of how substances act, for example, in different steps of their recruitment. Therefore, the main aim of this study was to evaluate the potential anti-inflammatory effect of hydroethanolic extract of *Eugenia aurata* leaves - EA and *Eugenia punicifolia* - EP, on neutrophil activities. We evaluated the adhesion process and cell degranulation, as well NETs (Neutrophil Extracellular Traps NETs) generation in human neutrophils. The results show that EA inhibits adhesion, while EP degranulation, and further, both inhibit the release of DNA (NET), in the absence of cytotoxic effect. These results give support to the use of these extracts in the popular medicine. Furthermore, they demonstrate a potential of both extracts for the development of phytomedicines with anti-inflammatory properties

Keywords: Inflammation. Myrtaceae. *Eugenia*. Neutrophils.

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

1. Introdução Geral

Figura 1 - Processo inflamatório agudo simplificado em fluxograma.....	22
Figura 2 - Recrutamento de neutrófilos.....	23
Figura 3 - Migração sequencial de neutrófilos.....	25
Figura 4 - A cascata de adesão dos leucócitos.....	29
Figura 5 - Os grânulos neutrofílicos e suas características principais.....	31

2. Artigo

Figure 1 - <i>Eugenia aurata</i> inhibits human neutrophil adhesion.....	43
Figure 2 - <i>Eugenia punicifolia</i> inhibits elastase secretion from human neutrophil.....	44
Figure 3 - <i>Eugenia</i> spp. extracts inhibit NET release.....	45
Figure 4 - Cell viability of neutrophils is not affected by <i>Eugenia aurata</i> or <i>Eugenia punicifolia</i>	46
Figure 5 - <i>Eugenia</i> extracts inhibit neutrophil migration showing anti- inflammatory activity.....	47
Figure 6 - Schematic summary of the effects upon neutrophil recruitment cascade from <i>Eugenia aurata</i> and <i>Eugenia punicifolia</i>	53

ANNEXS

Figure A.1 - Analytical HPLC-PAD <i>Eugenia punicifolia</i> chromatogram.....	58
Figure B.1 - Analytical HPLC-PAD <i>Eugenia aurata</i> chromatogram.....	59

LISTA DE TABELAS

Table 1. Phenolic compounds and related inhibitory effect on neutrophil activities.....	51
Table C.1 - UV spectra data of the peaks from HPLC-PDA chromatogram of the SPE Fraction 95% MeOH from hydroethanolic extract from leaves of <i>Eugenia punicifolia</i>	60
Table C.2 - UV spectra data of the peaks from HPLC-PDA chromatogram of the SPE Fraction 8:2 from hydroethanolic extract from leaves of <i>Eugenia punicifolia</i>	61
Table C.3 - UV spectra data of the peaks from HPLC-PDA chromatogram of the SPE Fraction 1:1 from hydroethanolic extract from leaves of <i>Eugenia punicifolia</i>	61
Table D.1 - UV spectra data of the peaks from HPLC-PDA chromatogram of the SPE Fraction 95% MeOH from hydroethanolic extract from leaves of <i>Eugenia aurata</i>	62
Table D.2 - UV spectra data of the peaks from HPLC-PDA chromatogram of the SPE Fraction 8:2 from hydroethanolic extract from leaves of <i>Eugenia aurata</i>	62
Table D.3 - UV spectra data of the peaks from HPLC-PDA chromatogram of the SPE Fraction 1:1 from hydroethanolic extract from leaves of <i>Eugenia aurata</i>	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAP-37	<i>Cationic Antimicrobial Protein 37</i>
C5a	Componente 5 ^a do sistema complemento
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EA	Extrato hidroetanólico de <i>Eugenia aurata</i> - fração solúvel em PBS
ECM	<i>Extracellular matrix</i>
ECAM	<i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i>
EP	Extrato hidroetanólico de <i>Eugenia punicifolia</i> Humb. Benpl. & Kunth.- fração solúvel em PBS
ESL-1	<i>E-Selectin Ligand 1</i>
fMLP	<i>N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine</i>
hCAP-18	<i>Human Cathelicidin Antibacterial Protein</i>
HDDP	<i>Hexahydroxydiphenoyl</i>
HPLC-PAD	<i>High-Performance Liquid Chromatography with Pulsed Amperometric Detector</i>
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
IL	Interleucina
JAM	<i>Junctional Adhesion Molecule</i>
LFA-1	<i>Lymphocyte Function-Associated Antigen 1</i>
LSP-1	<i>Leukocyte Specific Protein 1</i>
Mac-1	<i>Macrophage-1 Antigen</i>
MMP-9	Metaloproteinase 9
NETs	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
NGAL	<i>Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin</i>
PAF	<i>Platelet-Activating Factor</i>

PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i>
PECAM-1	<i>Platelet/Endothelial-Cell Adhesion Molecule 1</i>
PMA	<i>Phorbol Myristate Acetate</i>
PR-3	Proteinase 3
PSGL-1	<i>P-Selectin Glycoprotein Ligand 1</i>
p38MAPK	Proteína p38MAP
PVR	<i>Poliovirus Receptor</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
VAP-1	<i>Vascular Adhesion Protein</i>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>
VE-caderina	<i>Vascular Endothelial- caderina</i>

SUMÁRIO

FICHA CATALOGRÁFICA	3
FOLHA DE APROVAÇÕES.....	4
DEDICATÓRIA	5
AGRADECIMENTOS	6
EPÍGRAFE	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS.....	12
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	14
1. INTRODUÇÃO GERAL	18
1.1 EXTRATOS VEGETAIS: IMPORTÂNCIA E POTENCIALIDADE FARMACOLÓGICA.....	18
1.2 INFLAMAÇÃO AGUDA	21
1.3 DESGRANULAÇÃO NEUTROFÍLICA.....	29
1.4 NETs	31
2. OBJETIVOS	33
3. ARTIGO.....	34
3.1 INTRODUCTION.....	36
3.2 MATERIAL AND METHODS.....	37
3.2.1 <i>Plant collection and extraction</i>	37
3.2.2 <i>Human neutrophils isolation</i>	38
3.2.3 <i>Cell viability (MTT assay)</i>	38
3.2.4 <i>Cell adhesion</i>	39
3.2.5 <i>Elastase secretion</i>	39
3.2.6 <i>NETs release</i>	40
3.2.7 <i>Animals</i>	40
3.2.8 <i>Peritonitis model (in vivo)</i>	40
3.2.9 <i>Phytochemical screening</i>	41
3.2.10 <i>Statistical Analysis</i>	41
3.3 RESULTS.....	42
3.3.1 <i>Ex vivo anti-inflammatory activity</i>	42

3.3.2	<i>In vivo anti-inflammatory activity</i>	46
3.3.3	<i>Phytochemical screening</i>	47
3.4	DISCUSSION AND CONCLUSION.....	48
	ACKNOWLEDGMENTS.....	53
	REFERENCES	54
	ANNEXS	58
	ANNEX A - Analytical HPLC-PAD <i>Eugenia punicifolia</i> chromatogram	58
	ANNEX B - Analytical HPLC-PAD <i>Eugenia aurata</i> chromatogram	59
	ANNEX C - UV spectra data of the peaks from HPLC-PDA chromatogram of the SPE Fractions from hydroethanolic extract from leaves of <i>Eugenia punicifolia</i>	60
	ANNEX D - UV spectra data of the peaks from HPLC-PDA chromatogram of the SPE Fractions from hydroethanolic extract from leaves of <i>Eugenia aurata</i>	62
4.	CONCLUSÕES GERAIS	64
5.	REFERÊNCIAS	64

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 EXTRATOS VEGETAIS: IMPORTÂNCIA E POTENCIALIDADE FARMACOLÓGICA

O uso de produtos naturais com a finalidade de tratar patologias acompanha a humanidade desde seus primórdios. As plantas medicinais representam a forma mais antiga de tratamento medicinal e os primeiros registros de utilização de plantas para esse fim provém da China (~3000 a.C.), onde o imperador Shen Nung compilou o *Pen Tsao* (Compêndio de Matéria Médica Chinesa) (Andréo, 2008). A diversidade química de compostos existentes na matéria vegetal colaborou para que tal fosse utilizado não só como um agente curativo, como também agente alucinógeno (eventualmente mediando a relação entre humanos e as divindades), agente de defesa contra animais, agente de auxílio na caça e também, inclusive, como agente de execução de prisioneiros. Tais compostos utilizados ao longo da história da humanidade para fins tão difusos são resultados da complexa interação com o meio ambiente, na qual é fundamental a garantia da sobrevivência. Desta forma, tais compostos, também chamados metabólitos, destacam-se pela ampla gama de aplicação biológica.

A importância da utilização de produtos naturais no combate a diferentes moléstias humanas pode ser percebida se for considerado que, apesar de todos os avanços da medicina moderna, cerca de 30% de todas as drogas avaliadas como agentes terapêuticos são derivados de metabólitos secundários (Calixto, 2005; Veiga-Junior e Mello, 2008; Lage, 2011). Dentre os fármacos derivados de metabólitos secundários vegetais, podem-se citar o taxol (antitumoral), cafeína

(estimulante), atropina (anticolinérgico), artemisina (antimalárico), forskolina (bronco- e vasodilatador), plaunotol (antiúlcera) (Andréo, 2008; Lage 2011), o que evidencia o grande potencial dos vegetais para o desenvolvimento de novos medicamentos.

Diversos fatores têm incentivado a procura por novas drogas de origem vegetal. A resistência microbiana desenvolvida com o passar do tempo às drogas comumente utilizadas, a procura por drogas mais eficazes e de maior acesso à população, além de estudos que visem preservar a biodiversidade (agregando valor às espécies) são alguns desses fatores. Dentro desse contexto deve-se enfatizar a vasta diversidade florística brasileira e a enorme potencialidade farmacológica que a mesma oferece.

O Brasil, em termos florísticos, abrange cerca de 20% da diversidade mundial (Calixto, 2003). Dentre os biomas brasileiros detentores de tal diversidade destaca-se o cerrado, o qual é representado pelo conjunto de ecossistemas que ocorrem no Brasil Central, sendo uma das principais zonas de biodiversidade do mundo (Myers *et al.*, 2000). A grande diversidade química e de espécies destas plantas, estão associadas com a heterogeneidade espacial do Cerrado e o distanciamento filogenético entre as mesmas (Machado *et al.*, 2004), e isso pode vir a ser útil tanto para a indústria farmacêutica, como para a alimentícia ou para a cosmética (Caramori, 2004).

Muitas das espécies vegetais presentes no Cerrado, pertencem as mais variadas famílias e têm sido empregadas popularmente no tratamento de diversas doenças, como é o caso das Myrtaceae (Almeida *et al.*, 1998). A família Myrtaceae, composta por 3000 espécies e cerca de 80 gêneros se destaca devido sua ampla distribuição em todos os ecossistemas brasileiros (Fabris e Cesar, 1996).

Dentro dessa família, o gênero *Eugenia*, com mais de 500 espécies, das quais cerca de 400 se encontram no Brasil, assume destaque na medicina popular,

principalmente no tratamento de ferimentos e infecções intestinais (Adebajo *et al.*, 1989). Desse gênero já foram isolados flavonoides e taninos, além de triterpenos e óleos essenciais (De Oliveira *et al.*, 2005), e descritas várias atividades farmacológicas.

Dentre os usos na medicina popular, cita-se, por exemplo, a infusão da entrecasca de *Eugenia dysenterica* (cagaita) como antiinflamatório (Coelho *et al.* 2005). A partir do extrato aquoso das folhas de *Eugenia uniflora* foram isolados compostos fenólicos com atividade antioxidante (Kade *et al.*, 2008). De *Eugenia jambolana* (muito utilizada na medicina tradicional no tratamento de diabetes) e a partir de seu extrato hidroetanólico 70% foram isolados flavonóides (Sharma *et al.* 2008). Em outro trabalho, foram identificados no extrato hidroalcoólico de *E. brasiliensis* os compostos fenólicos quercetina, catequina e galocatequina com elevada atividade anti-inflamatória (Petrovski *et al.*, 2008).

Além desses, encontram-se relatadas na literatura as atividades anti-inflamatória (de *Eugenia uniflora* por indução de úlceras em ratos, conforme Falcão *et al.*, 2005 *apud* Schapoval *et al.*, 1994), a antifúngica (de *Eugenia uniflora* e outras espécies, segundo Lima *et al.*, 2006), a analgésica e antipirética (de *Eugenia umbelliflora*, conforme Kuskoski *et al.*, 2003); a hipotensiva (de *Eugenia uniflora* L por Consolini *et al.*, 1999). Também a antidiabética (de *Eugenia jambolana* segundo Ravi *et al.*, 2005, *Myrcia uniflora* e outras espécies, conforme Barbosa-Filho *et al.*, 2005), a antioxidante (de *Eugenia uniflora* e outras espécies, por Velazquez *et al.*, 2003), a antimicrobiana dos óleos essenciais (de *Eugenia stipitata* por Medeiros *et al.*, 2003; de *Eugenia dysenterica* por Costa *et al.*, 2000). Além dessas, citam-se o efeito farmacológico de extrato aquoso sobre a neurotransmissão nicotínico-colinérgica (de *Eugenia punicifolia* por Grangeiro *et al.*, 2006) e a avaliação da capacidade anti-

inflamatória de extratos orgânicos sobre uma lesão muscular em camundongos distróficos sob a influência da ativação seletiva do receptor de acetilcolina $\alpha 7$ (de *Eugenia punicifolia* por Leite *et al.*, 2010), dentre outros.

O controle de processos inflamatórios agudos/ crônicos e/ou patológicos como artrite reumatóide, asma, vasculite, e outras doenças como câncer, aterosclerose, diabetes é de grande interesse, uma vez que tais processos e doenças podem ter relação com os danos causados pela gênese de radicais livres (Degaspari e Waszczynskyj, 2004), a qual pode ser minimizada por substâncias antioxidantes, como por exemplo, os compostos fenólicos presentes no gênero *Eugenia*.

O conhecimento das importantes funções que os compostos fenólicos podem vir a desempenhar na imunidade inata se faz importante, uma vez que representa uma alternativa extremamente viável de exploração da modulação de resposta imunológica, por meio da utilização da biodiversidade nacional (agregando valor de preservação à mesma), além do desenvolvimento de uma estratégia terapêutica, a qual vise auxiliar no combate às infecções em suas fases iniciais ou mesmo crônicas.

1.2 INFLAMAÇÃO AGUDA

A inflamação ou resposta inflamatória é uma reação do organismo a uma infecção ou a alguma lesão tissular, sendo, portanto, entendida como o recrutamento e ativação de células imunes frente uma infecção ou injúria (Amulic *et al.*, 2012). Macroscopicamente, caracteriza-se pela presença de dor, edema, calor, rubor, devido a alterações vasculares coordenadas por mediadores inflamatórios. Tais alterações englobam a vasodilatação, a expressão de moléculas de superfície pelas

células endoteliais dos vasos e o aumento da permeabilidade vascular (revisto por Toledo, 2007). A vasodilatação é causada pela liberação de mediadores como prostaglandinas, histamina, alguns leucotrienos, fator alfa de necrose tumoral (TNF- α), interleucina – 8 (IL-8), dentre outros, pelas células residentes no tecido lesionado (tais como mastócitos) e possibilita um maior fluxo de sangue e de células para o local atingido. A presença de moléculas de superfície (selectinas e integrinas) e mediadores químicos (citocinas e quimiocinas) em células endoteliais auxilia na interação com leucócitos circulantes, permitindo a adesão e posterior migração dos mesmos ao sítio de infecção. Por fim, o aumento da permeabilidade capilar é consequência da liberação de mediadores químicos pelas células residentes no sítio infeccioso, associada à ativação da expressão de moléculas de superfície endoteliais vasculares, o que propicia o extravasamento de fluidos e proteínas para a circulação, e auxilia no recrutamento e ativação de células leucocitárias para elaboração da resposta imunológica na região afetada, como esquematizado, de maneira simplificada na **Figura 1**.

