

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA *IN VITRO* DO
EXTRATO BRUTO E DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE
Baccharis dracunculifolia (Asteraceae)**

DAISY MARIZETH DE CARVALHO LEAL

Juiz de Fora
2014

DAISY MARIZETH DE CARVALHO LEAL

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA *IN VITRO* DO
EXTRATO BRUTO E DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE
Baccharis dracunculifolia (Asteraceae)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas – Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho
Coorientador: Prof. Dr. José Otávio do Amaral Corrêa

Juiz de Fora
2014

Avaliação da atividade imunomodulatória *in vitro* do extrato bruto e de metabólitos secundários de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae)

Daisy Marizeth de Carvalho Leal

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho
COORIENTADOR: Prof. Dr. José Otávio do Amaral Corrêa

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 04 / 08 /2014

Prof. Dr. Didier Silveira Castellano Filho

Prof. Dr. José Otávio do Amaral Corrêa

Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.
(Marthin Luther King)

Aos meus pais José Antônio e Maria
José, ao meu irmão Vinícius e ao meu
companheiro Diogo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por ter-me dado força para chegar até aqui.

À minha mãe Maria José, minha encorajadora, que não me deixou cair em nenhum momento, fazendo de si o meu espelho.

Ao meu pai José Antônio, pelo carinho e amor concedido.

Ao meu irmão Vinícius, pelos momentos de alegria e descontração.

Ao meu noivo Diogo, por toda dedicação, companheirismo, paciência e compreensão.

À minha amiga Patrícia, pelo encorajamento e amparo.

Aos amigos do Núcleo de Identificação e Pesquisa em Princípios Ativos Naturais (NIPPAN), em especial a Clarissa, ao Paulo Henrique, a Lara, a Luísa e ao Matheus, que estiveram sempre prontos para me ajudar.

À minha eterna IC e amiga de trabalho Débora Dias, por todas as horas de bancada juntas, sempre disposta e bem humorada!!!

À Vanessa Temponi, pelo apoio nos ensaios biológicos e amizade em todas as horas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ademar, pelos ensinamentos, pelas palavras de incentivo, por ter-me recebido como uma filha!

Ao meu coorientador, Prof. Dr. José Otávio, por ter-me ajudado nos ensaios biológicos, pela paciência, disponibilidade e perseverança, quando tudo parecia estar perdido.

Ao Departamento de Química da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), pelo uso do aparelho de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

Ao Fábio Balbino, pela ajuda com os espectros de RMN.

A minha turma do Mestrado em Ciências Farmacêuticas, pela amizade.

Aos professores do Mestrado em Ciências Farmacêuticas, pelos ensinamentos passados.

À Faculdade de Farmácia da UFJF, em especial ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelos recursos fornecidos para a execução deste projeto.

Aos amigos do Hospital Monte Sinai, que sempre me apoiaram nesta jornada.

Ao Dr. Marcelo Maroco, pelo apoio prestado.

À Leila, pela serenidade e tranquilidade nos momentos finais.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para que esta etapa pudesse ser conquistada.

LEAL, D.M.C. Avaliação da atividade imunomodulatória *in vitro* do extrato bruto e de metabólitos secundários de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). 2014. 99p. Dissertação. (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais.

RESUMO

As plantas são utilizadas há mais de 60.000 anos pelos seres humanos através da medicina popular. *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) é uma espécie nativa do Brasil conhecida por ser a principal fonte botânica da própolis verde. A própolis verde é conhecida por suas propriedades antimicrobiana, anti-inflamatória e imunomodulatória. Devido à escassez de estudos sobre a ação da *Baccharis dracunculifolia*, no sistema imune, o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar os efeitos do extrato bruto e frações da *B. dracunculifolia* bem como de metabólitos secundários sobre a produção de mediadores inflamatórios em sobrenadante de culturas celulares de esplenócitos de camundongos C57BL/6. Buscou-se produzir o extrato bruto e frações das partes aéreas da mesma e realizar o isolamento, a purificação e a identificação dos metabólitos secundários majoritários presentes nas partes aéreas da *B. dracunculifolia*. Após isto, avaliar os efeitos do extrato bruto das frações orgânicas e dos metabólitos secundários obtidos dessa espécie vegetal sobre os níveis das citocinas IL-17, IL-4, TNF- α , IFN- γ (por ELISA) e óxido nítrico (NO) (método de Griess) em esplenócitos de camundongos C57BL/6. O isolamento dos metabólitos foi realizado por meio de técnicas cromatográficas, os quais foram identificados pela espectroscopia de RMN de ^1H . Nas análises dos espectros, tomou-se como base a comparação com dados da literatura o que permitiu identificar a estrutura do ácido (*E*)-4-(2,3-diidrocinamoiloxi) cinâmico, da ermanina e do beturetol. Nos ensaios para a avaliação *in vitro* da atividade imunomodulatória, concluiu-se que o NO sofreu inibição tanto do extrato bruto quanto da fração clorofórmica nas duas maiores concentrações testadas (100 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$). Já a fração hexânica e a aquosa inibiram somente na maior concentração testada (100 $\mu\text{g/mL}$). Os metabólitos isolados foram capazes de inibir a produção de NO também na concentração de (100 $\mu\text{g/ml}$). Os resultados obtidos na avaliação das citocinas IL-4, IL17, INF- γ e TNF- α mostraram que o extrato bruto foi capaz de inibir a produção de IL-4, IL-17 e TNF- α nas três concentrações

testadas (100 µg/mL; 50 µg/mL; 25 µg/mL) e IFN- γ nas duas maiores concentrações (100 µg/mL; 50 µg/mL). A fração clorofórmica inibiu a produção de IL-4, IFN- γ e TNF- α nas três concentrações testadas (100 µg/mL; 50 µg/mL; 25 µg/mL) e IL-17 somente na maior concentração (100 µg/mL). A fração hexânica foi capaz de inibir todas as citocinas apenas na maior concentração (100 µg/mL). Já a fração aquosa inibiu apenas IL-17 na maior concentração (100 µg/mL). A substância (*E*)-4-(2,3-diidrocinaoiloxi) cinâmico mostrou-se ativa nas duas maiores concentrações (100 µg/mL; 50 µg/mL) frente à IL-4, IFN- γ e TNF- α . Já a substância beturetol inibiu a produção de IL-4 e IL-17 (100 µg/mL; 50 µg/mL) e IFN- γ e TNF- α (100 µg/mL). A substância ermanina inibiu a produção de IL-4 e IFN- γ apenas na maior concentração testada (100 µg/mL). A fração clorofórmica se mostrou a mais ativa das frações testadas. Conclui-se que o estudo comprovou o efeito imunomodulatório da espécie frente aos mediadores inflamatórios analisados e novos estudos devem ser realizados para elucidar o potencial imunomodulatório da *Baccharis dracunculifolia*.

Palavras-chave: *Baccharis dracunculifolia*; Própolis verde; Atividade imunomodulatória; Citocinas

,

LEAL, D.M.C. Evaluation of the *in vitro* immunomodulatory activity of crude extracts and secondary metabolites *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). 2014. 99p. Dissertation. (Master's degree). Graduate Program in Pharmaceutical Sciences. Faculty of Pharmacy, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais.

ABSTRACT

Plants are used for over 60,000 years by humans through folk medicine. *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) is a native species from Brazil that is being considered as the main botanical source of green propolis, known for its antimicrobial, anti-inflammatory and immunomodulatory properties. Due to the scarcity of studies on the action of *Baccharis dracunculifolia* in the immune system, the present work had as main objective to evaluate the effects of the crude extract and fractions of *B. dracunculifolia* and their secondary metabolites on the production of inflammatory mediators in supernatant of cell cultures of mice C57BL/6 splenocytes. Also sought to give the crude extract and fractions of its aerial parts, to perform the isolation, purification and identification of the major secondary metabolites present in *B. dracunculifolia* aerial parts and to evaluate the effects of the crude extract, organic fractions and secondary metabolites obtained from this plant species on the levels of IL-17, IL-4, TNF- α , IFN- γ cytokines (for ELISA) and nitric oxide (NO) (Griess method) in mice C57BL/6 splenocytes. The metabolites isolation was performed by chromatographic techniques which were identified by ^1H NMR spectroscopy. In the spectra analysis, it was considering as a basis the data literature comparison, which allowed us to identify the structure of the acid (*E*)-4-(2,3- dihydrocinamoiloxi) cinnamic, ermanina and beturetol. In tests for evaluating *in vitro* of immunomodulatory activity, it was concluded that NO has suffered inhibition of both the crude extract and the chloroform fraction in the two highest concentrations tested (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). By another, the hexane and the aqueous fractions were inhibited only at the highest concentration tested (100 mg / mL). The isolated metabolites were also able to inhibit NO production in concentration (100 mg / ml). The results of IL-4, IL17, INF- γ e TNF- α cytokines evaluation have showed that crude extract was able to inhibit the IL-4, IL-17 and TNF- α production in all of three concentrations that were tested (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and IFN- γ in the two highest tested concentrations (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The chloroform fraction has inhibited IL-4, IFN- γ e TNF- α production in three concentrations tested (100

µg/mL; 50 µg/mL; 25 µg/mL) and IL-17 only at the highest concentration (100 µg/mL). The hexane fraction was able to inhibit all cytokines only at the highest concentration (100 mg / mL). Since the aqueous fraction has inhibited only IL-17 at the highest concentration (100 mg / mL). The (E) -4 - (2,3-diidrocinaoiloxi) cinnamic substance has proved to be active at the two highest concentrations in the presence of IL-4, IFN-γ and TNF-α. Now, the beturetol substance has inhibited IL-4 and IL-17 (100 mg / mL, 50 mg / ml) and IFN-γ and TNF-α (100 g / ml) production. The ermanina substance has inhibited IL-4 and IFN-γ production only at the highest concentration tested (100 mg / mL). The chloroform fraction has showed to be the most active of the tested ones. It was concluded that the study demonstrated the immunomodulatory effect of the specie analyzed against inflammatory mediators and further studies should be conducted to elucidate *Baccharis dracunculifolia* immunomodulatory potential.

Key-words: *Baccharis dracunculifolia*; Green própolis; Immunomodulatory activity
Cytokine

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1 | Estruturas químicas da Luteolina (1) e da Curcumina (2)..... | 22 |
| Figura 2 | (a) <i>Apis mellifera</i> coletando ápices foliares de <i>Baccharis dracunculifolia</i> e guardando o material coletado dentro de suas corbículas, nas patas, onde será transportado para a colmeia e misturado (b) com a secreção salivar para a formação (c) da própolis verde..... | 27 |
| Figura 3 | Partição líquido-líquido do extrato hidroalcoólico de <i>B. dracunculifolia</i> | 47 |
| Figura 4 | Diagrama geral do procedimento de partição líquido/líquido do extrato hidroalcoólico bruto das partes aéreas de <i>B. dracunculifolia</i> | 48 |
| Figura 5 | Fluxograma do isolamento dos metabólitos majoritários da fração clorofórmica das partes aéreas de <i>B. dracunculifolia</i> (BD-Fc)..... | 53 |
| Figura 6 | Espectro de RMN de ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) do composto BD-Fc-E2..... | 59 |
| Figura 7 | Espectro de RMN de ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) do composto BD-Fc-E2 (expansão)..... | 60 |
| Figura 8 | Espectro de RMN de ¹ H (MeOD, 500 MHz) do composto BD-Fc-F6..... | 61 |
| Figura 9 | Espectro de RMN de ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) do composto BDFc5.2..... | 62 |
| Figura 10 | Produção de óxido nítrico em cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 estimulados com LPS. As células foram incubadas com extratos de <i>B. dracunculifolia</i> nas concentrações de 100µg/mL, 50µg/mL e 25µg/mL. Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 6 [®] , expressos como média ± SEM, e foram considerados resultados significativos com <i>P</i> < 0,05..... | 65 |
| Figura 11 | Produção de óxido nítrico em cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 estimulados com LPS. As células foram incubadas com as frações de <i>B. dracunculifolia</i> nas concentrações de 100µg/mL, 50µg/mL e 25µg/mL. Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 6 [®] , expressos como média ± SEM, e foram considerados resultados significativos com <i>P</i> < 0,05..... | 66 |

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 12 | <p>Produção de óxido nítrico em cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 estimulados com LPS. As células foram incubadas com as substâncias isoladas de <i>B. dracunculifolia</i> nas concentrações de 100µg/mL, 50µg/mL e 10µg/mL. Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 6[®], expressos como média ± SEM, e foram considerados resultados significativos com $P < 0,05$.....</p> | 67 |
| Figura 13 | <p>Produção de IL-4 em cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 estimulados com LPS. As células foram incubadas com extratos de <i>B. dracunculifolia</i> nas concentrações de 100µg/mL, 50µg/mL e 25µg/mL. Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 6[®], expressos como média ± SEM, e foram considerados resultados significativos com $P < 0,05$.....</p> | 68 |
| Figura 14 | <p>Produção de IL-4 em cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 estimulados com LPS. As células foram incubadas com as frações de <i>B. dracunculifolia</i> nas concentrações de 100µg/mL, 50µg/mL e 25µg/mL. Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 6[®], expressos como média ± SEM, e foram considerados resultados significativos com $P < 0,05$.....</p> | 69 |
| Figura 15 | <p>Produção de IL-4 em cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 estimulados com LPS. As células foram incubadas com as substâncias isoladas de <i>B. dracunculifolia</i> nas concentrações de 100µg/mL, 50µg/mL e 10µg/mL. Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 6[®], expressos como média ± SEM, e foram considerados resultados significativos com $P < 0,05$.....</p> | 70 |
| Figura 16 | <p>Produção de IL-17 em cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 estimulados com LPS. As células foram incubadas com extratos de <i>B. dracunculifolia</i> nas concentrações de 100µg/mL, 50µg/mL e 25µg/mL. Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 6[®], expressos como média ± SEM, e foram considerados resultados significativos com $P < 0,05$.....</p> | 71 |
| Figura 17 | <p>Produção de IL-17 em cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 estimulados com LPS. As células foram incubadas com as frações de <i>B. dracunculifolia</i> nas concentrações de 100µg/mL, 50µg/mL e 25µg/mL. Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 6[®], expressos como média ± SEM, e foram considerados resultados significativos com $P < 0,05$.....</p> | 72 |

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 18 | <p>Produção de IL-17 em cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 estimulados com LPS. As células foram incubadas com as substâncias isoladas de <i>B. dracunculifolia</i> nas concentrações de 100µg/mL, 50µg/mL e 10µg/mL. Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 6[®], expressos como média ± SEM, e foram considerados resultados significativos com $P < 0,05$.....</p> | 73 |
| Figura 19 | <p>Produção de IFN-γ em cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 estimulados com LPS. As células foram incubadas com extratos de <i>B. dracunculifolia</i> nas concentrações de 100µg/mL, 50µg/mL e 25µg/mL. Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 6[®], expressos como média ± SEM, e foram considerados resultados significativos com $P < 0,05$.....</p> | 74 |
| Figura 20 | <p>Produção de IFN-γ em cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 estimulados com LPS. As células foram incubadas com as frações de <i>B. dracunculifolia</i> nas concentrações de 100µg/mL, 50µg/mL e 25µg/mL. Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 6[®], expressos como média ± SEM, e foram considerados resultados significativos com $P < 0,05$.....</p> | 75 |
| Figura 21 | <p>Produção de IFN-γ em cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 estimulados com LPS. As células foram incubadas com as substâncias isoladas de <i>B. dracunculifolia</i> nas concentrações de 100µg/mL, 50µg/mL e 10µg/mL. Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 6[®], expressos como média ± SEM, e foram considerados resultados significativos com $P < 0,05$.....</p> | 76 |
| Figura 22 | <p>Produção de TNF-α em cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 estimulados com LPS. As células foram incubadas com extratos de <i>B. dracunculifolia</i> nas concentrações de 100µg/mL, 50µg/mL e 25µg/mL. Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 6[®], expressos como média ± SEM, e foram considerados resultados significativos com $P < 0,05$.....</p> | 77 |
| Figura 23 | <p>Produção de TNF-α em cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 estimulados com LPS. As células foram incubadas com as frações de <i>B. dracunculifolia</i> nas concentrações de 100µg/mL, 50µg/mL e 25µg/mL. Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 6[®], expressos como média ± SEM, e foram considerados resultados significativos com $P < 0,05$.....</p> | 78 |

Figura 24

Produção de TNF- α em cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 estimulados com LPS. As células foram incubadas com as substâncias isoladas de *B. dracunculifolia* nas concentrações de 100 μ g/mL, 50 μ g/mL e 10 μ g/mL. Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 6[®], expressos como média \pm SEM, e foram considerados resultados significativos com $P < 0,05$

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | Metabólitos secundários isolados de <i>B. dracunculifolia</i> | 29 |
| Tabela 2 | Frações obtidas por CLV da fração BD-Fc | 49 |
| Tabela 3 | Frações obtidas por CC da fração BD-Fc-E..... | 50 |
| Tabela 4 | Frações obtidas por CC da fração BD-Fc-F..... | 51 |
| Tabela 5 | Subfrações obtidas por meio de coluna <i>flash</i> da fração BD-Fc-F5..... | 52 |
| Tabela 6 | Dados do espectro de RMN de ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) dos compostos 1-3 | 63 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------|---|
| ABTS | substrato líquido |
| AcOEt | acetato de etila |
| APCs | células apresentadoras de antígenos |
| Ar | aromático |
| BD | <i>Baccharis dracunculifolia</i> |
| BD-Fa | fração aquosa do extrato bruto de <i>B. dracunculifolia</i> |
| BD-Fc | fração clorofórmica do extrato bruto de <i>B. dracunculifolia</i> |
| BDFc5.2 | 5,7-diidroxi-3,4'-di-metoxiflavona / ermanina |
| BDFcE2 | ácido (E)-4-(2,3-diidrocinamoiloxi) cinâmico |
| BDFcF6 | 3, 5, 7-triidroxi-6, 4'-dimetoxi flavona / beturetol |
| BD-Fh | fração hexânica do extrato bruto de <i>B. dracunculifolia</i> |
| °C | graus Celsius |
| CBR | Centro de Biologia da Reprodução |
| CC | cromatografia em coluna |
| CCD | cromatografia em camada delgada |
| CDCl ₃ | clorofórmio deuterado |
| CESJ | Herbário Leopoldo Krieger |
| CHCl ₃ | clorofórmio |
| CLV | cromatografia líquida a vácuo |
| cm | centímetro |
| CNPq | Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico |
| CO ₂ | dióxido de carbono |
| d | duplete |
| ELISA | ensaio imunoenzimático |
| EtOH | etanol |
| FA | fração aquosa |
| FAPEMIG | Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais |

| | |
|--------------------------------|--|
| FC | fração clorofórmica |
| FH | fração hexânica |
| FoxP3 | fator de transcrição envolvido em respostas imunitárias adquiridas |
| g | grama |
| GATA | fator de transcrição |
| H | hidrogênio |
| H ₂ O | água |
| H ₂ O ₂ | peróxido de hidrogênio |
| H ₃ PO ₄ | ácido fosfórico |
| Hex | hexano |
| (HiF)-1 | fator indutor de hipóxia |
| Hz | hertz |
| ICB | Instituto de Ciências Biológicas |
| IFN- γ | interferon gama |
| IL | interleucina |
| INOS | óxido nítrico sintase induzível |
| <i>J</i> | constante de acoplamento |
| Kg | kilograma |
| LPS | lipopolissacarídeo |
| m | multipleto |
| MeOD | metanol deuterado |
| MeOH | metanol |
| mg | miligrama |
| MHz | megahertz |
| min | minuto |
| ml | mililitro |
| NF- κ B | fator nuclear <i>kappa</i> B |
| NIPPAN | Núcleo de Investigação e Pesquisa de Produtos Naturais e Ativos Naturais |
| NK | <i>natural killer</i> |
| nm | nanômetro |

| | |
|-----------------------|---|
| NO | óxido nítrico |
| NOS | óxido nítrico sintetases |
| P.A | pró-análise |
| PBS | salina tamponada com fosfato |
| PBS-T | salina tamponada com fosfato e tween 20 |
| PMA | éster de forbol |
| ppm | parte por milhão |
| RMN de ¹ H | ressonância magnética nuclear de hidrogênio |
| ROR _γ t | fator de transcrição envolvido em resposta imunitária adquirida |
| rpm | rotação por minuto |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |
| s | simpleto |
| SEM | desvio-padrão em relação à média |
| SFB | soro fetal bovino |
| STAT | gene transdutor de sinal e ativador da transcrição |
| t | tripleto |
| T-bet | fator de transcrição |
| TGF-β | fator estimulante de colônia de granulócitos beta (<i>transforming growth factor</i>) |
| TMS | tetrametilsilano |
| TNF-α | fator de necrose tumoral alfa |
| T _{REG} | células T reguladoras |
| U/ml | unidades/mililitro |
| UFJF | Universidade Federal de Juiz de Fora |
| v/v | volume por volume |
| δ | deslocamento químico |
| μg/mL | micrograma por mililitro |
| μm | micrômetro |
| μM | micromolar |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 19 |
| 1.1 | A PRÓPOLIS VERDE..... | 23 |
| 1.2 | A FAMÍLIA ASTERACEAE, O GÊNERO <i>Baccharis</i> E A ESPÉCIE <i>B. dracunculifolia</i> | 25 |
| 1.3 | RESPOSTA IMUNOLÓGICA..... | 35 |
| 1.3.1 | Subpopulações de linfócitos T e a imunidade específica..... | 38 |
| 2 | OBJETIVOS | 42 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 43 |
| 3.1 | EQUIPAMENTOS E MATERIAIS UTILIZADOS PARA OBTENÇÃO DO EXTRATO..... | 43 |
| 3.1.1 | Instrumentação materiais cromatográficos..... | 43 |
| 3.2 | COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL..... | 45 |
| 3.3 | OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO BRUTO DAS FOLHAS DE <i>B. dracunculifolia</i> | 45 |
| 3.4 | FRACIONAMENTO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO BRUTO UTILIZANDO PROCESSOS DE PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO... ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS <i>B.</i> <i>dracunculifolia</i> | 46 |
| 3.5 | <i>dracunculifolia</i> | 49 |
| 3.5.1 | Estudo da BD-Fc..... | 49 |
| 3.5.1.1 | Fração BD-Fc-E..... | 49 |
| 3.5.1.2 | Fração BD-Fc-F..... | 50 |
| 3.5.1.3 | Fração BD-Fc-F5..... | 51 |
| 3.6 | ENSAIOS PARA A AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA..... | 54 |
| 3.6.1 | Animais para experimentação..... | 54 |
| 3.6.2 | Grupos experimentais..... | 54 |
| 3.6.3 | Obtenção dos esplenócitos..... | 55 |
| 3.6.4 | Utilização dos sobrenadantes de cultura de esplenócitos..... | 56 |
| 3.6.5 | Produção de óxido nítrico (nitrito)..... | 56 |
| 3.6.6 | Dosagem de citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-17) por ELISA..... | 56 |

| | | |
|---------|---|----|
| 3.7 | ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 57 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 58 |
| | IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS | |
| 4.1 | ISOLADAS..... | 58 |
| 4.1.1 | Substância BD-Fc-E2..... | 58 |
| 4.1.2 | Substância BD-Fc-F6..... | 60 |
| 4.1.3 | Substância BD-Fc-5.2..... | 62 |
| | ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA <i>IN VITRO</i> DO EXTRATO, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE <i>B.</i> <i>dracunculifolia</i> | 64 |
| 4.2.1 | Produção de óxido nítrico (NO)..... | 64 |
| 4.2.2 | Produção de citocinas..... | 67 |
| 4.2.2.1 | Interleucina 4 (IL – 4)..... | 67 |
| 4.2.2.2 | Interleucina 17 (IL – 17)..... | 70 |
| 4.2.2.3 | Interferon-gama (IFN- γ)..... | 73 |
| 4.2.2.4 | Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)..... | 76 |
| 5 | CONCLUSÃO | 83 |
| | REFERÊNCIAS | 84 |

1 INTRODUÇÃO

A humanidade herdou de seus ancestrais costumes da utilização de plantas, tanto para uso alimentar como medicinal. O homem, em busca de sua sobrevivência, usou os recursos naturais, manipulando-os e modificando-os para seu próprio benefício. Diante da gigantesca variedade de organismos vivos no planeta, neste caso, o reino vegetal, distribuídos em espaços geográficos diversos, pode-se obter produtos economicamente importantes e significativos para o desenvolvimento de novos fármacos a serem utilizados no tratamento de diversas patologias que acometem os seres humanos, destacando-se, entre eles, os fitoterápicos e os fitofármacos (MONTANARI, BOLZANI, 2001; GUERRA, NODARI, 2010).

