

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 19/02/2017.

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 puniceifolia* (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, desordens 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 puniceifolia* – 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 puniceifolia* (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 puniceifolia* - *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 puniceifolia</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 Waszczyński, 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

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 punicifolia* (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 Ethnopharmacology* 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., Nusgens, 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.