

UNIVERSIDADE VILA VELHA-ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE TERPENOS EM
MACRÓFAGOS RAW 264.7 ESTIMULADOS POR
LIPOPOLISSACARÍDEO**

FRANCIANE MARTINS MARQUES

VILA VELHA - ES
MARÇO/2017

UNIVERSIDADE VILA VELHA-ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE TERPENOS EM
MACRÓFAGOS RAW 264.7 ESTIMULADOS POR
LIPOPOLISSACARÍDEO**

Dissertação apresentada a Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

FRANCIANE MARTINS MARQUES

VILA VELHA - ES
MARÇO/2017

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

M357s

Marques, Franciane Martins.

Atividade anti-inflamatória de terpenos em macrófagos RAW 264.7 estimulados por Lipopolissacarídeo. / Franciane Martins Marques – 2017.

47 f.: il.

Orientador: Marcio Fronza.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Vila Velha, 2017.

Inclui bibliografias.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Citocinas.
I. Fronza, Marcio. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615

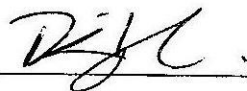
FRANCIANE MARTINS MARQUES

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE TERPENOS EM
MACRÓFAGOS RAW 264.7 ESTIMULADOS POR
LIPOPOLISSACARÍDEO**

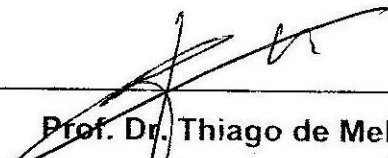
Dissertação apresentada a Universidade
Vila Velha, como pré-requisito do
Programa de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas, para a obtenção do grau
de Mestra em Ciências Farmacêuticas

Aprovada em 29 de Março de 2017,

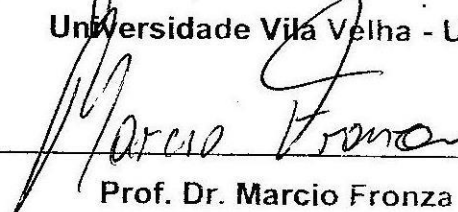
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Rodrigo Rezende Kitagawa
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES



Prof. Dr. Thiago de Melo Costa Pereira
Universidade Vila Velha - UVV



Prof. Dr. Marcio Fronza
Universidade Vila Velha – UVV (Orientador)

Dedico esta Dissertação a minha preciosa família e amigos, que foram essenciais em toda minha trajetória e para esta conquista.

AGRADECIMENTOS

O caminho percorrido para a realização desta pesquisa foi árduo, porém cheio de desafios, oportunidades e alegrias. A troca de experiências e a amizade foram essenciais para a conclusão dessa jornada.

Agradeço a Jeová Deus por estar ao meu lado em todos os momentos, dando-me sabedoria, coragem, força, por me sustentar e não me deixar cair quando as forças pareciam se esvair e pelas oportunidades que me permitiram ter grandes experiências e um grande aprendizado.

Ao meu orientador, Márcio Fronza pela excelente orientação, por todos os ensinamentos, confiança, apoio e conselhos dados e estímulos durante todos esses anos. Sua sabedoria, humildade, paciência, perfeccionismo ao ensinar e motivação que foram essenciais para a conclusão dessa jornada. Obrigada por ser um pesquisador exemplar e uma pessoa admirável. É uma honra inestimável ser sua aluna e orientanda.

Aos meus pais, Joana e Francisco, pelo amor, carinho, dedicação, conselhos dados durante toda a minha vida.

A minha amiga, que eu considero como uma irmã, Luciane, obrigada por acreditar em mim, muitas vezes, mais do que eu. Obrigada pelos conselhos e sempre ter palavras reconfortantes e estimulantes.

A minha grande amiga Maria Eduarda, pelo apoio, amizade incondicional, carinho e por enxugar as minhas lágrimas quando os experimentos não davam certo ou o cansaço era demasiado.

Ao meu grande amigo Edgar, pelo apoio, conversas, incentivo, amizade e pelas inúmeras risadas (muitas mesmo).

Ao meu querido amigo Augusto, pelo apoio, carinho, amizade, pela imensa ajuda durante o desenvolvimento do método com NPS e pelos momentos que compartilhamos no laboratório.

As minhas alunas de iniciação científica, Waléria e Mariana, pela dedicação e garra demonstradas. Sempre me lembrarei de vocês com muito carinho.