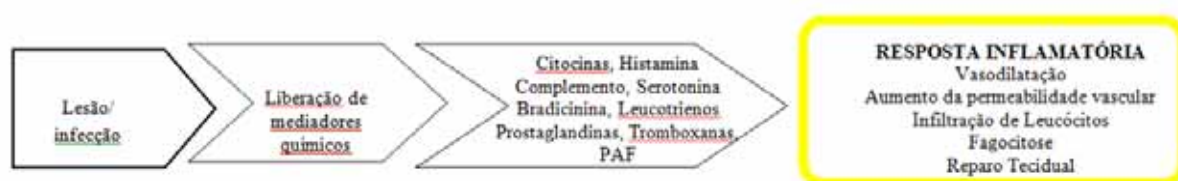


Figura 1 - Processo inflamatório agudo simplificado em fluxograma. Primeiramente, após a lesão/infecção, ocorre a liberação de mediadores químicos inflamatórios pelas células (lesionadas / que tiveram contato com o patógeno) presentes no local da lesão/infecção, e esses mediadores ativarão as células endoteliais do vaso sanguíneo. Assim, haverá as alterações vasculares necessárias para recrutamento das células imunológicas ao tecido lesionado e a posterior ativação dessas para que, consequentemente, ocorra o restabelecimento da homeostasia.

O processo de elaboração da resposta imunológica efetiva abarca, dentre outros fatores, o recrutamento de leucócitos. Dentre as populações de células leucocitárias,

a primeira população a ser recrutada para o sítio inflamatório é a de neutrófilos, a qual atua como mediadora entre a resposta imune inata e a adaptativa. Os neutrófilos são leucócitos polimorfonucleares e são considerados um dos principais representantes dos fagócitos durante processos inflamatórios. Eles exercem papel crucial na primeira linha de defesa contra bactérias, fungos e protozoários invasores, além de reações autoimunes. A migração neutrofílica é um processo que ocorre através da ativação sequencial de proteínas e seus ligantes, expressos nos neutrófilos e nas células endoteliais, como mostra, de forma resumida, a **Figura 2**.

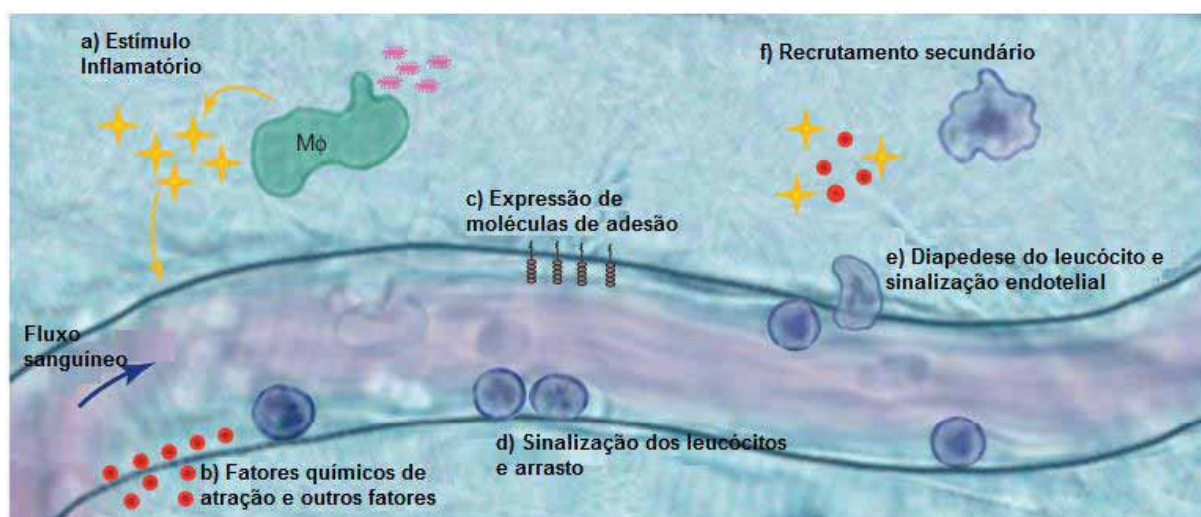


Figura 2 - Recrutamento de neutrófilos. A migração de neutrófilos (leucócitos polimorfonucleares) envolve desde o estímulo inflamatório induzido pela liberação de TNF- α ou interleucina 1 β (IL-1 β) por macrófagos residentes no sítio inflamado (a), os quais induzirão o endotélio a expressar moléculas que atraiam os neutrófilos e os permitam se aderir à superfície endotelial (b, c e d), levando a sua transmigração (e) ao local da infecção e posterior recrutamento de outros neutrófilos ou linfócitos via liberação de mediadores químicos (f).

Fonte: Williams *et al.*, 2011 (adaptado).

O recrutamento de neutrófilos é iniciado por alterações na superfície do endotélio que resultam do estímulo de mediadores inflamatórios (incluindo histamina, cisteinil-leucotrienos e citocinas - principalmente IL-1- β e TNF- α) liberados por leucócitos residentes no tecido lesionado (macrófagos, mastócitos) ao entrarem em contato

com patógenos (revisto por Kolaczowska e Kubes, 2013) (**Figura 2** partes a e b). Células endoteliais estimuladas por tais mediadores inflamatórios, incluindo as quimiocinas, também aumentam a expressão de moléculas de adesão em sua superfície (selectina P e selectina E) (**Figura 2** parte c). A selectina P é estocada em grânulos citoplasmáticos e rapidamente expressa sob a ação de substâncias microbianas. A selectina E é expressa na superfície endotelial devido a estímulos inflamatórios e a substâncias microbianas, no entanto, sua expressão é mais tardia e só ocorre uma ou duas horas após o estímulo. As interações entre selectinas e seus ligantes neutrofílicos são de baixa afinidade (**Figura 3** parte I), e se rompem em virtude da pressão resultante do sangue fluente, sendo necessário, portanto, que essas interações endotélio-neutrófilo ocorram repetidas vezes. Consequentemente, ocorre uma redução na velocidade de rolamento e ativação intracelular de quinases das famílias Src- HcK, Fgr e Lyn-, o que resultará em rearranjo de citoesqueleto, expressão e mudança na afinidade das integrinas, as moléculas-chave para etapa de firme adesão (revisto por Borregaard, 2010) (**Figura 3** parte II).

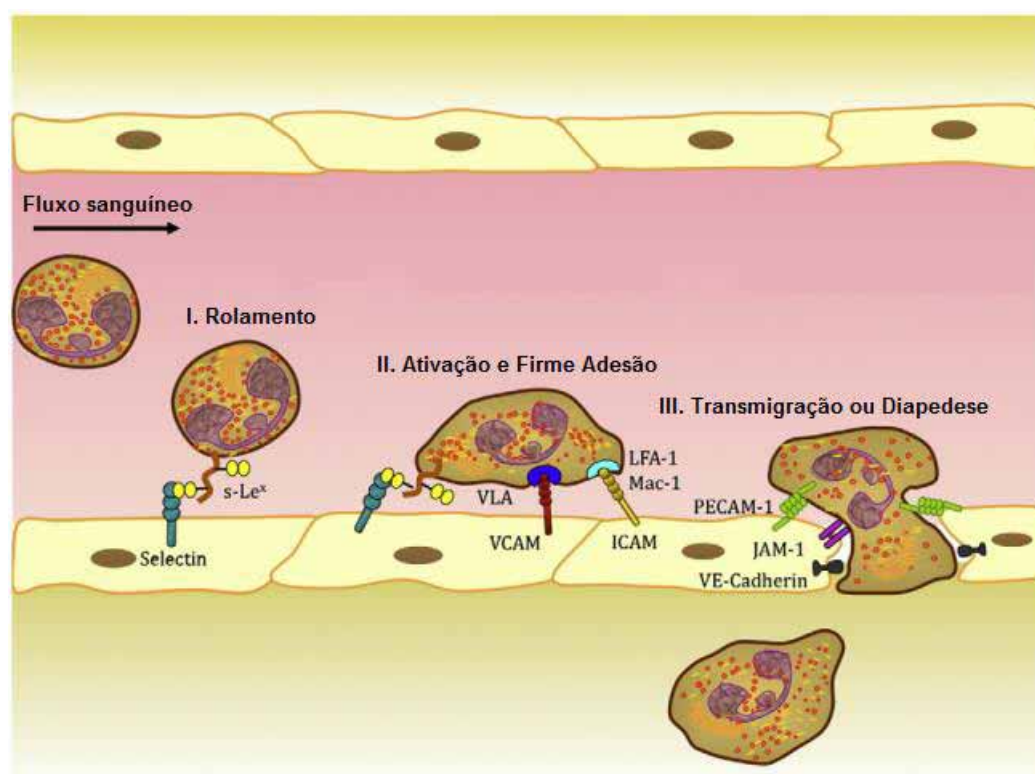


Figura 3 - Migração sequencial de neutrófilos. Envolve a interação de glicoproteínas transmembrânicas como as selectinas (P e E expressas no endotélio e L expressa nos neutrófilos), o que ativa o processo de rolamento ao longo do vaso, no sentido do fluxo sanguíneo (I). Após o processo de rolamento mediado por selectinas, os neutrófilos se aderem à superfície endotelial (II), principalmente devido à expressão de moléculas da família de $\beta 2$ integrinas (*Lymphocyte Function-Associated Antigen 1* - LFA-1 - e *Macrophage-1 Antigen*- Mac-1 - nos neutrófilos e *Vascular Cell Adhesion Molecule* - VCAM - e *Intercellular Adhesion Molecule* – ICAM - no endotélio). Elas também colaboram para direcionar o processo de transmigração celular (III- também chamada de diapedese), o qual ocorrerá sequencialmente, via uma complexa rede de interação de moléculas presentes nos neutrófilos e nas junções celulares das células endoteliais, incluindo *Vascular Endothelial*- caderina - VE-caderina (endotélio), *Junctional Adhesion Molecule* - JAMs (endotélio) e *Platelet/Endothelial-Cell Adhesion Molecule 1* - PECAM-1 (presente tanto em neutrófilos como nas células endoteliais).

Fonte: Yuan *et al.*, 2012 (adaptado).

As integrinas são glicoproteínas transmembrânicas heterodiméricas, as quais estabelecem interações do tipo proteína-proteína e são expressas na superfície dos leucócitos como heterodímeros de CD11/CD18 (revisto por Toledo, 2007). LFA-1 é a principal molécula de adesão nos neutrófilos, junto com Mac-1, que media a transição do rolamento para adesão à superfície celular do endotélio (revisto por Borregaard, 2010) (**Figura 3** parte II). O nome integrina se deve ao fato de que elas são as proteínas responsáveis por integrar os sinais gerados por ligantes

extracelulares às respostas de movimento, alteração de forma e fagocitoses dependentes do citoesqueleto, justamente por suas caudas citoplasmáticas formarem sítios para fosforilação e ligação a proteínas do citoesqueleto (revisto por Toledo, 2007). Além disso, interagem com moléculas do endotélio da família das imunoglobulinas - ICAM-1 e VCAM-1 -, permitindo a firme adesão do neutrófilo. São ativadas por um mecanismo de transdução de sinais emitidos por domínios citoplasmáticos da L-selectina e de PSGL-1, o que promove a sua expressão ordenada e sequencial devido a alterações conformacionais de seus heterodímeros, estimuladas pela interação com quimiocinas, citocinas e mediadores inflamatórios (fator ativador de plaquetas-PAF, leucotrieno B4) presentes no endotélio inflamado. Desta forma ocorrem eventos intracelulares que polarizam o neutrófilo, permitindo a firme adesão celular e sua locomoção ao tecido perivascular pelo processo denominado transmigração.

A transmigração pelas paredes vasculares é a última etapa no processo de migração do neutrófilo ao tecido inflamado. Para isso, os neutrófilos devem primeiramente cruzar o endotélio (o que leva de dois a cinco minutos), e então a membrana basal (o que leva mais tempo, de cinco a quinze minutos) (revisto por Amulic *et al.*, 2012; Kolaczkowska e Kubes, 2013). A transmigração requer integrinas e imunoglobulinas CAMs (ICAM-1, ICAM-2 e VCAM-1), assim como diferentes proteínas de junção, incluindo PECAM-1 (conhecida como CD31), CD99, JAMs, ECAM e algumas outras moléculas endoteliais, cujo papel ainda permanece obscuro, tais como PVR (também conhecido como CD155), ectoenzimas (tais como VAP-1 e CD157) e proteínas específicas de leucócitos (LSP-1) (revisto por Kolaczkowska e Kubes, 2013). A passagem pelas células endoteliais pode ocorrer de duas maneiras: paracelularmente (entre as células endoteliais) ou

transcelularmente (através de uma célula endotelial), sendo que preferencialmente, os neutrófilos realizam a primeira, por ser a forma mais rápida e eficiente (revisto por Amulic *et al.* 2012; Kolaczkowska e Kubes, 2013). Durante o processo de transmigração, é necessário que os espaços intercelulares se abram, logo ocorre um rearranjo no citoesqueleto da matriz extracelular (*Extracellular Matrix* - ECM) dessas células. Os neutrófilos tendem a migrar por regiões onde exista uma menor densidade de moléculas da ECM, tais como colágeno IV, laminina 10 e nidogênio 2 (Kolaczkowska e Kubes, 2013). Além do mais, nessas regiões há lacunas (*gaps*) entre os pericitos (células da membrana basal), o que representa menor resistência à transmigração do neutrófilo (revisto por Kolaczkowska e Kubes, 2013). Assim, para ocorrer a transmigração, além da interação entre as moléculas de superfície do neutrófilo e das células endoteliais (por exemplo, CD31 que ocorre em ambos e regula a rede de actina neutrofílica, sendo uma das moléculas que medeia o processo de migração através das junções), os neutrófilos também contêm grânulos com proteases as quais apresentam atividade enzimática contra as moléculas de ECM (tais como metaloproteinase-9 - MMP-9 e elastase) (Borregaard, 2010; Williams *et al.*, 2011)

Transposta a barreira endotelial, os neutrófilos devem seguir um gradiente quimiotático que existe no tecido inflamado em virtude das substâncias liberadas, como por exemplo, por bactérias (N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine - fMLP), ou pelo Componente 5^a do sistema complemento (C5a) (revisto por Borregaard, 2010; Amulic *et al.*, 2012). Além disso, essas substâncias químicas de atração podem ser divididas em intermediárias e de alvo final (*end-target*), sendo que os neutrófilos respondem preferencialmente às últimas (revisto por Williams *et al.*, 2011; Kolaczkowska e Kubes, 2013). Atualmente, sabe-se que existe uma hierarquia de

sinais intracelulares em resposta às substâncias químicas de atração de alvo-final, que envolve p38MAPK, e que promove a migração direcional dos neutrófilos, também estimulada pela expressão sequencial de quimiocinas (revisto por Williams *et al.*, 2011). A locomoção neutrofílica exige a formação de contatos adesivos constantes e dinâmica, para que a região frontal possa se ligar à matriz, enquanto a região posterior se desliga (revisto por Toledo 2007; Borregaard, 2010; Williams *et al.*, 2011; Kolaczowska e Kubes, 2013) .