Essas plantas, que há mais de 60.000 anos são utilizadas pelos seres humanos através da medicina popular, são empregadas sem conhecimento científico de suas propriedades biológicas e terapêuticas, e necessitam de comprovações científicas de suas propriedades químicas, biológicas e genotóxicas (RESENDE et al., 2012).

Devido a esse fato, no século XX, observou-se um grande avanço na pesquisa de produtos naturais, sobretudo no campo das plantas e microorganismos no que diz respeito a produtos oncológicos, havendo a descoberta de diversas substâncias que hoje são utilizadas na terapêutica antineoplásica. Assim, 60% dos fármacos utilizados na terapia do câncer, atualmente, tiveram sua origem nos produtos naturais, dentre eles, podemos citar a Vimblastina e a Vincristina (COSTA-LOTUFO et al., 2010)

Um marco importante foi o isolamento da morfina, por Friedrich Wilhelm Adam, um alcaloide natural extraído da *Papaver somniferum* (Papaveraceae), com atividade analgésica importante. Outro exemplo clássico foi o ácido acetilsalicílico, que foi produzido sinteticamente, a partir da salicina, um protótipo molecular ativo de origem vegetal, sendo esta isolada e obtida a partir das cascas do salgueiro (*Salix sp*) (PUPO, GALLO, 2007; BARREIRO, 2009; COSTA, 2009).

O Brasil tem a maior biodiversidade genética de plantas no mundo, com mais de 55.000 espécies catalogadas. Essas são largamente aproveitadas em tratamentos diversos, conforme as tradições populares de nativos, e são

uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos e meio de obtenção da síntese potencial para muitos fármacos. Dessa forma, as pesquisas etnobotânicas e etnofarmacológicas ganham destaque em todo mundo e buscam seleção de plantas medicinais e substâncias naturais para uso terapêutico (GUERRA; NODARI, 2010).

A variedade e a complexidade dos metabólitos secundários, biossintetizados pelas plantas, têm atraído grandes investimentos em pesquisas de bioprospecção, objetivando a obtenção de novas entidades químicas farmacologicamente ativas (MONTANARI; BOLZANI, 2001; BARREIRO, 2002; MEDEIROS et al., 2007). A procura por produtos naturais bioativos tem como objetivo central a descoberta de novas substâncias que podem servir de modelos (protótipos) para o desenvolvimento de novos fármacos (MONTANARI; BOLZANI, 2001). Ao considerar a possibilidade de se obter novos fármacos, devem-se distinguir os produtos naturais dos sintéticos, pois eles se diferenciam quanto à diversidade molecular e função biológica, uma vez que essa diversidade molecular é muito maior nos produtos naturais do que nos produtos derivados de processos de síntese (GUERRA; NODARI, 2010).

A partir da descoberta dessas moléculas naturais “modelo”, pode-se avaliar também o potencial farmacológico de seus análogos estruturais, o que permite, em muitos casos, selecionar compostos correlatos ainda mais promissores (BARREIRO, 2002; VUORELA et al., 2004).

Além disso, a investigação farmacológica de princípios ativos de plantas medicinais tem proporcionado importantes avanços na abordagem terapêutica de várias patologias, e diversas substâncias encontradas em plantas têm sido utilizadas como ferramentas úteis em estudos farmacológicos, fisiológicos e bioquímicos (RATES, 2001). Por outro lado, atualmente, há uma tendência multidisciplinar nas pesquisas envolvendo o descobrimento de novos protótipos naturais, associando metodologias de isolamento e purificação de constituintes (fitoquímica) à realização de ensaios farmacológicos e/ou toxicológicos com as moléculas obtidas (BARREIRO, 2002; VUORELA et al., 2004).

Desse modo, há necessidade de se incrementar as pesquisas com plantas medicinais e seus compostos ativos, envolvendo maior associação

entre a química e a farmacologia, tendo em vista a possibilidade de se descobrir substâncias químicas farmacologicamente ativas que possam ser úteis para o desenvolvimento de novos fármacos. Nos últimos anos, houve um crescente interesse por parte dos pesquisadores quanto à descoberta de produtos naturais com ação moduladora sobre o sistema imunológico.

A necessidade de pesquisa de novos agentes imunofarmacológicos para o tratamento de diversos tipos de doenças leva ao interesse de explorar um grande número de espécies de plantas e seus metabólitos secundários (COLARES et al., 2013). Assim, sabe-se que as raízes de Ginseng (*Panax ginseng*) mostram grande potencial como fonte de micromoléculas imunomoduladoras. Sua atividade imunoestimulante tem sido atribuída a polissacarídeos, enquanto sua atividade imunossupressora (via inibição da liberação de citocinas de macrófagos ativados) está relacionada com a presença de ginsenosídeos desse vegetal (GERTSH, 2011; HADDAD et al., 2005). Dutra et al. (2012) também avaliaram o potencial imunomodulador do Euphol, um triterpeno tetracíclico encontrado na Aveloz (*Euphorbia tirucalli*), a qual é popularmente utilizada como anti-inflamatória.

Considerando a importância do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no sistema imune e em terapias de doenças inflamatórias, muitas micromoléculas de origem vegetal são capazes de inibir ou reduzir os níveis dessa citocina. Além disso, muitas dessas micromoléculas podem ser capazes de interferir com vários outros mediadores pró-inflamatórios e moléculas de sinalização, como o gene fator nuclear *Kappa B* (NF-kB), as quais também estão envolvidas na expressão de TNF- α . Dessa forma, algumas micromoléculas e metabólitos secundários podem ter efeito na regulação dos níveis ou na atividade de TNF- α , podendo ser uma alternativa para o desenvolvimento de novos fármacos inibidores de TNF- α para o tratamento de doenças inflamatórias relacionadas, como esclerose múltipla e artrite reumatoide (GERTSH, 2011; HADDAD et al., 2005; PAUL et al., 2006; COUTINHO et al., 2009).

A literatura tem relatado que alguns flavonoides, como a luteolina, são potentes inibidores da produção de TNF- α estimulada por lipopolissacarídeo (LPS). A curcumina, encontrada nas raízes do açafrão (*Curcuma longa*), é um diarilheptanoide capaz de inibir a produção de TNF- α em macrófagos

estimulados por LPS (as estruturas das substâncias citadas acima estão representadas na Figura 1). Além disso, outros compostos naturais, como terpenos e lignanas, mostraram ser capazes de diminuir os níveis ou inibir a atividade de TNF- α (HADDAD et al., 2005; PAUL et al., 2006).

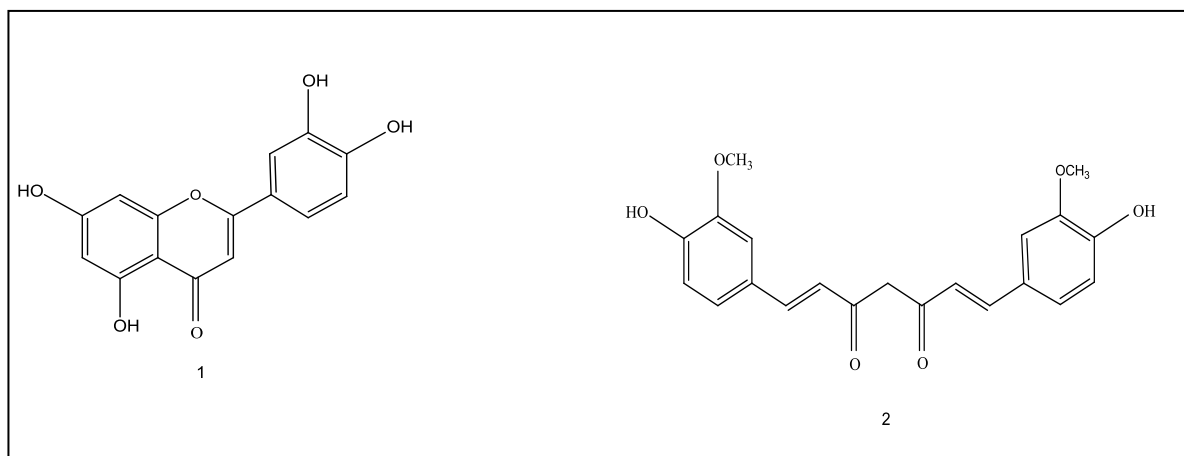


Figura 1: Estruturas químicas da Luteolina (1) e da Curcumina (2).
Fonte: A autora (2013).

Outros estudos *in vitro* com flavonoides mostraram que esses podem inibir e, também, induzir uma grande variedade de sistemas enzimáticos de mamíferos. Algumas enzimas estão envolvidas em importantes vias que regulam divisão e proliferação celular, bem como respostas inflamatória e imune (MIDDLETON JR.; KANDASWAMI, 2000). Os efeitos dos flavonoides no sistema imune são considerados complexos e não parecem claros. Em baixas concentrações, eles podem agir como imunoestimulantes nos indivíduos imunodeficientes; em altas concentrações, todavia, podem inibir a função dos linfócitos (BOIK, 1996). A atividade imunomoduladora dos flavonoides varia com sua capacidade de inibir a formação de eicosanoides e histaminas (DI CARLO et al., 1999).

Portanto, considerando o potencial da flora medicinal e dos flavonoides, novos fármacos poderiam ser desenvolvidos a partir da descoberta de protótipos de origem natural, representando, assim, uma alternativa para o tratamento de várias doenças inflamatórias, via modulação do sistema imune e da produção ou atividade de TNF- α .

Dentre as amostras naturais com grande potencial sobre o sistema imune, destacam-se o alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) e a própolis verde.

. A propriedade imunomoduladora da própolis verde brasileira tem sido amplamente investigada (SFORCIN, 2007), porém, ainda é escasso o conhecimento sobre a ação de sua principal fonte vegetal, a *Baccharis dracunculifolia*, no sistema imune (DA SILVA FILHO et al., 2012).

1.1 A PRÓPOLIS VERDE

Própolis é um termo de origem grega que significa “em defesa da cidade” (do grego *pro* = em defesa e *pólis* = cidade / colmeia). É formada por material resinoso de composição química complexa, sendo coletada pelas abelhas de brotos, exsudatos de árvores e de outras partes do tecido vegetal, sendo modificada na colmeia por adição de secreções salivares. A própolis é utilizada pelas abelhas para construção, manutenção, proteção, reparo de frestas e danos na colmeia, bem como para controle de temperatura, principalmente, no inverno, na construção de locais assépticos, protegendo-o contra bactérias e vírus, para postura da abelha rainha e na mumificação dos insetos invasores (MARCUCCI, 1996; SALATINO et al., 2005; SFORCIN et al., 2012). É formada por um complexo de substâncias, abrangendo, em sua composição química *in natura*, 55% de resinas e bálsamos, 30% de cera, 10% de óleos voláteis e 5% de pólen (THOMSON, 1990; MELLO, 2012).

Como a mais importante arma química das abelhas contra microorganismos patogênicos, a própolis tem sido usada pela humanidade desde a Antiguidade e ainda é um das preparações mais comuns usadas popularmente para o tratamento de diversas doenças (BANKOVA et al., 2000).

De modo geral, a própolis tem sido utilizada na medicina popular mundialmente, devido a seu amplo espectro de atividades biológicas, tais como: antimicrobiana (MARCUCCI, 1996; FERNADES-SILVA et al., 2013), anti-inflamatória (REIS et al., 2000; FERNADES-SILVA et al., 2013), antitumoral (BANKOVA et al., 2000; FERNADES-SILVA et al., 2013) e antioxidante (SIMÕES et al., 2004; FERNADES-SILVA et al., 2013), no tratamento de feridas e queimaduras, no tratamento de úlceras estomacais,

desde os primórdios, como, por exemplo, pelos egípcios para embalsamar cadáveres, e, atualmente, pela indústria farmacêutica e de cosméticos (BANKOVA, 2005b; CASTALDO; CAPASSO, 2002). No Brasil, seu uso já é bem difundido, sendo utilizada para tratamento de distúrbios gástricos, febre, doenças inflamatórias, anticancerígeno, antimicrobiano, para tratamento de tuberculose, bem como agente anestésico (SALATINO et al., 2005; SFORCIN et al., 2012).

Considerando que grande parte das atividades farmacológicas observadas para a própolis estão relacionadas a sua capacidade de modular a resposta imune, vários trabalhos foram e continuam sendo realizados, evidenciando a ação da própolis na resposta imune e também na inflamação (ORSI et al., 2000, 2005; MURAD et al., 2002). Trabalhos realizados evidenciaram que macrófagos peritoneais de camundongos estimulados com a própolis apresentaram aumento na atividade fungicida contra *Paracoccidioides brasiliensis* (MURAD et al., 2002) e na atividade bactericida contra *Salmonella typhimurium* (ORSI et al., 2005). Foi evidenciado, também, que a própolis induz elevação na geração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por macrófagos e inibição de óxido nítrico por essas células (ORSI et al., 2000). Por essa razão, a própolis tem sido objeto de intensas investigações químicas e farmacológicas nos últimos 30 anos, despertando a atenção de pesquisadores interessados em elucidar, cientificamente, suas propriedades (BANSKOTA et al., 2001).

Entretanto, na última década, o paradigma a respeito da química da própolis mudou radicalmente, evidenciando que a sua constituição química é extremamente variável. Para entender quais as causas dessas diferenças na composição química da própolis, é preciso ter em mente a sua origem botânica. Assim, a composição química da própolis depende da flora do local de coleta e, portanto, das características geográficas e climáticas da região. Além disso, as características genéticas das abelhas podem influenciar, significativamente, no modo e no hábito da coleta das resinas nos vegetais, tendo importância crucial no preparo e na constituição química da própolis. Esses fatos resultam em enorme variabilidade de sua composição química, sobretudo na própolis originária de regiões tropicais (BANKOVA et al., 2000).

Desse modo, apesar da enorme diversidade de atividades biológicas relacionadas para a própolis, devido à variação na sua composição química e

consequente falta de padronização entre as matérias-primas e extratos de própolis obtidos, as reprodutibilidades químicas e farmacológicas dessas amostras ficam comprometidas. Enquanto a própolis europeia é caracterizada quimicamente por flavonoides e ácidos fenólicos, tendo como principais origens botânicas as plantas do gênero *Populus*, a própolis verde brasileira é rica em derivados prenilados do ácido *p*-cumárico principalmente, além de chalconas, ácido benzoico, benzaldeído, compostos fenólicos, ácido cinâmico, ácido cafeico, diterpenos e triterpenos, e tem como principal origem botânica o alecrim-do-campo (*B. dracunculifolia*) (BANKOVA et al., 2000; De CASTRO 2001; SFORCIN et al., 2012). A própolis verde brasileira, encontrada principalmente nos estados de Minas Gerais e São Paulo, difere, quimicamente e de maneira singular, de todas as outras amostras de própolis do mundo. Conhecida, internacionalmente, como *green* própolis, apresenta uma coloração característica devido a elevadas concentrações de clorofila. Nos últimos anos, essa própolis vem sendo extensivamente usada em alimentos e bebidas, sobretudo no Japão, para melhorar a saúde e prevenir certas doenças (BANKOVA et al., 2000; PARK et al., 2002; DA SILVA FILHO, 2006). Recentemente, verificou-se que a própolis brasileira, além de outras amostras de própolis, inibem a produção de TNF- α (IKEDA et al., 2011; KOURISH; ARAFA, 2011).

Apesar dos extensos trabalhos sobre a capacidade imunomodulatória da própolis brasileira e de sua capacidade de inibição de TNF- α , pesquisas relacionando tais atividades com extrato e/ou metabólitos secundários de *B. dracunculifolia*, a principal fonte botânica da própolis verde (ROCHA et al., 2012), ainda não foram realizadas, mostrando que há apenas um trabalho preliminar sobre a atividade de extrato na produção de H₂O₂ (MISSIMA et al., 2007).

1.2 A FAMÍLIA ASTERACEAE, O GÊNERO *Baccharis* E A ESPÉCIE *B. dracunculifolia*

A família Asteraceae, conhecida também pelo nome de Compositae, possui cerca de 1.100 gêneros e 25.000 espécies (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005). Compreende uma grande diversidade de metabólitos

secundários, caracterizada pela presença de terpenoides e flavonoides (MARTINEZ, 2005; DA SILVA FILHO, 2012).

O gênero *Baccharis*, pertencente à família Asteraceae e à tribo *Astereae*, possui cerca de 500 espécies, distribuídas, principalmente, no Brasil, na Argentina, na Colômbia, no Paraguai e no Uruguai. A grande concentração de espécies no Brasil, principalmente no cerrado, indica que essa região é um provável centro de origem do gênero (MARTINEZ-CORREA et al., 2011; BOLDT, 1989; FERRACINI, 1995; BUDEL; DUARTE, 2004; BUDEL; DUARTE; SANTOS, 2005). No Brasil, estão descritas 120 espécies de *Baccharis*, as quais estão localizadas, principalmente, na região Sudeste do país (MARTINEZ-CORREA et al., 2011). Devido a enormes importâncias medicinais, comerciais e ecológicas, várias espécies de *Baccharis* têm atraído à atenção de muitos pesquisadores das áreas de química, farmacologia e biologia (VERDI et al., 2005; BODLT, 1989).

Grande número dessas espécies, principalmente aquelas encontradas nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Santa Catarina e Paraná, são utilizadas na medicina popular para o tratamento de várias doenças do estômago e do fígado, além de anemias, inflamações, diabetes e doenças na próstata, sendo também descritas como remédio para o processo de desintoxicação do organismo (CIFUENTE et al., 2001; VERDI et al., 2005). Assim, por exemplo, no Brasil e na Argentina, *B. crispa* e *B. notoserigila* são usadas para curar feridas e inflamações (VERDI et al., 2005). Outras espécies da medicina popular brasileira são *B. trimera* e *B. genistelloides*, conhecidas como “carqueja”, são utilizadas pela população para o tratamento de doenças hepáticas, circulatórias, úlceras, verminoses e processos inflamatórios (CORRÊA, 1975; NASCIMENTO et al., 2008).

Baccharis dracunculifolia, conhecida vulgarmente como alecrim-do-campo e vassoura, é uma espécie nativa do Brasil, ocorre nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, sobretudo nas áreas de cerrado do estado de Minas Gerais (OLIVEIRA et al., 2012; FERRACINI et al., 1995; ALENCAR et al., 2005; VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005). Considerando seu emprego na medicina popular, essa espécie é utilizada no tratamento de feridas e processos inflamatórios, além de ser usada como febrífuga, tônica e no

tratamento de problemas gástricos (DA SILVA FILHO et al., 2004, 2008; LEMOS et al., 2007; CORRÊA, 1975).

Além do seu papel na medicina popular, é principalmente a sua relação com as abelhas (*Apis mellifera*) que torna a *B. dracunculifolia* o alvo de potenciais investigações fitoquímicas e farmacológicas. Sua estrutura, planta dioica, reproduzida por sementes, com ramos bastante ramificados, nos quais as folhas e os ápices foliares possuem grande quantidade de tricomas glandulares, facilita sua interação com insetos, principalmente com as abelhas (DA SILVA FILHO, 2006). De acordo com a literatura (BASTOS, 2001; KUMAZAWA et al., 2003), as abelhas (*Apis mellifera*) cortam os ápices foliares de *B. dracunculifolia* e, com o auxílio de suas patas, vão formando “bolotas verdes”, repletas de fragmentos epidérmicos e tricomas glandulares, as quais são carregadas para a colmeia e utilizadas na elaboração da própolis, denominada “verde” (Figura 2). Segundo Bastos (2001), quanto maior o número de fragmentos de *B. dracunculifolia* presentes na própolis, mais intensa é a sua coloração verde.

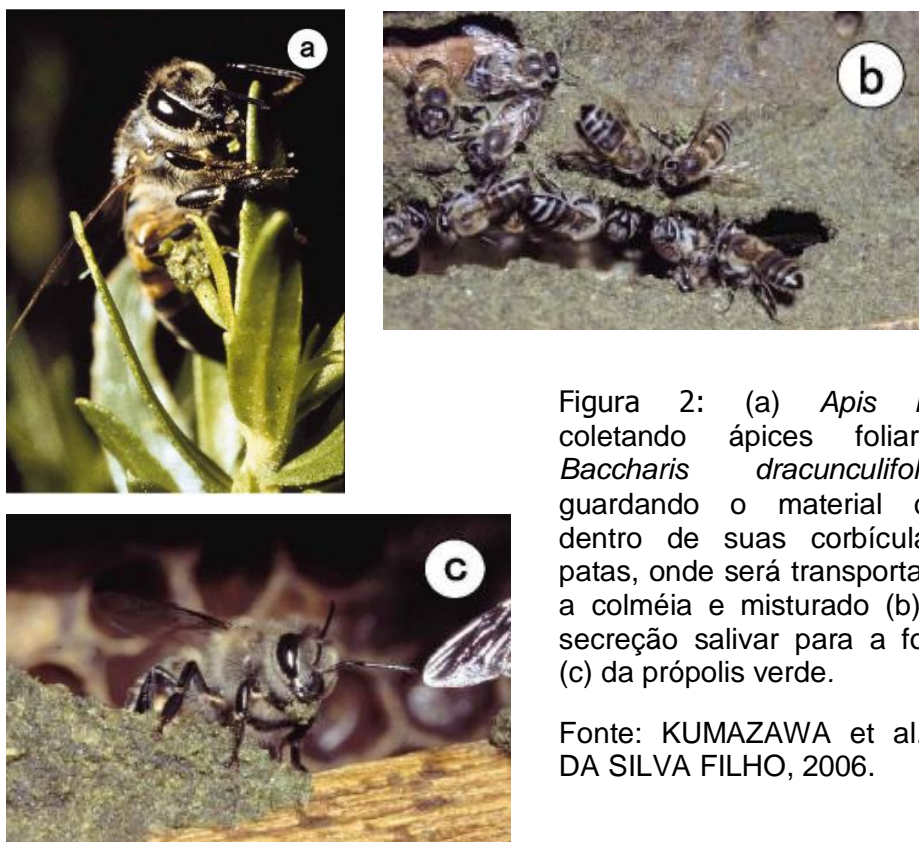
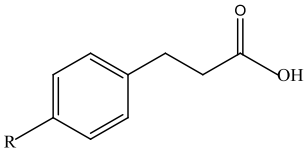
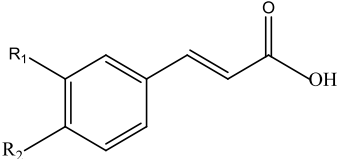
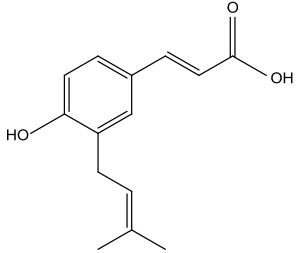
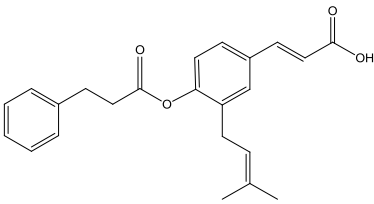
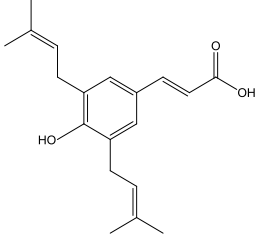


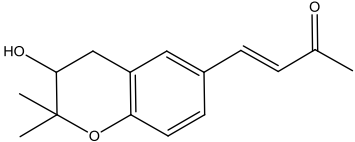
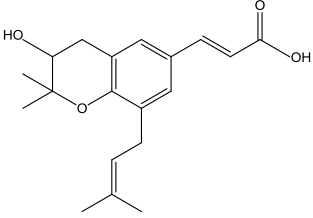
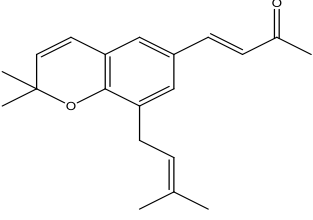
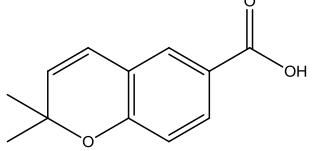
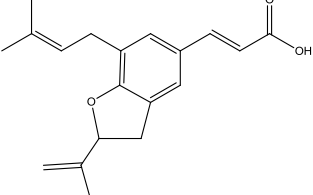
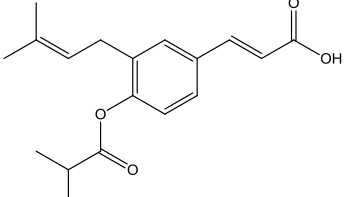
Figura 2: (a) *Apis mellifera* coletando ápices foliares de *Baccharis dracunculifolia* e guardando o material coletado dentro de suas corbículas, nas patas, onde será transportado para a colméia e misturado (b) com a secreção salivar para a formação (c) da própolis verde.