Aos meus queridos colegas, Alegna, Jean, Luciana, Ana Cláudia, Cleociane, Layla, Beatriz, Laryssa e Bianca por todos os momentos que

compartilhamos no laboratório, pela ajuda, amizade, carinho, incentivo e conselhos que me deram.

Aos meus queridos companheiros de laboratório por todas as experiências compartilhadas.

Aos professores Dr. Levy Gomes de Carvalho, Dra. Denise Coutinho Endringer pela disposição em ajudar em deixar seus laboratórios à disposição do meu trabalho e pelo carinho ao ensinar.

Ao prof. Dr. Rodrigo Scherer por gentilmente ceder os terpenos analisados neste estudo.

Ao prof. Dr. Thiago de Melo Costa Pereira, pela ajuda, carinho, valiosos ensinamentos, questionamentos e discussões que foram essenciais durante esse projeto.

A prof^a. Dr^a Tamara P. Kondratyuk pelos ensinamentos e dicas que foram de grande importância para o realização deste projeto.

Aos queridos colegas, Silas, Girlandia, Ewelyne e Andrews, por terem sido meus mestres durante minha iniciação científica e terem sido sempre grandes exemplos de profissionais. Aprendi com o exemplo de vocês a amar a pesquisa científica, a correr atrás dos meus objetivos e a nunca desistir por mais difícil que a caminhada fosse.

Agradeço a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À UVV e todos os professores e funcionários do PPGCF e biopráticas; à CAPES, FAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro e a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Finalmente, agradeço a todos os meus amigos, da vida acadêmica e pessoal, e aos profissionais que de alguma forma me auxiliaram ao longo deste projeto, dando muito apoio, carinho e me proporcionando conhecimento.

Obrigado a todos!!!

“Sem sonhos a vida não tem brilho, sem metas os sonhos não têm alicerces, sem prioridades os sonhos não se tornam reais. Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e corra riscos para executar seus sonhos. Melhor é errar por tentar do que errar por omitir”.

Augusto Curry

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	iv
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	8
2. MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1. <i>REAGENTES QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS</i>	13
2.2. <i>AQUISIÇÃO DOS TERPENOS</i>	13
2.3. <i>SEQUESTRO DO RADICAL NO</i>	13
2.4. <i>LINHAGEM CELULAR</i>	14
2.5. <i>ENSAIO DO MTT</i>	14
2.6. <i>SULFORODAMINA B (SRB)</i>	15
2.7. <i>REDUÇÃO DA PRODUÇÃO DO ÂNION SUPERÓXIDO (O₂⁻)</i>	15
2.8. <i>ENSAIO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H₂O₂)</i>	16
2.9. <i>PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO INDUZIDO POR LPS EM MACRÓFAGOS RAW 264.7</i>	16
2.10. <i>QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS</i>	17
2.11. <i>DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DO FATOR NUCLEAR KAPPA B</i>	17
2.12. <i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	18
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4. CONCLUSÃO	29
5. REFERENCIAS	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeito dos terpenos sobre a produção de ânion superóxido *in vitro*. Macrófagos RAW 264.7 foram expostos com os terpenos (10, 50 e 100 μM) por 2 h seguido da adição ou não de LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Ácido gálico (AG) 50 μM foi usado como controle positivo. A produção do ânion superóxido foi determinada após 24 h utilizando o reagente colorimétrico. (A) Monoterpenos: L-carveol, L-carvona e m-cimeno e (B) Sesquiterpenos: guaieno e valenceno. Os resultados foram expressos como média \pm DP de três experimentos independentes. * Significativo quando $p < 0,05$ comparado com o controle +LPS. # controle *versus* controle + LPS.

Figura 2. Redução dos terpenos sobre a produção de óxido nítrico (NO) *in vitro*. Os macrófagos RAW 264.7 foram expostos com ou sem os terpenos e após 2 h, foram estimulados com LPS. (A) Monoterpenos: L-carveol, L-carvona e m-cimeno e (B) Sesquiterpenos: guaieno e valenceno foram medidos 24 h mais tarde utilizando o reagente de Griess tal como descrito na seção de materiais e métodos. L-NMMA 500 μM foi usado como controle positivo. Os resultados foram expressos como média \pm DP de três experiências independentes. * Significativo quando $p < 0,05$ comparado com o controle com células induzidas por LPS.