As moléculas principais responsáveis pela mediação dos processos de adesão e transmigração de leucócitos (neutrófilos e outros) são abaixo resumidas, na **Figura 4.**

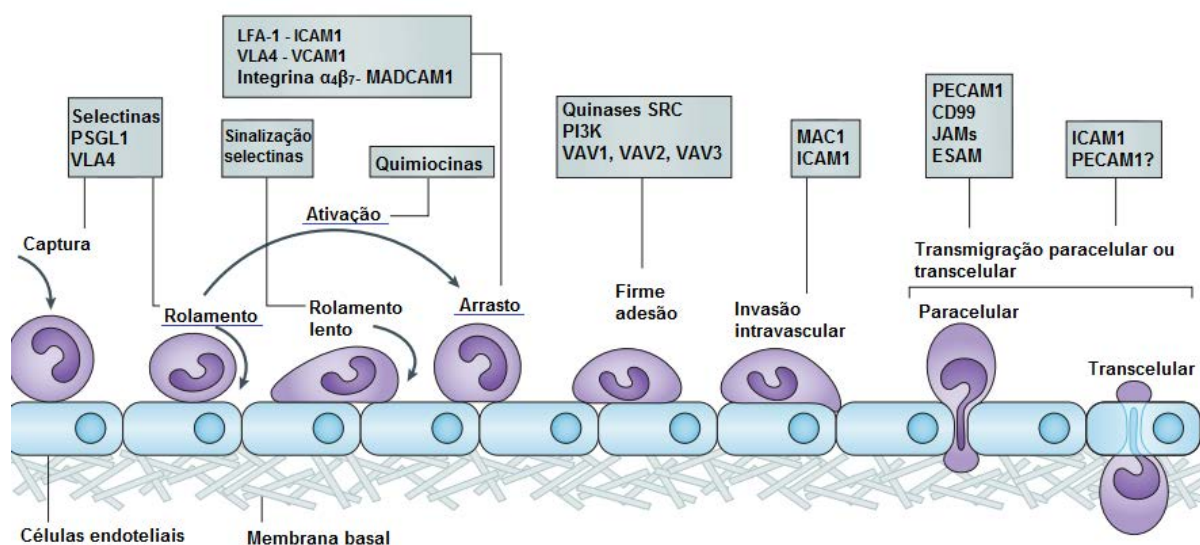


Figura 4 - A cascata de adesão dos leucócitos. Os principais passos estão sublinhados e incluem o rolamento, que é mediado pelas selectinas; a ativação, que é mediada pelas quimiocinas; e o arrasto, mediado pelas integrinas. Entre a etapa de rolamento e arrasto existe o rolamento lento, e posterior ao arrasto, ou fixação no endotélio, ocorre a adesão, a invasão intravascular e a transmigração, a qual pode ser paracelular (quando o leucócito migra intercelularmente), ou transcelular (quando o leucócito migra intracelularmente). As moléculas-chave envolvidas em cada etapa estão indicadas nas caixas. ESAM, *Endothelial Cell-Selective Adhesion Molecule*; ICAM1, *Intercellular Adhesion Molecule 1*; JAM, *Junctional Adhesion Molecule*; LFA1, *Lymphocyte Function-Associated Antigen 1* (também conhecida como α L β 2-integrin); MAC1, *Macrophage Antigen 1*; MADCAM1, *Mucosal Vascular Addressin Cell-Adhesion Molecule 1*; PSGL1, *P-Selectin Glycoprotein Ligand 1*; PECAM1, *Platelet/Endothelial-Cell Adhesion Molecule 1*; PI3K, *Phosphoinositide 3-Kinase*; VCAM1, *Vascular Cell-Adhesion Molecule 1*; VLA4, *Very Late Antigen 4* (também conhecida como α 4 β 1-integrin).

Fonte: Ley et al., 2007 (adaptado).

1.3 DESGRANULAÇÃO NEUTROFÍLICA

Os neutrófilos exercem papel crucial na primeira linha de defesa contra bactérias, fungos, protozoários invasores, além de doenças autoimunes, mediando a resposta inflamatória em múltiplas etapas, as quais envolvem a adesão inicial dos neutrófilos circulantes ao endotélio vascular ativado, o subsequente extravasamento e migração de neutrófilos para o sítio inflamatório e, por último, a eliminação do microrganismo estranho, através de fagocitose, geração de metabólitos reativos do oxigênio e liberação de substâncias microbicidas. A ocorrência de tais etapas só é possível graças à estocagem e liberação sequencial de grânulos neutrofílicos, os quais se

subdividem em primários (azurofílicos), secundários (específicos), terciários (grânulos de gelatinase) e vesículas secretórias. A mobilização desses grânulos é dependente de cálcio (Ca^{2+}), e a desgranulação ocorre por ordem inversa da formação dos grânulos durante a maturação do neutrófilo (revisto por Borregaard *et al.*, 2007; Borregaard, 2010; Amulic *et al.*, 2012), ou seja, primeiro são mobilizadas as vesículas secretórias, depois os grânulos terciários, posteriormente os secundários e finalmente os primários (revisto por Amulic *et al.*, 2012). A ordem de liberação está relacionada com a composição dos grânulos.

Os grânulos primários e secundários são os mais antimicrobianos por conterem enzimas antimicrobianas (mieloperoxidase, elastase, defensinas, azurocidina-CAP-37, proteinase3 –PR3-, NGAL, hCAP-18, lisozima, dentre outras). Dentre essas enzimas, as defensinas, a hCAP-18 e a azurocidina-CAP-37 atuam como recrutadoras de células T (CD4^+ e CD8^+), estabelecendo um elo entre a imunidade inata e adaptativa (revisto por Toledo, 2007; Borregaard *et al.*, 2007). Elas serão liberadas durante a fagocitose do patógeno. Esse processo se inicia com a fusão dos grânulos com o fagossoma, originando o fagolisossoma, o que colabora para ativar a maquinaria da NADPHoxidase e, a partir disso, ocorre a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Quando o microrganismo é exposto, simultaneamente, a esses vários peptídeos antimicrobianos, enzimas e ROS, ele é efetivamente morto pelo sinergismo entre esses componentes (processo conhecido como *burst oxidativo*).

Os grânulos terciários (ou de gelatinase) são atuantes no processo de transmigração (liberação de metaloproteases é o que possibilita o atravessamento pela membrana basal).

As vesículas secretórias atuam na fase de adesão (por participarem da ativação das integrinas) (revisto por Borregaard *et al.*, 2007; Borregaard, 2010; Amulic *et al.*, 2012, Kolaczowska e Kubes, 2013). Os grânulos, bem como sua composição e ordem de maturação e de liberação são resumidos na **Figura 5**.

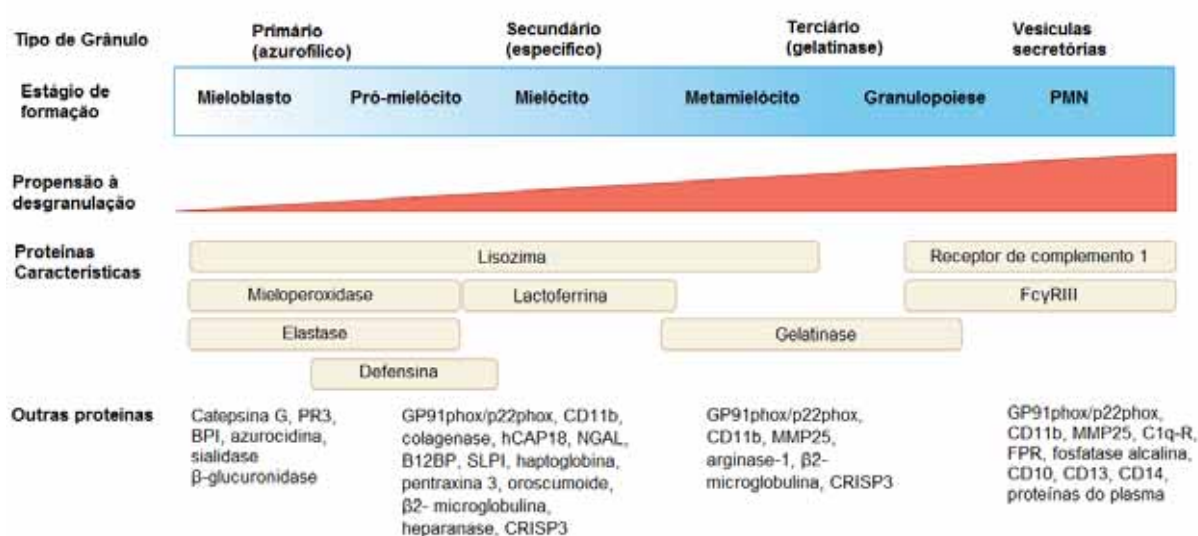


Figura 5 - Os grânulos neutrofílicos e suas características principais. Os grânulos neutrofílicos contêm uma variedade de moléculas antimicrobianas e de sinalização. São divididos em três tipos (primários, secundários e terciários), acrescidos das vesículas secretórias, sendo que sua diferença de composição está relacionada ao tempo de maturação durante a hematopoiese, além de sua capacidade de mobilização. Os primeiros grânulos a se fundirem com a membrana plasmática, ou seja, a serem mobilizados e liberados extracelularmente são as vesículas secretórias, seguidas dos grânulos terciários (ou de gelatinase), depois pelos secundários (ou específicos) e os últimos são grânulos primários (ou azurofílicos).

Fonte: Amulic *et al.*, 2012 (adaptado).

1.4 NETs

Sob estímulo inflamatório, os neutrófilos podem liberar DNA associado às histonas e proteínas granulares para o meio extracelular. Estas estruturas são chamadas de armadilhas extracelulares de neutrófilos (***Neutrophil Extracellular Traps; NET***) (Kolaczowska e Kubes, 2013). A formação das NETs é um processo ativo, distinto da apoptose e da necrose e envolve resposta imune pró-inflamatória e

antimicrobiana e, portanto, requer participação de NADPHoxidase e mieloperoxidase (revisto por Toledo, 2007; Borregaard, 2010; Amulic *et al.*, 2012). As armadilhas contêm proteínas antimicrobianas (lactoferrina, defensinas, catepsina-G), proteases (proteinase 3, gelatinase, elastase neutrofílica) e enzimas como a mieloperoxidase (MPO) responsável pela geração de ROS e a função dessas armadilhas é otimizar a captura de patógenos que não são prontamente fagocitados. As NETs capturam e matam diversos patógenos, dentre eles bactérias, fungos e, recentemente, o vírus HIV e os parasitas *Leishmania sp* e *Toxoplasma gondii*. No entanto, em virtude de sua composição antimicrobiana e enzimaticamente ativa, as NETs também podem matar as células endoteliais, em processos que envolvem reações de autoimunidade (revisto por Mantovani *et al.*, 2011; Amulic *et al.*, 2012) como também atuar em processos inflamatórios crônicos, tais como carcinoma mamário sólido, o qual predispõe os neutrófilos a liberarem NETs que contribuem para gerar trombose (Kolaczkowska e Kubes, 2013). Assim, fica claro que estratégias que visem minimizar ou eliminar a geração de NETs em condições não-infecciosas são bem importantes (Borregaard, 2010; Mantovani *et al.*, 2011; Amulic, *et al.* 2012).

Além disso, o controle de processos inflamatórios crônicos e/ou patológicos como artrite reumatóide, asma, vasculite, e outras doenças como câncer, aterosclerose, diabetes é de grande interesse, uma vez que tais processos e doenças podem ter relação com os danos causados pela gênese de radicais livres (Degaspari e Waszczynskyj, 2004), a qual pode ser minimizada por substâncias antioxidantes, como por exemplo, os compostos fenólicos presentes em plantas do gênero *Eugenia* (revisto por De Oliveira *et al.*, 2005, Kade *et al.*, 2008, Sharma *et al.* 2008).

O conhecimento das importantes funções que os compostos fenólicos podem vir a desempenhar na imunidade inata se faz importante, uma vez que representa uma

alternativa extremamente viável de exploração da modulação de resposta imunológica. No que tange à inibição da ação dos radicais livres, resultantes do metabolismo celular, os compostos fenólicos, por sua ação antioxidante, podem interagir com essas espécies radicalares, consumindo-as em reação, ou através da inibição de enzimas envolvidas na cascata de reações enzimáticas realizada nos neutrófilos, e, por conseguinte, na formação das NETs (como relatado por Kirchner e colaboradores, 2013). Logo, por meio da utilização da biodiversidade nacional (o que agrega valor de preservação à mesma), existe a possibilidade de desenvolvimento de uma estratégia terapêutica, a qual vise auxiliar no combate a infecções em suas fases iniciais ou mesmo crônicas.

2. OBJETIVOS

Os neutrófilos são células essenciais no desenvolvimento e controle de processos inflamatórios. Um melhor estudo destas células passa necessariamente pela avaliação de processos como migração, adesão e desgranulação celular, bem como, mais recentemente, geração e liberação das NETs. Portanto, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar o potencial anti-inflamatório de *Eugenia* spp. sobre neutrófilos humanos sensibilizados pelos extratos hidroetanólicos de folhas de *Eugenia aurata* e de *Eugenia punicifolia* e estimulados por PMA (um potente mediador inflamatório) quanto a:

- Adesão celular
- Desgranulação celular
- Geração e liberação das NETs

Posteriormente, verificou-se o efeito desses mesmos extratos sobre a migração neutrofílica no modelo *in vivo* de peritonite induzida por tioglicolato.

3. ARTIGO

***Eugenia aurata* and *Eugenia punicifolia* HBK inhibit inflammatory process by reducing neutrophilic adhesion, degranulation and NET release**

Mírian Feliciano da Costa^{a*}, Tais Iara de Jesus^a, Bruno Rafael Pereira Lopes^a, Abner Montagnolli^a, Lorraine de Paula Gomes^a, Gabriela Sterle^a, Catarina dos Santos^a, Karina Alves Toledo^a

^aDepartment of Biological Sciences, Universidade Estadual Paulista – UNESP (FCL-Assis), Brazil

**Corresponding author:* Mírian Feliciano da Costa, Av Dom Antônio, 2100, Parque Universitário, ZIP 19806-900, Assis/SP, Brazil. Tel: + 55-18-3302-5848; *E-mail address:* mirianfc@gmail.com

Email addresses authors:

Mírian Feliciano da Costa - mirianfc@gmail.com

Tais Iara de Jesus – niseiara@hotmail.com

Bruno Rafael Pereira Lopes – brunorp@hotmail.com

Abner Montagnolli – abnermontagnolli@gmail.com

Lorraine de Paula Gomes – lozinhaba@hotmail.com

Gabriela Sterle Pereira – gabi_sterle@live.com

Catarina dos Santos – csantos@assis.unesp.br

Karina Alves Toledo – karinafcla@gmail.com

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Eugenia* spp. have been studied for their anti-inflammatory effects upon neutrophils, based on their use in popular medicine, which includes the treatment of pain, diabetes, intestinal disorders, cough among other ailments.

Aim of the study: Evaluating, *ex vivo* and *in vivo*, the potential anti-inflammatory activity of hydroethanolic extracts of the leaves of *Eugenia aurata* (EA) and *Eugenia punicifolia* (EP) upon neutrophils.

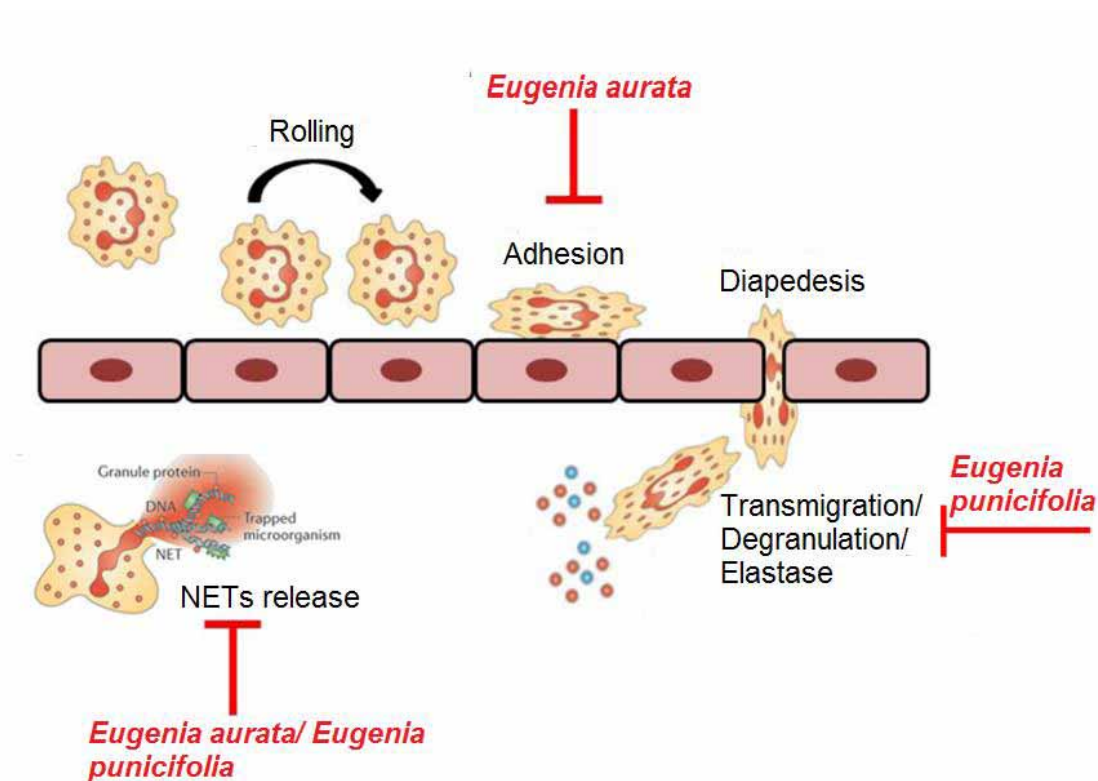
Materials and methods: *Ex vivo*, isolated human neutrophils were sensitized by *Eugenia* extracts and stimulated by PMA (a potent inflammatory inductor agent). In these conditions, different neutrophilic activities closed to inflammatory process were measured: adhesion, degranulation and NET release. Cell viability was monitored by MTT assay. *In vivo*, neutrophilic influx was assayed by peritonitis model performed in mice pretreated with different concentrations of *Eugenias*. A phytochemical screening to detect tannins, flavonoids and saponins was performed as described in literature.