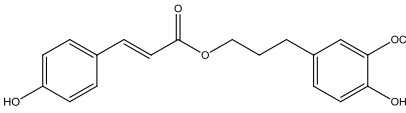
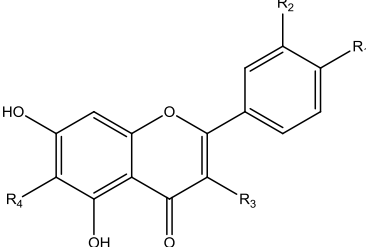
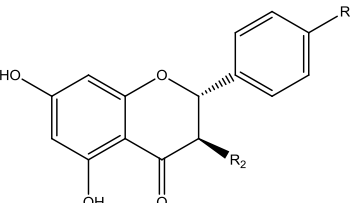
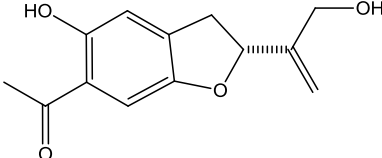
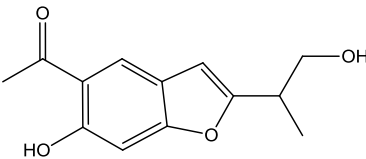
Fonte: KUMAZAWA et al., 2003; DA SILVA FILHO, 2006.

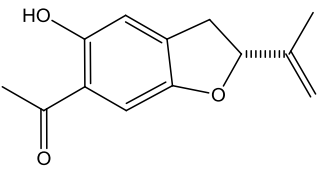
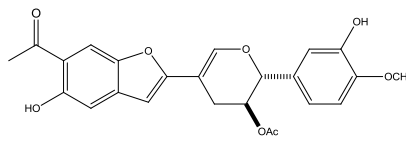
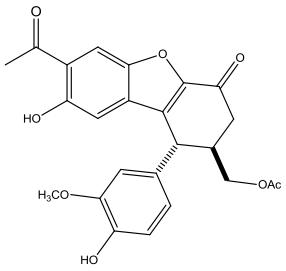
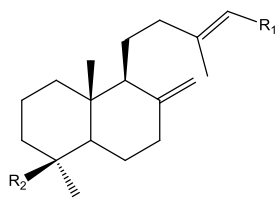
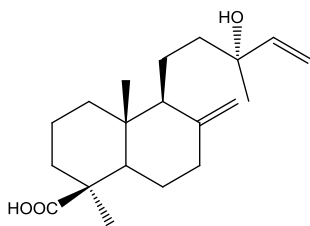
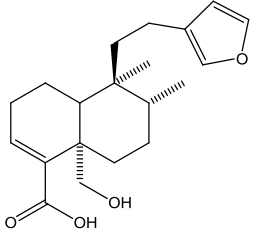
Vários trabalhos demonstraram a importância dessa espécie vegetal como fornecedora de resina para a produção da própolis verde por *Apis mellifera* (PARK et al., 2002, 2004). Após a descoberta de *B. dracunculifolia* como sendo a principal fonte botânica da própolis verde, muitos estudos vêm sendo realizados com a planta, demonstrando o grande potencial farmacológico e o interesse por essa espécie vegetal. Vários estudos fitoquímicos já foram realizados, o que possibilitou a identificação de 51 substâncias, até o momento conhecidas como: ácido diidrocinâmico **(1)**, ácido diidrocumárico **(2)**, ácido cafeico **(3)**, ácido cinâmico **(4)**, ácido cumárico **(5)**, ácido ferúlico **(6)**, drupanina **(7)**, bacarina **(8)**, artepelin C **(9)**, ácido 3'-hidróxi-2'-2'- dimetilcromano – 1- propenoico **(10)**, acacetina **(17)**, apigenina **(18)**, beturetol **(19)**, crisina **(20)**, ermanina **(21)**, galangina **(22)**, canferide **(23)**, canferol **(24)**, quercetina **(25)**, aromadendrina – 4' – metil éter **(26)**, isosacuranetina **(27)**, naringenina **(28)**, pinocembrina **(29)**, viscidona **(31)**, 11-hidróxi-10,11-diidroeuparina **(32)**, 6- hidroxitremetona, ácido isocuprêssico **(36)**, ácido agático **(37)**, ácido agálico **(38)**, ácido cuprêssico **(39)**, ácido ursólico **(44)**, ácido 2 α -hidróxi-ursólico **(45)**, uvaol **(46)**, friedelanol **(47)**, friedelina **(48)**, óxido de baccharis **(49)**, ácido 3,4- dicafeoilquínico **(50)**, ácido 3,5- cafeoilquínico **(51)**. Vale ressaltar que esses estudos estão resumidos na Tabela 1, a seguir.

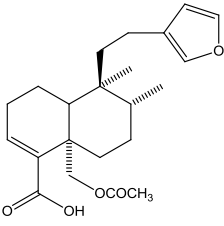
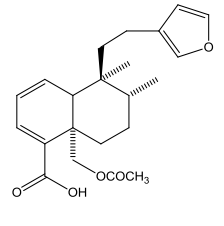
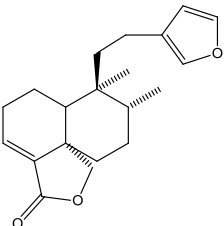
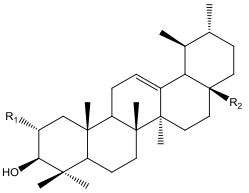
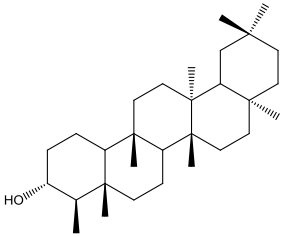
Tabela 1: Metabólitos secundários isolados de *B. dracunculifolia*.

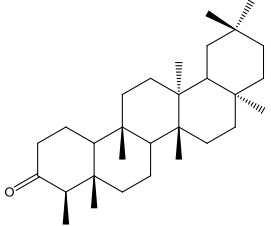
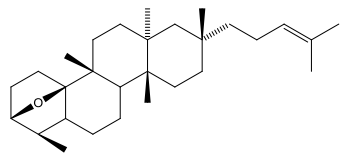
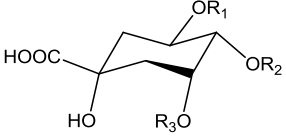
| Estrutura | Classe do Composto | Parte da planta | Referências |
|---|--------------------|---------------------------------|--|
|  <p>1- R = H 2- R = OH</p> | Fenilpropanoides | Aéreas | 1,2- DA SILVA FILHO, 2012 2- DA SILVA FILHO et al., 2004 |
|  <p>3 - R₁, R₂: OH 4 - R₁, R₂: H 5 - R₁=H, R₂=OH 6 - R₁= OCH₃; R₂= OH</p> | Fenilpropanoides | 5- Folhas 6- Folhas e Raízes | 3,5- KUMAZAWA et al., 2003; SAWAYA et al., 2004 4- MIDORIKAWA et al., 2003 5,6,7- DA SILVA FILHO, 2012 5,6- PARK et al., 2002; PARK et al., 2004 6- DA SILVA FILHO et al., 2004; MIDORIKAWA et al., 2003 |
|  <p>7</p> | Fenilpropanoide | Aéreas | BOHLMANN et al., 1981; KUMAZAWA et al., 2003; SAWAYA et al., 2004; MIDORIKAWA et al., 2003 |
|  <p>8</p> | Fenilpropanoide | Aéreas | BOHLMANN et al., 1981; KUMAZAWA et al., 2003; SAWAYA et al., 2004; DA SILVA FILHO et al., 2004 MIDORIKAWA et al., 2003 |
|  <p>9</p> | Fenilpropanoides | Aérea | BOHLMANN et al., 1981; KUMAZAWA et al., 2003; SAWAYA et al., 2004; PARK et al., 2004; MIDORIKAWA et al., 2003 |

| | | | |
|--|------------------|--------|---|
|  <p style="text-align: center;">10</p> | Fenilpropanoides | Aéreas | DA SILVA FILHO, 2012 |
|  <p style="text-align: center;">11</p> | Fenilpropanoides | _____ | MIDORIKAWA et al., 2003 |
|  <p style="text-align: center;">12</p> | Fenilpropanoides | _____ | MIDORIKAWA et al., 2003 |
|  <p style="text-align: center;">13</p> | Fenilpropanoides | _____ | MIDORIKAWA et al., 2003 |
|  <p style="text-align: center;">14</p> | Fenilpropanoides | Broto | KUMAZAWA et al., 2003; SAWAYA et al., 2004 |
|  <p style="text-align: center;">15</p> | Fenilpropanoides | Broto | KUMAZAWA et al., 2003; SAWAYA et al., 2004 |

| | | | |
|--|------------------|--------------------------------|--|
|  <p style="text-align: center;">16</p> | Fenilpropanoides | Broto | KUMAZAWA et al., 2003; SAWAYA et al., 2004 |
|  <p> 17- R₁= OCH₃; R₂,R₃,R₄= H 18- R₁= OH; R₂,R₃,R₄= H 19- R₁,R₄= OCH₃; R₂= H; R₃= OH 20- R₁,R₂,R₃,R₄= H 21- R₁,R₃= OCH₃; R₂, R₄= H 22- R₁,R₂,R₄= H; R₃= OH 23- R₁= OCH₃; R₄,R₂= H; R₃= OH 24- R₁, R₃= OH; R₂, R₄= H 25- R₁, R₂,R₃= OH; R₄= H </p> | Flavonoides | 17,18,20,21,22,23,24 Aéreas | 17- DA SILVA FILHO, 2012; 18, 20, 22,23, 24- PARK et al., 2002; PARK et al., 2004; 19,21,23,24,25- MIDORIKAWA et al., 2003; 21- DA SILVA FILHO, 2012 |
|  <p> 26- R₁= OCH₃; R₂= OH 27- R₁= OCH₃; R₂= H 28- R₁= OH; R₂= H 29- R₁, R₂= H 30- R₁,R₂= OH </p> | Flavonoides | Aéreas | 26- KUMAZAWA et al., 2003; SAWAYA et al., 2004; 26,27,28- NAGATANI et al., 2001; NAGATANI et al., 2002a.; NAGATANI et al., 2002b; 26,27 DA SILVA FILHO et al., 2004; MIDORIKAWA et al., 2003 26,27,30- DA SILVA FILHO, 2012 27,29 PARK et al., 2002; PARK et al., 2004 |
|  <p style="text-align: center;">31</p> | Benzofuranos | Aéreas | MIDORIKAWA et al., 2003; DA SILVA FILHO, 2012 |
|  <p style="text-align: center;">32</p> | Benzofunus | Aéreas | DA SILVA FILHO, 2012 |

| | | | |
|--|--------------------------|--------|-------------------------|
|  <p>33</p> | Benzofuranos | Aéreas | DA SILVA FILHO, 2012 |
|  <p>34</p> | Derivados benzofurânicos | _____ | MIDORIKAWA et al., 2003 |
|  <p>35</p> | Derivados benzofurânicos | _____ | MIDORIKAWA et al., 2003 |
|  <p>36- R₁ = CH₂OH; R₂ = COOH 37- R₁, R₂ = COOH 38- R₁ = COOH; R₂ = CHO</p> | Diterpenos | _____ | MIDORIKAWA et al., 2003 |
|  <p>39</p> | _____ | _____ | MIDORIKAWA et al., 2003 |
|  <p>40</p> | Furanoditerpeno | Aéreas | DA SILVA FILHO, 2012 |

| | | | |
|--|------------------|--------|----------------------|
|  <p>41</p> | Furanoditerpenos | Aéreas | DA SILVA FILHO, 2012 |
|  <p>42</p> | Furanoditerpenos | Aéreas | DA SILVA FILHO, 2012 |
|  <p>43</p> | Furanoditerpenos | Aéreas | DA SILVA FILHO, 2012 |
|  <p>44- R₁= H; R₂= COOH 45- R₁= OH; R₂= COOH 46- R₁= H; R₂= CH₂OH</p> | Triterpenos | Aéreas | DA SILVA FILHO, 2012 |
|  <p>47</p> | — | Raízes | RESENDE, 2009 |

| | | | |
|--|--|---|--|
|  <p style="text-align: center;">48</p> | <p style="text-align: center;">_____</p> | <p style="text-align: center;">Raízes</p> | <p style="text-align: center;">RESENDE, 2009</p> |
|  <p style="text-align: center;">49</p> | <p style="text-align: center;">_____</p> | <p style="text-align: center;">Raízes</p> | <p style="text-align: center;">RESENDE, 2009</p> |
|  <p>50- R₁, R₂= cafeoil; R₃= H 51- R₁, R₃= cafeoil; R₂= H</p> | <p style="text-align: center;">_____</p> | <p style="text-align: center;">_____</p> | <p style="text-align: center;">MIDORIKAWA et al., 2003</p> |

Além disso, vários trabalhos foram publicados mostrando as semelhanças entre os constituintes químicos da própolis verde e dos extratos das folhas de *B. dracunculifolia*. Lemos et al. (2007) demonstraram que o extrato das partes aéreas de *B. dracunculifolia* possui atividade antiúlcera, reduzindo o suco gástrico e aumentando o pH gástrico, semelhante ao extrato da própolis verde (GUIMARÃES et al., 2011). Da Silva Filho et al. (2008) demonstraram que o extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *B. dracunculifolia* possui atividade antimicrobiana similar ao extrato hidroalcoólico da própolis verde. Santos et al. (2010) demonstraram que o extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *B. dracunculifolia* possui atividade anti-inflamatória, assim como o extrato da própolis verde. Adicionalmente, Leitão et al. (2004), comparando os efeitos dos extratos da própolis verde e de *B. dracunculifolia* sobre os fatores cariogênicos de *Streptococcus mutans*, demonstraram a semelhança na atividade desses extratos sobre a inibição do potencial acidogênico e sobre a síntese de glucanos pela bactéria. Em outro estudo acerca dos constituintes das folhas de *B. dracunculifolia* e sua atividade

citotóxica, (FUKUDA et al., 2006) descobriram que os extratos alcoólicos dessas folhas apresentam atividade citotóxica potente contra células de leucemia (SANTOS et al., 2012). Levando-se em consideração as dificuldades na obtenção de amostras de própolis verde quimicamente padronizadas, os pesquisadores propuseram que, se a *B. dracunculifolia* e a própolis verde apresentam atividades biológicas similares e composição química semelhante, os extratos dessa planta, em vez da própolis verde, poderiam ser incorporados aos produtos farmacêuticos empregados no combate à cárie dental (LEITÃO et al., 2004; DA SILVA FILHO et al., 2012).

Estudo realizado por Sforcin et al. (2005), objetivando avaliar a atividade imunomodulatória, com extratos hidroalcoólicos de *B. dracunculifolia* a 10% e de alguns compostos isolados (ácido cafeico e quercetina, 100 mg/kg) sobre a produção de anticorpos por ratos imunizados com albumina sérica bovina (BSA), mostrou que o extrato hidroalcoólico de *B. dracunculifolia* induziu um aumento na produção de anticorpos, embora não significativamente quando comparado ao controle, mas, de modo eficiente, quando comparado com os grupos tratados com própolis. Já o ácido cafeico e a quercetina (antimicrobianos) não demonstraram efeito na produção de anticorpos (DA SILVA FILHO et al., 2012).

Enfim, diante do exposto sobre a planta e a própolis verde, os estudos de caracterização de metabólitos secundários e de atividades biológicas do alecrim-do-campo (*B. dracunculifolia*) não se limitam somente ao interesse da planta como medicamento, mas também na criação de uma padronização química para a própolis “verde” (baseada na origem geográfica), o que possibilitaria, no futuro, o cultivo desse vegetal, em grande escala, para obtenção de uma própolis verde padronizada e de elevado valor agregado (DA SILVA FILHO, 2006; SOUSA et al., 2007; SOUSA, BASTOS, 2012).

1.3 RESPOSTA IMUNOLÓGICA

A função principal do sistema imunológico é prover proteção ao hospedeiro contra a invasão de microorganismos e contra as doenças, identificando e matando agentes patogênicos e células tumorais (MUSSI-PINHATA; REGO, 2005). De modo geral, esse sistema é formado por

processos complexos e eventos moleculares e celulares múltiplos, dinâmicos e altamente regulados pelas redes modulatórias de citocinas (GERTSH, 2011). Assim, o sistema imune inato possui mecanismos de defesa celulares e bioquímicos, existentes até mesmo antes da infecção, e compreende células (como p. ex. os fagócitos) e proteínas, que defendem o hospedeiro contra a infecção por outros organismos (de uma forma não específica e genérica) por interação molecular e expressão de quimiocinas e citocinas indutíveis. Os fagócitos incluem neutrófilos, monócitos e macrófagos, os quais são células capazes de fagocitar microorganismos e destruí-los intracelularmente por meio da liberação de uma variedade de substâncias tóxicas, como superóxidos, radicais hidroxila e óxido nítrico (NO) (HADDAD et al., 2005; PAUL et al., 2006). Ainda, além da fagocitose e produção de radicais livres, os macrófagos produzem importantes citocinas inflamatórias como interleucina 1 (IL-1), TNF- α e interleucina 12 (IL-12). Além disso, os macrófagos (juntamente com as células dendríticas) são as principais células apresentadoras de antígenos solúveis que induzem a proliferação de linfócitos T, por meio da secreção de citocinas, as quais provêm sinais para ativação e indução da imunidade específica (MUSSI-PINHATA; REGO, 2005; GERTSH, 2011; HADDAD et al., 2005; PAUL et al., 2006).

O sistema imune adaptativo (específico) é expresso por reações a componentes de microorganismos, e, independente das consequências fisiológicas ou patológicas dessas reações, revela especificidade, capacidade de memória e aumento de defesa com cada exposição sucessiva (CRUVINEL et al., 2010). É, ainda, composto por células especializadas efetoras (células T e B), que reconhecem antígenos processados e apresentados por macrófagos e/ou células dendríticas, levando à ativação de células T citotóxicas e à geração de anticorpos, os quais são criticamente envolvidos na eliminação ou prevenção de organismos patogênicos (GERTSH, 2011; HADDAD et al., 2005; PAUL et al., 2006; ROCHA JUNIOR et al., 2013)

Os linfócitos T, após reconhecimento dos antígenos, secretam citocinas que estimulam a expansão clonal e a diferenciação das células T em efetoras ou de memória. Na fase efetora da resposta, as células T CD4⁺ respondem ao antígeno, produzindo citocinas, que realizam o recrutamento, a ativação dos

leucócitos e dos linfócitos T; já os linfócitos T CD8⁺ respondem, eliminando outras células (MESQUITA JÚNIOR et al. 2010).

De modo geral, a resposta imune (inata e específica) desempenha papéis diferentes em resposta a diferentes patógenos, atuando em diversos processos inflamatórios, alérgicos e autoimunes. Assim, um sistema imunológico superativo é visto em numerosas patologias, incluindo doenças autoimunes, doenças inflamatórias crônicas, vasodilatação sistêmica e carcinogênese. Por outro lado, a imunossupressão conduz a uma maior susceptibilidade à infecção, tendo sido relacionada também ao desenvolvimento de tumores (AGGARWAL et al., 2006). Portanto, o nível de ativação do sistema imune pode ser benéfico e protetor para o organismo, dependendo do grau de modulação e do contexto fisiopatológico. Ademais, uma disfunção do sistema imunológico, claramente, implica desenvolvimento de várias doenças, principalmente doenças anti-inflamatórias e crônicas.

A inflamação é, em termos gerais, benéfica, quando aguda, e prejudicial, quando crônica, sendo que fármacos anti-inflamatórios (adicionalmente imunossupressores e/ou imunoestimulatórios) poderão ser utilizados. Os fármacos anti-inflamatórios compreendem agentes que intervêm em processos inflamatórios agudos e crônicos nos quais o metabolismo do ácido araquidônico, radicais livres e citocinas ocupam importante papel, tais como doenças reumáticas, asma e processos autoimunes (COUTINHO et al., 2009). Assim, o entendimento do papel de substâncias em geral e micromoléculas no sistema imune contribui de forma significativa para o desenvolvimento de novos fármacos, especialmente de anti-inflamatórios (BILATE, 2007).

Ao analisar a ação de um potencial agente anti-inflamatório, devem-se considerar a geração das prostaglandinas, os radicais livres (como NO e peróxido de hidrogênio) e as citocinas produzidas por células do sistema imune (COUTINHO et al., 2009). Por exemplo, no processo inflamatório, várias citocinas pró-inflamatórias podem estar presentes, como a interleucina - 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Esses importantes mediadores estão presentes em uma variedade de doenças inflamatórias, neoplásicas e autoimunes, como o enfisema, a doença de Crohn e a artrite reumatoide (PAUL et al., 2006; COUTINHO et al., 2009).

Desde a identificação do fator de necrose tumoral (TNF- α) como a principal citocina pró-inflamatória (que regula a inflamação e outras doenças relacionadas), muitas pesquisas têm sido realizadas acerca dessa citocina. Com as pesquisas, descobriu-se que a síntese elevada de TNF- α está associada com o desenvolvimento de diabetes, da esclerose múltipla, de tumores, da artrite reumatoide, do lúpus e de várias outras doenças inflamatórias. No entanto, poucos estudos têm sido conduzidos no intuito de se encontrar moléculas ou fármacos que possam ser utilizados no tratamento de doenças mediadas por TNF- α (GERTSH, 2011; HADDAD et al., 2005; PAUL et al., 2006; COUTINHO et al., 2009). Atualmente, somente alguns medicamentos, caros e originados de estudos com proteínas, estão disponíveis clinicamente para a inibição da atividade de TNF- α . No entanto, apesar da eficácia demonstrada por esses medicamentos, vários e sérios efeitos colaterais são observados após a administração, como predisposição a infecções, insuficiência cardíaca e linfomas. Nesse cenário, é importante e essencial o desenvolvimento de fármacos mais seguros e baratos que possam ser utilizados como inibidores do TNF- α (GERTSH, 2011; HADDAD et al., 2005; PAUL et al., 2006).

Os linfócitos T CD4⁺ virgens podem se diferenciar em subtipos distintos de células efetoras em resposta ao antígeno, coestimuladores e citocinas, variando em T_H1, T_H2 e T_H17. Outra população distinta de células T CD4⁺ são as células T reguladoras, (T_{REG}), que possuem função de controlar as reações imunes aos antígenos próprios e estranhos (SILVA et al. 2013). Um subconjunto adicional de células T efetoras foi recentemente descrito, as células T_H9, as quais produzem predominantemente interleucina 9 (IL-9), a qual era anteriormente conhecida como uma citocina derivada das células T_H2. Essas células são conhecidas por serem altamente envolvidas nas doenças auto-imunes inflamatórias (LIN et al., 2013).

1.3.1 Subpopulações de linfócitos T e a imunidade específica

A diferenciação das células T CD4⁺ ativadas por antígenos em efetoras T_H1 é estimulada por microorganismos intracelulares e associada à produção

de citocinas como interleucina 12 (IL-12), interleucina 18 (IL-18) e interferon γ (IFN- γ), (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010, ROCHA JUNIOR et al., 2013).

A maturação das células T_H1 é controlada pela IL-12, produzida pelas células dendríticas e macrófagos em resposta aos microorganismos, incluindo os patógenos intracelulares e o IFN- γ produzido pelas células *natural killer* (NK), que ativam os fatores de transcrição T-bet, membro da família T-box de fatores de transcrição, sendo considerado regulador-mestre da diferenciação de T_H1 (BOWEN, 2008, ROCHA JUNIOR et al., 2013).