Figura 3. Os monoterpenos reduzem a concentração das citocinas pró e anti-inflamatória (TNF- α , IL-1 α e IL-10) *in vitro*. Macrófagos RAW 264.7 foram expostos com os terpenos e após 2 h receberam ou não estímulo com LPS. (A) TNF- α (B) IL-1 α e (C) IL-10. Os níveis das citocinas foram medidos 24 h mais tarde utilizando kits por ELISA como descrito na seção de material e métodos. Os resultados foram expressos como média \pm DP de três experiências independentes. * Significativo quando $p < 0,05$ comparado com o controle com células induzidas por LPS.

Figura 4. Os sesquiterpenos reduzem a concentração das citocinas pró e anti-inflamatória (TNF- α , IL-1 α e IL-10) *in vitro*. Os macrófagos RAW 264.7

foram expostos com os terpenos e após 2 h receberam ou não estímulo com LPS. (A) TNF- α (B) IL-1 α e (C) IL-10. Os níveis das citocinas foram medidos 24 h mais tarde utilizando kits por ELISA como descrito na seção de material e métodos. Os resultados foram expressos como média \pm DP de três experiências independentes. * Significativo quando $p < 0,05$ comparado com o controle com células induzidas por LPS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeitos dos terpenos na concentração de 50 μM na viabilidade celular e percentual de inibição da produção de NO em macrófagos RAW 264.7

Tabela 2. Representação do efeito de diferentes concentrações de terpenos sobre a atividade do fator de transcrição nuclear kappa B em cultura de células renais embrionárias humanas 293.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LPS - Lipopolissacarídeo

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

SRB - Sulforodamina B

NO - Óxido nítrico

iNOS - Óxido nítrico sintase induzível

NPS - Nitroprussiato de sódio

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral-Alfa

IL-1 α – Interleucina 1 alfa

IL-10 – Interleucina 10

NF- κ B - Fator nuclear kappa b

O₂^{•-}- Ânion superóxido

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

g – Grama

μ g – Micrograma

μ L – Microlitro

°C – Grau Celsius

% - Porcentagem

h - Hora

L – Litros

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mm - Milímetro

mM - Milimolar

min - Minuto

nm - Nanômetro

M - Molar

mM - milimolar

μ M – Micromolar

ERs - Espécies reativas

EROs - Espécies reativas de oxigênio

ERNs - Espécies reativas de nitrogênio

MIC - Concentração inibitória mínima

ELISA - Ensaio imunoenzimático
NBT - Cloreto de nitroazul tetrazólico
TPCK - Np-Tosil-L-fenilalanina clorometilcetona
L-NMMA - Acetato de NG-metil-L-arginina
DMSO - Dimetilsulfóxido
TCA - Ácido tricloroacético
KOH - Hidróxido de potássio
DMEM - Meio Eagle Modificado por Dulbecco
COX-2 - Ciclooxygenase 2
UI – Unidade Internacional
UVV – Universidade Vila Velha

RESUMO

MARQUES, Franciane Martins, M.Sc, Universidade Vila Velha - ES, março de 2017.
Atividade anti-inflamatória de terpenos em macrófagos RAW 264.7 estimulados por Lipopolissacarídeo. Orientador: Prof. Dr. Marcio Fronza.

A inflamação é um processo natural e complexo, necessário para a defesa do organismo. Porém uma resposta inflamatória excessiva pode causar danos irreversíveis no tecido e induzir até mesmo a morte celular. O uso excessivo de drogas anti-inflamatórias aliado aos seus efeitos colaterais faz necessária a pesquisa de novas opções terapêuticas. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito anti-inflamatório de cinco terpenos (L-carveol, L-carvona, m-cimeno, guaieno e valenceno) em linhagem de macrófagos RAW 264.7 estimulados com lipopolissacarídeos (LPS). A viabilidade celular foi determinada pelos métodos colorimétricos do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e sulfurodamina B (SRB). A determinação da influência sobre produção de óxido nítrico (NO), citocinas pró e anti-inflamatórias (TNF- α , IL-1 α e IL-10) e fator nuclear kappa b (NF- κ B) foram realizadas utilizando reagente de Griess, kit de ensaio imunoenzimático (ELISA) e pela medida da quimioluminescência, respectivamente. Para avaliar o potencial inibitório de espécies reativas de oxigênio, foi analisado o efeito inibitório dos terpenos sobre a produção do ânion superóxido (O₂⁻), o efeito protetor dos terpenos contra o dano oxidativo do peróxido de hidrogênio em macrófagos, e a atividade sequestrante do radical NO. No método para avaliação da concentração de citocinas todos os terpenos apresentaram aumento do nível da citocina anti-inflamatória IL-10 na concentração de 100 μ M de até 278,9 \pm 76,0% para o sesquiterpeno (guaieno) e de 69,1 \pm 12,7% para o monoterpeno (L-carvona). Os terpenos com exceção do guaieno reduziram as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 α . Além disso, todos apresentaram inibição sobre a produção de NO especialmente na concentração de 100 μ M, onde o guaieno e m-cimeno obtiveram as maiores inibições de 52,3 \pm 24,5% e 36,8 \pm 6,5%, respectivamente, porém nenhum dos terpenos demonstraram influencia no sequestro deste radical. O L-carveol e m-cimeno foram inibidores significativos da produção do O₂⁻, obtendo redução significativa de 71,3 \pm 11,5% e 59,6 \pm 21,4%; e 52,7 \pm 21,5% e 55,7 \pm 21,2% nas concentrações de 10 e 100 μ M, respectivamente. O valenceno apresentou o maior potencial na supressão de NF- κ B na concentração de 100 μ M, obtendo inibição de 22,1%. Tais resultados indicam que esses terpenos apresentam propriedades anti-inflamatórias demonstrando possuir um potencial terapêutico e que poderão ser utilizados como possíveis agentes supressores da inflamação.