Results: *Ex vivo*, EA and EP (1mg/mL) reduced the cell adhesion and degranulation, respectively. NET release was inhibited by both extracts. Anti-inflammatory activities occurred in the absence of cytotoxicity. Both extracts inhibited *in vivo* neutrophil migration. The phytochemical profile and the HPLC analyses revealed phenolic compounds as flavonoids and tannins, whose anti-adhesion effect and anti-elastase secretion have been described in the literature.

Conclusion: This study contributes to the elucidation of the cellular mechanisms involved in the anti-inflammatory activity observed in the popular use of the leaves of EA and EP. Our results indicate that these plants are able to inhibit important events

during the inflammatory process such as adhesion, degranulation and release of NETs.

GRAPHICAL ABSTRACT



KEYWORDS

Inflammation; Myrtaceae; *Eugenia aurata*; *Eugenia punicifolia*; Neutrophils.

3.1 INTRODUCTION

Inflammation is a process that includes a complex immune response, which occurs in several steps and may be caused by chemical-physical, microbiological and immunological stimuli. It involves leukocyte recruitment where the first leukocytes to be recruited and act on the inflamed tissue are neutrophils. Neutrophils have been

taken as a target for pharmacological intervention given their abilities to kill microorganisms, begins and amplifies the inflammatory process. Neutrophil recruitment and inflammatory activities require a complex sequence of events, including cell adhesion, degranulation, and more recently, NET release.

The control of the inflammatory process is critical because the associated risks: tissue damage, loss of performance and organ failure. The *Eugenia* genus with over 500 species, of which about 400 are in Brazil, assumes prominence in popular medicine, mainly for their anti-inflammatory activity in the treatment of wounds and infections (Adebajo *et al.*, 1989; Schapoval *et al.*, 1994; Pietrovski *et al.*, 2008; Leite *et al.*, 2010).

Our aim was to evaluate *ex vivo* and *in vivo* cellular mechanisms involved in the anti-inflammatory activity from *Eugenia aurata* (EA) and *Eugenia punicifolia* HBK (EP).

3.2 MATERIAL AND METHODS

3.2.1 Plant collection and extraction

Leaves of *Eugenia punicifolia* and *E. aurata* were collected in December (2009) by Dr. Catarina dos Santos in the Instituto Florestal e Estações Experimentais – Floresta Estadual de Assis at the point 22° 33' to 22°37' Lat. S–50°21' to 50°24' Long. W, Assis, State of São Paulo, Brazil. The specimen was identified by Dr. Antônio C. G. Melo, and the voucher specimen (nº 43.522) was deposited in the Herbarium D. Bento Pickel, São Paulo, SP, Brazil, for future reference. The extract was prepared with 10g vegetal material and 100mL solvent(ethanol:water70:30v/v).

The solution was extracted using dynamic maceration for 2h at room temperature ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$). Afterwards, the solution was filtered, and the residue was reextracted two more times following the same procedure. The solution was dried in a rotary evaporator at yielding 4.49g (45%) of extract for *EP* and 0,7g (7%) of extract for *EA*. The fraction from hydroethanolic extracts soluble in Phosphate Buffer Solution (PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4) was evaluated in all bioassays.

3.2.2 Human neutrophils isolation

Human neutrophils were isolated and prepared according methodology described by Brinkmann *et al.*, 2010. All assays were done following the ethical principles in human research recommended by the Faculty of Science and Letters of Assis- Ethics Committee on Human Research, UNESP (procedure approved under registration no. 02073912.0.0000.5401).

3.2.3 Cell viability (MTT assay)

Cytotoxicity was evaluated by the colorimetric method of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-Diphenyl Tetrazolium bromide) which consists of indirectly measure cell viability by mitochondrial enzyme activity of living cells. Human neutrophils (2×10^5 /well) seeded into wells of a culture plate of 96 wells were incubated with different concentrations of *Eugenia* spp. during 1 hour at 37°C . At the end, MTT (1 mg/mL) was added to each well and incubated at 37°C for 4 hours. After this time, formazan crystals were diluted by addition of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) and the absorbance of the samples was measured in a spectrophotometer at 570nm.

Neutrophils incubated with medium alone or water were used as negative and positive control to cell death, respectively. The percentage cytotoxicity was calculated by the equation 1:

$$\text{Cellular cytotoxicity (\%)} = (\text{DO570 (sample)} \times 100) / \text{DO570 (control)} \quad (1)$$

3.2.4 Cell adhesion

Cell adhesion assays were performed in 96-well microplates. Human neutrophils (4×10^5) suspended in RPMI medium plus 5% of Fetal Bovine Serum (FBS) were added to wells of a microplate containing different concentrations of *Eugenia* spp. During 15 minutes, cellular sedimentation was allowed. Then, the cells were stimulated by Phorbol Myristate Acetate (PMA 20nM) for 1 hour at 37°C. Non-adherent cells were removed and adherent cells were made evident by a colorimetric test with the aid of Bicinchoninic Acid (BCA; Pierce). The absorbance of the samples was measured at 560 nm in a microplate reader (EL800 Microplate Reader; BIO-TEK Instruments).

3.2.5 Elastase secretion

Elastase released in the process of degranulation was assessed as follows: Neutrophils (2×10^5) suspended in Hank's solution were incubated for 30 minutes in the presence of different concentrations of *Eugenia* spp. to then be stimulated with PMA (25nM) for 3 hours at 37 °C. At the end of the incubation, neutrophils were centrifuged ($437 \times g$, 5 minutes) and the supernatants were then incubated with elastase substrate (N-Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val p-nitroanilide, Sigma) at a

concentration of 100 μ M. After 30 minutes incubation, color reaction was measured at 405nm on microplate reader EL800.

3.2.6 NETs release

Human neutrophils (2×10^5) were incubated with different concentrations of *Eugenia* spp. during 30min and stimulated with PMA (50 nM) for 4 hours at 37 °C. The NETs generated by activated neutrophils were digested with 500 mU/mL micrococcal nuclease (MNase, Worthington Biochemical Corp.). The nuclease activity was stopped by 5 mM EDTA and the culture supernatant was collected and stored at 4 °C until the moment of quantification. NETs were quantified using the Picogreen dsDNA kit (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations.

3.2.7 Animals

Female, Swiss mice whose weight was 20–30 grams, kept in temperature controlled rooms (23–25 °C) with free access to food and water, were lodged under approved conditions at the Animal Research Facility of the Faculdade de Ciências e Letras de Assis (FCLA) - UNESP. Mice were employed in the *in vivo* neutrophil migration assay under approval of the Ethics Committee of FCLA (process no. 017/2012).

3.2.8 Peritonitis model (*in vivo*)

Mice receive intraperitoneal injection (1mL) of 3% Thioglicolate one hour after plant extract subcutaneous administration (3-300 mg/kg) (Souto *et al.*, 2011). Six hours later, the mice were euthanized by cervical dislocation. The cells were

immediately harvested with 5 mL PBS containing heparin (5 IU/mL). Total counts of harvested cells were performed in a Neubauer chamber. Differential counts were made on smears stained by the Rosenfeld panchromatic method (Rosenfeld e Kak, 1976). The results are reported as the number of neutrophils per mL of cavity wash. In the control groups, the animals received: (1) PBS subcutaneous and intraperitoneal; (2) PBS subcutaneous and Thioglicolate intraperitoneal; (3) Dexamethasone subcutaneous (0.5 mg/kg) and Thioglicolate intraperitoneal.

3.2.9 Phytochemical screening

A phytochemical screening to detect tannins, flavonoids and saponins was performed as described in literature (Harborne, 1998). Crude plant extracts were screened for alkaloids, flavonoids, saponins and sesquiterpene lactones on thin layer chromatography plates (TLC aluminum sheets, 20X20 cm, Silicagel 60,Fluka) using appropriate spray reagents and UV absorbances according to procedures described by Wagner and Bladt (1995). For detecting classes of compounds it was used the methodology as described by Matos (1997).

3.2.10 Statistical Analysis

The experimental data were evaluated by analysis of variance (one-way ANOVA) followed by Bonferroni test. A significance level of 5% was adopted. All assays were performed in triplicate at least.

3.3 RESULTS

Myrtaceae family and among them, the *Eugenia* genus are used in the popular medicine to treat cold, pain, to regulate menstruation, as well as antifungal, anticancer, antidiabetic agent, among other properties. In order to evaluate this anti-inflammatory potential already described by folks, *ex-vivo* experiments were performed.

3.3.1 Ex vivo anti-inflammatory activity

The inflammatory process involves the recruitment of neutrophils and occurs as sequential events. Among them, we can mention adhesion, degranulation and generation of NETs. Human neutrophils isolated and sensitized with plant extracts were tested for their ability to maintain responsive to stimulus for adhesion, degranulation and NETs release.

Neutrophils incubated in the presence of PMA adhered to the culture plate and were considered as 100% adhesion. Neutrophils incubated only with culture medium showed basal adhesion rate (~ 50%). Pretreatment of neutrophils with different concentrations of *EP* did not alter their ability to adhere under PMA stimulus. On the other hand, pretreatment with *EA* 1000 µg/mL significantly reduced the cell adhesion. The *EP* 1000 µg/mL was the only concentration able to induce a weak neutrophil adhesion when neutrophils were incubated with extracts alone (*data not shown*).

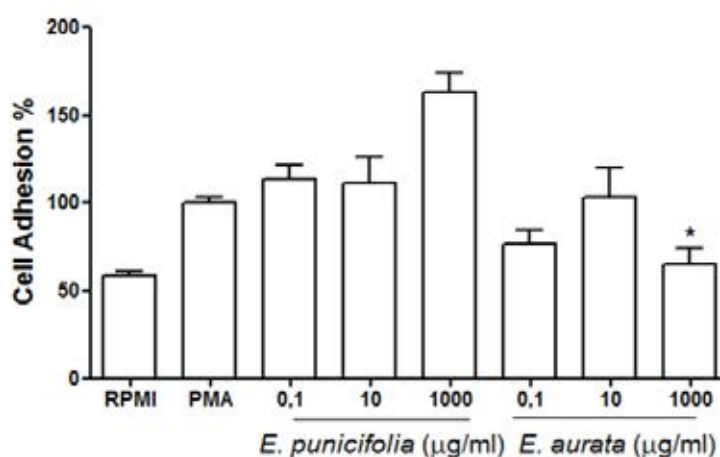


Figure 1 – *Eugenia aurata* inhibits human neutrophil adhesion. Human neutrophils (4×10^5) were previously pretreated with different concentrations of *EA* or *EP* and stimulated to adhesion by PMA. Neutrophils incubated with RPMI alone were used as negative control. Data are shown as adhesion (%) $\pm$ S.D. where PMA is 100%. * $p < 0,05$ when compared to PMA control.

Next inflammatory event assayed by us was degranulation. The degranulation of neutrophils was assessed through release of elastase in the supernatant of neutrophils stimulated by PMA and previously sensitized by plant extracts. Again, the release of elastase induced by PMA was considered 100% and the degranulation of neutrophils incubated with medium alone showed significant reduction. The presence of *EA* did not alter elastase secretion at any concentration tested. However, *EP* at a concentration of 1000 $\mu\text{g/mL}$ significantly reduced the elastase secretion induced by PMA. No concentration of the extracts was able to induce *per se* the elastase secretion (*data not shown*).

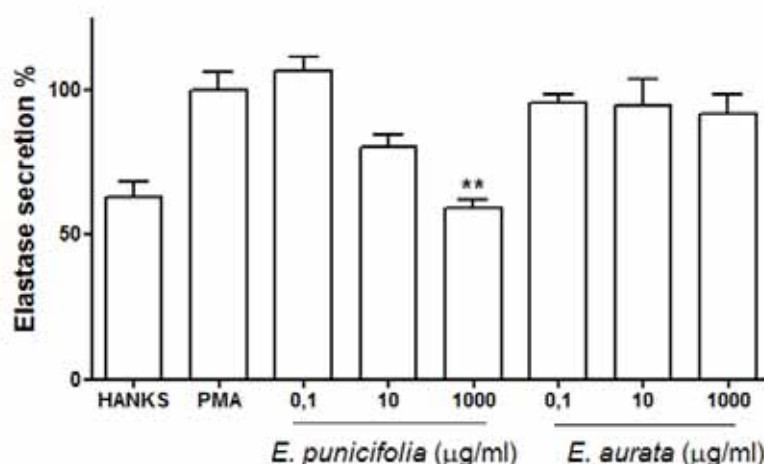


Figure 2 – *Eugenia punicifolia* inhibits elastase secretion from human neutrophil. Human neutrophils (4×10^5) were previously pretreated with different concentrations of *EA* or *EP* and stimulated to degranulation by PMA. Neutrophils incubated with RPMI alone were used as negative control. Data are shown as elastase (%) $\pm$ S.D. where PMA is 100%. ** $p < 0,01$ when compared to PMA control.

During the inflammatory process, neutrophils release NETs in order to capture and eliminate the invading agent. Furthermore, the release of NETs amplifies the tissue inflammation. The presence of both plant extracts studied here inhibited significantly the release of NETs induced by PMA. **Figure 3** shows release of, approximately, 170 ng/mL of DNA in the supernatant from PMA-stimulated neutrophils. This release has been reduced to baseline levels when cells were stimulated in the presence of herbal extracts for all concentrations tested.

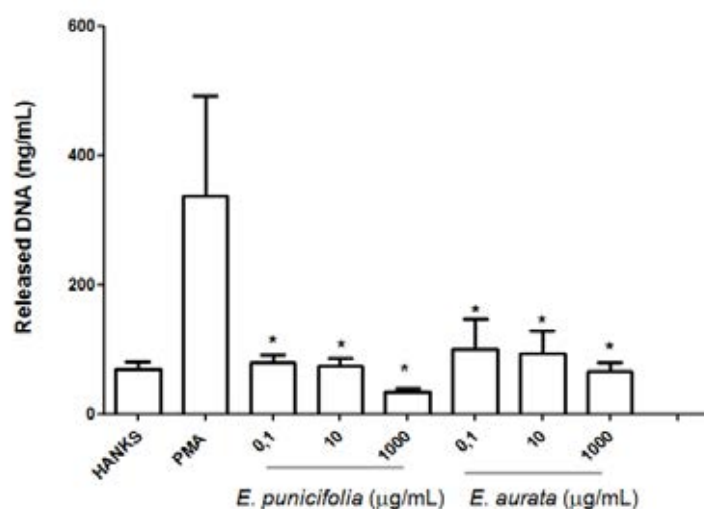


Figure 3 - *Eugenia* spp. extracts inhibit NET release. Human neutrophils (4×10^5) were previously pretreated with different concentrations of *EA* or *EP* and stimulated to NET release during 4 hours. Neutrophils incubated with RPMI alone were used as negative control. Data are shown as released DNA (ng/mL) $\pm$ S.D. * $p < 0,05$ when compared to PMA control.