Os macrófagos, quando ativados, matam os microorganismos fagocitados principalmente pelas ações das espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico e enzimas lisossômicas. Esses produtos microbicidas não distinguem tecidos próprios ou não próprios, assim, são capazes de gerar lesão tecidual (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

O óxido nítrico (NO) é uma espécie reativa de nitrogênio, sendo uma molécula efetora importante em vários sistemas biológicos, como nos tecidos cardiovasculares, neuronais e no sistema imunológico (DING et al., 1988). É produzido pelos macrófagos ativados através da ação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que catalisa a conversão de arginina em citrulina, promovendo sua liberação em forma de gás. O óxido nítrico (NO) impacta tanto na resposta imune (T_H1) quanto na resposta imune (T_H2) (SOLEYMANINEJADIAN; PRAMANIK; SAMADIAN, 2012) e pode se combinar com o peróxido de hidrogênio gerado pela oxidase fagocitária no interior dos fagolisossomos, produzindo radicais de peroxinitrito altamente reativos que levam à morte os microorganismos (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

Estudos realizados por Martínez et al. (1999) e Figueroa-Veja et al. (2008) mostraram que células ativadas no processo inflamatório são as principais responsáveis pelo dano tecidual, devido à liberação de óxido nítrico, radicais de oxigênio, aminas vasoativas e citocinas.

Foi demonstrado, ainda, que o aumento dos níveis de NO estão associados aos sintomas neurológicos, pois são responsáveis pela lesão direta dos oligodendrócitos e axônios. As enzimas NO sintetases (NOS) são fundamentais para o controle da biossíntese do NO, enzima presente em três

isoformas, sendo a forma indutível (*iNOS*) a envolvida nas reações inflamatórias.

Durante a diferenciação das células T_H1 , a IL-12 liga-se aos receptores e ativa o fator de transcrição STAT4, aumentando a produção de IFN- γ . Este, por sua vez, ativa o fator de transcrição STAT1, que estimula a produção de Tbet. Em seguida, o Tbet estimula ainda mais a produção de IFN- γ , intensificando a diferenciação de T_H1 . Sendo assim, a deficiência na via de sinalização do receptor de interleucina 12 (IL-12R) leva a respostas prejudicadas a infecções por vários tipos de bactérias intracelulares (COPE et al., 2011).

Os linfócitos T_H2 são estimulados, classicamente, em resposta aos parasitas extracelulares e alérgenos. As células T_H2 podem produzir IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 e IL-25. O desenvolvimento dessas células é dependente da IL-4, que é produzida pelas células T ativadas ou pelos mastócitos e eosinófilos, em particular em resposta aos helmintos (ZHU; PAUL, 2008). A IL-4 ativa os fatores de transcrição GATA-3 e STAT6, que estimulam a diferenciação das células virgens no fenótipo T_H2 e também amplificam essa resposta e inibem o desenvolvimento das células T_H1 e T_H17 (BILATE, 2007).

Recentemente, foram descobertas as células T_H17 , que são caracterizadas pela produção de IL-17 e produzidas em resposta a bactérias extracelulares e fungos. Essas células participam de várias doenças autoimunes e inflamatórias, como, por exemplo, doença de Crohn, lúpus eritematoso sistêmico (LES), artrite reumatoide, psoríase e esclerose múltipla (FLETCHER et al., 2010; CROME et al., 2009).

A resposta T_H17 produz citocinas como IL-17, IL-6, IL-21, IL-22, IL-23 e TNF- α , que têm funções pró-inflamatórias (JADIDI-NIARAGH; MIRSHAFIEY, 2011). O início da resposta T_H17 ocorre com a produção de IL-1 e IL-6 pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) e o fator β de crescimento transformante produzido por várias células. Estes ativam os fatores de transcrição ROR γ t e STAT3, que estimulam a diferenciação das células T $CD4^+$ virgens no subtipo T_H17 . As células apresentadoras de antígenos APCs também produzem IL-23, principalmente em resposta aos fungos, estabilizando as células T_H17 . Indiretamente, o fator estimulante de colônias de granulócitos

β (TGF- β) pode favorecer a resposta Th-17 por suprimir as células T_{H1} e T_{H2}. A IL-21 produzida também é responsável pela amplificação da resposta T_{H17} (OLIVEIRA et al., 2013).

Já as células T reguladoras (T_{REG}) são responsáveis por suprimir a autoimunidade e também por outras respostas imunes excessivas a antígenos não próprios. São geradas, sobretudo, pelo reconhecimento de antígenos próprios no timo e pelo reconhecimento de antígenos próprios e estranhos nos órgãos linfoides periféricos. Quando o reconhecimento ocorre no timo, são chamadas de células reguladoras naturais, e de células reguladoras induzíveis ou adaptativas quando o reconhecimento ocorre por meio de antígenos em órgãos periféricos (WING; SAKAGUCHI, 2010).

IL-2 e o fator de transcrição Foxp3 são responsáveis pelo desenvolvimento e pela sobrevivência das células T reguladoras. Sua expressão fenotípica está representada. Em tecidos periféricos, as células T reguladoras suprimem a ativação e as funções efetoras de outros linfócitos, autorreativos e potencialmente patogênicos.

As células T reguladoras produzem IL-10 e TGF- β , os quais inibem respostas imunológicas (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010).

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar os efeitos do extrato bruto da *B. dracunculifolia*, frações e de seus metabólitos secundários sobre a produção de mediadores inflamatórios em sobrenadante de esplenócitos de camundongos C57BL/6 saudáveis e imunoestimulados, com o intuito de avaliar a atividade imunomodulatória da espécie.

Para esses propósitos, os objetivos específicos do estudo foram:

- Produzir o extrato bruto das partes aéreas de *B. dracunculifolia*.
- Realizar o isolamento, a purificação e a identificação dos metabólitos secundários majoritários presentes nas partes aéreas de *B. dracunculifolia*.
- Avaliar os efeitos do extrato bruto, das frações orgânicas e dos metabólitos secundários obtidos de *B. dracunculifolia*, sobre os níveis das citocinas IL-17, IL-4, TNF- α , IFN- γ e óxido nítrico (NO) em esplenócitos de camundongos C57BL/6.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS UTILIZADOS PARA OBTENÇÃO DO EXTRATO

3.1.1 Instrumentação materiais cromatográficos

Para a realização do trabalho, foram disponibilizados os seguintes equipamentos pelo Núcleo de Identificação e Pesquisa em Princípios Ativos Naturais (NIPPAN), da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF):

- Rotaevaporador (Fisaton[®], modelo 558; e *Bucchi* RII);
- Bomba a vácuo (Prismatec[®], modelo 121)
- Banho ultratermostático (Cientec[®], modelo CT-281-28).
- Bomba *Bunchi* V-700.
- Câmara ultravioleta 254 e 366 nm (U.V. SL-204, Solab Científica[®]).
- Balança semianalítica (BL 320, Marte[®]).
- Balança analítica (AY 220, Marte[®]).

Nos processos cromatográficos, o tipo de fase estacionária utilizada variou de acordo com a separação desejada:

a) para cromatografia em camada delgada (CCD), utilizaram-se cromatofolhas de sílica gel 60 GF₂₅₄ *Merck*, com espessura de 25 mm (TLC Silicagel 60 GF₂₅₄, 20x20 cm, *Merck*[®]).

b) para cromatografia líquida a vácuo (CLV), foram utilizados como adsorventes sílica gel 60H (partículas menores que 55 µm, *Merck*) e sílica gel 60 (partículas de 0,015-0,040 mm, *Merck*), na proporção de 1:1 (m/m), empregando-se colunas de vidro, com 10 cm de diâmetro e 30 cm de altura, contendo placa sinterizada de 2,5 cm de altura.

c) para cromatografia em coluna (CC), utilizou-se como adsorvente sílica gel (partículas de 40-63 µm, *Aldrich*) e colunas de vidro de diferentes alturas e diâmetros.

d) para cromatografia em coluna *flash*, utilizou-se como adsorvente sílica gel 60 (partículas de 15-40 μm , *Merck*), empregando-se coluna de vidro com 5 cm de diâmetro e 15 cm de altura.

e) para as revelações dos cromatogramas obtidos em placas comparativas, foram utilizados vapores de iodo, solução de anisaldeído sulfúrico, solução de vanilina em ácido sulfúrico e/ou irradiação no UV (254 e 366 nm).

f) para as extrações, partições, fracionamentos e sistemas cromatográficos, foram e serão utilizados solventes de grau P.A., das marcas *Vetec*, *Cromato Produtos Químicos LTDA*, *Quemis*, *Isofar* e *Alphatec* grau técnico previamente submetido à destilação.

g) para a obtenção dos espectros de RMN ^1H das substâncias isoladas utilizou-se clorofórmio e metanol deuterados (CDCl_3 , MeOD, *Cambridge Isotope Laboratories*).

h) para identificação dos compostos isolados, utilizou-se o aparelho de Ressonância Magnética Nuclear de Próton e Carbono (Bruker – 500 MHz), cedido pelo Departamento de Química da UFJF em colaboração com a Professora Dra. Mara Rubia Costa Courie. Os dados foram obtidos em 500 MHz para hidrogênio. Como referência interna, utilizou-se o tetrametilsilano (TMS), os valores de deslocamento químico (δ) foram referidos em partes por milhão (ppm), e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

Para realização dos testes imunológicos, foram disponibilizados pelo Laboratório de Bioatividade Celular e Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora os seguintes equipamentos:

- Lavadora de microplacas TP Washer NM Thermoplate
- Leitora de microplacas TP Reader NM Thermoplate
- Estufa de gás CO_2 Laboven
- Máquina de gelo em cubo *automatic* EGC 50^a Everest
- PHmetro HI 2221 Hanna instruments
- Osmose Reversa: RO 0210/220V. Permution
- Centrífuga refrigerada NT 815 Novatécnica
- Ultrafreezer - 86 $^{\circ}\text{C}$ Indrel – Iult 335-700

- Balança analítica EEQ 9009 – Edutec
- Estufa digital time microprocessada para esterilização e secagem Spolabor
- Cabine de Segurança biológica Bio Seg Classe II Tipo A1 – Grupo Veco
- Autoclave vertical CS – Primatec
- Agitador magnético MS-H-S – Gostirrer
- Agitador tipo Vortex – T9200- Arsec
- Microscópio – 0900082 – Physis

3.2 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal foi coletado no *campus* da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, em 18 de janeiro de 2013. A exsiccata do vegetal foi identificada por L. B. V. Matta e depositada no Herbário Leopoldo Krieger (CESJ), do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), sob o número do tombo 47.482.

3.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO BRUTO DAS FOLHAS DE *B. dracunculifolia*

Após seleção e separação das folhas e dos caules de tamanhos maiores, foram obtidos 1,5 Kg de amostra. Desses, 1 Kg foi pulverizado em liquidificador e tamisado. Após pulverização, o pó obtido foi submetido à maceração com solvente hidroalcoólico (EtOH: H₂O 9:1 v/v), por 72 horas.

A solução hidroalcoólica obtida foi filtrada com papel de filtro e transferida, progressivamente, para balão de fundo redondo e, então, submetida à rotaevaporação a 55 °C à pressão reduzida, para remoção do solvente.

O extrato obtido foi transferido para frasco previamente pesado e deixado para evaporação do solvente residual em temperatura ambiente. Todo processo de maceração e concentração do extrato foi realizado até o esgotamento do material vegetal. No final de três meses, foram obtidos 183 g

de extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *B. dracunculifolia* (**BD**).

3.4 FRACIONAMENTO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO BRUTO UTILIZANDO PROCESSO DE PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

Com a finalidade de separação inicial dos constituintes do extrato bruto, este foi submetido a partições com solventes orgânicos (Figura 3).

Primeiramente, o extrato foi ressuspenso com mistura MeOH:H₂O (9:1 v/v), utilizando agitador magnético. Para cada 1 g de extrato bruto, foram utilizados 25 mL da mistura metanol-água. Após ressuspensão, este foi transferido para funil de separação e extraído com hexano, previamente saturado com água destilada, por processo de partição líquido-líquido. Para cada 10 g de extrato bruto, foi utilizado 1 L de hexano. A partição foi realizada até a clarificação do extrato, totalizando 4,5 L da fração hexânica. A esta, foi adicionado sulfato de sódio anidro para eliminação da água e, em seguida, esta foi filtrada para um balão de fundo redondo, utilizando-se papel de filtro, e rotaevaporada a 55 °C, à pressão reduzida, sendo, em seguida, transferida para frascos previamente pesados e denominados fração hexânica do extrato bruto de *B. dracunculifolia* (**BD-Fh**).

A solução hidrometanólica restante, inicialmente, foi concentrada em rotaevaporador para eliminação de parte do metanol e, em seguida, particionada com clorofórmio. À solução clorofórmica obtida, foi adicionado sulfato de sódio anidro para eliminar água. Em seguida, a solução foi filtrada, utilizando papel de filtro, para balão de fundo redondo, e concentrada em rotaevaporador sob pressão reduzida a 55 °C, sendo, em seguida, transferida para frascos previamente pesados e denominada fração clorofórmica do extrato bruto de *B. dracunculifolia* (**BD-Fc**).

A solução aquosa remanescente foi concentrada em rotaevaporador sob pressão reduzida a 55 °C. O concentrado foi transferido para frasco previamente pesado e denominado fração aquosa do extrato bruto de *B. dracunculifolia* (**BD-Fa**).



Figura 3: Partição líquido-líquido do extrato hidroalcoólico de *B. dracunculifolia*.

Fonte: Núcleo de Investigação e Pesquisa de Produtos Naturais e Ativos Naturais (NIPPAN) – Faculdade de Farmácia UFJF. Fotografia tirada pela autora (2013).

No total, foi realizada a partição de 45 g de extrato bruto **BD**, sendo obtidos 5,7 g de fração **BD-Fh**, 36,1 g de fração **BD-Fc** e 3,1 g de fração **BD-Fa**. O restante do extrato hidroalcoólico bruto que não foi particionado, totalizando 138,3 g, foi armazenado no Núcleo de Identificação e Pesquisa em princípios Ativos Naturais, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora.

O processo de fracionamento do extrato hidroalcoólico bruto está resumido na Figura 4, a seguir:

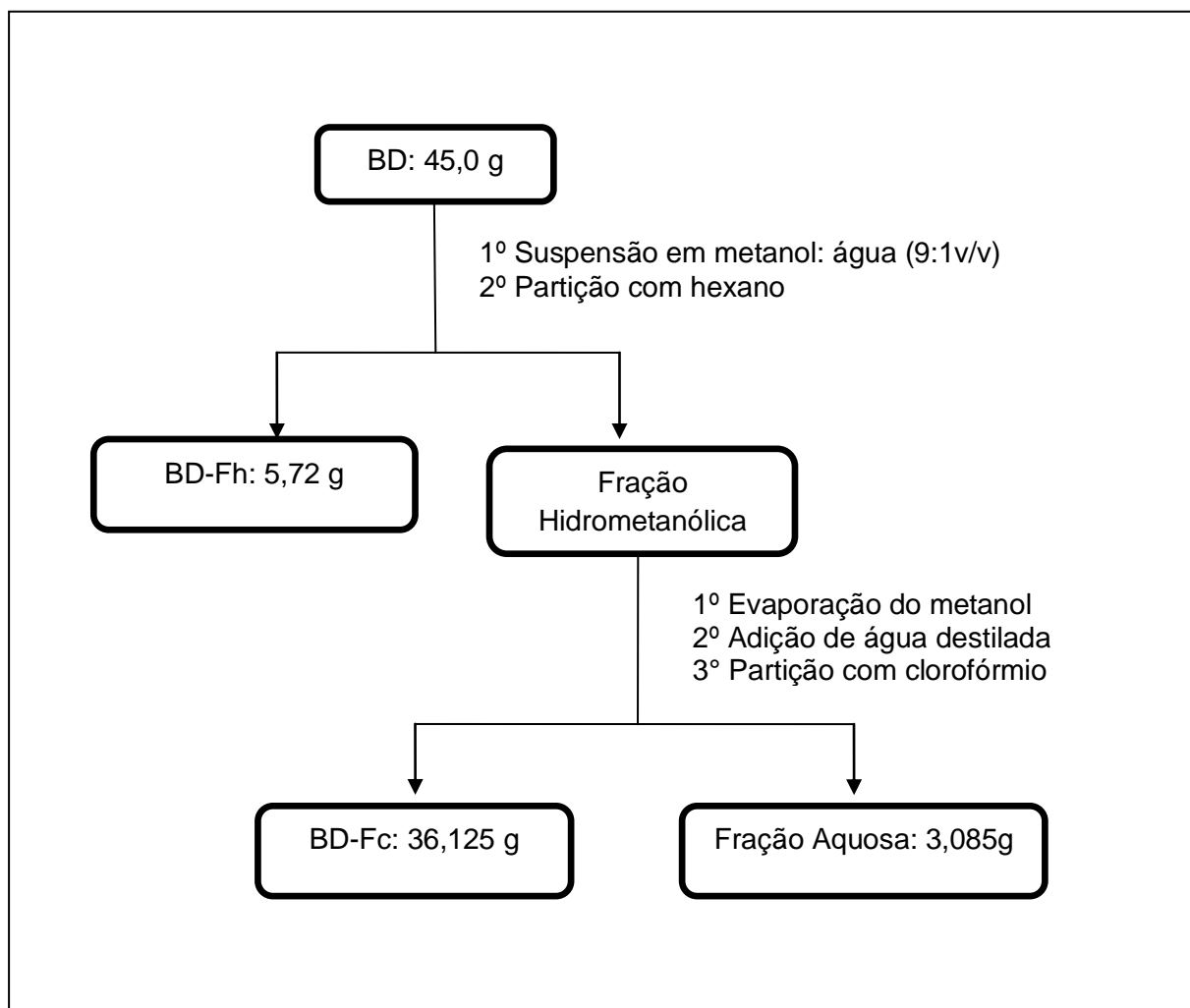


Figura 4: Diagrama geral do procedimento de partição líquido/líquido do extrato hidroalcoólico bruto das partes aéreas de *B. dracunculifolia*.

Fonte: A autora (2013).

As frações obtidas por meio de partição com solventes orgânicos foram analisadas por CCD, utilizando Hex/AcOEt 1:1 (v/v) como sistema eluente, e anisaldeído sulfúrico como revelador, com a finalidade de se obter o perfil cromatográfico das substâncias presentes em cada fração. No intuito de selecionar uma das frações para dar continuidade ao processo fitoquímico, essas foram avaliadas quanto à atividade imunomodulatória *in vitro*.

De acordo com os resultados descritos no item 5, a fração clorofórmica (**BD-Fc**), por apresentar melhor atividade imunomodulatória *in vitro*, foi selecionada para dar prosseguimento ao estudo fitoquímico.

3.5 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS *B. dracunculifolia*

3.5.1 Estudo da BD-Fc

Com o objetivo de isolar seus constituintes, 30 g da fração **BD-Fc** foi submetida à CLV de 10 cm de diâmetro por 15 cm de altura, empacotada com 600 g de sílica 60 H, utilizando-se como eluentes solventes e misturas de solventes com polaridades crescentes, sendo coletadas 49 frações de 500 mL cada. Após análise das frações, por meio de CCD, foi possível agrupá-las em 11, como mostra a Tabela 2:

Tabela 2: Frações obtidas por CLV da fração **BD-Fc**.

| Eluentes | Frações | Massas (g) |
|----------------------|----------------|---------------|
| Hex:AcOEt 5% | ----- | |
| Hex:AcOEt 10% | BD-Fc-A | 0,102 |
| Hex:AcOEt 20% | BD-Fc-B | 0,106 |
| Hex:AcOEt 20% | BD-Fc-C | 0,093 |
| Hex:AcOEt 20% e 30% | BD-Fc-D | 0,349 |
| Hex:AcOEt 30% | BD-Fc-E | 1,428 |
| Hex:AcOEt 50% | BD-Fc-F | 1,719 |
| Hex:AcOEt 70% | BD-Fc-G e H | 1,653 e 4,263 |
| AcOEt 100% | BD-Fc-I | 0,115 |
| AcOEt: MeOH 50% | BD-Fc-J | 0,237 |
| MeOH 100% | BD-Fc-K | 0,136 |

3.5.1.1 Fração BD-Fc-E

Dando prosseguimento ao processo de purificação, a fração **BD-Fc-E** (1,2 g) foi submetida à CC de 4 cm de diâmetro e 26 cm de altura, empacotada com 120 g de sílica (40 a 63 μm). A eluição foi realizada com mistura de hexano: acetato com polaridades crescentes, obtendo-se 79 subfrações de 200 mL cada, as quais foram reagrupadas em 12 subfrações após análise por CCD, conforme descrito na Tabela 3. Após análise cromatográfica, observou-se que uma subfração apresentou uma única mancha, nas condições cromatográficas

analisadas. Essa subfração isolada, codificada como **BD-Fc-E2**, foi submetida à análise espectroscópica para a identificação de sua estrutura química.

Tabela 3: Frações obtidas por CC da fração BD-Fc-E.

| Eluentes | Frações | Massas (g) |
|----------------------|-----------------|--------------|
| Hex:AcOEt 5% | BD-Fc-E1 | 0,029 |
| Hex:AcOEt 10% | BD-Fc-E2 | 0,114 |
| Hex:AcOEt 15% | BD-Fc-E3 | 0,102 |
| Hex:AcOEt 20% | BD-Fc-E4 | 0,208 |
| Hex:AcOEt 20% | BD-Fc-E5 | 0,401 |
| Hex:AcOEt 20% | BD-Fc-E6 | 0,180 |
| Hex:AcOEt 20% | BD-Fc-E7 | 0,034 |
| Hex:AcOEt 20% | BD-Fc-E8 | 0,072 |
| Hex:AcOEt 30%→40% | BD-Fc-E9 | 0,315 |
| Hex:AcOEt 60% | BD-Fc-E10 | 0,069 |
| Hex:AcOEt 80% | BD-Fc-E11 | 0,141 |
| AcOEt 100% | BD-Fc-E12 | 0,097 |

3.5.1.2 Fração BD-Fc-F

Em continuidade ao estudo fitoquímico, a fração **BD-Fc-F** (1,7 g) foi submetida a CC, utilizando coluna de vidro de 4 cm de diâmetro por 15 cm de altura empacotada com 200 g de sílica gel (70-230 *mesch*). Foram coletadas 77 frações de 200 mL cada, utilizando-se como eluentes clorofórmio: metanol em diferentes concentrações. Após análise em CCD, as frações foram reunidas em 16 subfrações (Tabela 4). Após análise cromatográfica, observou-se que, das 16 subfrações, 1 (uma) apresentou uma única mancha, nas condições cromatográficas analisadas. Essa subfração isolada, codificada como **BD-Fc-F6**, foi submetida à análise espectroscópica para a identificação de sua estrutura química.

Tabela 4: Frações obtidas por CC da fração BD-Fc-F.

| Eluentes | Frações | Massas (g) |
|---------------------------------|-----------------|--------------|
| CHCl ₃ :MeOH 5% | BD-Fc-F1 | 0,018 |
| CHCl ₃ :MeOH 5% | BD-Fc-F2 | 0,023 |
| CHCl ₃ :MeOH 5% | BD-Fc-F3 | 0,015 |
| CHCl ₃ :MeOH 5% | BD-Fc-F4 | 0,020 |
| CHCl ₃ :MeOH 5% | BD-Fc-F5 | 0,887 |
| CHCl₃:MeOH 5% | BD-Fc-F6 | 0,023 |
| CHCl ₃ :MeOH 5% | BD-Fc-F7 | 0,024 |
| CHCl ₃ :MeOH 5% | BD-Fc-F8 | 0,034 |
| CHCl ₃ :MeOH 5% | BD-Fc-F9 | 0,095 |
| CHCl ₃ :MeOH 5% | BD-Fc-F10 | 0,039 |
| CHCl ₃ :MeOH 5% | BD-Fc-F11 | 0,031 |
| CHCl ₃ :MeOH 5% | BD-Fc-F12 | 0,200 |
| CHCl ₃ :MeOH 5% | BD-Fc-F13 | 0,009 |
| CHCl ₃ :MeOH 10% | BD-Fc-F14 | 0,043 |
| CHCl ₃ :MeOH 10% | BD-Fc-F15 | 0,075 |
| CHCl ₃ :MeOH 10% | BD-Fc-F16 | 0,023 |

3.5.1.3 Fração BD-Fc-F5

Ainda, a fração **BD-Fc-F5** (0,887 g) foi aplicada em coluna *flash* de vidro de 4 cm de diâmetro e 15 cm de altura, e essa coluna foi empacotada com 200 g de sílica gel (70-230 *mesh*), da qual foram coletadas 53 frações de 30 mL cada, utilizando os eluentes clorofórmio: metanol em gradiente de polaridade. Após análise da CCD, as frações foram reunidas em 9 subfrações (Tabela 5).