Palavras-chaves: óxido nítrico, citocinas, NF- κ B, ânion superóxido, peróxido de hidrogênio.

ABSTRACT

MARQUES, Franciane Martins, M.Sc, Universidade Vila Velha - ES, March 2017.
Anti-inflammatory activity of terpenes lipopolysaccharide- stimulated in RAW 264.7 macrophages. Adviser: Prof. Dr. Marcio Fronza.

Inflammation is a natural and complex process, necessary for the defense of the organism. However, an excessive inflammatory response can cause irreversible tissue damage and even induce cell death. The excessive use of anti-inflammatory drugs and their side effects makes it necessary to investigate new therapeutic options. In this context, the objective of the present work was to investigate the effect of five terpenes (L-carveol, L-carvone, m-cimene, guaiene and valencene) on the inflammatory process in lipopolysaccharide-stimulated (LPS) macrophage RAW 264.7 lineage. Cell viability was determined by the de 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) - 2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and sulforhodamine B (SRB) colorimetric methods. The determination of the influence on the production of nitric oxide (NO), pro and anti-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 α and IL-10) and nuclear factor kappa B (NF- κ B) were performed using Griess reagent, immunoenzymatic assay kit (ELISA) and chemiluminescence measurements, respectively. For to evaluate the inhibitory potential of reactive oxygen species, was analyses the inhibitory effect of terpenes on superoxide anion production ($O_2^{\cdot-}$), the protective effect of terpenes against oxidative damage of hydrogen peroxide on macrophages, and the sequestering activity of radical NO. In the method to evaluate the concentration of cytokines, all terpenes showed an increase in the level of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in the concentration of 100 μ M up to $278.9 \pm 76.0\%$ for sesquiterpene (guaiene) and $69.1 \pm 12.7\%$ for monoterpene (L-carvone). Terpenes with the exception of guaiene have reduced the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 α . In addition, all of them showed inhibition on NO production especially at the concentration of 100 μ M, where guaiene and m-cymene obtained the highest inhibitions of $52.3 \pm 24.5\%$ and $36.8 \pm 6.5\%$, respectively, but none of the terpenes showed influence in the sequestration of this radical. L-carveol and m-cymene were significant inhibitors of $O_2^{\cdot-}$ production, obtaining a significant reduction of $71.3 \pm 11.5\%$ and $59.6 \pm 21.4\%$; And $52.7 \pm 21.5\%$ and $55.7 \pm 21.2\%$ at concentrations of 10 and 100 μ M, respectively. Valencene had the highest potential in the suppression of NF- κ B concentration of 100 μ M, obtaining inhibition of 22.1%. These results indicate that these terpenes exhibited anti-inflammatory activity showing a therapeutic potential and that could be used as possible suppressive agents of inflammation.

Key words: Nitric oxide, cytokines, NF- κ B, superoxide anion, hydrogen peroxide.

1. INTRODUÇÃO

A inflamação é um processo natural e complexo do organismo que ocorre em função de uma lesão tecidual ou proveniente de um processo infeccioso, com consequente exposição à endotoxinas como lipopolissacarídeos (LPS) [1,2].

A resposta inflamatória está ligada ao processo de controle e eliminação do agente lesivo e envolve várias células do sistema imune, mediadores moleculares e vasos sanguíneos [3-6].