Cell viability of neutrophils incubated with both plant extracts was monitored by MTT assay. The cytotoxicity by MTT assay reveals that for any tested concentrations (0.1, 10 and 1000 $\mu\text{g/mL}$) from both extracts did not alter in a significantly manner the cell viability, as shown in **Figure 4**.

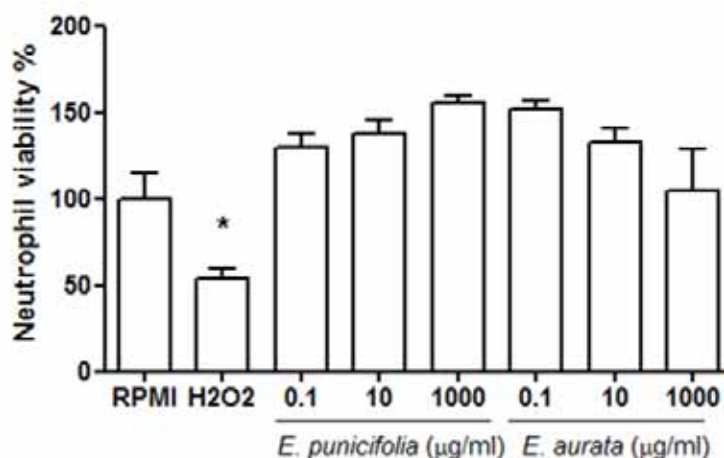


Figure 4 - Cell viability of neutrophils is not affected by *Eugenia aurata* or *Eugenia punicifolia*. Human neutrophils (4×10^5) were incubated with different concentrations of EA or EP. At the end of incubation, cell viability was measured by MTT assay. Neutrophils incubated with RPMI alone or 50µM H₂O₂ (Hydrogen Peroxide) were used as negative and positive control, respectively. Data are shown as cell viability (%) $\pm$ S.D.

3.3.2 *In vivo* anti-inflammatory activity

In the analysis of cellular migration *in vivo*, extracts were injected subcutaneously and one hour later, the animal was challenged intraperitoneally with thioglycolate. In a model of peritonitis assayed in mice, it is necessary a period of 6 hours for a maximum of acute neutrophil recruitment. The analysis of cell migration *in vivo* showed that subcutaneous injection of different concentrations of the extracts significantly reduced the cell influx into the peritoneal cavity (**Figure 5**). The extract of EP showed anti-inflammatory activity at concentrations of 30 and 300 mg/mL. As for EA, the anti-inflammatory activity was demonstrated for all concentrations tested. In both cases, the anti-inflammatory activity of the extracts was compared to the effect of dexamethasone, a potent anti-inflammatory drug in clinical use. Internal controls, where extracts were s.c. injected and PBS was i.p. injected, did not present neutrophil migration.

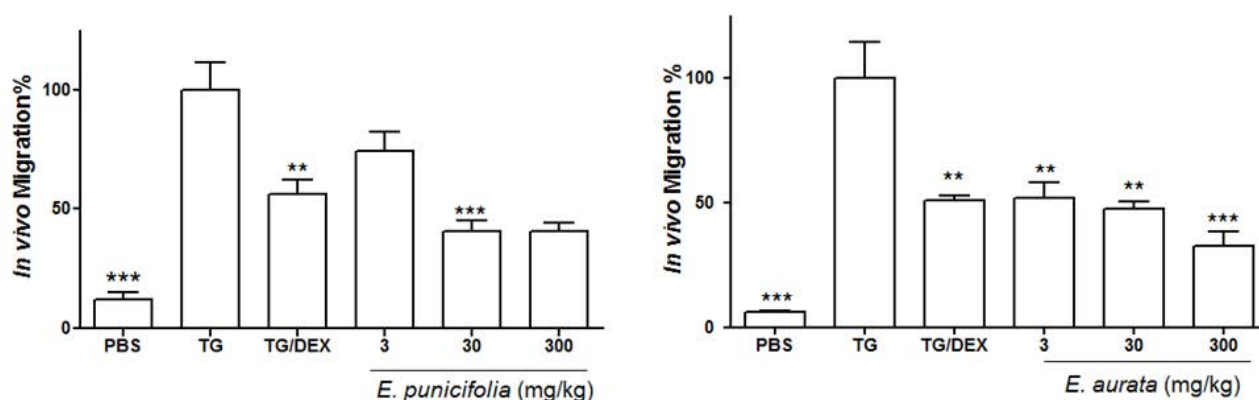


Figure 5 - *Eugenia* extracts inhibit neutrophil migration showing anti-inflammatory activity.

Swiss male mice received s.c. injection with different concentrations of *EA* or *EP* or PBS vehicle only. After 1 h, same mice received i.p. Thioglicolate. Cellular migration was allowed by six hours when the peritoneal lavage fluid was collected and subjected to total and differential cell count. Data are shown as no. neutrophils $\times 10^3$ / ml $\pm$ SD. (n = 5) ** p < 0,01 and *** p < 0,001 when compared to Thioglicolate control.

3.3.3 Phytochemical screening

In the analysis for *EA* and *EP* phytochemical composition, using thin layer chromatography and detecting classes of compounds tests, the presence of saponins, flavonoids, tannins and terpenoids was revealed. The results obtained were consistent with literature data for the *genus* (De Oliveira *et al.*, 2005, Kade *et al.*, 2008, Pietrovski *et al.*, 2008, Sharma *et al.* 2008). Other results from our research group (**Annexs A – D**, Basting *et al.*, 2014), from HPLC-PAD analyses confirm the existence of these secondary metabolites, suggesting also that the water soluble fractions of *EP* are enriched in derivatives of myricetin, quercetin, rutin, gallotanins and di-HDDP glucose (**Annex C, table C.3**), whereas *EA* are enriched of quercetin derivative, gallotannin, galloyl-hexahydroxydiphenoyl (HDDP) and proanthocyanidin derivatives.

3.4 DISCUSSION AND CONCLUSION

There are several reports about the popular use of the leaves from genus *Eugenia* in the treatment of diseases with their origin in acute and chronic inflammatory processes, among them, *Eugenia aurata* and *Eugenia punicifolia* (Grangeiro *et al.*, 2006; Leite *et al.*, 2010; Basting *et al.*, 2014). Our aim was to improve the understanding about the mechanisms involved in the anti-inflammatory activity exerted by these two plants. We demonstrated that hydroethanolic extracts from both *Eugenia* are able to inhibit neutrophils activities, under clear evidence of no toxicity for the cells. For the first time, it was shown that both extracts have inhibitory effect on the generation of Neutrophil Extracellular Traps (NETs), which is extremely useful as a promising alternative of treatment in those cases where it is already known that NETs mechanism play an important role, such as some kinds of carcinomas, thrombosis, atherosclerosis, lupus, among others (Borregaard, 2010; Mantovani *et al.*, 2011; Jancinova *et al.*, 2012; Amulic *et al.*, 2012; Kirchner *et al.*, 2012; Kolaczowska e Kubes, 2013).

Inflammatory diseases such as diabetes, auto immunities and tumors cause death and decrease quality of life of the population (Szondy *et al.*, 2014). Chronic processes may result in the loss of function of the affected organ or limb, or even the loss of the same. These facts justify investments in the search for anti-inflammatory molecules that have minimal side effects.

The inflammatory process involves cellular and molecular events that begin with the neutrophil recruitment. Neutrophil recruitment is a complex sequential event array, which is calcium dependent (Ca^{2+}) and includes proteins expression and activation, as well as neutrophil granules mobilization. The process is commonly

separated in four steps: rolling, adhesion, transmigration and degranulation. The rolling is mediated by the interaction between neutrophil selectins (selectin- L) and endothelium selectin (selectins P and E). Sequentially, the adhesion happens by the interaction between endothelium and neutrophil integrins as well as by mobilization of neutrophil secretory vesicles. After that, the transmigration - or diapedesis – also occurs under effect of integrins interactions and counting on the help from neutrophil tertiary granules release to digest endothelium basal membrane. Finally, the release of neutrophil secondary/primary granules is done, in response to some immunological stimuli (reviewed by Borregaard, 2010; Amulic *et al.*, 2012; Kolaczowska e Kubes, 2013). The proteins release from these granules can be associated with DNA and oxidative enzymes. These structures are called **Neutrophil Extracellular Traps (NETs)**. They improve microbe capture, as well as increase phagocytosis efficiency.

Ex vivo analyses focused in some events involved in the recruitment and function of neutrophils. Result revealed that cell adhesion was affected significantly only by *Eugenia aurata* (1000 µg/mL), although it has also been reduced at the other concentrations tested (0.1 and 10 µg/mL). In addition, *Eugenia punicifolia* (1000 µg/mL) reduced elastase secretion effectively.

Neutrophils newcomers to the inflammatory focus have as their first objective the elimination of agent responsible for tissue damage, as well as the maintenance of controlled inflammatory process. In order to evaluate this, we observe phagocytosis and release of NETs at this stage. Both, *Eugenia aurata* and *Eugenia punicifolia* were able to inhibit NET release. Inhibition of the release of NETs by *Eugenias* may have a suppressive effect on inflammation, activation of neutrophils and capture/

elimination of pathogens by decreasing the inflammatory stimulus that comes from genetic material released. Furthermore, the presence of extracellular DNA has been appointed as a direct source stimulus to inflammatory and autoimmune diseases (Kirchner *et al.*, 2012; Amulic *et al.*, 2012; Kolaczowska e Kubes, 2013).

In vivo assays, both *Eugenias* showed anti-inflammatory effect by inhibiting the neutrophil influx in acute peritonitis model. No animal showed symptoms of toxicity or even died. *In vivo* experiment comprises a greater complexity of events once compared to *in vitro* and *ex vivo* experiments, in which the experimental conditions are better monitored. Therefore, the results obtained using *in vivo* analyses are more close to the real scenario.

The phenolic compounds found in hydroethanolic *Eugenia* extracts, which were confirmed by TLC analysis and detecting class compounds, are consistent with the partially published results by our research group from HPLC-PAD analysis (**Annexs A – D**, Basting *et al.*, 2014). From these results, it was suggested that those fractions more soluble in water of *Eugenia punicifolia* are enriched in derivatives of myricetin, quercetin, rutin, gallotanins and di-HDDP glucose (**Annex C, table C.3**), whereas *Eugenia aurata* fractions are enriched of quercetin derivative, gallotannin, galloyl-hexahydroxydiphenoyl (HDDP) and proanthocyanidin derivatives (**Annex D, table D.3**). These results are according to Gordon *et al.*, (2011), who showed the presence of gallic acid and its derivatives, myricetin, ellagic acid and other tannins derivatives and pentagalloylglucose from Myrtaceae family (Araça and Jambolão).

Differences in chemical composition between *Eugenia aurata* and *Eugenia punicifolia* may explain the anti-inflammatory effects described herein. Neutrophil activation is largely dependent on the generation of oxygen free radicals (ROS) that

are known to be inhibited by antioxidant compounds found abundantly in plant extracts (as reviewed by Kirchner *et al.*, 2013). Selected flavonoids decreases the adhesion of inflammatory cells to the endothelium (Friesenecker *et al.*, 1995), whereas others flavonoids can inhibit degranulation of neutrophils without affecting superoxide production (Ferrandiz *et al.*, 1996).

The table 1 shows that water soluble fractions from *Eugenia aurata* are enriched for phenolic compounds that are reported by the literature as anti-adhesion compounds. These compounds can inhibit the expression of the adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, E-selectin) or they can affect signaling pathways that result in reduced expression of chemokines, cytokines and adhesion molecules. Quercetin is the only compound that presents anti-adhesion and anti-elastase secretion activity.

On the other hand, the fraction more soluble in water of *Eugenia punicifolia* present a larger proportion of phenolic compounds directly involved in the inhibition of elastase secretion once compared to *Eugenia aurata*.

Table 1. Phenolic compounds and related inhibitory effect on neutrophil activities

Extract	Phenolic compound	Anti-adhesion		Anti-elastase secretion	
<i>E.aurata</i>	Quercetin derivative	✓	a	✓	f
	Gallotannin	✓	b		
	Galloyl HHDP derivative	✓	c		
	Proanthocyanidin	✓	d		
<i>E.punicifolia</i>	Rutin	✓	g	✓	e
	Myricetin derivative			✓	f
	Quercetin derivative	✓	a	✓	f
	Gallotannin	✓	b		

^aHuang et al 1999, ^bErdelyi et al 2005, ^cYoudim, K.A., et al., 2002, ^dGarbacki et al. 2005), ^eSelloum et al. 2003, ^fKanashiro et al. 2007, ^gEun-Wha et al. 2001

In the same vein, it was reported that myricetin has a potent anti-inflammatory function - in acute and chronic inflammation - in different models (Wang et al., 2010; Basting *et al.*, 2014), as it also affects leucocyte migration (Wang et al., 2010). This

seems to be attributed to the reduction of cytoplasmic pro-inflammatory mediators or superoxide radicals from the leukocytes (Wang *et al.*, 2010). More so, it is already known that quercetin (Warren *et al.* 1987) and some of its derivatives (Siedle *et al.*, 2007) inhibits neutrophil degranulation.

In addition, other anti-inflammatory activities were reported to those phenolic compounds. The proanthocyanidin *seligueain* from *Poplypodium* species was found to inhibit the proteolytic enzyme elastase *in vitro* (Siedle *et al.*, 2007 cited Vasänge *et al.*, 1997). Proanthocyanidins have also been related to the inhibition of gastric mucosal injury, as reported by Iwasaki *et al.* (2004) and Basting *et al.* (2014). In another development, ellagitannins – *agrimoniin* and *peduncalagin* - isolated from *Alchemilla xanthochlora* Rothmaler were also described as potent inhibitors of human neutrophil elastase (Hrenn *et al.*, 2006). Elagittanins belongs to the same class of compounds that galloyl-HDDP and gallotannins, which is the hydrolysable tannins. Besides that, the flavonoid rutin was shown to block NETs release (Kircher *et al.* (2013).

Based in our results, we can propose an action model to anti-inflammatory properties exhibited by both hydroethanolic extracts evaluated from *Eugenia aurata* and *Eugenia punicifolia* (**Figure 6**). In this model, both extracts, whose chemical composition differs in terms of phenolic compounds, are not toxic to neutrophils and exhibit *in vivo* and *ex-vivo* anti-inflammatory action by different mechanisms. *Eugenia aurata* reduces neutrophil adhesion and *Eugenia punicifolia* decreases elastase degranulation. NET release is inhibited by two extracts. Together, these effects result on lower inflammatory and give support to their use in the popular medicine.

Furthermore, these results demonstrate a potential of both extracts for the development of phytomedicines with anti-inflammatory properties.