Tabela 5: Subfrações obtidas por meio de coluna *flash* da fração BD-Fc-F5.

| Eluentes | Frações | Massas (g) |
|---------------------------------|-------------------|--------------|
| CHCl ₃ :MeOH 5% | BD-Fc-F5.1 | 0,037 |
| CHCl₃:MeOH 5% | BD-Fc-F5.2 | 0,038 |
| CHCl ₃ :MeOH 5% | BD-Fc-F5.3 | 0,041 |
| CHCl ₃ :MeOH 5% | BD-Fc-F5.4 | 0,172 |
| CHCl ₃ :MeOH 5% | BD-Fc-F5.5 | 0,018 |
| CHCl ₃ :MeOH 5% | BD-Fc-F5.6 | 0,010 |
| CHCl ₃ :MeOH 5% | BD-Fc-F5.7 | 0,002 |
| CHCl ₃ :MeOH 5% | BD-Fc-F5.8 | 0,011 |
| CHCl ₃ :MeOH 20% | BD-Fc-F5.9 | 0,034 |
| MeOH 100% | BD-FC-F5.10 | 0,472 |

Após a análise das subfrações por meio da CCD, a **BD-FC-5.2** (0,038 mg) foi submetida à análise espectroscópica para a identificação de sua estrutura química.

Os procedimentos empregados para o isolamento dos metabólitos majoritários das partes aéreas de *B. dracunculifolia* são apresentados, resumidamente, na Figura 5:

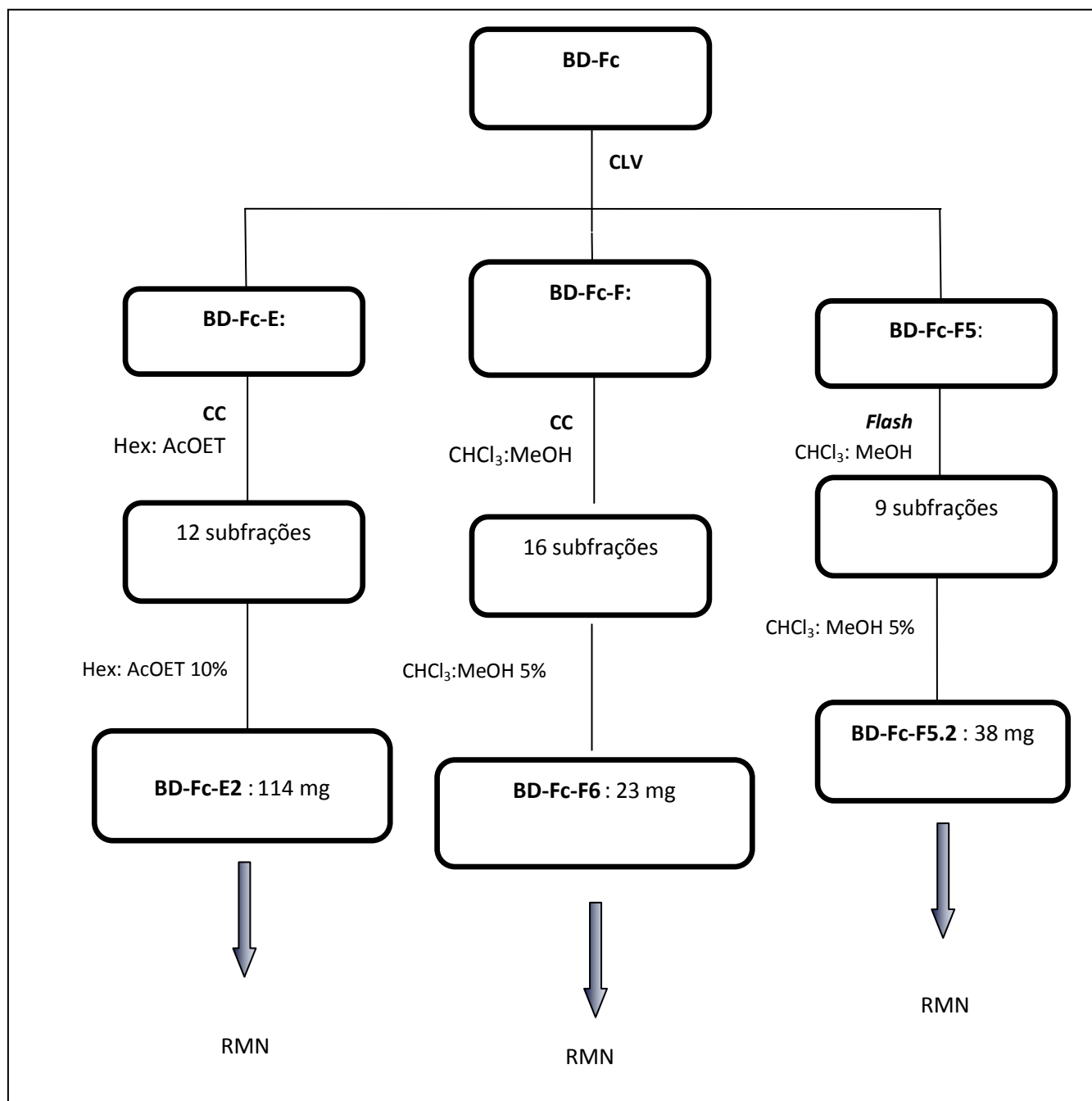


Figura 5: Fluxograma do isolamento dos metabólitos majoritários da fração clorofórmica das partes aéreas de *B. dracunculifolia* (BD-Fc).
Fonte: A autora (2013).

3.6 ENSAIOS PARA A AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA

3.6.1 Animais para experimentação

Foram utilizados 30 camundongos da linhagem C57Bl/6 fêmeas, com 8-12 semanas, provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR), da Universidade Federal de Juiz de Fora. Todos os procedimentos estão de acordo com os princípios do Código Brasileiro para a Utilização de Animais de Laboratório, tendo sido autorizados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG (Protocolo n°. 039/2013).

3.6.2 Grupos experimentais

Foram utilizados 23 grupos neste estudo, sendo que as células utilizadas como controle negativo não receberam qualquer tipo de tratamento. Os demais grupos foram expostos a extratos, frações e metabólitos secundários isolados e identificados, em três diferentes concentrações, e imunoestimulados com Lipopolissacarídeo – LPS para avaliar o padrão de resposta sobre os mediadores inflamatórios.

Grupo controle negativo (grupo I): Células mantidas em cultura, sem qualquer tratamento ou estímulo;

Grupo controle positivo (grupo II): Células mantidas em cultura e estimuladas com 10 µg/mL de LPS;

Grupos de avaliação do extrato bruto com imunoestimulante (grupos III - V): Células mantidas em cultura, em presença de 10 µg/mL LPS e do extrato bruto, em 3 diferentes concentrações 100µg/mL, 50µg/mL, 25µg/mL;

Grupos de avaliação da fração clorofórmica com imunoestimulante (grupos IV - VIII): Células mantidas em cultura, em presença de 10 µg/mL LPS e da fração clorofórmica, em 3 diferentes concentrações 100µg/mL, 50µg/mL, 25µg/mL;

Grupos de avaliação da fração hexânica com imunoestimulante (grupos IX - XI): Células mantidas em cultura, em presença de 10 µg/mL LPS e da fração hexânica, em 3 diferentes concentrações 100µg/mL, 50µg/mL, 25µg/mL;

Grupos de avaliação da fração aquosa com imunoestimulante (grupos XII - XIV): Células mantidas em cultura, em presença de 10 µg/mL LPS e da fração aquosa, em 3 diferentes concentrações 100µg/mL, 50µg/mL, 25µg/mL;

Grupos de avaliação da substância isolada BD-Fc-E2 com imunoestimulante (grupos XV - XVII): Células mantidas em cultura, em presença de 10 µg/mL LPS e da substância BD-Fc-E2, em 3 diferentes concentrações 100µg/mL, 50µg/mL, 10µg/mL;

Grupos de avaliação da substância isolada BD-Fc-F6 com imunoestimulante (grupos XVIII - XX): Células mantidas em cultura, em presença de 10 µg/mL LPS e da substância BD-Fc-F6, em 3 diferentes concentrações 100µg/mL, 50µg/mL, 10µg/mL;

Grupos de avaliação da substância isolada BD-Fc-F5.2 com imunoestimulante (grupos XXI - XXIII): Células mantidas em cultura, em presença de 10 µg/mL LPS e da substância BD-Fc-F5.2, em 3 diferentes concentrações 100µg/mL, 50µg/mL, 10µg/mL.

3.6.3 Obtenção dos esplenócitos

Os animais foram eutanasiados com utilização de xilasina (30 mg/Kg) e quetamina (160mg/Kg). Em seguida, retirou-se o baço para obtenção dos esplenócitos. O baço dos animais foi coletado de maneira asséptica e, após lavagem com solução de RPMI incompleto estéril, foi macerado em 5 mL dessa mesma solução. As células foram centrifugadas (1.200 rpm, 8 min, 4 °C) e o botão celular ressuspensado em solução de cloreto de amônio para lise das hemácias. Esse processo foi repetido até completa lise das hemácias. Em seguida, as células foram ressuspensas em meio RMPI completo (10% SFB – soro bovino fetal) e incubadas em placas de 96 poços por 1 hora em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ transferido para tubos do tipo falcon de 15 mL para serem contados em câmara de Neubauer com azul de Tripán, avaliando-se, aqui, a

viabilidade das células. Procedeu-se, então, o ajuste de 2×10^6 células/mL, e essas foram colocadas em cultura por 24 e 48 horas com ou sem estímulo. Após esse procedimento, o sobrenadante foi coletado e mantido sob congelamento para posteriores dosagens de citocinas e óxido nítrico (NO), respectivamente.

3.6.4 Utilização dos sobrenadantes de cultura de esplenócitos

Para determinação da ativação de macrófagos, foram dosados TNF- α e NO (Griees). Os padrões de resposta específica, Th1, Th2 e Th17, foram identificados por meio das concentrações obtidas das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-17. Para tanto, foram utilizados os sobrenadantes da cultura de células (esplenócitos), anteriormente obtidas.

3.6.5 Produção de óxido nítrico (nitrito)

Após o descongelamento das células, 100 μ L de sobrenadante da cultura de esplenócitos foram colocados nos poços de microplacas de ELISA com fundo chato tipo Corning. O sobrenadante foi incubado por 5 minutos à temperatura ambiente com 100 μ L do Reativo de Griess (DING et al., 1988). Esse reativo foi obtido misturando-se a solução A (50 mL de sulfanilamida 1%) com a solução B (50 mL de 0,1% dihidro-cloreto de naftiletlenodiamina diluído em 2,5% de H_3PO_4 - Sigma Co., St. Louis), volume a volume. A absorbância foi medida, utilizando-se um filtro de 540 nm em um leitor automático de ELISA (TP READER NM), e a produção de NO foi quantificada por meio de comparação com uma curva padrão de Nitrito em concentrações variando de 3,12 a 100 μ M, sendo os resultados expressos em mols/mL.

3.6.6 Dosagem de citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-17) por ELISA

Suspensões de esplenócitos foram cultivadas na densidade de 2×10^5 /poço em meio RPMI 1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino inativado pelo calor, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 μ g/mL

de estreptomicina (RPMI 5%, Sigma), em câmara úmida, a 37 °C e em atmosfera de 5% de CO₂. As culturas foram estimuladas com LPS (Sigma) a 10 µg/mL. Os sobrenadantes foram coletados após 24 h e em Placas de ELISA, que foram sensibilizadas com um primeiro anticorpo (anti-TNF-α, anti-IFN-γ, anti-IL-17 e anti-IL-4) (PeProtechInc, New Jersey), diluídos em PBS, incubadas durante 16 horas a 4 °C e bloqueadas com PBS- Tween 20 (PBST) + 10% SFB, por 2 horas. Após esse período, as placas foram lavadas quatro vezes em PBS-T e, em seguida, adicionados os padrões (das citocinas citadas anteriormente) recombinante de camundongo (PeProtechInc, New Jersey) e as amostras dos animais utilizados no modelo experimental. As placas foram então incubadas por mais 2 horas à temperatura ambiente. Terminada a incubação, as placas foram lavadas quatro vezes em PBS-T e o segundo anticorpo, biotilado (dos respectivos anticorpos primários) (PeProtechInc, New Jersey), foi adicionado e incubado por mais 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, mais quatro lavagens com PBS-T foram feitas e adicionado o conjugado enzimático constituído do complexo *streptoavidina-peroxidase*, na diluição de 1/2000 (SIGMA - Co, St. Louis), seguido de incubação por mais 1/2 hora à temperatura ambiente. Após este período, mais quatro lavagens com PBS-T foram realizadas e, em seguida, a reação foi revelada pela adição do substrato ABTS. A leitura foi feita em leitor de ELISA (SPECTRAMAX 250, *Molecular Devices*) a 405 nm. As amostras foram quantificadas por comparação com as curvas padrões recombinantes (as concentrações dos anticorpos e dos recombinantes foram realizados de acordo com recomendações do fabricante PeProtechInc, New Jersey).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos pela média ± desvio-padrão (SEM) (GraphPad Prism 6[®]). As variáveis numéricas foram avaliadas nos diferentes grupos pelo teste t não pareado para a determinação das diferenças significativas entre os grupos, com nível de significância $P < 0,05$ (SOKAL; ROHLF, 1995).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo fitoquímico do extrato bruto das partes aéreas de *B. dracunculifolia* resultou no isolamento de três substâncias, codificadas como BD-Fc-FE2, BD-Fc-F6 e BD-Fc-F5.2.

4.1 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

4.1.1 Substância BD-Fc-E2

No espectro de RMN de ^1H (Figura 6), foram observados dois tripletos ($J= 7,5$ Hz) em δ 2,72 (2H) e δ 2,99 (2H) referentes a hidrogênios do grupo CH_2 , um duplete ($J= 9,0$ Hz) em δ 6,96 (1H) referentes aos hidrogênios aromáticos, um multiplete entre δ 7,20-7,34 (9H) correspondente a hidrogênios aromáticos, um duplete em δ 8,07 (1H) referente a hidrogênios aromáticos. Os resultados foram analisados no programa NMR *notebook* 2.7.

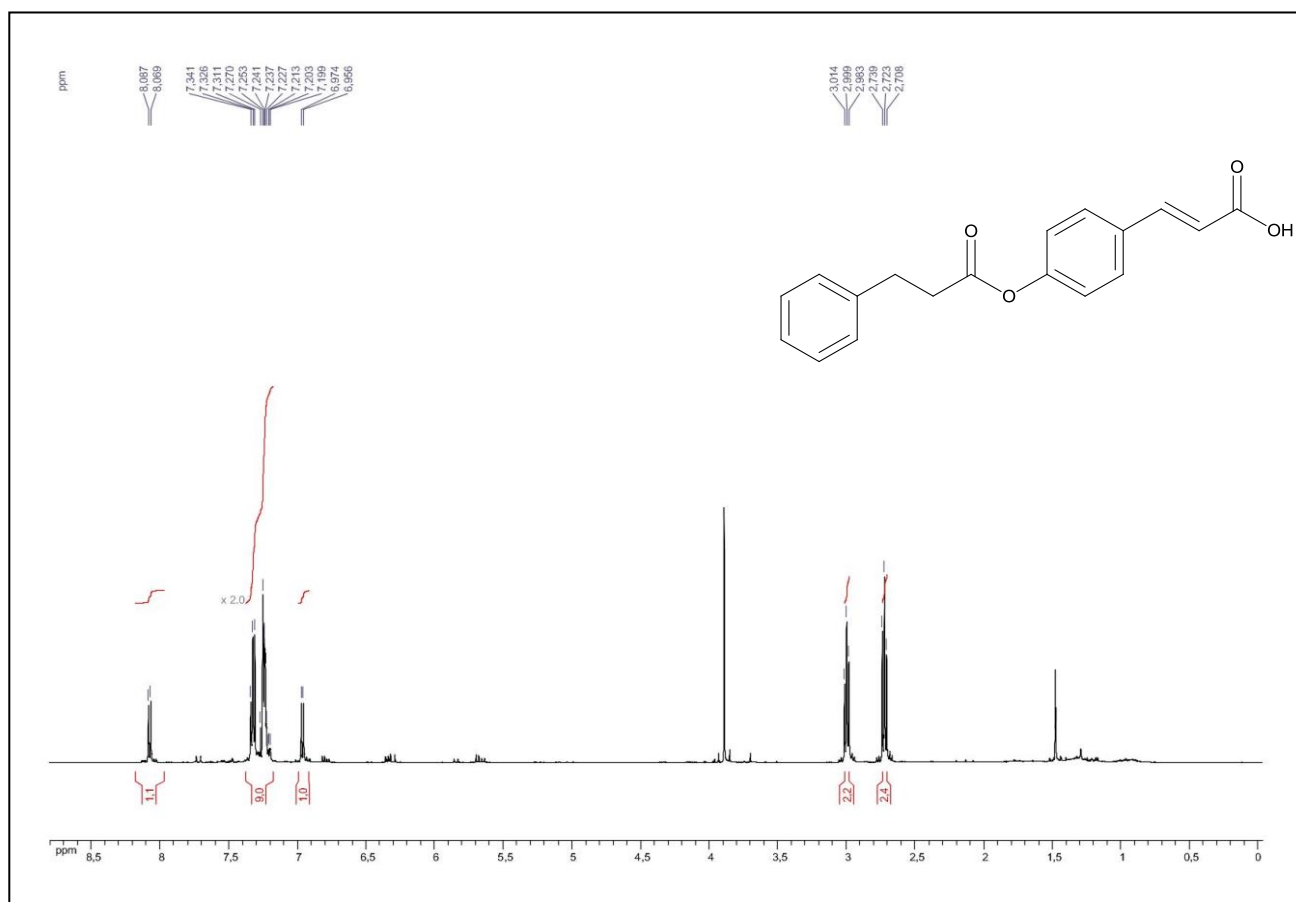


Figura 6: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do composto BD-Fc-E2.
Fonte: A autora (2014).

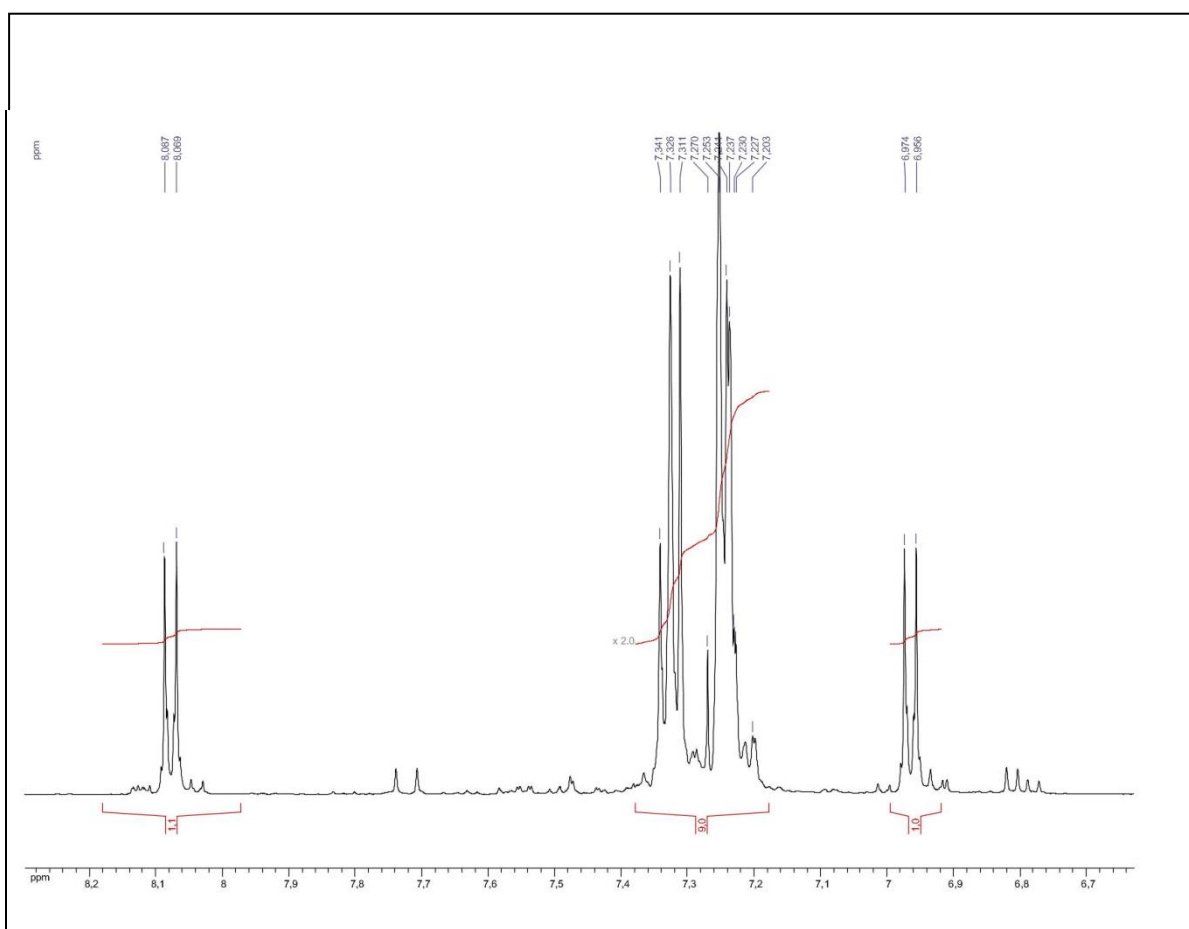


Figura 7: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do composto BD-Fc-E2 (expansão).

Fonte: A autora (2014).

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) d (ppm): 2,72 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz, CH_2); 2,99 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz, CH_2); 6,96 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz, Ar), 7,20-7,34 (m, 9H, Ar); 8,07 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz, Ar).

A análise desses dados e a comparação com aqueles previamente publicados (TAZAWA; WARASHINA; NORO, 1999) permitem sugerir que a substância BD-Fc-E2 trata-se do ácido (E)-4-(2,3-diidrocinaoiloxi) cinâmico.

4.1.2 Substância BD-Fc-F6

No espectro de RMN de ^1H (Figura 8), foi observado um multipletto entre δ 3,87-3,88 (6H) referente a hidrogênios metoxílicos do composto, dois multipletos entre δ 6,51-6,63 (2H) e entre δ 7,04-7,08 (2H) referentes a hidrogênios aromáticos do composto, além de dois dupletos ($J = 8,0$ Hz) em δ

7,93 (1H) e δ 8,17 (1H) referentes aos demais hidrogênios aromáticos do composto. Os resultados foram analisados no programa NMR *notebook* 2.7.