A função da inflamação é eliminar a causa inicial da lesão, coordenar as reações do sistema imune inato, eliminar as células lesadas e os tecidos danificados para iniciar a reparação dos tecidos e restaurar a sua função [3,4,7,8]. Compreender essa resposta, já que a inflamação e o sistema imune estão estreitamente inter-relacionados, é essencial para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas no tratamento dos processos inflamatórios.

A imunidade inata é mediada por um grupo de receptores chamados receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Os principais PRRs são o receptor tipo Toll (TLR), receptor de lectina do tipo C (CLR), receptor tipo NOD (NLR) e o receptor RIG-I (RLR) [9-12]. Os PRRs detectam a presença de patógenos através do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos conservados (PAMPs) ou padrões moleculares associados a micróbios (MAMPs), além de se ligarem a moléculas endógenas liberadas de células danificadas ou moribundas, que são conhecidas como padrões moleculares associados a perigo (DAMPs) [9, 13-15]. Exemplos de PAMPs incluem lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), flagelina, DNA, lipoproteínas e peptidoglicanos, já alguns DAMPs são cristais de ácido úrico, ATP extracelular e fosfolipídeos oxidados [9,12-14,16-19]. Uma vez ativados, esses PRRs, iniciam as vias de sinalização induzindo o mecanismo de defesa imediata e promovendo a resposta imune adaptativa [15,20]. Um exemplo muito conhecido de PAMPs é o LPS que está presente na membrana de bactérias gram-negativas sendo este um dos mais potentes ativadores de macrófagos [21-24].

O LPS é um importante gatilho para o processo inflamatório, pela sua interação com PRRs como o receptor tipo toll, o TLR4 [4, 24-27]. A indução do LPS estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias e de citocinas, ativação do NF- κ B, além de promover um fenótipo M1(ativação clássica), resultando em um aumento de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria (EROs) [26-29].

A resposta celular na inflamação aguda é mediada por neutrófilos, basófilos, mastócitos, eosinófilos, macrófagos, células dendríticas e epiteliais [3,4]. Os macrófagos são células do sistema imunológico que se destacam como células efetoras atuando nas linhas de defesa contra a invasão microbiana. Além disso, estão relacionados a diferentes funções biológicas como a remodelação tecidual durante a embriogênese, o reparo de ferimentos e podem ainda iniciar a resposta inflamatória [30-32]. Os principais mecanismos de ação dessas células envolvem a produção de espécies reativas de oxigênio, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, processamento e apresentação de antígenos, além do recrutamento de outras células do sistema imunológico [2,30,33,34].

O fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) é um importante fator de transcrição envolvido na ativação celular, resposta imune, proliferação celular e processo inflamatório [2,24]. A cascata de sinalização do NF- κ B está relacionada com a resposta inflamatória dos macrófagos [35]. Quando ativado, o NF- κ B induz a expressão de genes pró-inflamatórios, incluindo quimiocinas, citocinas tais como fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina (IL) -1, e a codificação de enzimas como a ciclooxigenase-2 (COX-2) e iNOS [1,2,35-37].

As citocinas são consideradas mediadores de grande importância na condução da resposta inflamatória, permitindo que o processo de cicatrização e a resolução do processo inflamatório sejam possíveis [38]. As citocinas pró-inflamatórias induzem a produção de óxido nítrico (NO) através do estímulo da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), além de induzirem a migração de outras citocinas para o local [38]. TNF- α e IL-1 são consideradas as principais citocinas pró-inflamatórias [38]. Por outro lado, as citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, agem como controladores do processo inflamatório, reduzindo possíveis danos gerados pelo excesso de citocinas pró-inflamatória [38].

O óxido nítrico é um radical livre gerado a partir da L-arginina através da ação da enzima NO-sintase (constitutiva cNOS (nNOS e eNOS) ou induzível iNOS) e está envolvido principalmente no relaxamento vascular [39]. Entretanto, ao ser produzido pela iNOS apresenta ação citotóxica e citostática, destruindo microrganismos, parasitas e células tumorais [39]. O NO pode gerar intermediários do oxigênio, como o peroxinitrito (ONOO⁻), um poderoso oxidante de proteínas, gerado a partir da reação com o ânion superóxido [39].

Embora a inflamação seja um mecanismo de proteção do corpo, quando ocorre uma resposta inflamatória excessiva, pode gerar danos irreversíveis nos tecidos, induzir falência de órgãos ou mesmo causar a morte [40,41]. Existe uma grande variedade de fármacos anti-inflamatórios disponíveis para o tratamento de doenças inflamatórias agudas e crônicas, mas a sua utilização contínua pode levar a vários efeitos secundários [42,43-46]. Por esta razão, há uma crescente procura de novos fármacos com maior eficácia terapêutica e menos efeitos nocivos ao organismo.