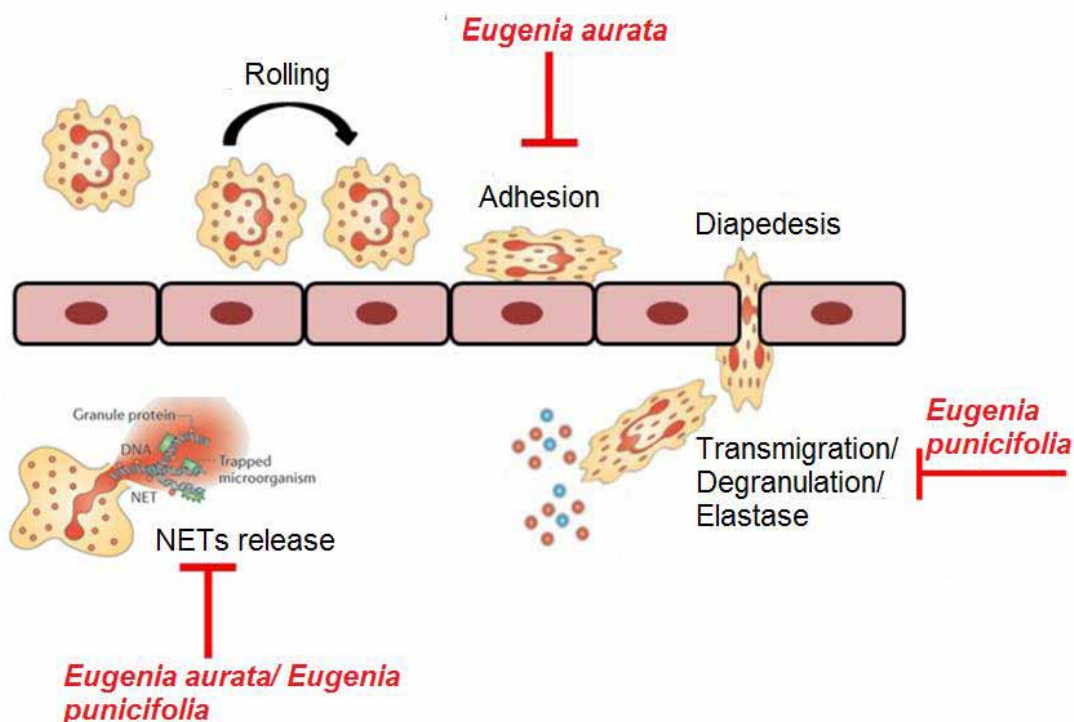


Figure 6 - Schematic summary of the effects upon neutrophil recruitment cascade from *Eugenia aurata* and *Eugenia punicifolia*. EA affects mainly adhesion while EP, degranulation. Both extracts cease the NETs release.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the Capes for funding this study, and everyone who collaborated with the accomplishment of this investigation, especially the biomedic Ivan Vicente Nascimento, the nurse Roseli Aparecida Vezanfard Soto and the Health Technical Section (FCL-Unesp) for their valuable help at blood collection.

REFERENCES

- Adebajo, A.C., Oloke, K.J., Aladesanmi, A.J. Antimicrobial activity of the leaf and extract of *Eugenia uniflora*. *Phytotherapy Research* v. 3, pp. 258-259, 1989.
- Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G.L., Metzler, K.D., Zychlinsky, A. Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. *The Annual Review of Immunology* v. 30, pp. 459-489, 2012.
- Basting, R.T., Nishijima, C.M., Lopes, J.A., Santos, R.C., Périco, L.L., Laufer, S., Bauer, S., Costa, M.F., Santos, L.C., Rocha, L.R.M., Vilegas, W., Santos, A.R.S., Santos, C., Hiruma-Lima, C.A. Antinociceptive, anti-inflammatory and gastroprotective effects of a hydroalcoholic extract from the leaves of *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. in rodents. *Journal of Etnopharmacology* 2014.
- Borregaard, N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity Review* v.33, pp. 657-670, 2010.
- Brinkmann, V., Laube, B., Abu Abed, U., Goosmann, C., Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps: how to generate and visualize them. *Journal of Visualized Experiments* v. 24, n. 36, 2010.
- Erdelyi K, Jiss A, Bakondi E, Bai P, Szabo C, Gergely P, Erdodi F, Virag L. Gallotannin inhibits the expression of chemokines and inflammatory cytokines in A549 cells. *Molecular Pharmacology* v.68, n. 3, pp. 895-904, 2005.
- Eun-Wha, S., Kang-Ro, L., Dong-Kwon, R., Suhkneung, P. Effects of rutin on adhesion molecules expression and NO production induced by gamma-irradiation in human endothelial cell. *The Journal of Applied Pharmacology* v. 9, pp. 156-161, 2001.
- Ferrándiz, M.L., Gil, B., Sanz, M.J., Ubeda, A., Erazo, S., Gonzáles, E., Negrete, R., Pacheco, S., Payá, M., Alcaraz, M.J. Effect of bakuchiol on leukocyte functions and some inflammatory responses in mice. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* v. 48, n. 9, pp. 975-980, 1996.
- Fischer, U. A., Carle R., Kammerer . D. R. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD–ESI/MSⁿ . *Food Chemistry* v. 127, pp. 807–821, 2011.
- Friesenecker, B., Tsai, A.G., Intaglietta, M. Cellular basis of Inflammation, edema and the activity of Daflon 500mg. *International Journal of Microcirculation, Clinical and experimental* v. 15, pp.17-21, 1995.
- Garbacki, N., Kinet, M., Nussgens, B., Desmecht, D., Damas, J. Proanthocyanidins, from *Ribes nigrum* leaves, reduce endothelial adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1. *Journal of Inflammation* v. 2, n. 9, 2002.

- Gordon, A., Jungfer, E., Silva, B.A., Maia, J.G.S., Marx, F. Phenolic Constituents and Antioxidant Capacity of Four Underutilized Fruits from the Amazon Region. *Journal of agricultural and food chemistry* v. 59, pp. 7688-7699, 2011.
- Grangeiro, M.S., Calheiros-Lima, A.P., Martins, M.F., Arruda, L.F., Garcez-do-Carmo, L., Santos, W.C. Pharmacological effects of *Eugenia punicifolia* (Myrtaceae) in cholinergic nicotinic neurotransmission. *Journal of Ethnopharmacology* v. 108, pp. 26-30, 2006.
- Harborne, J.B. *Phytochemical Methods*. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. third ed. Chapman and Hall, London, 1998.
- Hrenn, A., Steinbrecher, T., Labahn, A., Schwager, J., Schempp, C.M., Merfort, I. Plant phenolic inhibit neutrophil elastase. *Planta medica* v. 72, n. 12, pp. 1127-1131, 2006.
- Huang, Y.T., Hwang, J.J., Lee, P.P., Ke, F.C., Huang, J.H., Huang, C.J., Kandaswami, C., Middleton, E.J., Lee, M.T. Effects of luteolin and quercetin, inhibitors of tyrosine kinase, on cell growth and metastasis-associated properties in A431 cell overexpressing epidermal growth factor receptor. *British Journal of Pharmacology* v. 128, n. 5, pp. 999-1010, 1999.
- Hung, S.L., Lee, Y.Y., Liu, T.Y., Peng, J.L., Cheng, Y.Y., Chen, Y.T. Modulation of phagocytosis, chemotaxis, and adhesion of neutrophils by areca nut extracts. *Journal of Periodontology* v. 77, n. 4, pp. 579-585, 2006.
- Iwasaki, Y., Matsui, T., Arakawa, Y., The protective and hormonal effects of proanthocyanidin against gastric mucosal injury in Wistar rats. *Journal of Gastroenterology* v. 39, pp. 831-837, 2004.
- Jančinová, V., Perečko, T., Harmatha, J., Nosál, R., Drábiková, K. Decreased activity and accelerated apoptosis of neutrophils in the presence of natural polyphenols. *Interdisciplinary toxicology* v.5, n. 2, pp. 59-64, 2012.
- Kanashiro, A., Souza, J.G., Kabeva, L.M., Azzolini, A.E., Lucisano-Valim, Y.M. Elastase release by stimulated neutrophils inhibited by flavonoids: importance of the catechol group. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of Biosciences* v. 62, n. 5-6, pp. 357-361, 2007.
- Kirchner, T., Möller, S., Klinger, M., Solbach, W., Laskay, T., Behnen, M. The impact of various reactive oxygen species on the formation of Neutrophil Extracellular Traps. *Mediators of Inflammation* 2012.
- Kirchner, T., Hermann, E., Möller, S., Klinger, M., Solbach, W., Laskay, T., Behnen, M. Flavonoids and 5-Aminosalicylic Acid inhibit the formation of Neutrophil Extracellular Traps. *Mediators of Inflammation* 2013.
- Kolaczowska, E., Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews* v. 13, pp. 159-175, 2013.

- Laghari, A. H; Menon, S; Nelofar, A; Khan, K. M.; Yasmin, A. Determination of free phenolic acids and antioxidant activity of methanolic extracts obtained from fruits and leaves of *Chenopodium álbum*. *Food Chemistry* v.126, pp. 1850–1855, 2011.
- Leite, P.E.C., Almeida, K.B., Lagrota-Candido, J., Trindade, P., Silva, R.F., Ribeiro, M.G.L., Lima-Araújo, K.G., Santos, W.C., Quirico-Santos, T. Anti-inflammatory activity of *Eugenia punicifolia* extract on muscular lesion of mdx dystrophic mice. *Journal of Cellular Biochemistry* v. 111, pp. 1652-1660, 2010.
- Matos, F.J.A. *Introdução à Fitoquímica Experimental* UFC: Fortaleza, 1997.
- Ola, S. S., Giaccherini, C., Innocenti, M., Vincieri, F. F., Akindahunsi A. A., Mulinacci N. HPLC/DAD/MS characterisation and analysis of flavonoids and cinnamoyl derivatives in four Nigerian green-leafy vegetables. *Food Chemistry* v. 115, pp.1568–1574, 2009.
- Pietrovski, E. F., Magina, M.D.; Gomig, F., Pietrovski, C.F., Micke, G.A., Barcellos, M., Pizzolatti, M.G., Cabrini, D.A., Brighente, I.M., Otuki, M.F. Topical anti-inflammatory activity of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) leaves. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* v. 60, pp. 479–487, 2008.
- Ramirez, J. E.; Zambrano, R.; Sepulveda, B.; Simirgiotis, M. J. Antioxidant Properties and Hyphenated HPLC-PDA-MS Profiling of Chilean *Pica* Mango Fruits (*Mangifera indica* L. Cv. piqueño). *Molecules* v. 19, pp. 438-458, 2014.
- Romani, A., Campo, M., Pinelli, P., HPLC/DAD/ESI-MS analyses and anti-radical activity of hydrolysable tannins from different vegetal species. *Food Chemistry* v. 130, pp. 214-221, 2012.
- Rosenfeld, A., Kak, C.A. Digital Picture Processing. *Academic Press*, New York and London, 1976.
- Schapoval, E.E.S., Silveira, S.M., Miranda, M.L., Alice, C.B., Henriques, A.T. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. *Journal of Ethnopharmacology* v. 44, pp. 137-142, 1994.
- Selloum, L., Bouriche, H., Tigrine, C., Boudoukha, C. Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. *Experimental and Toxicology Pathology* v. 54, n. 4, pp. 313-318, 2003.
- Siedle, B., Hrenn, A., Merfort, I. Natural compounds as inhibitors of human neutrophil elastase. *Planta medica* v. 73, pp. 401-420, 2007.
- Simirgiotis, M.J. Antioxidant Capacity and HPLC-DAD-MS Profiling of Chilean Peumo (*Cryptocarya alba*) Fruits and Comparison with German Peumo (*Crataegus monogyna*) from Southern Chi. *Molecules* v. 18, pp. 2061-2080, 2013.
- Simirgiotis, M. J., Silva, M., Becerra J., Schmeda-Hirschmann, G. Direct characterisation of phenolic antioxidants in infusions from four Mapuche medicinal plants by liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) and

electrospray ionisation tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS). *Food Chemistry* v. 131, pp. 318–327, 2012.

- Simões, C.M.O, Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. In: _____. Flavonoides. UFRGS: Edição 6ª, 2010, pp. 557-614.
- Souto, F.O., Zarpelon, A.C., Staurengo-Ferrari, L., Fattori, V., Casagrande, R., Fonseca, M.J., Cunha, T.M., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., Verri, W.A.J. Quercetin reduces neutrophil recruitment induced by CXCL8, LTB4, and fMLP: inhibition of actin polymerization. *Journal of Natural Products* v. 74, n. 2, pp. 113-118, 2011.
- Szondy, Z., Garabuczi, E., Joós, G., Tsay, G.J., Sarang, Z. Impaired clearance of apoptotic cells in chronic inflammatory diseases: therapeutic implications. *Frontiers in Immunology* v. 1, n. 5, pp. 1-8, 2014.
- Vasänge, M., Liu, B., Welch, C.J., Rolfsen, W., Bohlin, L. The flavonoid constituents of two Polypodium species (Calaguala) and their effect on the elastase release in human neutrophils. *Planta medica* v. 63, n.6, pp. 511-517, 1997.
- Wagner, H., Bladt, S. *Plant drug analysis* 2nd edition, New York: Springer Verlag, 1996.
- Wang, S.J., Tong, Y., Shuang, L., Yang, R., Liao, X., Xu, Y.F, Li, X. Anti-inflammatory activity of Myricetin isolated from *Myrica rubra* Sieb. et Zucc. leaves. *Planta medica* v. 76, pp. 1492-1496, 2010.
- Warren, D., Blackburn, J., Louis, W.H., Wallace, R.W. The bioflavonoid quercetin inhibits neutrophil degranulation, superoxide production, and the phosphorylation of specific neutrophil proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* v. 144, n. 3, pp. 1229-1236, 1987.
- Youdim, K.A., McDonald, J., Kalt, W., Joseph, J.A. Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults. *The Journal of Nutritional Biochemistry* v. 13, n. 5, pp. 282-288, 2002.

ANNEXS

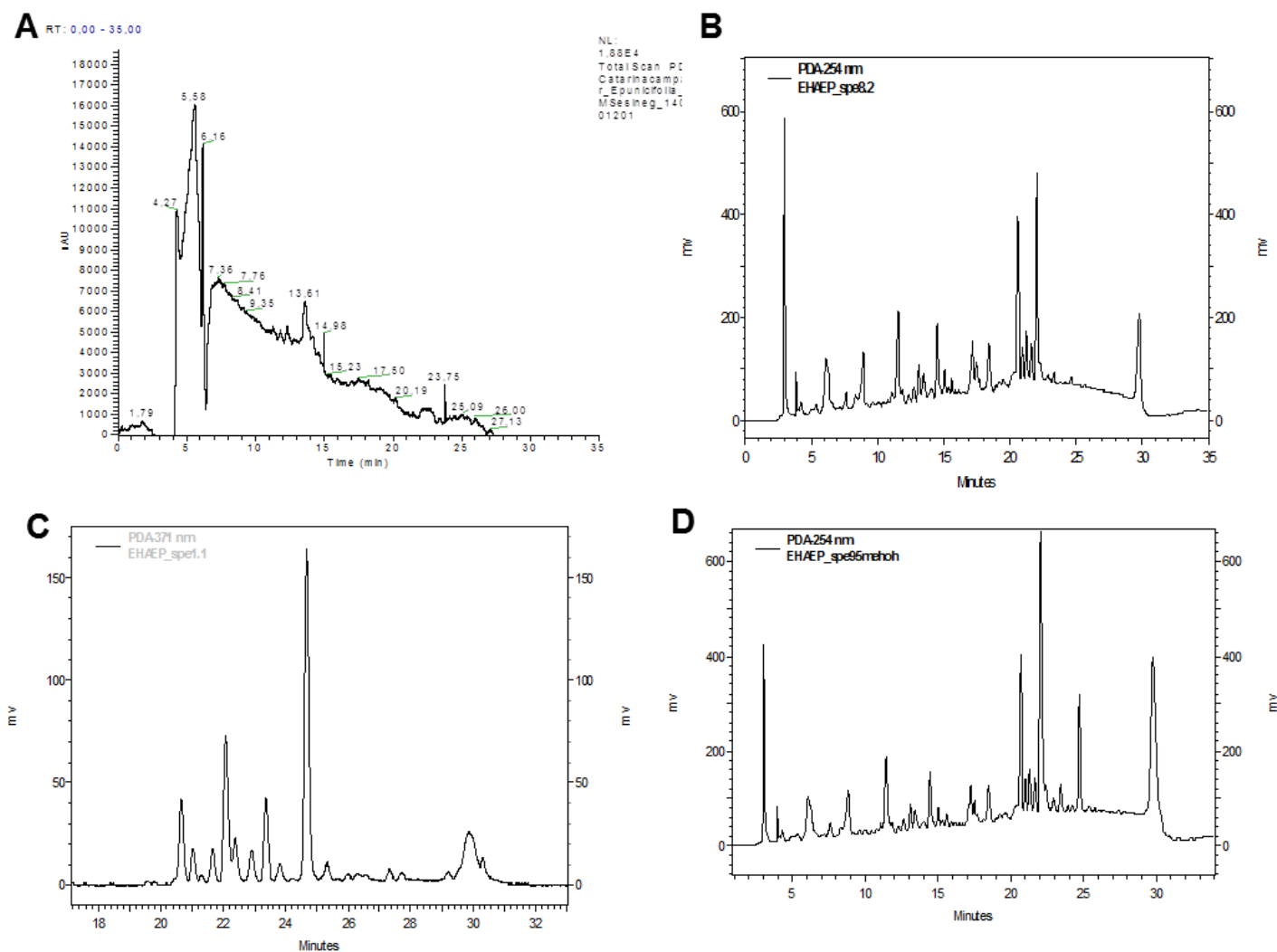
ANNEX A - Analytical HPLC-PAD *Eugenia punicifolia* chromatogram

Figure A.1 - Analytical HPLC-PAD *Eugenia punicifolia* chromatogram: a) hydroethanolic crude extract recorded at 254 nm; b) Fraction SPE MeOH:H₂O 8:2 (v/v) recorded at 254 nm; c) Fraction SPE MeOH:H₂O, 1:1 (v/v) recorded at 371 nm; d) Fraction SPE MeOH:H₂O, 95:5 (v/v) recorded at 254 nm.