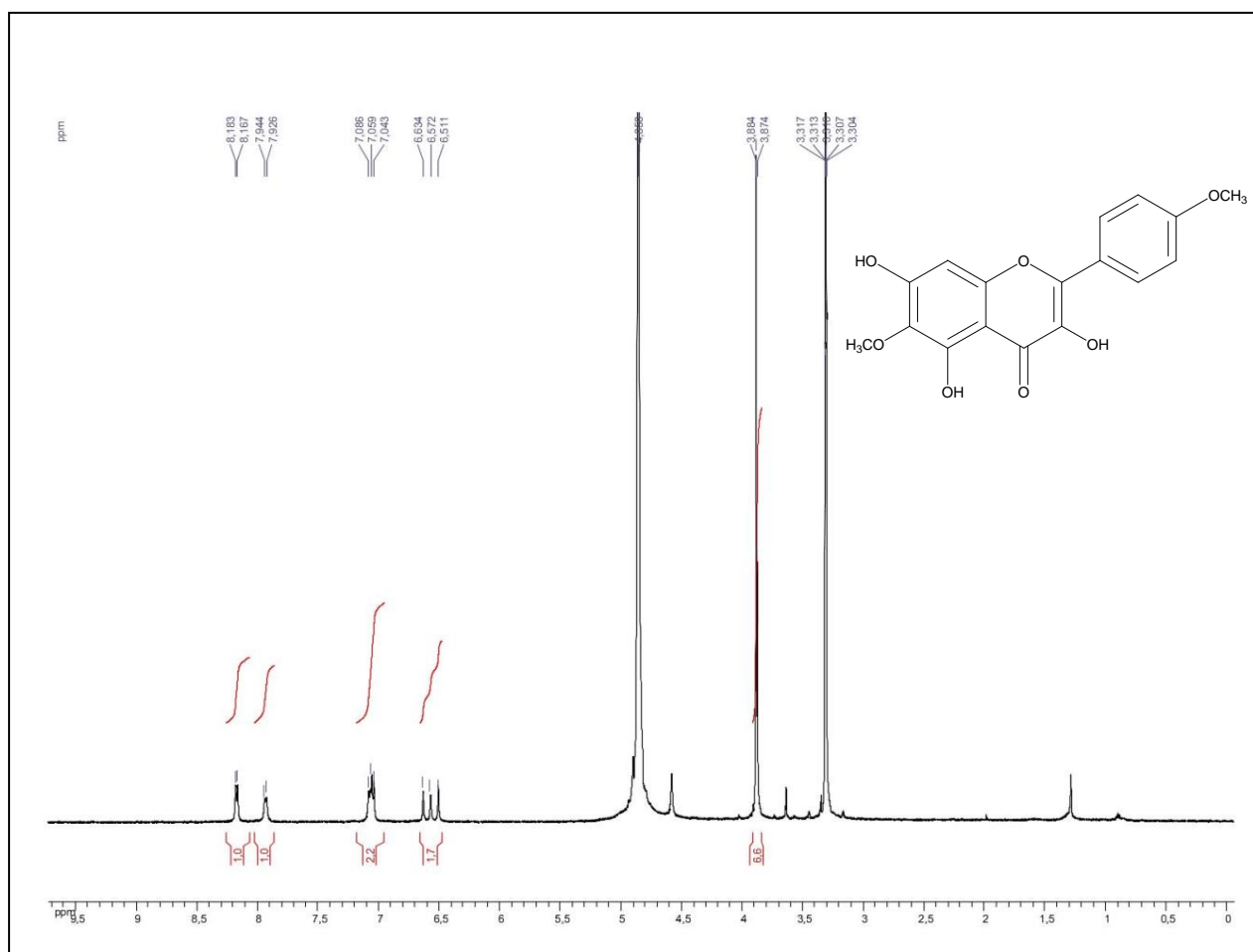


Figura 8: Espectro de RMN de ^1H (MeOD, 500 MHz) do composto BD-Fc-F6.
Fonte: A autora (2014).

RMN de ^1H (500 MHz, MeOD) δ (ppm): 3,87-3,88 (m, 6H, CH_3); 6,51-6,63 (m, 2H, Ar), 7,04-7,08 (m, 2H, Ar), 7,93 (d, 1H, $J= 8,0$ Hz, Ar), 8,17 (d, 2H, $J= 8,0$ Hz, Ar).

A análise desses dados em conjunto com aqueles previamente publicados (PATIL; VISHWKARMA, 2012) permite sugerir que a substância BD-Fc-F6 corresponde à substância 3, 5, 7-triidroxi-6, 4'-dimetoxi flavona conhecida como beturetol.

4.1.3 Substância BD-Fc-5.2

No espectro de RMN de ^1H (Figura 9), foram observados dois simpletos em δ 3,88 (3H) e δ 4,03 (3H) referentes a hidrogênios metoxílicos do composto, um duplete ($J= 2,0$ Hz) em δ 6,58 (2H) referente aos hidrogênios aromáticos e dois dupletos ($J= 9,0$ Hz) em δ 7,01 (2H) e δ 7,83 (2H) referentes aos demais hidrogênios aromáticos. Os resultados foram analisados no programa NMR *notebook 2.7*.

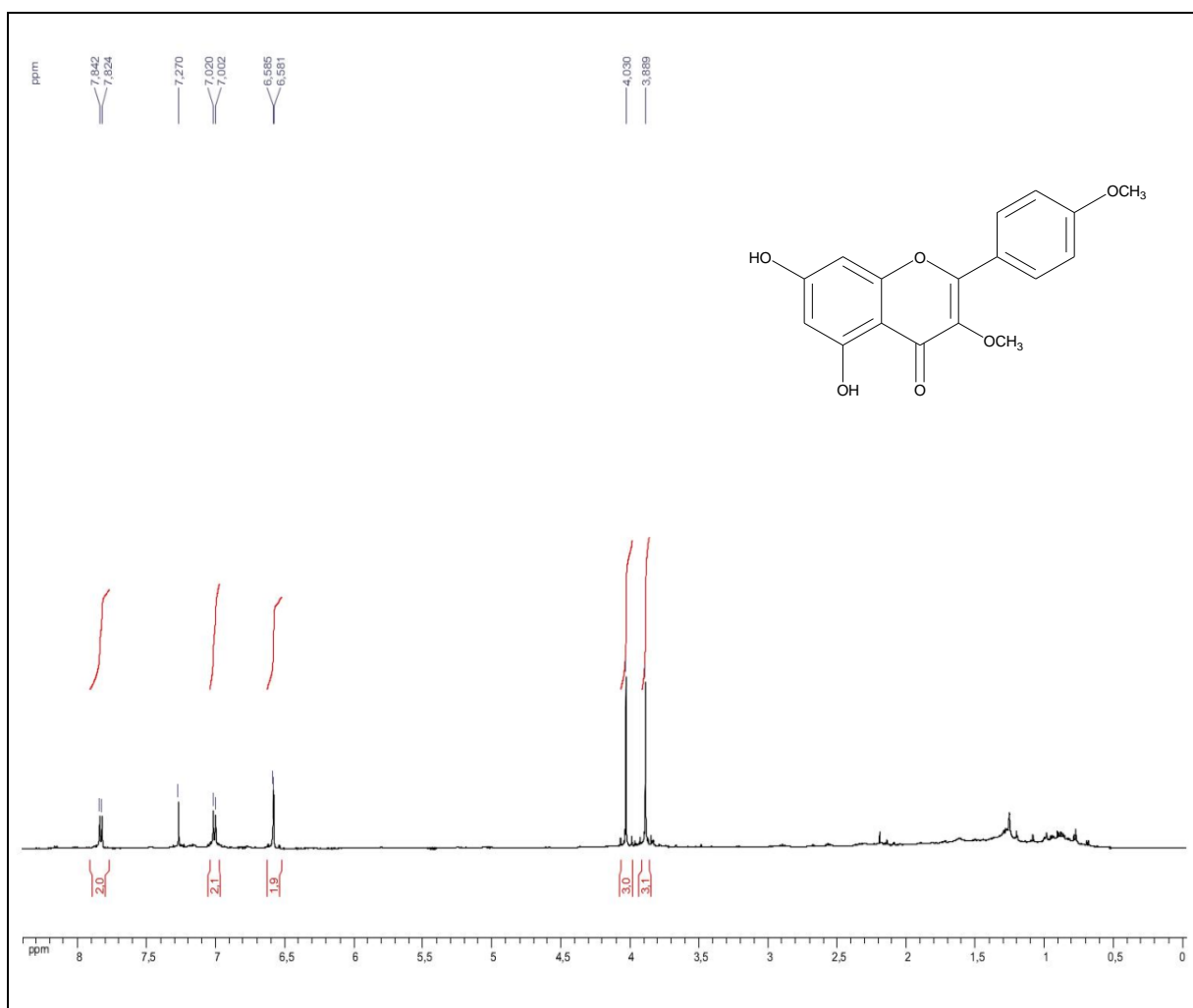
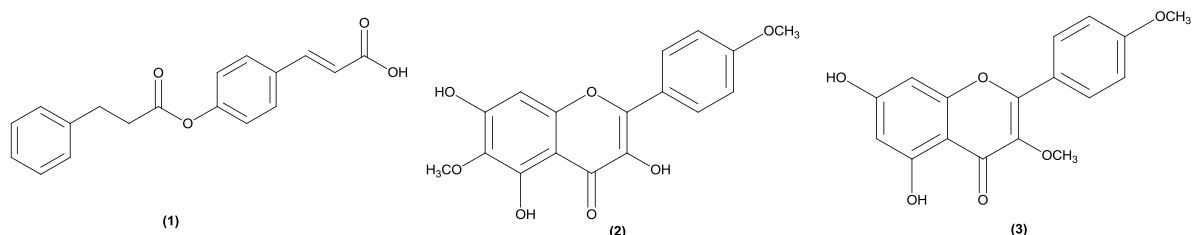


Figura 9: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do composto BDFc5.2.
Fonte: A autora (2014).

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) d (ppm): 3,88 (s, 3H CH_3); 4,03 (s, 3H, CH_3); 6,58 (d, 2H, $J= 2,0$ Hz, Ar), 7,01 (d, 1H, $J= 9,0$ Hz, Ar), 7,83 (d, 2H, $J= 9,0$ Hz, Ar).

A análise desses dados juntamente com aqueles previamente publicados (VERDENIKOV; ROSHCHIN, 2009) permite sugerir que a substância BD-Fc-5.2 trata-se da 5,7-diidroxi-3,4'-di-metoxiflavona, conhecida como ermanina.

Tabela 6: Dados do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) dos compostos 1-3.



| | (1) | | | (2) | | | (3) | | |
|-----------------|--------------|---|-------|--------------|---|-------|--------------|---|-------|
| Atribuições | (δ) | M | J(Hz) | (δ) | M | J(Hz) | (δ) | M | J(Hz) |
| CH ₃ | - | - | - | 3,87-3,88 | m | - | 3,88 | s | - |
| CH ₃ | - | - | - | - | - | - | 4,03 | s | - |
| CH ₂ | 2,72 | t | 7,5 | - | - | - | - | - | - |
| Ar | 6,96 | d | 9,0 | 6,51-6,63 | m | - | 6,58 | d | 2,0 |
| Ar | 7,20-7,34 | m | - | 7,04-7,08 | m | - | 7,01 | d | 9,0 |
| Ar | 8,07 | d | 9,0 | 7,93 | d | 8,0 | 7,83 | d | 9,0 |
| Ar | - | - | - | 8,17 | d | 8,0 | - | - | - |

Legenda: δ – deslocamento químico
M – multiplicidade
J – constante de acoplamento

4.2 ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA *IN VITRO* DO EXTRATO, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *B. dracunculifolia*

4.2.1 Produção de óxido nítrico (NO)

O NO foi medido no sobrenadante da cultura de esplenócitos, tendo sido observado que o grupo controle positivo (células com presença de LPS) apresentou altos níveis de NO quando comparado com o controle negativo ($P < 0,001$) (Figuras 10, 11, 12). Com relação aos grupos de células que receberam o extrato bruto de *B. dracunculifolia*, este foi capaz de inibir a produção do NO na concentração de BD 100 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,001$) e BD 50 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,001$), como demonstrado na Figura 10. A fração clorofórmica obtida do extrato bruto de *B. dracunculifolia* foi capaz de inibir essa produção, nas duas maiores concentrações testadas, de 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,001$ e $P < 0,001$). Já as frações hexânica e aquosa inibiram a produção de NO somente na maior concentração testada 100 $\mu\text{g/mL}$, sendo FH ($P < 0,001$) e FA ($P < 0,05$) (Figura 11).

Ao analisarmos as substâncias isoladas testadas, percebemos que ocorreu inibição da produção de NO somente nas maiores concentrações 100 $\mu\text{g/mL}$, sendo BDFcE2 ($P < 0,001$), BDFcF6 ($P < 0,001$), BDFc5.2 ($P < 0,001$) (Figura 12).

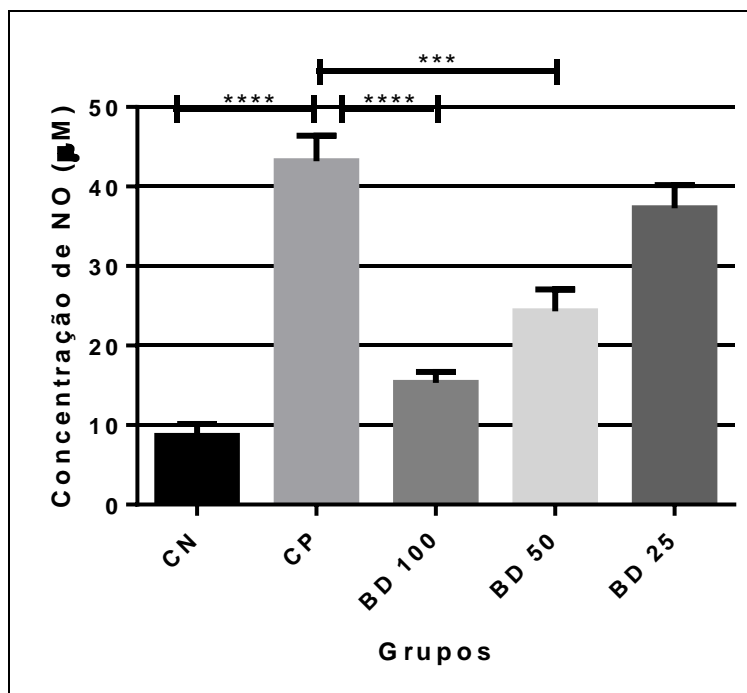


Figura 10: Produção de óxido nítrico em cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 estimulados com LPS. As células foram incubadas com extratos de *B. dracunculifolia* nas concentrações de 100μg/mL, 50μg/mL e 25μg/mL. Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 6[®], expressos como média ± SEM, e foram considerados resultados significativos com $P < 0,05$.

Fonte: A autora (2014).

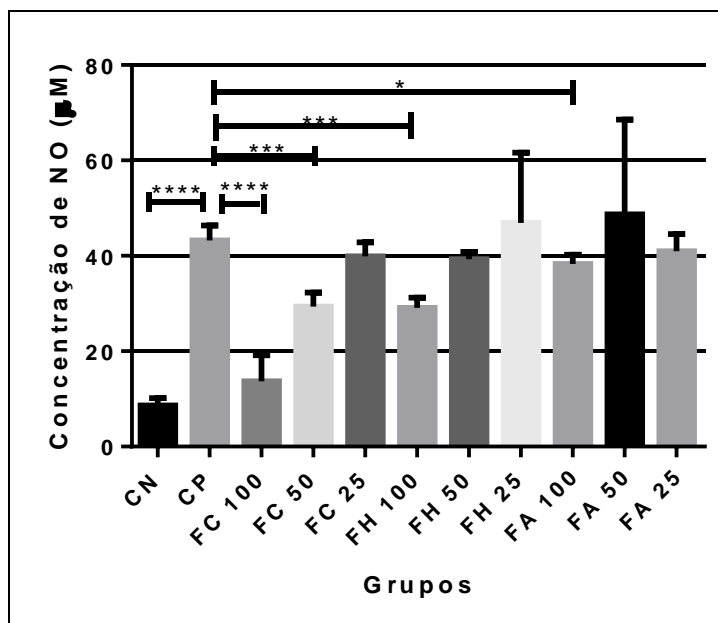


Figura 11: Produção de óxido nítrico em cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 estimulados com LPS. As células foram incubadas com as frações de *B. dracunculifolia* nas concentrações de 100μg/mL, 50μg/mL e 25μg/mL. Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 6®, expressos como média ± SEM, e foram considerados resultados significativos com $P < 0,05$.

Fonte: A autora (2014).

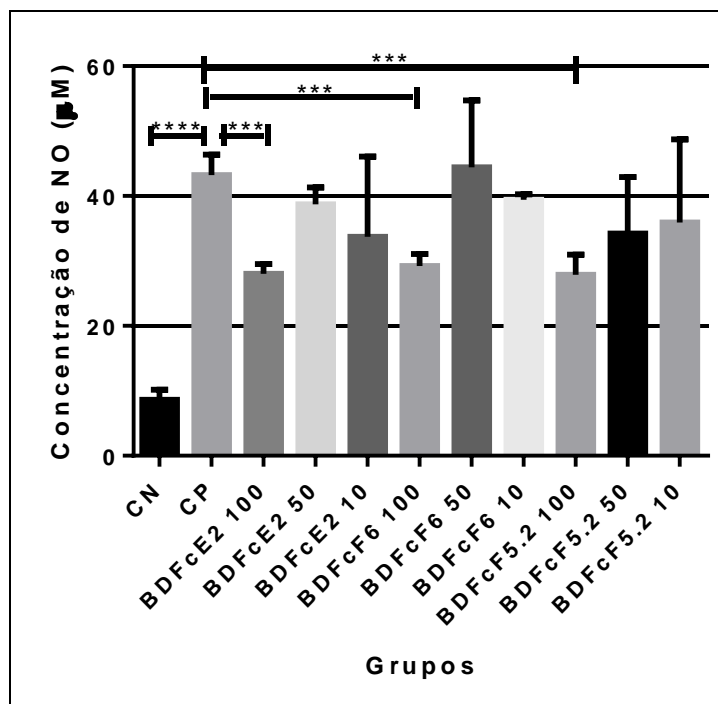


Figura 12: Produção de óxido nítrico em cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 estimulados com LPS. As células foram incubadas com as substâncias isoladas de *B. dracunculifolia* nas concentrações de 100μg/mL, 50μg/mL e 10μg/mL. Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 6[®], expressos como média ± SEM, e foram considerados resultados significativos com $P < 0,05$. Fonte: A autora (2014).

4.2.2 Produção de citocinas

4.2.2.1 Interleucina 4 (IL – 4)

A IL-4 também foi medida no sobrenadante da cultura de esplenócitos. O grupo controle positivo (células com presença de LPS) apresentou altos níveis de IL-4, quando comparado com o controle negativo ($P < 0,001$) (Figuras 13, 14, 15). Com relação aos grupos de células que receberam o extrato bruto de *B. dracunculifolia*, este foi capaz de inibir a produção da citocina nas 3 concentrações testadas de BD 100 μg/mL ($P < 0,001$), BD 50 μg/mL ($P < 0,001$) e BD 25 μg/mL ($P < 0,01$) como demonstrado na Figura 13. A fração clorofórmica obtida do extrato bruto de *B. dracunculifolia* foi capaz de inibir a produção da IL-4 também nas suas 3 concentrações, FC 100 μg/mL ($P < 0,001$), FC 50 μg/mL ($P < 0,001$) e FC 25 μg/mL ($P < 0,01$). Em contrapartida, a fração

hexânica inibiu somente na maior concentração FH 100 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,01$), e a fração aquosa não acarretou em nenhum resultado significativo (Figura 14).

Ao analisarmos as substâncias isoladas testadas, percebemos que ocorreu inibição da produção de IL-4 com as 3 substâncias investigadas. BDFcE2 100 ($P < 0,001$), BDFcE2 50 ($P < 0,001$), BDFcF6 100 ($P < 0,001$), BDFcF6 50 ($P < 0,05$), BDFc5.2 100 ($P < 0,01$) (Figura 15).

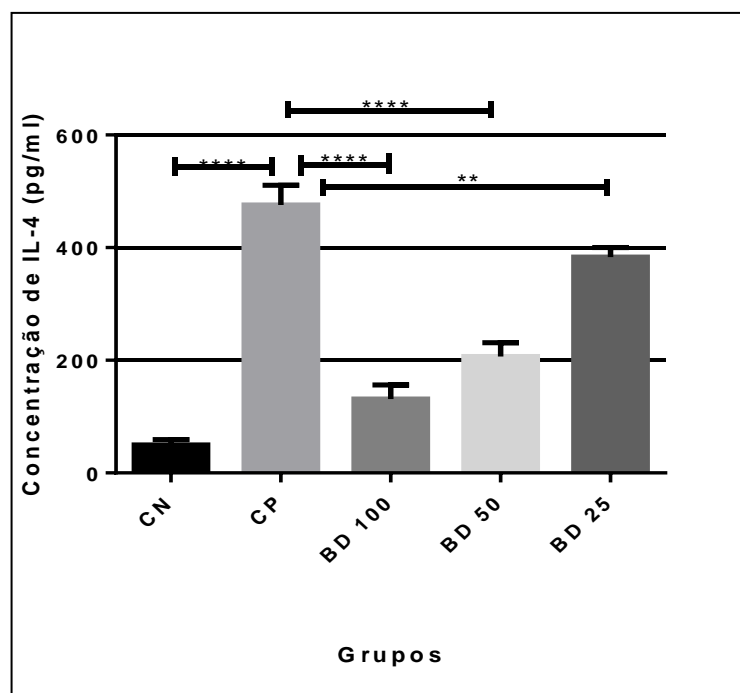


Figura 13: Produção de IL-4 em cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 estimulados com LPS. As células foram incubadas com extratos de *B. dracunculifolia* nas concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ e 25 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 6[®], expressos como média \pm SEM, e foram considerados resultados significativos com $P < 0,05$.

Fonte: A autora (2014).

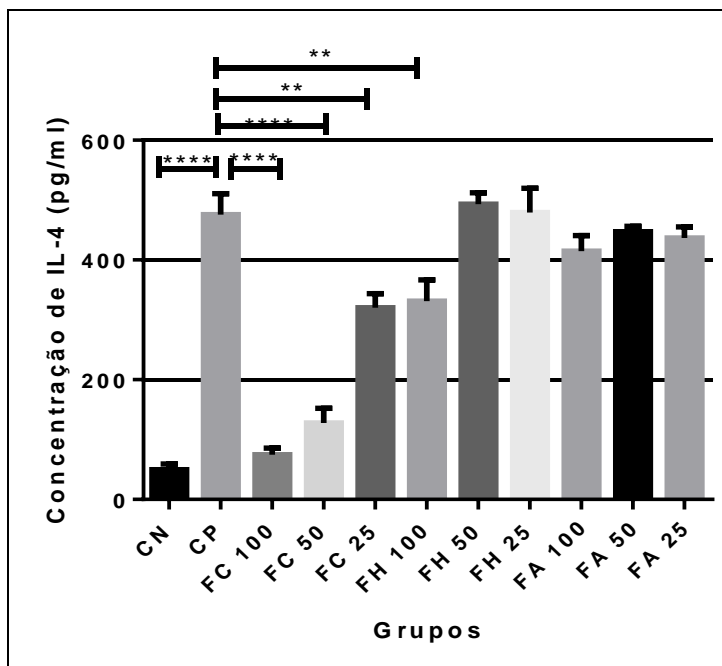


Figura 14: Produção de IL-4 em cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 estimulados com LPS. As células foram incubadas com as frações de *B. dracunculifolia* nas concentrações de 100µg/mL, 50µg/mL e 25µg/mL. Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 6®, expressos como média ± SEM, e foram considerados resultados significativos com $P < 0,05$.

Fonte: A autora (2014).

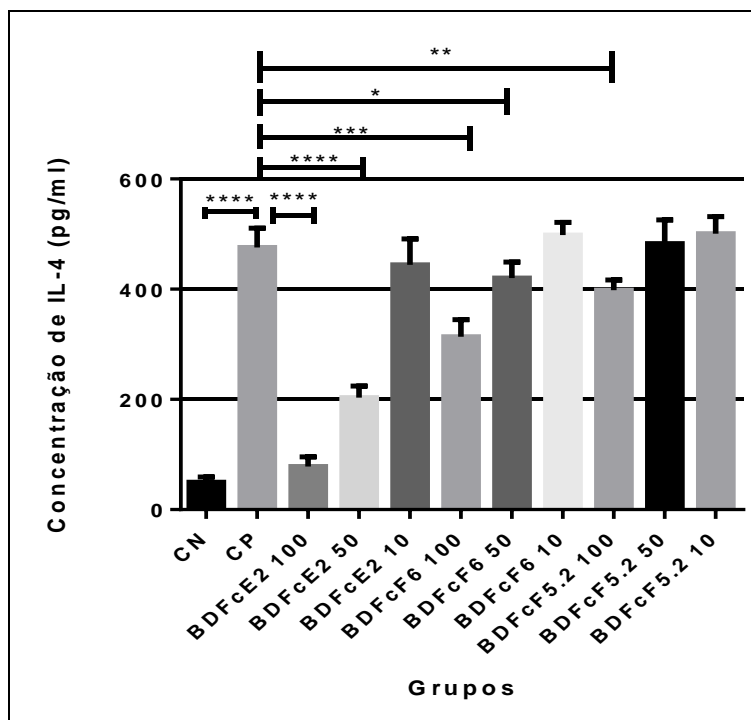


Figura 15: Produção de IL-4 em cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 estimulados com LPS. As células foram incubadas com as substâncias isoladas de *B. dracunculifolia* nas concentrações de 100µg/mL, 50µg/mL e 10µg/mL. Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 6®, expressos como média ± SEM, e foram considerados resultados significativos com $P < 0,05$.