Diversas plantas medicinais, devido as suas propriedades terapêuticas, e sua ampla diversidade e variedade de constituintes químicos, muitas vezes são utilizadas como o primeiro recurso para o tratamento das mais variadas enfermidades [43,47-50]. Os óleos essenciais são obtidos de plantas aromáticas possuindo como principais características a volatilidade, o forte odor, aspecto oleoso, pouca solubilidade em água e pouca estabilidade em ambientes com luz, ar e calor [51,52]. Apresentam um grande potencial industrial como agentes terapêuticos na aromaterapia, indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética [53-57].

Os terpenos são considerados os componentes majoritários dos óleos essenciais e apresentam inúmeras atividades terapêuticas tais como atividade antimicrobiana, antinoceptiva, neuroprotetora, vasorelaxante, antifúngica, antiparasitária, antiviral, anti-alérgica, antiespasmódica, anti-hiperglicêmica, anti-inflamatória, além de propriedades imunomodulatórias [59-65]. Quimicamente os terpenos são classificados de acordo com o número de unidades de isoprenos (uma molécula com 5 átomos de carbono) em hemi (C5), mono (C10), sesqui (C15), di (C20), tri (C30), tetraterpenos (C40) e politerpenos (C > 40) [61,66].

Os terpenos isolados têm sido alvo de estudos que procuram investigar suas potencias atividades biológicas, bem como seus possíveis mecanismos de ação. Dentre os compostos com potencial atividade biológica, o L-carveol, a L-carvona, o m-cimeno, o valenceno e o guaieno merecem atenção devido as suas estruturas químicas de monoterpenos e de sesquiterpenos.

Os monoterpenos são conhecidos por apresentarem diferentes efeitos biológicos com destaque para as propriedades antimicrobianas [67], antitumorais [68,69], analgésicas [68,70] e anti-inflamatórias [71].

Os sesquiterpenos são compostos altamente lipofílicos e apresentam principalmente efeito antioxidante, antitumoral, antiparasitário e anti-inflamatório [72].

A L-carvona, um monoterpene encontrado principalmente na hortelã (*Mentha spicata* L.) [73], possui potencial antimicrobiano com zonas de inibição de 14-28 mm e valores de MIC de 59,4-170,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra os microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Alternaria solani*, *Rhizopus solani*, *Alternaria alternate* e *Rhizopus* spp [74], além do efeito anestésico sobre os sistemas nervoso periférico e central na concentração de 100 mg/kg em modelo com ratos [75,76]. Patel e colaboradores [77] avaliaram os efeitos DA L-carvona na proliferação celular, indução da apoptose e geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células de câncer de mama MCF-7 e constataram que a L-carvona reduziu a proliferação celular com IC_{50} de 1,2 mM, induziu a apoptose nas concentrações de 0,6 mM a 2,4 mM com um aumento de 10 - 25% após 48 h quando comparado ao período de 24 h e aumentou significativamente a produção de EROs e os níveis de GSH nas concentrações de 1,2 e 2,4 mM.

O carveol pertence à classe dos monoterpenos monocíclicos, apresenta efeito nematocida sobre *Meloidogyne incógnita* [78], efeito repelente sobre *Anopheles gambiae* [79], agente quimiopreventivo eficaz para o cancer da mama de rato [80] e inibição da função de receptores acetilcolina $\alpha 7$ nicotínicos humanos [81].

O m-cimeno é um monoterpene com fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{14}$, descrito por possuir atividade antimicrobiana sobre o *Bacillus cereus* e, ao ser combinado com outro monoterpene com estrutura similar, o carvacrol, apresentou maior efeito antimicrobiano [82].

Valenceno é um sesquiterpene bicíclico presente em diversos óleos essenciais do gênero Citrus [83]. O valenceno em estudos anteriores apresentou efeito cicatrizante em lesões de pele de ratos e efeito anti-inflamatório [84], antiproliferativo e pró-oxidativo em células de câncer CaCo-2, além de efeito antioxidante em células primárias de hepatócitos de ratos [85].

O guaieno é um terpeno pertencente a classe dos sesquiterpenos. De acordo com o estudo realizado por Mendes e colaboradores [86], possui atividade anti-inflamatória ao ser isolado do extrato de frutas de *Pittosporum undulatum*. Silva-Filho e colaboradores [87] comprova a atividade anti-inflamatória in vitro e in vivo do

óleo essencial de patchouli (*Pogostemon cablin*) onde o guaieno foi identificado como um dos compostos majoritários.