ANNEX B - Analytical HPLC-PAD *Eugenia aurata* chromatogram

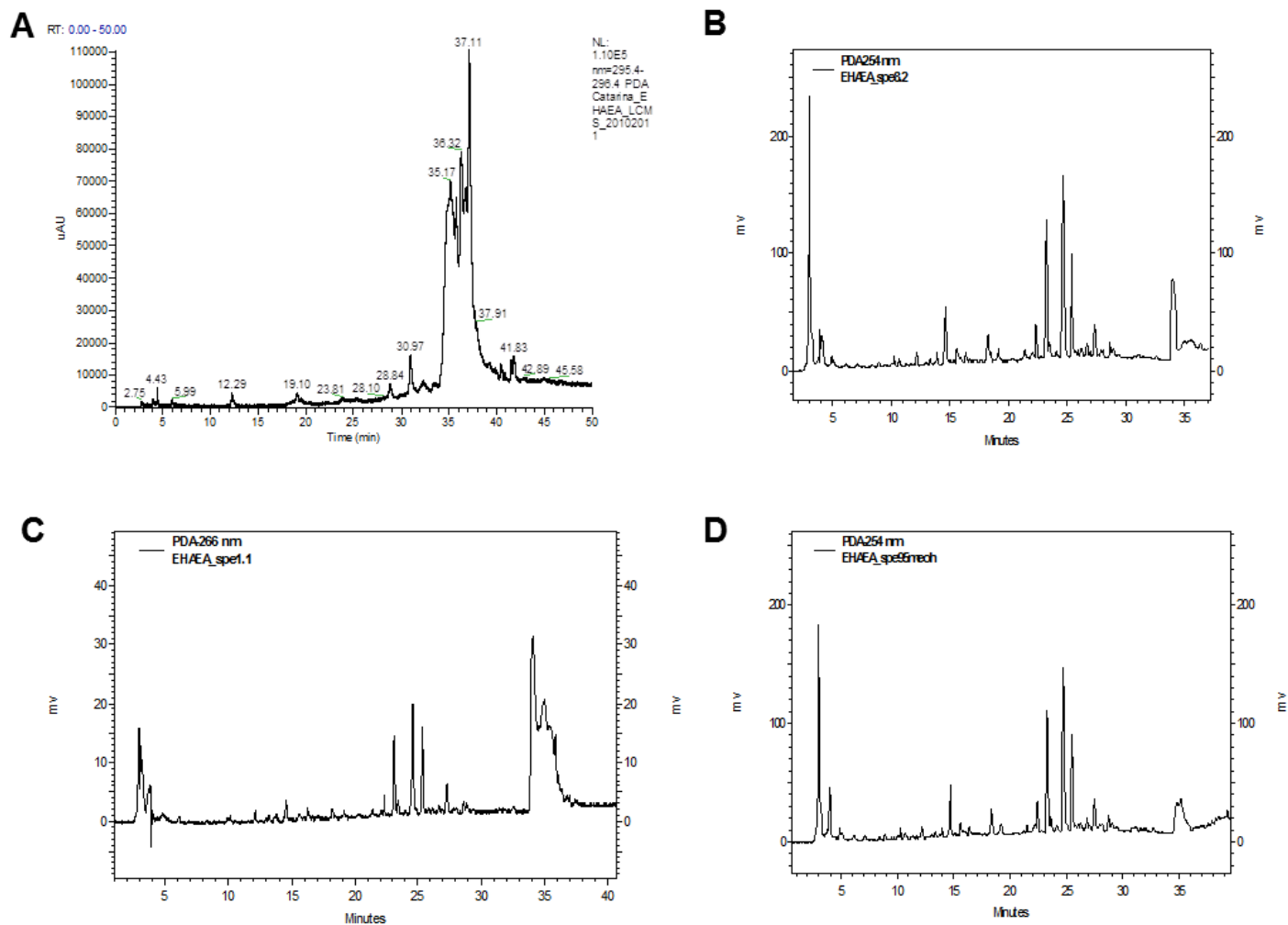


Figure B.1 - Analytical HPLC-PAD *Eugenia aurata* chromatogram: a) hydroethanolic crude extract recorded at 254 nm; b) Fraction SPE MeOH:H₂O 8:2 (v/v) recorded at 266 nm, c) Fraction SPE MeOH:H₂O, 1:1 (v/v) recorded at 254 nm, d) Fraction SPE MeOH:H₂O, 95:5 (v/v) recorded at 254 nm.

ANNEX C - UV spectra data of the peaks from HPLC-PDA chromatogram of the SPE Fractions from hydroethanolic extract from leaves of *Eugenia punicifolia*.

Table C.1 - UV spectra data of the peaks from HPLC-PDA chromatogram of the SPE Fraction 95% MeOH from hydroethanolic extract from leaves of *Eugenia punicifolia*.

Peak no.	t _r	λ _{máx} (nm)	Phenolic compound assignment	Reference
1	2.99	274	Gallotannin or Gallic acid derivative	Laguari <i>et al.</i> , 2012
2	6.00	276	proanthocyanidin	Ramirez <i>et al.</i> , 2014
3	6.12	275, 344	Unknown flavonoid	Laguari <i>et al.</i> , 2012
4	7.56	274	Gallotannin or Gallic acid derivative	
5	8.84	274	gallotannin or Gallic acid derivative	Laguari <i>et al.</i> , 2012
6	11.52	264	Galloyl HHDP glucose	Romani <i>et al.</i> , 2012
7	12.63	263	Galloyl HHDP glucose	Romani <i>et al.</i> , 2012
8	13.10	274	Gallotannin or Gallic acid derivative	Laguari <i>et al.</i> , 2012
9	13.40	273	Gallotannin or Gallic acid derivative	Laguari <i>et al.</i> , 2012
10	14.44	272	Gallotannin or Gallic acid derivative	Laguari <i>et al.</i> , 2012
11	14.50	272	gallotannin or Gallic acid derivative	Laguari <i>et al.</i> , 2012
12	15.04	279	proanthocyanidin	Ramirez <i>et al.</i> , 2014
13	20.63	255, 366	Flavonol derivative	Ramirez <i>et al.</i> , 2014
14	20.72	258, 348	quercetin	
15	21.04	267, 353	Myricetin derivative	Simirgiotis, 2013
16	21.34	254, 360	Myricetin	Simirgiotis, 2013
17	21.69	265, 349	Quercetin derivative	Ramirez <i>et al.</i> , 2014
18	22.04	254, 356	Rutin	Simirgiotis, 2013; Ola <i>et al.</i> , 2009
19	23.44	269, 354	Myricetin derivative	Simirgiotis, 2013
20	24.77	258, 348	quercetin	
21	29.74	221, 278	di-HHDP glucose	

Table C.2 - UV spectra data of the peaks from HPLC-PDA chromatogram of the SPE Fraction 8:2 from hydroethanolic extract from leaves of *Eugenia punicifolia*.

Peak no.	t _r	λ _{máx} (nm)	Phenolic compound assignment	Reference
1	6.23	274	Gallotannin or Gallic acid derivative	Laguari <i>et al.</i> , 2012
	8.93	216, 256	Unknown flavonoid	Romani <i>et al.</i> , 2012
	11.54	264	Galloyl HHDP glucose	
	14.58	272	Gallotannin or Gallic acid derivative	Laguari <i>et al.</i> , 2012
	18.50	271	Gallotannin or Gallic acid derivative	Ramirez <i>et al.</i> , 2014
	20.63	256,355	Rutin	Simirgiotis, 2013; Ola <i>et al.</i> , 2009
	21.03	267, 353	Myricetin derivative	Simirgiotis, 2013
	21.28	254, 359	Myricetin	Simirgiotis, 2013
	21.59	265, 349	Quercetin derivative	Ramirez <i>et al.</i> , 2014
	22.02	254, 360	Myricetin	Simirgiotis, 2013; Ola <i>et al.</i> , 2009
	23.36	273, 352	Myricetin derivative	Simirgiotis, 2013
	29.80	218, 278	di-HHDP glucose	Gordon, 2011

Table C.3 - UV spectra data of the peaks from HPLC-PDA chromatogram of the SPE Fraction 1:1 from hydroethanolic extract from leaves of *Eugenia punicifolia*.

Peak no.	t _r	λ _{máx} (nm)	Phenolic compound assignment	Reference
	20.66	256, 354	Rutin	Simirgiotis, 2013; Ola <i>et al.</i> , 2009
	21.02	266, 353	Myricetin derivative	Simirgiotis, 2013
	21.65	264, 350	Quercetin derivative	Ramirez <i>et al.</i> , 2014
	22.08	254, 356	Quercetin derivative	Simirgiotis, 2013; Ola <i>et al.</i> , 2009
	22.87	267,355	Myricetin derivative	Simirgiotis, 2013;
	23.31	258, 352	Myricetin derivative	
	23.82	269	Gallotannin	
	24.69	257, 348	Quercetin derivative	Simirgiotis, 2013
	25.32	273	Gallotannin or Gallic acid derivative	Laguari <i>et al.</i> , 2012
	29.86	220, 278	di-HHDP glucose	Gordon, 2011

ANNEX D - UV spectra data of the peaks from HPLC-PDA chromatogram of the SPE Fractions from hydroethanolic extract from leaves of *Eugenia aurata*.

Table D.1 - UV spectra data of the peaks from HPLC-PDA chromatogram of the SPE Fraction 95% MeOH from hydroethanolic extract from leaves of *Eugenia aurata*.

Peak no.	t _r	λ _{máx} (nm)	Phenolic compound assignment	Reference
	3.86	265	Gallotannin	
	14.71	240, 290 sh, 325	Phenolic acid derivative	Fischer <i>et al.</i> , 2011
	18.34	238, 290 sh, 325	gallotannin or Gallic acid derivative	Laguari <i>et al.</i> , 2012
	23.32	257, 348	Quercetin	
	24.69	259, 350	Quercetin	Simirgiotis, 2013
	25.48	265	Gallotannin	Romani <i>et al.</i> , 2012
	27.43	264	Gallotannin	Romani <i>et al.</i> , 2012
	35.16	281	Proanthocyanidin	Ramirez <i>et al.</i> 2014; Simirgiotis <i>et al.</i> , 2013

Table D.2 - UV spectra data of the peaks from HPLC-PDA chromatogram of the SPE Fraction 8:2 from hydroethanolic extract from leaves of *Eugenia aurata*.

Peak no.	t _r	λ _{máx} (nm)	Phenolic compound assignment	Reference
1	4.00	260	Ellagic acid derivative	Fischer <i>et al.</i> , 2014
	14.57	290 sh, 325	Phenolic acid derivative	Sanz <i>et al.</i> , 2012, Fischer <i>et al.</i> , 2014.
	18.24	290 sh, 326	Phenolic acid derivative	Sanz <i>et al.</i> , 2012, Fischer <i>et al.</i> , 2014.
	22.36	255, 350	Quercetin derivative	Simirgiotis <i>et al.</i> , 2012
	23,26	257, 349	Quercetin derivative	Simirgiotis <i>et al.</i> , 2012
	24,60	258, 350	Quercetin derivative	Simirgiotis <i>et al.</i> , 2012
	25.41	265, 349	kaempferol	Ramirez <i>et al.</i> , 2014
	27.29	264	Gallotanin	Simirgiotis <i>et al.</i> , 2013;
	34.01	281	Proanthocyanidin	Ramirez <i>et al.</i> , 2014

Table D.3 - UV spectra data of the peaks from HPLC-PDA chromatogram of the SPE Fraction 1:1 from hydroethanolic extract from leaves of *Eugenia aurata*.

Peak no.	t _r	λ _{máx} (nm)	Phenolic compound assignment	Reference
	23.14	257, 344	Quercetin derivative	Simirgiotis <i>et al.</i> , 2013
	24.53	262	Gallotannnin	Romani <i>et al.</i> , 2012
	25.33	264, 335	Galloyl HHDP derivative	Fischer <i>et al.</i> , 2014
	34.19	279	Proanthocyanidin	Ramirez <i>et al.</i> , 2014; Simirgiotis <i>et al.</i> , 2013

4. CONCLUSÕES GERAIS

Os neutrófilos atuam como células efetoras no controle de processos inflamatórios agudos e crônicos, e os extratos hidroetanólicos de folhas de *Eugenia aurata* (EA) e de *Eugenia punicifolia* (EP) se mostram aptos a modular algumas de suas respostas, por atuarem na inibição de etapas do recrutamento neutrofílico. O EA inibe o processo de adesão, enquanto que o EP, a desgranulação (secreção de elastase). Ademais, ambos inibem a liberação de DNA (NETose). Além disso, o EA e o EP, cujas composições fenólicas são diferentes, não apresentam efeitos tóxicos aos neutrófilos nas concentrações estudadas *ex vivo* (0,1; 10 e 1000 µg/mL). Esses resultados, em conjunto, mostram o efeito anti-inflamatório desses extratos, o que sugere o seu potencial no desenvolvimento de fitoterápicos com propriedades anti-inflamatórias. Estudos futuros são necessários para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos pelos efeitos do EA e do EP, correlacionando-os aos seus componentes fitoquímicos.

5. REFERÊNCIAS

- Adebajo, A.C., Oloke, K.J., Aladesanmi, A.J. Antimicrobial activity of the leaf and extract of *Eugenia uniflora*. *Phytotherapy Research* v. 3, pp. 258-259, 1989.
- Almeida, S. P.; Proença, C. E .B.; Sano, S. M.; Ribeiro, J. F. Cerrado: espécies vegetais úteis. *Planaltina, DF: Embrapa-CPAC*, 464 p. , 1998.
- Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G.L., Metzler, K.D., Zychlinsky, A. Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. *The Annual Review of Immunology* v. 30, pp. 459-489, 2012.
- Andréo, M.A. *Prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: Estudo químico e atividade sobre o Sistema gastrointestinal de Mouriri pusa Gardner e Mouriri elliptica Martius (Melastomataceae)*. 2008. 265f. Tese (Doutorado em Química)- Universidade Estadual Paulista- Instituto de Química, Araraquara, 2008.