Fonte: A autora (2014).

4.2.2.2 Interleucina 17 (IL-17)

O grupo controle positivo (células com presença de LPS) apresentou altos níveis de IL-17, quando comparado ao controle negativo ($P < 0,001$) (Figuras 16, 17, 18). Com relação aos grupos de células que receberam o extrato bruto de *B. dracunculifolia*, este foi capaz de inibir a produção da citocina nas 3 concentrações testadas de BD 100 µg/mL ($P < 0,001$), BD 50 µg/mL ($P < 0,01$) e BD 25 µg/mL ($P < 0,001$) como demonstrado na Figura 16. As frações clorofórmica, hexânica e aquosa, obtidas do extrato bruto de *B. dracunculifolia*, foram capazes de inibir a produção da IL-17 somente nas suas maiores concentrações, FC 100 µg/mL ($P < 0,001$), FH 100 µg/mL ($P < 0,001$) e FA 100 µg/mL ($P < 0,05$) (Figura 17).

Ao analisarmos as substâncias isoladas testadas, percebemos que somente a substância BDFcF6, nas concentrações 100 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$, obtiveram respostas inibitórias para essa citocina, sendo ($P < 0,01$) e ($P < 0,05$), respectivamente (Figura 18).

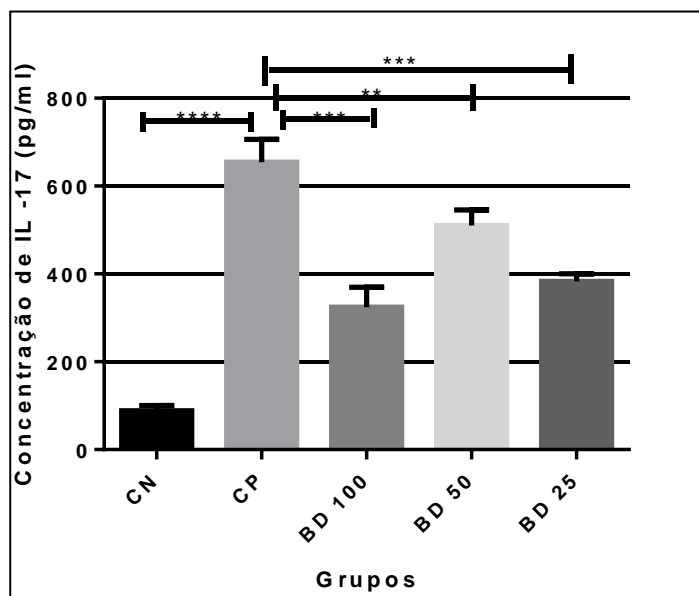


Figura 16: Produção de IL-17 em cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 estimulados com LPS. As células foram incubadas com extratos de *B. dracunculifolia* nas concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ e 25 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 6[®], expressos como média \pm SEM, e foram considerados resultados significativos com $P < 0,05$.

Fonte: A autora (2014).

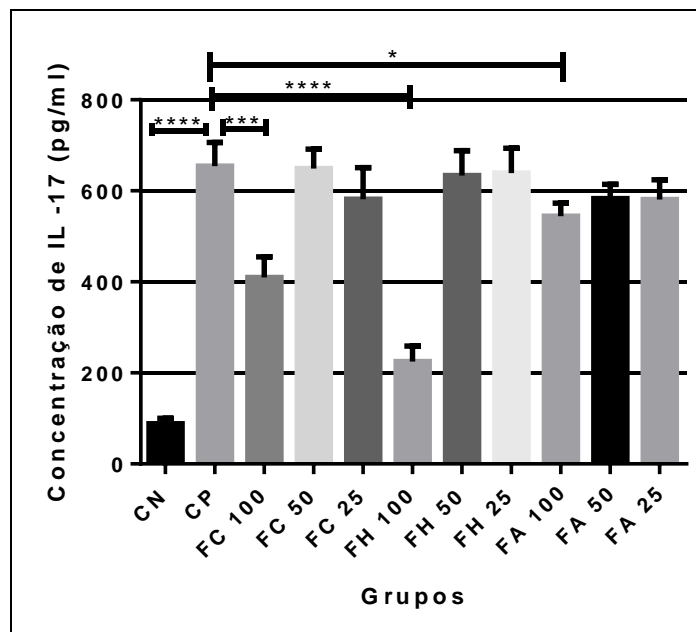


Figura 17: Produção de IL-17 em cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 estimulados com LPS. As células foram incubadas com as frações de *B. dracunculifolia* nas concentrações de 100µg/mL, 50µg/mL e 25µg/mL. Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 6®, expressos como média \pm SEM, e foram considerados resultados significativos com $P < 0,05$.

Fonte: A autora (2014).

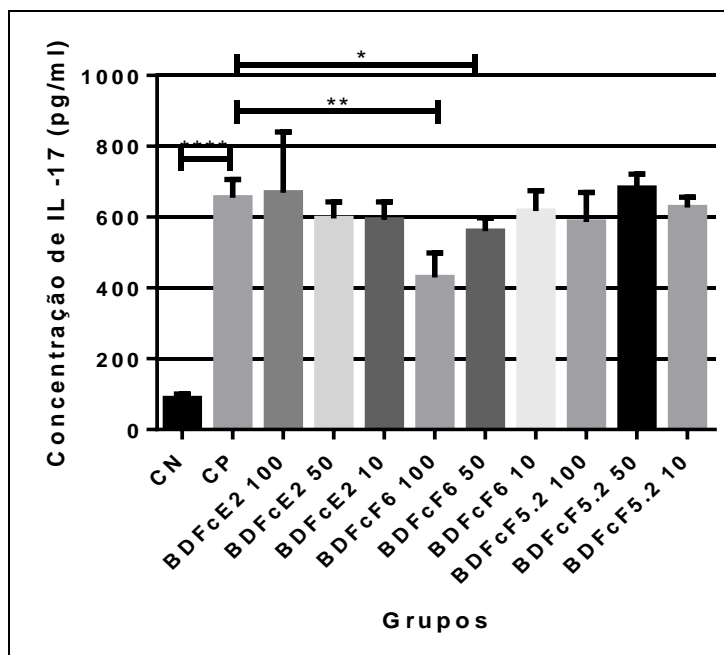


Figura 18: Produção de IL-17 em cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 estimulados com LPS. As células foram incubadas com as substâncias isoladas de *B. dracunculifolia* nas concentrações de 100µg/mL, 50µg/mL e 10µg/mL. Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 6®, expressos como média ± SEM, e foram considerados resultados significativos com $P < 0,05$. Fonte: A autora (2014).

4.2.2.3 Interferon-gama (IFN- γ)

O grupo controle positivo (células com presença de LPS) apresentou altos níveis de IFN- γ , quando comparado ao controle negativo ($P < 0,001$) (Figuras 19, 20, 21). Com relação aos grupos de células que receberam o extrato bruto de *B. dracunculifolia*, esse foi capaz de inibir a produção da citocina nas 2 maiores concentrações testadas de BD 100 µg/mL ($P < 0,001$) e BD 50 µg/mL ($P < 0,01$), como demonstrado na Figura 19. A fração clorofórmica, obtida do extrato bruto de *B. dracunculifolia*, foi capaz de inibir a produção de IFN- γ nas suas 3 concentrações, FC 100 µg/mL ($P < 0,001$), FC 50 µg/mL ($P < 0,001$) e FC 25 µg/mL ($P < 0,05$). Já a fração hexânica inibiu na maior concentração FH 100 µg/mL ($P < 0,001$), e a fração aquosa na menor FA 25 µg/mL ($P < 0,05$) (Figura 20).

Ao analisarmos as substâncias isoladas testadas, percebemos que a substância BDFcE2, nas concentrações 100 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$, obtiveram respostas inibitórias para essa citocina, sendo ($P < 0,001$) e ($P < 0,001$), respectivamente. Já as substâncias BDFcF6 e BDFc5.2 obtiveram respostas na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, sendo ($P < 0,001$) e ($P < 0,01$), respectivamente (Figura 21).

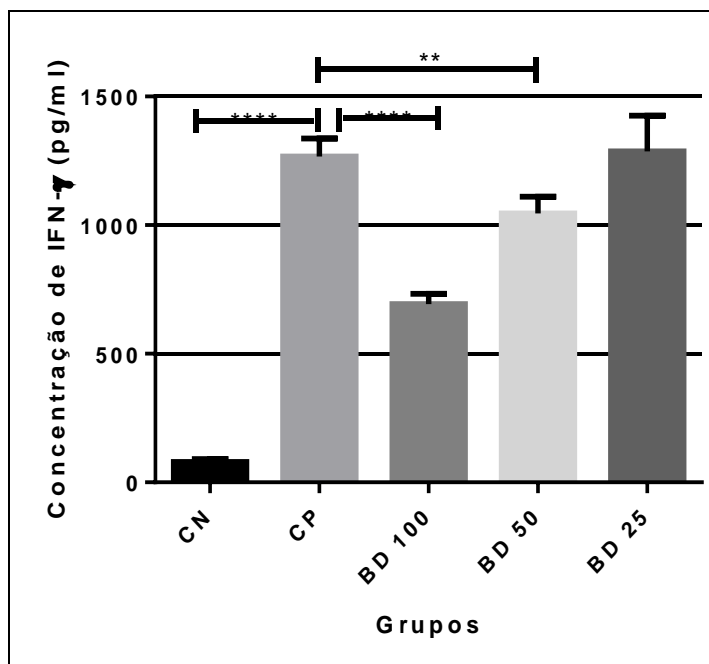


Figura 19: Produção de IFN- γ em cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 estimulados com LPS. As células foram incubadas com extratos de *B. dracunculifolia* nas concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ e 25 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 6[®], expressos como média \pm SEM, e foram considerados resultados significativos com $P < 0,05$.

Fonte: A autora (2014).

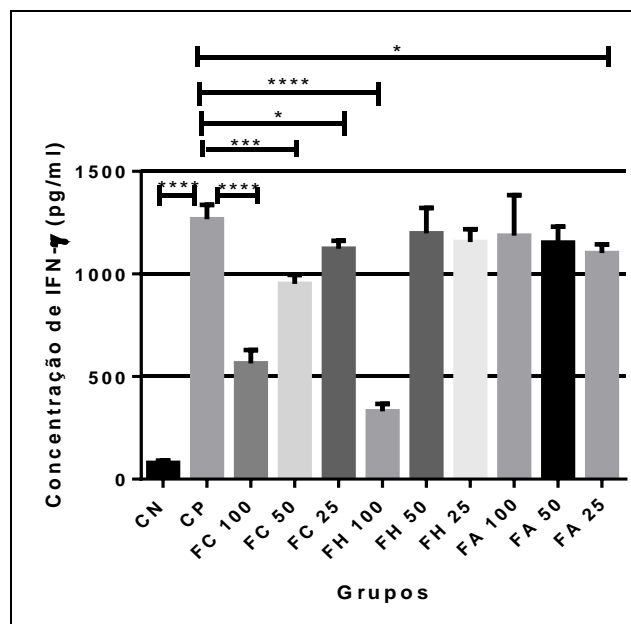


Figura 20: Produção de IFN- γ em cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 estimulados com LPS. As células foram incubadas com as frações de *B. dracunculifolia* nas concentrações de 100 μ g/mL, 50 μ g/mL e 25 μ g/mL. Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 6[®], expressos como média \pm SEM, e foram considerados resultados significativos com $P < 0,05$.

Fonte: A autora (2014).

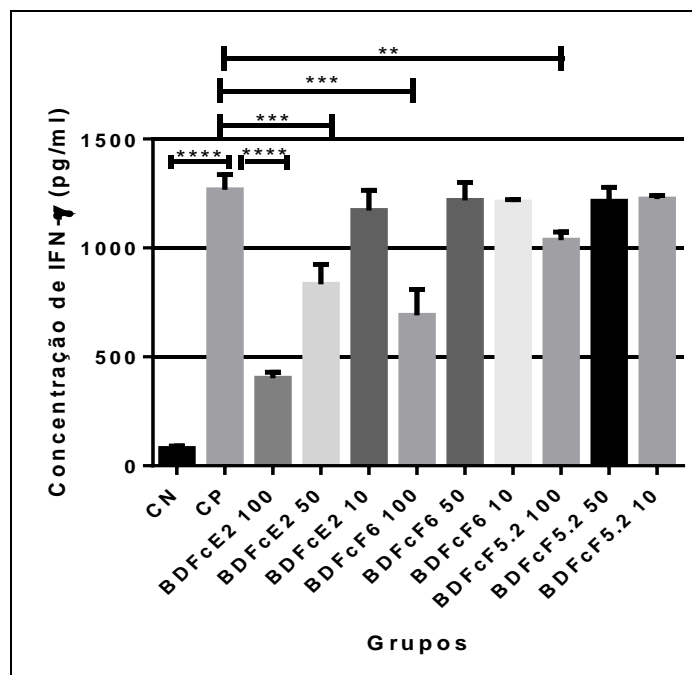


Figura 21: Produção de IFN- γ em cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 estimulados com LPS. As células foram incubadas com as substâncias isoladas de *B. dracunculifolia* nas concentrações de 100 μ g/mL, 50 μ g/mL e 10 μ g/mL. Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 6[®], expressos como média \pm SEM, e foram considerados resultados significativos com $P < 0,05$.

Fonte: A autora (2014).

4.2.2.4 Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)

A citocina TNF- α foi determinada no sobrenadante de células, e o grupo controle positivo (células com presença de LPS) apresentou diferença estatística significativa, com altos níveis de TNF- α , quando comparado ao controle negativo ($P < 0,001$) (Figuras 22, 23, 24). Com relação aos grupos de células que receberam o extrato bruto de *B. dracunculifolia*, esse foi capaz de inibir a produção da citocina nas 3 concentrações testadas BD 100 μ g/mL ($P < 0,001$), BD 50 μ g/mL ($P < 0,001$) e BD 25 μ g/mL ($P < 0,01$), como demonstrado na Figura 22. A fração clorofórmica, obtida do extrato bruto de *B. dracunculifolia*, foi capaz de inibir a produção de TNF- α nas suas 3 concentrações, FC 100 μ g/mL ($P < 0,001$), FC 50 μ g/mL ($P < 0,001$) e FC 25 μ g/mL ($P < 0,01$). Já a fração hexânica inibiu na maior concentração FH 100 μ g/mL ($P < 0,001$), e a fração aquosa não causou inibição (Figura 23).

Ao analisarmos as substâncias isoladas testadas, percebemos que a substância BDFcE2, nas concentrações 100 µg/mL e 50 µg/mL, obtiveram respostas inibitórias para essa citocina, sendo ($P < 0,001$) e ($P < 0,001$), respectivamente. Já a substância BDFcF6 obteve resposta somente na concentração de 100 µg/mL, sendo ($P < 0,01$). A substância BDFcF5.2 não causou resposta, estatisticamente, significativa na inibição dessa citocina (Figura 24).

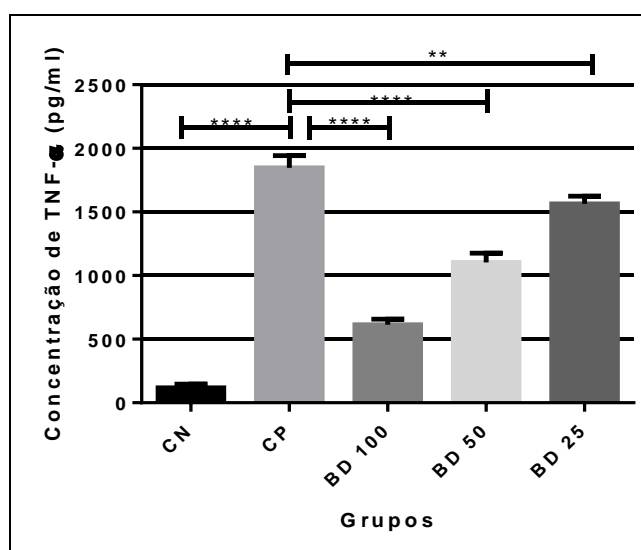


Figura 22: Produção de TNF- α em cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 estimulados com LPS. As células foram incubadas com extratos de *B. dracunculifolia* nas concentrações de 100µg/mL, 50µg/mL e 25µg/mL. Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 6[®], expressos como média \pm SEM, e foram considerados resultados significativos com $P < 0,05$.

Fonte: A autora (2014).

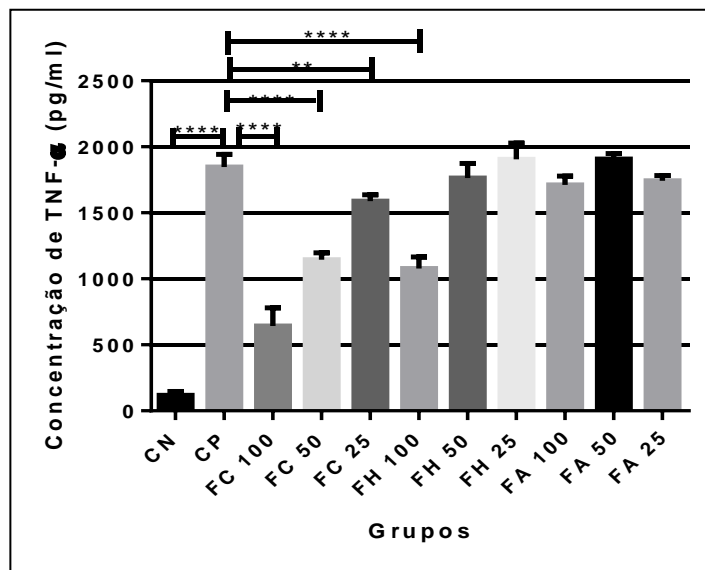


Figura 23: Produção de TNF- α em cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 estimulados com LPS. As células foram incubadas com as frações de *B. dracunculifolia* nas concentrações de 100 μ g/mL, 50 μ g/mL e 25 μ g/mL. Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 6[®], expressos como média \pm SEM, e foram considerados resultados significativos com $P < 0,05$.
Fonte: A autora (2014).

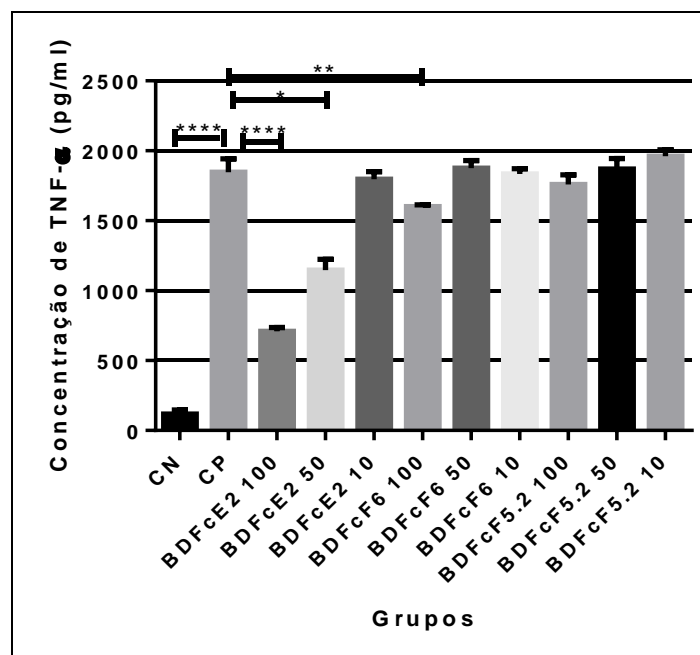


Figura 24: Produção de TNF- α em cultura de esplenócitos de camundongos C57Bl/6 estimulados com LPS. As células foram incubadas com as substâncias isoladas de *B. dracunculifolia* nas concentrações de 100 μ g/mL, 50 μ g/mL e 10 μ g/mL. Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 6[®], expressos como média \pm SEM, e foram considerados resultados significativos com $P < 0,05$.
Fonte: A autora (2014).

Conforme já abordado neste estudo, sabe-se da importância das pesquisas sobre os produtos naturais no que diz respeito à sua atividade imunomodulatória. No entanto, quanto à própolis, que tem como sua principal fonte vegetal a *B. dracunculifolia*, este conhecimento ainda é exíguo, de acordo com Sforcin (2007). O estudo de Bachiega et al. (2013) mostrou efeitos anti-inflamatórios das folhas de *B. dracunculidolia*, bem como de um dos seus componentes majoritários, o ácido cafeico, na inibição da produção de citocinas. A *B. dracunculifolia* demonstrou efeito preventivo e terapêutico no modelo de atividade inflamatória estimulada com LPS. Assim, os resultados obtidos na presente pesquisa confirmam a atividade anti-inflamatória da *B. dracunculifolia*, uma vez que todas as citocinas analisadas também sofreram atividade inibitória quando as células foram estimuladas com LPS, e testadas frente ao extrato bruto da mesma.

Vale salientar que a inflamação é um processo fisiológico que se inicia devido a uma resposta a um dano tecidual causado por uma infecção bacteriana. Os macrófagos são a primeira linha de defesa do sistema imune contra esses agentes nocivos, os quais são estimulados pelo LPS, presente na parede bacteriana, a produzir citocinas pró-inflamatórias, como, por exemplo, o TNF- α e o óxido nítrico, para destruir esses microorganismos. A produção desses mediadores ocorre em várias doenças, como, por exemplo, aterosclerose, doenças neurodegenerativas e câncer (CARDONA, GARCIA, CARDONA, 2013; LEE et al., 2010; PRADHAN, 2007). Moléculas que reduzem a expressão dessas citocinas pró-inflamatórias se fazem importantes para diminuir os danos de doenças crônicas de origens inflamatórias.

Em ensaios realizados por Orsi et al. (2000), a própolis inibiu a produção de NO por macrófagos peritoneais de camundongos. Em outro estudo, realizado por Missima et al. (2007), há uma forte ação ativadora de extrato e compostos isolados de *B. dracunculifolia* também sobre macrófagos.

Assim, corroborando os estudos citados, na presente pesquisa, tanto o extrato bruto quanto as frações e as três substâncias isoladas de *B. dracunculifolia*, ácido (*E*)-4-(2,3-diidrocinamoiloxi) cinâmico, ermanina e beturetol, tiveram importantes atividades inibitórias de NO.

Bachiega et al. (2013), ao analisarem algumas citocinas como IL-6, IL-10 e IL-1 β imunoestimuladas com LPS, comprovaram o efeito inibidor da produção das mesmas após incubação em cultura celular com extrato de *B. dracunculifolia*, o que demonstrou atividade imunomodulatória do extrato bruto e do ácido cafeico. No nosso estudo, a análise das citocinas IL-4, IL17, IFN- γ e TNF- α frente ao extrato bruto e às frações orgânicas, bem como em relação às substâncias isoladas, ácido (*E*)-4-(2,3-diidrocinamoiloxi) cinâmico, ermanina e beturetol, como podemos observar nas Figuras 13 a 24, vem complementar a descoberta da ação moduladora da espécie, uma vez que essas citocinas também foram inibidas.

Quanto às substâncias isoladas nesta pesquisa, quais sejam a ermanina, o beturetol e o ácido (*E*)-4-(2,3-diidrocinamoiloxi) cinâmico, constata-se suas capacidades anti-inflamatórias e inibidoras de citocinas.

A ermanina, 5,7- diidroxi 3,4- dimetoxiflavona, em trabalho anterior, inibiu a proliferação de células de adenocarcinoma mamário humano e de carcinoma de células escamosas orais. A sua utilização mostrou seu potencial de indução apoptótico (SALIMI et al., 2014).

Ainda, essa substância inibiu o desenvolvimento de edema de orelha induzido por PMA (éster de forbol) em camundongos, sendo mais ativa que a indometacina, fármaco controle, na mesma concentração (3 mg/orelha, via tópica), ermanina 95,1% e indometacina 47,3% (COUTINHO et al., 2009). Essa atividade confirma o efeito anti-inflamatório dessa substância já explicitado no trabalho em questão.