Apesar dos óleos essenciais serem amplamente difundidos e utilizados pela indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia, poucos estudos retratam as propriedades biológicas dos terpenos isolados. Neste contexto, no presente estudo, realizamos um *screening* com 33 terpenos para a atividade anti-inflamatória, selecionando os mais ativos para uma investigação mais detalhada dos seus efeitos anti-inflamatórios *in vitro* em células de macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Reagentes químicos e bioquímicos

Kits de ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção das citocinas: IL-1 α , IL-10 e TNF- α foram adquiridos da eBioscience, San Diego, Califórnia, EUA. Nitroprussiato de sódio dihidratado (NPS) foi adquirido da Neon Comercial Ltda. Lipopolissacarídeo (LPS), sulforodamina B (SRB), acetato de NG-metil-L-arginina (L-NMMA), cloreto de nitroazul de tetrazólio (NBT), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ácido gálico, Np-Tosil-L-fenilalanina clorometilcetona (TPCK), e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) humano, foram adquiridos da Sigma Aldrich® Chemical Co, St. Luís, MO, EUA. Dual-Luciferase® Reporter Assay System 10-Pack foi obtido na Promega Corporation, EUA). Todos os demais reagentes utilizados apresentavam grau analítico e foram obtidos a partir de várias fontes comerciais.

2.2. Aquisição dos terpenos

Os terpenos, sendo em seu total 33, foram adquiridos da Sigma Aldrich® Chemical Co, St. Luís, MO, EUA com alto teor de pureza (acima de 98%), e armazenados de acordo com as recomendações do fabricante. Terpenos selecionados: (-)-Borneol, (+)-Borneol, (-)- α -Bisabolol, (+)-Carvona, (+)- α -Pineno, (+)- β -Pineno, (\pm)-Citronelal, (R)-(+)-Limoneno, Canfeno, Cânfor, Carvacrol, Citral, Eucaliptol, Eugenol, Geraniol, Guaieno, L-Carveol, L-Carvona, Linalol, m-Cimeno, Mirceno, Ocimeno, p-Cimeno, Sabineno, Terpeneol, Terpinoleno, Timol, Valenceno, α -Humuleno, α -Felandreno, β -Cariofileno, β -Citronelol, γ -Terpineno.

2.3. Sequestro do radical NO

A inibição de óxido nítrico foi realizada pela determinação indireta sobre o sequestro do radical NO em solução contendo nitroprussiato de sódio (NPS) usando a reação de Griess descrita por Bates e colaboradores [88] com modificações. A solução de NPS 2,5 mM (diluída em água) foi adicionada a diferentes concentrações da amostra (0,0625 mM - 2 mM) dissolvida em etanol e incubada à 37°C durante 10 min. A concentração de nitrito nas amostras foi determinada através da reação de Griess [89] após a adição de 150 μ L da solução contendo amostra e NPS com 150 μ L de reagente de Griess (1% sulfanilamida em 5% ácido fosfórico e 0,1% de diidrocloreto de naftiletlenodiamina em água). A densidade óptica foi medida a 540

nm utilizando um leitor de microplacas (Leitor de Microplacas Multi-Mode, Filter Max F5, Molecular Devices Spectra, EUA) e a quantificação do NO foi calculada através da análise de regressão a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio. Os resultados foram expressos em percentagem de inibição do NO comparando as concentrações de nitrito no grupo tratado ao grupo controle com NPS.

2.4. Linhagem celular

Foram utilizadas as células de fibroblastos 3T3 (American Type Culture Collection - ATCC® CCL-92™), hepatoma de camundongos (Hepa 1c1c7) (ATCC® CRL-2026™), macrófagos RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™) e carcinoma pancreático humano (MIA PaCa-2 -ATCC® CRL-1420™) todas adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro, Brasil. Células renais embrionárias humanas 293 – (293.12 – PTA-5554) transfectadas com o gene que expressa a luciferase - (Panomic, Fremont, CA) (retrovirus) foram gentilmente cedidas pela Prof Dra Tamara P. Kondratyuk (Universidade do Hawai em Hilo, USA). As células foram cultivadas em meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM - Sigma Aldrich® Chemical Co, St. Luís, MO, EUA) ou meio de cultura modificado com alto teor de glicose (DMEM - Gibco-BRL Life Biotechnologies, Grand Island, Nova Iorque, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS- Sigma Aldrich® Chemical Co, St. Luís, MO, EUA), 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma Aldrich® Chemical Co, St. Luís, MO, EUA), a 37°C, numa atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂.