- Barbosa-Filho, J.M., Vasconcelos, T.H.C., Alencar, A.A., Batista, L.M., Oliveira, R.A.G., Guedes, D.N., Falcão, H.S., Moura, M.D., Diniz, M.F.F.M., Modesto-Filho, J. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia* v. 15, n. 4, pp. 392-413, 2005.
- Basting, R.T., Nishijima, C.M., Lopes, J.A., Santos, R.C., Périco, L.L., Laufer, S., Bauer, S., Costa, M.F., Santos, L.C., Rocha, L.R.M., Vilegas, W., Santos, A.R.S., Santos, C., Hiruma-Lima, C.A. Antinociceptive, anti-inflammatory and gastroprotective effects of a hydroalcoholic extract from the leaves of *Eugenia puniceifolia* (Kunth) DC. in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 2014.
- Borregaard, N., Sørensen, O.E., Theilgaard-Mönch, K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends in Immunology* v.8, n.8, pp. 340-345, 2007.
- Borregaard, N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity Review* v.33, pp. 657-670, 2010.
- Brinkmann, V., Laube, B., Abu Abed, U., Goosmann, C., Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps: how to generate and visualize them. *Journal of Visualized Experiments* v. 24, n. 36, 2010.
- Calixto, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Ciência e Cultura*. [online]. v. 55, n. 3, pp 37-39, 2003.
- Calixto, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. *Journal of Ethnopharmacology* v. 100, pp. 131-134, 2005.
- Caramori, S. S.; Lima, C. S.; Fernandes, K. F. Biochemical characterization of selected plant species from brazilian savannas. *Brazilian Archives of Biology and Technology* v. 47, n. 2, pp 253-259, 2004.
- Coelho, F.B.R., Dal Belo, C.A., Lolis, S.F., Santos, M.G. Levantamento etnofarmacológico realizado na comunidade Mumbuca localizada no Jalapão- TO. *Revista Eletrônica de Farmácia Suplemento* v.2, n.2, pp. 52-55, 2005.
- Consolini, A.E., Baldini, O.A.N., Amat, A.G. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. *Journal of Ethnopharmacology* v. 66, n. 1, pp. 33-39, 1999.
- Costa, T.R., Fernandes, O.F.L., Santos, S.C., Oliveira, C.M.A., Lião, L.M., Ferri, P.H., Paula, R.J., Ferreira, H.D., Sales, B.H.N., Silva, M.R.R. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. *Journal of Ethonopharmacology* v. 72, n. 2, pp. 111-117, 2000.
- Degaspari, C. H.; Waszczynskyj, N. Antioxidants Properties of Phenolic Compounds. *Revista Visão Acadêmica* v. 5, n. 1, pp. 33-40, 2004.

- De Oliveira, R.N., Dias, I.J.M., Câmara, C.A.G. Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia punicifolia* (HBK) DC. de diferentes localidades de Pernambuco. *Revista Brasileira de Farmacognosia* v. 15, n. 1, pp. 39-43, 2005.
- Erdelyi K, Jiss A, Bakondi E, Bai P, Szabo C, Gergely P, Erdodi F, Virag L. Gallotannin inhibits the expression of chemokines and inflammatory cytokines in A549 cells. *Molecular Pharmacology* v.68, n. 3, pp. 895-904, 2005.
- Eun-Wha, S., Kang-Ro, L., Dong-Kwon, R., Suhkneung, P. Effects of rutin on adhesion molecules expression and NO production induced by gamma-irradiation in human endothelial cell. *The Journal of Applied Pharmacology* v. 9, pp. 156-161, 2001.
- Fabris, L.C., Cesar, O. Estudos florísticos em uma mata litorânea no sul do estado do Espírito Santo, Brasil. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão (Nova Série)* v. 5, pp. 15-46, 1996.
- Falcão, H.S., Lima, I.O., Santos, V.L., Dantas, H.F., Diniz, M.F.F.M., Barbosa-Filho, J.M., Batista, L.M. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* v. 15, n. 4, pp. 381-391, 2005.
- Ferrándiz, M.L., Gil, B., Sanz, M.J., Ubeda, A., Erazo, S., Gonzáles, E., Negrete, R., Pacheco, S., Payá, M., Alcaraz, M.J. Effect of bakuchiol on leukocyte functions and some inflammatory responses in mice. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* v. 48, n. 9, pp. 975-980, 1996.
- Fischer, U. A., Carle R., Kammerer . D. R. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD–ESI/MSⁿ . *Food Chemistry* v. 127, pp. 807–821, 2011.
- Friesenecker, B., Tsai, A.G., Intaglietta, M. Cellular basis of Inflammation, edema and the activity of Daflon 500mg. *International Journal of Microcirculation, Clinical and experimental* v. 15, pp.17-21, 1995.
- Garbacki, N., Kinet, M., Nussgens, B., Desmecht, D., Damas, J. Proanthocyanidins, from *Ribes nigrum* leaves, reduce endothelial adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1. *Journal of Inflammation* v. 2, n. 9, 2002.
- Gordon, A., Jungfer, E., Silva, B.A., Maia, J.G.S., Marx, F. Phenolic Constituents and Antioxidant Capacity of Four Underutilized Fruits from the Amazon Region. *Journal of agricultural and food chemistry* v. 59, pp. 7688-7699, 2011.
- Grangeiro, M.S., Calheiros-Lima, A.P., Martins, M.F., Arruda, L.F., Garcez-do-Carmo, L., Santos, W.C. Pharmacological effects of *Eugenia punicifolia* (Myrtaceae) in cholinergic nicotinic neurotransmission. *Journal of Ethnopharmacology* v. 108, pp. 26-30, 2006.
- Harborne, J.B. *Phytochemical Methods*. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. third ed. Chapman and Hall, London, 1998.

- Hrenn, A., Steinbrecher, T., Labahn, A., Schwager, J., Schempp, C.M., Merfort, I. Plant phenolic inhibit neutrophil elastase. *Planta medica* v. 72, n. 12, pp. 1127-1131, 2006.
- Huang, Y.T., Hwang, J.J., Lee, P.P., Ke, F.C., Huang, J.H., Huang, C.J., Kandaswami, C., Middleton, E.J., Lee, M.T. Effects of luteolin and quercetin, inhibitors of tyrosine kinase, on cell growth and metastasis-associated properties in A431 cell overexpressing epidermal growth factor receptor. *British Journal of Pharmacology* v. 128, n. 5, pp. 999-1010, 1999.
- Hung, S.L., Lee, Y.Y., Liu, T.Y., Peng, J.L., Cheng, Y.Y., Chen, Y.T. Modulation of phagocytosis, chemotaxis, and adhesion of neutrophils by areca nut extracts. *Journal of Periodontology* v. 77, n. 4, pp. 579-585, 2006.
- Iwasaki, Y., Matsui, T., Arakawa, Y., The protective and hormonal effects of proanthocyanidin against gastric mucosal injury in Wistar rats. *Journal of Gastroenterology* v. 39, pp. 831-837, 2004.
- Jančinová, V., Perečko, T., Harmatha, J., Nosál, R., Drábiková, K. Decreased activity and accelerated apoptosis of neutrophils in the presence of natural polyphenols. *Interdisciplinary toxicology* v.5, n. 2, pp. 59-64, 2012.
- Kade, I.J., Ibukun, E.O., Nogueira, C.W., Rocha, J.B. Sun-drying diminishes the antioxidative potentials of leaves of *Eugenia uniflora* against formation of thiobarbituric acid reactive substances induced in homogenates of rat brain and liver. *Experimental and Toxicologic Pathology* v. 60, pp. 365–371, 2008.
- Kanashiro, A., Souza, J.G., Kabeva, L.M., Azzolini, A.E., Lucisano-Valim, Y.M. Elastase release by stimulated neutrophils inhibited by flavonoids: importance of the catechol group. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of Biosciences* v. 62, n. 5-6, pp. 357-361, 2007.
- Kirchner, T., Möller, S., Klinger, M., Solbach, W., Laskay, T., Behnen, M. The impact of various reactive oxygen species on the formation of Neutrophil Extracellular Traps. *Mediators of Inflammation* 2012.
- Kirchner, T., Hermann, E., Möller, S., Klinger, M., Solbach, W., Laskay, T., Behnen, M. Flavonoids and 5-Aminosalicylic Acid inhibit the formation of Neutrophil Extracellular Traps. *Mediators of Inflammation* 2013.
- Kolaczowska, E., Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews* v. 13, pp. 159-175, 2013.
- Kuskoski, E.M., Vega, J.M., Rios, J.J., Fett, R., Troncoso, A.M., Asuero, A.G. Characterization of anthocyanins from the fruits of baguaçu (*Eugenia umbelliflora* Berg). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* v. 51, n. 18, pp. 5450-5454, 2003.
- Laghari, A. H; Menon, S; Nelofar, A; Khan, K. M.; Yasmin, A. Determination of free phenolic acids and antioxidant activity of methanolic extracts obtained from fruits and leaves of *Chenopodium album*. *Food Chemistry* v.126, pp. 1850–1855, 2011.

- Lage, G.A. *Isolamento, identificação química e bioprospecção de metabólitos secundários nas folhas de Annona crassiflora Mart.* 2011.132f. Dissertação (Mestrado em Química)- Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Exatas, Belo Horizonte, 2011.
- Leite, P.E.C., Almeida, K.B., Lagrota-Candido, J., Trindade, P., Silva, R.F., Ribeiro, M.G.L., Lima-Araújo, K.G., Santos, W.C., Quirico-Santos, T. Anti-inflammatory activity of *Eugenia punicifolia* extract on muscular lesion of mdx dystrophic mice. *Journal of cellular biochemistry* v. 111, pp. 1652-1660, 2010.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: the leucocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews* v. 7, pp. 678-689, 2007.
- Lima, I.O., Oliveira, R.A.G., Lima, E.O., Farias, N.M.P., Souza, E.L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* v. 16, n. 2, pp. 197-201, 2006.
- Machado, R.B., M.B. Ramos Neto, P.G.P. Pereira, E., Caldas, D.A., Gonçalves, N.S. Santos, K. Tabor e M. Steininger. *Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro*. Relatório técnico não publicado. Conservação Internacional, Brasília, DF, 2004.
- Mantovani, A., Cassatella, M.A., Costantini, C., Jaillon, S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptative immunity. *Nature Reviews* v. 11, pp. 519-531, 2011.
- Matos, F.J.A. *Introdução à Fitoquímica Experimental* UFC: Fortaleza, 1997.
- Medeiros, J.R., Medeiros, N., Medeiros, H., Davin, L.B., Lewis, N.G. Composition of the bioactive oils from the leaves of *Eugenia stipitata* McVaugh ssp. *sororia* from the Azores. *Journal Essential Oil Research* v.15, pp. 293-295, 2003.
- Myers, N., R.A. Mittermeier, C.G. Mittermeier, G.A.B. da Fonseca & J. Kent. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* v. 403, pp 853-858, 2000.
- Ola, S. S., Giaccherini, C., Innocenti, M., Vincieri, F. F., Akindahunsi A. A., Mulinacci N. HPLC/DAD/MS characterisation and analysis of flavonoids and cinnamoyl derivatives in four Nigerian green-leafy vegetables. *Food Chemistry* v. 115, pp.1568–1574, 2009.
- Pietrovski, E. F., Magina, M.D.; Gomig, F., Pietrovski, C.F., Micke, G.A., Barcellos, M., Pizzolatti, M.G., Cabrini, D.A., Brighente, I.M., Otuki, M.F. Topical anti-inflammatory activity of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) leaves. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* v. 60, pp. 479–487, 2008.
- Ramirez, J. E.; Zambrano, R.; Sepulveda, B.; Simirgiotis, M. J. Antioxidant Properties and Hyphenated HPLC-PDA-MS Profiling of Chilean *Pica* Mango Fruits (*Mangifera indica* L. Cv. piqueño). *Molecules* v. 19, pp. 438-458, 2014.

- Ravi, K., Rajasekaran S., Subramanian, S. Antihyperlipidemic effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Food and Chemical Toxicology* v. 43, n. 9, pp. 1433-1439, 2005.
- Romani, A., Campo, M., Pinelli, P.,. HPLC/DAD/ESI-MS analyses and anti-radical activity of hydrolysable tannins from different vegetal species. *Food Chemistry* v. 130, pp. 214-221, 2012.
- Rosenfeld, A., Kak, C.A. Digital Picture Processing. Academic Press, New York and London, 1976.
- Schapoval, E.E.S., Silveira, S.M., Miranda, M.L., Alice, C.B., Henriques, A.T. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. *Journal of Ethnopharmacology* v. 44, pp. 137-142, 1994.
- Selloum, L., Bouriche, H., Tigrine, C., Boudoukha, C. Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. *Experimental and Toxicology Pathology* v. 54, n. 4, pp. 313-318, 2003.
- Sharma, B., Viswanath, G., Salunke, R., Roy, P. Effects of flavonoid-rich extract from seeds of *Eugenia jambolana* (L.) on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic mice. *Food Chemistry* v.110, pp.697–705, 2008.
- Siedle, B., Hrenn, A., Merfort, I. Natural compounds as inhibitors of human neutrophil elastase. *Planta medica* v. 73, pp. 401-420, 2007.
- Simirgiotis, M.J. Antioxidant Capacity and HPLC-DAD-MS Profiling of Chilean Peumo (*Cryptocarya alba*) Fruits and Comparison with German Peumo (*Crataegus monogyna*) from Southern Chi. *Molecules* v. 18, pp. 2061-2080, 2013.
- Simirgiotis, M. J., Silva, M., Becerra J., Schmeda-Hirschmann, G. Direct characterisation of phenolic antioxidants in infusions from four Mapuche medicinal plants by liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) and electrospray ionisation tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS). *Food Chemistry* v. 131, pp. 318–327, 2012.
- Simões, C.M.O, Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. Farmacognosia da planta ao medicamento. In: _____. *Flavonoides*. UFRGS: Edição 6ª, 2010, pp. 557-614.
- Souto, F.O., Zarpelon, A.C., Staurengo-Ferrari, L., Fattori, V., Casagrande, R., Fonseca, M.J., Cunha, T.M., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., Verri, W.A.J. Quercetin reduces neutrophil recruitment induced by CXCL8, LTB4, and fMLP: inhibition of actin polymerization. *Journal of Natural Products* v. 74, n. 2, pp. 113-118, 2011.
- Szondy, Z., Garabuczi, E., Joós, G., Tsay, G.J., Sarang, Z. Impaired clearance of apoptotic cells in chronic inflammatory diseases: therapeutic implications. *Frontiers in Immunology* v. 1, n. 5, pp. 1-8, 2014.
- Toledo, K.A. Da ativação de neutrófilos pela lectina MNCF decorrem transcrição gênica e secreção de mediadores sustentadas em ambiente anti-inflamatório. 2007.

106f.: il. Tese. (Doutorado em co-tutela em Imunologia Básica e Aplicada). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Ribeirão Preto, 2007.

- Vasänge, M., Liu, B., Welch, C.J., Rolfsen, W., Bohlin, L. The flavonoid constituents of two Polypodium species (Calaguala) and their effect on the elastase release in human neutrophils. *Planta medica* v. 63, n.6, pp. 511-517, 1997.
- Veiga-Junior, V.F.; Mello. J. C. P. As monografias sobre plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, n. 3, pp. 464-471, 2008.
- Velázquez, E., Tournier, H.A., Buschiazzo, P.M., Saavedra, G., Schinella, G.R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia* v. 74, n. 2, pp. 91-97, 2003.
- Wagner, H., Bladt, S. *Plant drug analysis* 2nd edition, New York: Springer Verlag, 1996.
- Wang, S.J., Tong, Y., Shuang, L., Yang, R., Liao, X., Xu, Y.F, Li, X. Anti-inflammatory activity of Myricetin isolated from Myrica rubra Sieb. et Zucc. leaves. *Planta medica* v. 76, pp. 1492-1496, 2010.
- Warren, D., Blackburn, J., Louis, W.H., Wallace, R.W. The bioflavonoid quercetin inhibits neutrophil degranulation, superoxide production, and the phosphorylation of specific neutrophil proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* v. 144, n. 3, pp. 1229-1236, 1987.
- Williams, M.R., Azcutia, V., Newton, G., Alcaide, P., Luscinskas, F.W.. Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. *Trends in Immunology* v. 32, n.10, pp. 461-469, 2011.
- Youdim, K.A., McDonald, J., Kalt, W., Joseph, J.A. Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults. *The Journal of Nutritional Biochemistry* v. 13, n. 5, pp. 282-288, 2002.
- Yuan, S.Y., Shen, Q., Rigor, R.R., Wu, M.H. Neutrophil transmigration, focal adhesion kinase and endothelial barrier function. *Microvascular Research* v. 83, pp. 82-88, 2012.