Segundo Hattori et al. (2011), o microambiente do tumor é caracterizado por hipóxia, baixo nível de nutrientes e acidose. Moléculas oriundas da própolis verde brasileira, como o beturetol e o ácido (*E*)-4-(2,3-diidrocinamoiloxi) cinâmico, podem ser usadas para o desenvolvimento de novas terapias contra isquemias cardiovasculares e câncer, baseadas na habilidade de induzir ou inibir o fator indutor de hipóxia (HIF)-1, um mediador-chave para a sobrevivência do tumor.

Em nossa pesquisa, essas duas substâncias foram isoladas e estudadas mostrando importantes atividades inibitórias de NO, IL-4, IFN- γ e TNF- α . Ainda a substância beturetol apresentou efeito inibidor de IL-17. Esse tipo de interleucina, relacionada às células Th17, está ativamente envolvido em doenças autoimunes, como na esclerose múltipla, por exemplo (ZHOU et al., 2007; WEI et. al., 2007). Com isso, substâncias inibidoras de IL-17 vêm sendo investigadas como possíveis tratamentos para doenças autoimunes. Nesse sentido, ensaios clínicos realizados com anticorpos anti-IL-17 em pacientes com psoríase (uma doença de origem autoimune) demonstraram resultados bastante promissores no tratamento dessa doença (GARBER, 2012).

Como é sabido, a própolis tem sido utilizada na medicina popular há muitos anos, em diferentes regiões do mundo. Nos últimos anos, têm sido reportadas as várias atividades biológicas da mesma, tais como antimicrobiana, antibacteriana, antioxidante, anticancerígena e imunomodulatória. Sua composição química, bem como da sua principal fonte vegetal, a *B.*

dracunculifolia, é complexa e ainda não é totalmente esclarecida (TAZAWA et al., 1998).

De acordo com Rezende et al. (2014), os compostos fenólicos, baccarina, ácido cafeico, drupanina e artepelin C, presentes no extrato das folhas da *B. dracunculifolia*, possuem eficiente ação hepatoprotetora, corroborando o uso popular dessa espécie vegetal e a importância da mesma para o desenvolvimento de novas condutas terapêuticas.

No estudo realizado, o extrato bruto, as frações orgânicas obtidas, bem como as substâncias isoladas, ácido (*E*)-4-(2,3-diidrocinamoiloxi) cinâmico, beturetol e ermanina, apresentaram importante atividade modulatória do sistema imune, também ratificando o uso popular da espécie.

5 CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico do extrato hidroalcólico bruto das partes aéreas da *B. dracunculifolia* (**BD**) resultou no isolamento e na identificação do ácido (*E*)-4-(2,3-diidrocinamoiloxi) cinâmico, beturetol e ermanina. Dentre os metabólitos isolados, o presente estudo relata, pela primeira vez, a presença do ácido (*E*)-4-(2,3-diidrocinamoiloxi) cinâmico (BDFcE2) nessa espécie.

O extrato hidroalcólico bruto das partes aéreas da *B. dracunculifolia* apresentou atividade anti-inflamatória *in vitro*, corroborando com o potencial anti-inflamatório e imunomodulatório da espécie.

O extrato bruto inibiu a produção de IL-4, IL-17 e TNF- α nas três concentrações testadas; já frente às citocinas NO e IFN- γ , houve inibição apenas nas duas maiores concentrações testadas 100 μ g/mL e 50 μ g/mL.

Foram testadas frações clorofórmica, hexânica e aquosa, provenientes do extrato bruto. A fração clorofórmica foi a que apresentou maior inibição de citocinas quando testadas, o que acarretou em direcionamento do estudo fitoquímico dessa fração com intuito de isolamento de substâncias com potencial imunomodulatório.

As substâncias ácido (*E*)-4-(2,3-diidrocinamoiloxi) cinâmico e ermanina mostraram-se ativas quando testadas frente à produção de NO, IL-4, IFN- γ , TNF- α , *in vitro* por esplenócitos de camundongos C57BL/6.

Já a substância beturetol, mostrou-se ativa frente todas essas citocinas e foi a única que inibiu IL-17.

Finalmente, a análise dos dados obtidos sugere que a *B. dracunculifolia* exerce efeito imunomodulatório *in vitro* e que a utilização dessas substâncias pode ser uma importante estratégia terapêutica a ser empregada no tratamento de doenças inflamatórias e relacionadas ao sistema imunológico. No entanto, estudos adicionais devem ser realizados com as substâncias já isoladas *in vivo*, a fim de conhecer os mecanismos de ação dessas substâncias no organismo humano e definir se os efeitos imunomodulatórios estão relacionados com a presença de um desses compostos, pelo efeito sinérgico desses constituintes, ou mesmo de outros presentes na *B. dracunculifolia*.

REFERÊNCIAS

ALENCAR, S. M. et al. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 909-915, 2005.

AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 71, n.10, p. 1.397-1.421, 2006.

AZEVEDO, M. B. M. N. et al. Antigenotoxicity of artepillin C in vivo evaluated by the micronucleus and comet assays. **Journal of Applied Toxicology**, v. 31, n. 8, p. 714-719, 2011.

BACHIEGA, T.F. et al. Immunomodulatory/antiinflammatory effects of *Baccharis dracunculifolia* leaves. **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters**, v. 27, n. 8, p. 1646-1650, 2013.

BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, n. 1, p. 3-15, 2000.

_____. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 29-31, 2005.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, V.; KADOTA, S. Recent progress in Pharmacological research of propolis. **Phytother. Res.**, v. 15, p. 561-71, 2001.

BARREIRO, E. J. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

_____. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de um novo agente cardioativo. **Química Nova**, v. 25, p. 1.172-1.180, 2002.

BARROS, M. P. et al. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. **Journal Ethnopharmacology**, v. 110, p. 567-571, 2007.

BASTOS, E. M. Origem Botânica e Indicadores de Qualidade da “**Própolis Verde**” Produzida no Estado de Minas Gerais, Brasil. 2001. 137 f. Tese (Doutorado em Entomologia) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001.

BASTOS, J. K. et al. Seasonality role on the phenolics from cultivated *Baccharis dracunculifolia*. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2011.

BILATE, A. M. B. Inflamação, proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas. **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 8, n. 2, jun. 2007.

BOHLMANN, F. et al. Five Diterpenes and Other Constituents from nine *Baccharis* Species. **Phytochemistry**, v. 20, p. 1907-1913, 1981.

BOIK, J. **Cancer and natural medicine**. Princeton: Oregon Medical press, 1996.

BOLDT, P. E. *Baccharis* (Asteraceae): a review of its taxonomy, phytochemistry, ecology, economic status, natural enemies and the potential for its biological control in the United States. USDA, **Agricultural Research Service**, Texas, 1989.

BOWEN, H. et al. “Control of cytokine gene transcription in Th1 and Th2 cells,” **Clinical and Experimental Allergy**, v. 38, n. 9, p. 1422-1431, 2008.

BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R. Morfoanatomia foliar e caulinar de *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, n. 4, p. 47- 483, 2004.

BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R.; SANTOS, C. A. M. O progresso da pesquisa sobre o gênero *Baccharis*, Asteraceae: I – Estudos botânicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 227-268, 2005.

CARDONA, S. M.; GARCIA, J. A.; CARDONA, A. E. The fine balance of chemokines during disease: trafficking, inflammation, and homeostasis. **Methods in Molecular Biology**, v. 1013, p. 1-16, 2013.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, Milão, v. 73, n. 1, p. S1-S6, 2002.

CHEN, H. J. et al. Antiinflammatory effects and chemical study of a flavonoid-enriched fraction from adlay bran. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1741-1748, 2011.

CIFUENTE, D. A. et al. Antiinflammatory activity from aerial parts of *Baccharis medullosa*, *Baccharis rufescens* and *Laennecia sophiifolia* in Mice. **Phytother Res.**, v. 15, p. 529-531, 2001.

COLARES, A. V. et al. *In Vitro* Antileishmanial Activity of Essential Oil of *Vanillosmopsis arborea* (Asteraceae) Baker. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

COPE, G. et al. "The Th1 life cycle: molecular control of INF- γ to IL-10 switching". **Trends in Immunology**, v. 32, n. 6, p. 278-286, 2011.

CORRÊA, J. O. A.; AARESTRUP, B. J. V.; AARESTRUP, F.M. Effect of thalidomide and pentoxifylline on experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Exp Neurol.**, v. 226, p. 15-23, 2010.

CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. **Imprensa Nacional**, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro, 1975.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, ago. 2010.

COSTA, P. R. R. Produtos naturais como ponto de partida para a descoberta de novas substâncias bioativas: candidatos a fármacos com ação antiofídica, anticâncer e antiparasitária. **Revista Virtual de Química**, v. 1, p. 58-66, 2009.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

CROME, S. Q.; WANG, A. Y.; LEVINGS, M. K. Translational Mini-Review Series on Th17 Cells: Function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 159, p. 109-119, 2009.

CRUVINEL, W. M. et al. Sistema Imunitário – Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-61, 2010.

DA SILVA FILHO, A. A. **Estudo fitoquímico, de cultivo e das atividades biológicas de *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae), a principal fonte botânica da própolis verde.** 2006. 188 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade em Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

DA SILVA FILHO, A. A. et al. Antimicrobial activity of the extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). **Z Naturforsch Sect**, v. 63C, p. 40-46, 2008.

DA SILVA FILHO, A. A. Fitoquímica da *Baccharis dracunculifolia*. In: SFORCIN et al. ***Baccharis dracunculifolia*: uma das principais fontes vegetais da própolis brasileira.** São Paulo, SP: Editora da UNESP, 2012. p. 38-43.

DA SILVA FILHO, A. A. et al. Atividades biológicas da *Baccharis dracunculifolia*. In: SFORCIN et al. ***Baccharis dracunculifolia*: uma das principais fontes vegetais da própolis brasileira.** São Paulo, SP: Editora da UNESP, 2012. p. 46-69.

DA SILVA FILHO, A. A. et al. *In Vitro* Antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Fitoterapia**, v. 80, p. 478-482, 2009.

DA SILVA FILHO, A. A. et al. *In Vitro* Trypanocidal activity evaluation of crude extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, p. 1.195-1.199, 2004.

DAMY, S. B. et al. Aspectos fundamentais da experimentação animal – aplicações em cirurgia experimental. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 1, p. 103-111, 2010.

DE CASTRO, S. L. Propolis: Biological and a Pharmacological Activities. Therapeutic Uses of this Bee-Product. **Annual Review of Biomedical Science**, v. 3, p. 49-83, 2001.

DI CARLO, G. et al. Flavonoids: old and New aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, v. 65, n. 4., p. 337-353, 1999.

DUTRA, R. C. et al. Euphol prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice: Evidence for the underlying mechanisms. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, n. 4, p. 531-542, 2012.

FERNANDES-SILVA et al. Breyer Giuseppina Negri chemical profiling of six samples of brazilian propolis. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 237-240, 2013.

FERRACINI, V. L. et al. Essential oils of seven *Baccharis* species. **J Essential Oil Res**, v. 7, p. 355-367, 1995.

FIGUEROA-VEJA, N. et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in autoimmune thyroid disorders (AITD). **Endocrinología y Nutrición**, v. 55, p. 340-345, 2008.

FLETCHER, J. M. et al. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. **Clinical and Experimental Immunology**, p. 1-11, 2010.c

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev Ass Med Brasil**, v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000.

FUKUDA, M. et al. Studies on the constituents of the leaves of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) and their cytotoxic activity. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, n. 10, p. 1.465-8, 2006.

GARBER, K. Anti-IL-17 mAbs herald new options in psoriasis. **Nature Biotechnology**, v. 30, p. 475-77, 2012.

GARCÍA-LAFUENTE, Ana et al. In vitro antiinflammatory activity of phenolic rich extracts from white and red common beans. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/bmc>. Acesso em: 5 ago. 2013.

GERTSCH, J.; VIVEROS-PAREDES, J. M.; TAYLOR, P. Plant immunostimulants – Scientific paradigm or myth? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 385-391, 2011.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre, RS: Editora da UFRGS; Florianópolis, Santa Catarina: Editora da UFSC, 2010. p. 13-28.

GUIMARAES, Natalia S. S. et al. 2011. *Baccharis dracunculifolia*, the main source of green propolis, exhibits potent Antioxidant activity and prevents oxidative mitochondrial damage. 2011. Faltam dados

HADDAD, P. S.; AZZAR, G. A. Groom S, Boivin M. Natural Health Products, Modulation of Immune Function and Prevention of Chronic Diseases. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, p. 515-520, 2005.

HATTORI, Hisanori et al. Isolation, identification, and biological evaluation of HIF-1-modulating compounds from Brazilian green propolis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2011. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/bmc>. Acesso em: 20 jul. 2014.

HEYWOOD, V. H. **Flowering plants of the world**. New York: Oxford University

IKEDA, R. et al. Brazilian propolis-derived components inhibit TNF- α -mediated downregulation of adiponectin expression via different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1810, p. 695-703, 2011.

- JADIDI-NIARAGH, F.; MIRSHAFIEY, A. Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. **Scandinavia Journal of Immunology**, v. 74, n. 1, p. 1-13, July, 2011.
- KOURISH, A. A.; ARAFA, M. M. Propolis derivatives inhibit the systematic antiinflammatory response and protect hepatic and neuronal cells in acute septic shock. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, p. 332-338, 2011.
- KUMAZAWA, S. et al. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical And Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, p. 740-742, 2003.
- LEE, Y. J. et al. Inflammation and Alzheimer's disease. **Archives of Pharmacal Research**, v. 33, p. 1.539-1.556, 2010.
- LEITÃO, D. P. S. et al. Comparative evaluation of in vitro effects of Brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. **Chem Pharm Bull**, v. 27, p. 1834-1839, 2004.
- LEMOS, M. et al. *Baccharis dracunculifolia*, the main botanical source of Brazilian green propolis, displays antiulcer activity. **Chemical And Pharmaceutical Bulletin**, v. 59, p. 603-608, 2007.
- LIN, Ying-zhong et al. 4 Circulating Th22 and Th9 Levels in Patients with Acute Coronary Syndrome. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 2013, p. 1-10, 2013.
- MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v. 19, p. 529-536, 1996.
- MARTINEZ, M. J. A. Biologically active substances from the genus *Baccharis L.* (Compositae). **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 30, p. 703-759, 2005.
- MARTÍNEZ, I. I. et al. Type IV phosphodiesterase inhibition in experimental allergic encephalomyelitis of Lewis rats: Sequential gene expression analysis of cytokines, adhesion molecules and the inducible nitric oxide synthase. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 164, p. 13-23, 1999.

MARTINEZ-CORREA, Hugo A. Extracts from the leaves of *Baccharis dracunculifolia* obtained by a combination of extraction processes with supercritical CO₂, ethanol and water. **Institute of Food Science and Technology (INTAL)**, Carrera 50G, n. 12S-51, Medellin, Colombia, 2011.

MEDEIROS, R. et al. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordiaverbenaceae* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, p. 618-627, 2007.

MELLO, Beatriz C. B. S.; HUBINGER, Miriam D. Antioxidant activity and polyphenol contents in Brazilian green propolis extracts prepared with the use of ethanol and water as solvents in different pH values. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 2.510-2.518, 2012.

MESQUITA JÚNIOR et al. Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 5, p. 552-580, 2010.

MIDDLETON JR., E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 4, p. 673-751, 2000.

MIDORIKAWA, K. et al. Buds of *Baccharis dracunculifolia*: Potent Source of Biologically Active Caffeoylquinic Acids and Labdane-Type Diterpenes of Brazilian Propolis. **Journal of Traditional Medicine**, v. 20, p. 187-194, 2003.

MISSIMA, Fabiane. **Efeito da própolis sobre parâmetros imunológicos de camundongos balb/c submetidos a estresse crônico. 2005. xxx f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.**

_____ et al. Effect of *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) extracts and its isolated compounds on macrophage activation. **J Pharm Pharmacol**, v. 59, p. 463-468, 2007.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, p. 105-111, 2001.

MURAD, J. M. et al. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 331-34, 2002.

MUSSI-PINHATA, M. M.; REGO, M. A. Particularidades imunológicas do pré-termo extremo: um desafio para a prevenção da sepse hospitalar. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 81 (1 Supl), p. S59-S68, 2005.

NAGATANI, Y.; WARASHINA, T.; NORO, T. Studies on the constituents from the aerial part of *Baccharis dracunculifolia* DC. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 49, n. 11, p. 1388-1394, 2001.

_____. Studies on the constituents from the aerial part of *Baccharis dracunculifolia* DC. III. **Natural Medicines**, v. 56, n. 5, p. 195 – 197, 2002a.

_____. Studies on the constituents from the aerial part of *Baccharis dracunculifolia* DC. III. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, n. 5, p. 583-589, 2002b.

NASCIMENTO, E. A. et al. Um marcador químico de fácil detecção para a própolis de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 379-386, 2008.

OLIVEIRA, P. F. et al. In vivo antigenotoxicity of baccharin, an important constituent of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 109, n. 1, p. 35-41, 2011.

OLIVEIRA, Pollyanna Francielli de. Baccharin Prevents Genotoxic Effects Induced by Methyl Methane Sulfonate and Hydrogen Peroxide in V79 Cells. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 8, 2012.

OLIVEIRA, P. S. S. et al. Cratylia mollis 1, 4 Lectin: A New Biotechnological Tool in IL-6, IL-17A, IL-22, and IL-23 Induction and Generation of Immunological Memory. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-6, 2013.

ORSI, R.O. et al. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. **The Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 6, n. 2, p. 205-19, 2000.

ORSI, R. O.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J. M. Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against *Salmonella Typhimurium*. **International Immunopharmacology**, v. 5, p. 359-68, 2005.

ORSI, R. O. et al. Synergistic effect of propolis and antibiotics on the *Salmonella Typhi*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 108-112, 2006.

PARK, Y. K. et al. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1.100-1.103, 2004.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2.502-2.506, 2002.

PARREIRA, N. A. et al. Antiprotozoal, schistosomicidal, and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **Chemistry and Biodiversity**, v. 7, n. 4, p. 993-1001, 2010.

PATIL, Gautam; VISHWKARMA, Umesh. Flavone and Flavone Glycoside From *Cichorium Intybus* Linn. International **Journal Pharmaceutical Sciences and Research**, Madhya Pradesh, Índia, IJPSR, v. 3, n. 3, p. 835-839, 2012.

PAUL, A. T.; GOHIL, V. M.; BHUTANI, K. K. Modulating TNF- α signaling with natural products. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 15-16, p. 725-732, 2006.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; AQUINO NETO, F. R. Própolis: 100 anos de pesquisas e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, p. 321-326, 2002.

PRADHAN, A. Obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes: inflammatory basis of glucose metabolic disorders. **Nutrition Reviews**, v. 65, p. S152-156, 2007.

PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1446-1455, 2007.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

REIS, C. M. F. et al. Atividade anti-inflamatória, antiúlcera gástrica e toxicidade subcrônica do extrato etanólico de própolis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 10, p. 43-52, 2000.

RESENDE, F. A. et al. Inhibition of doxorubicin-induced mutagenicity by *Baccharis dracunculifolia*. **Mutation Research**, 2007. (in press).

RESENDE, F. A. et al. Comparative studies of the (anti) mutagenicity of *Baccharis dracunculifolia* and artemisinin C by the bacterial reverse mutation test. **Molecules**, v. 17, n. 3, p. 2.335-2.350, 2012.

RESENDE, D. O. **Estudo fitoquímico e investigação das atividades antioxidante e leishmanicida de extratos de *Baccharis dracunculifolia* D. C.** (Asteraceae). Franca, 2009. 104 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Franca.

REZENDE, Túlio P. et al. Protective Effects of *Baccharis dracunculifolia* Leaves Extract against Carbon Tetrachloride- and Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Experimental Animals. **Molecules**, v. 19, p. 9.257-9.272, 2014.

ROCHA, Bruno Alves et al. Preparation and thermal characterization of inclusion complex of Brazilian green propolis and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **J Therm Anal Calorim**, v. 108, p. 87-94, 2012.

ROCHA JUNIOR, L. F. da et al. PPAR Agonists in Adaptive Immunity: What Do Immune Disorders and Their Models Have to Tell Us?. **PPAR Research**, v. 2013, Article ID 519724, p. 1-9, 2013.

SALATINO, A. et al. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 33-38, 2005.

SALIMI, M. et al. Anti-proliferative and apoptotic activities of constituents of chloroform extract of *Juglans regia* leaves. **Cell Prolif.**, v. 47, p. 172-179, 2014.

SANTOS, D. A. et al. Antiinflammatory and antinociceptive effects of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) in different experimental models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 2, p. 543-550, 2010.

SANTOS, R. F. et al. Composição química e produtividade dos principais componentes do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC. em função da adubação orgânica. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 14, n. esp., p. 224-234, 2012.

SAWAYA, A. C. H. F. et al. Electrospray Ionization Mass Spectrometry Fingerprinting of Propolis. **Analyst**, v. 129, p. 739-744, 2004.

SFORCIN, J. M.; ORSI, R. O.; BANCOVA, V. Effects of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 301-305, 2005.

SFORCIN, José Maurício. Propolis and the immune System: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 1-14, 2007.

SFORCIN, José Maurício et al. **Baccharis dracunculifolia**: uma das principais fontes da própolis brasileira. São Paulo: UNESP, 2012.

SIEUWERTS, A. M. The MTT Tetrazolium Salt Assay Scrutinized: How to Use this Assay Reliably to Measure Metabolic Activity of Cell Cultures in vitro for the Assessment of Growth Characteristics, IC50-Values and Cell Survival. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v. 33, n. 11, p. 813-823, 1995.

SILVA, J. C. et al. Hydroxychloroquine decreases Th17-related cytokines in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients. **Clinics**, v. 68, n. 6, p. 766-771, 2013.

SIMÕES, L. M. C. et al. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 59-65, 2004.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometria**. New York: W. H. Freeman and Company, 1995.

SOLEYMANINEJADIAN, E.; PRAMANIK, K.; SAMADIAN, E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: cytokines and factors. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 67, p. 1-8, 2012.

SOUSA, J. P. B. et al. A reliable quantitative method for the analysis of phenolic compounds in Brazilian propolis by reverse phase high performance liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, 2007. (in press).

SOUSA, J. P. B. et al. Seasonality role on the phenolics from cultivated *Baccharis dracunculifolia*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1-8, 2011.

SOUSA, João Paulo Barreto de; BASTOS, Jairo Kenupp. Controle de qualidade das partes aéreas da *Baccharis dracunculifolia*. In: SFORCIN et al. **Baccharis dracunculifolia**: uma das principais fontes vegetais da própolis brasileira. São Paulo, SP: Editora da UNESP, 2012. p. 70-85.

TAVARES, D. C. et al. Propolis-induced genotoxicity and antigenotoxicity in Chinese hamster ovary cells. **Toxicol In Vitro**, v. 20, p. 1154-1158, 2006.

TAZAWA, Shigemi et al. Studies on the Constituents of Brazilian Propolis. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 46, n. 9, p. 1.477-1.479, Sep. 1998.

TAZAWA, Shigemi; WARASHINA, Tsutomu; NORO, Tadataka. Studies on the Constituents of Brazilian Propolis II. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 47, n. 10, p. 1.388-1.392, 1999.

THOMSON, W. Propolis. **Med. J. Aust.**, v. 153, p. 654, 1990.

VEDERNIKOV, D. N.; ROSHCHIN, V. I. Extractive Compounds of Betulaceae Family Birch Buds (*Betula pendula* Roth.): IV. Composition of Sesquiterpene Diols, Triols and Flavonoids. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 38, n. 7, p. 753-761, 2012.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. C. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

VUORELA, P. et al. Natural products in the process of finding new drug candidates. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1.375-1.389, 2004.

WEI, L. et al. IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 34.605-10, 2007.

WING, Sakaguchi. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. **Nature Immunology**, v. 11, n. 1, p. 7-13, 2010.

ZDERO, F. C. et al. *Ent*-Clerodanes and other constituents from Bolivian *Baccharis* species. **Phytochemistry**, v. 28, p. 531-542, 1989.

ZHOU, L. et al. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. **Nature Immunology**, v. 8, p. 967-974, 2007.

ZHU, J.; PAUL, W. E. "CD4 T cells: fates, functions, and faults". **Blood**, v. 112, n. 5, p. 1.557-1.569, 2008.