2.5. Ensaio do MTT

A viabilidade celular dos terpenos foi avaliada pelo método colorimétrico do MTT [90] com modificações. Em resumo, as células de fibroblastos 3T3, macrófagos RAW 264.7, carcinoma pancreático humano (MIA PaCa-2) e células de hepatoma de camundongos (Hepa 1c1c7) foram plaqueadas na concentração de 7×10^4 células/mL em placas de 96 poços e cultivadas por 24 h com concentrações crescentes dos terpenos (1 – 1000 µM). A camptotecina (10 µM) foi utilizada como controle positivo. Após o período de incubação de 24 h, 100 µL de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (5 mg/mL) foi adicionado em cada poço e os cristais de formazana formados foram dissolvidos com dimetilsulfóxido (DMSO). A densidade óptica foi medida a 595 nm, usando um leitor de microplacas

(Multi-Mode Microplate Reader, Filter Max F5, Molecular Devices Spectra, USA). Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.6. Sulforodamina B (SRB)

O método do SRB foi usado para determinar a viabilidade celular [91-93]. Resumidamente, as células de macrófagos RAW 264.7 e células renais embrionárias humanas 293 foram plaqueadas na concentração de 2×10^5 e 10×10^4 células/mL, respectivamente, em placas de 96 poços e cultivadas por 24 h com concentrações crescentes dos terpenos (1 – 1000 μM). Após o período de incubação de 24 h, as células foram fixadas pela adição do ácido tricloroacético (TCA) a 10% e a placa foi incubada na temperatura de 4°C por 30 min. Em seguida, a placa foi suavemente lavada com água ultrapura e após seca, foi adicionado 100 μL da solução de SRB (0,4% em 1% ácido acético) em cada poço e incubada por aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Após os 30 minutos de incubação a placa foi lavada com 1% ácido acético e deixada por aproximadamente 1 h a 45°C para secar. O corante ligado à proteína foi dissolvido com solução de Tris 10 mM (pH 10,0) e a placa foi colocada sob agitador para dissolver os cristais. A densidade óptica foi realizada a 515 nm, usando um leitor de microplacas (Multi-Mode Microplate Reader, Filter Max F5, Molecular Devices Spectra, USA). Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.7. Redução da produção do ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

O ensaio do superóxido foi usado para determinar o efeito inibitório dos terpenos sobre a produção do radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) em cultura de macrófagos RAW 264.7 ativados por LPS [94-96]. Resumidamente, macrófagos RAW 264.7 foram plaqueados na concentração de 2×10^5 células/mL em placas de 96 poços e cultivados por 24 h. As células foram então, pré-tratadas com concentrações crescentes (1 - 100 μM) dos terpenos e estimulados com LPS na concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e incubadas por 20 h. Utilizou-se o ácido gálico na concentração de 100 μM como controle positivo. Após a incubação, removeu-se o sobrenadante e adicionou-se a cada poço 100 μL de cloreto de nitroazul de tetrazólio (NBT) (1 mg/mL) por 2 h. Após as 2 h de incubação as células foram lavadas com metanol e incubadas durante 20 minutos a 37°C para secar. Após o período de incubação de 20 minutos os cristais de formazana formados foram dissolvidos com dimetilsulfóxido (DMSO) e

hidróxido de potássio (KOH) 2M. A densidade óptica foi realizada a 620 nm, usando um leitor de microplacas (Mults-Mode Microplate Reader, Filter Max F5, Molecular Devices Spectra, USA). Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.8. Ensaio com peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

O efeito protetor dos terpenos contra o dano oxidativo/toxicidade do peróxido de hidrogênio em macrófagos foi avaliado pelo ensaio do peróxido de hidrogênio modificado [97,98]. Resumidamente, as células de macrófagos RAW 264.7 foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 células/mL em placas de 96 poços e cultivadas overnight. Após incubação adicionou-se H_2O_2 500 μ M seguida de adição de concentrações crescentes (1 – 100 μ M) das amostras e as células foram incubadas novamente por 24 h. Utilizou-se o ácido gálico na concentração de 80 μ M como controle positivo. Após o período de incubação a viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico do MTT.

2.9. Produção de óxido nítrico induzido por LPS em macrófagos RAW 264.7

Os efeitos inibitórios dos terpenos sobre a produção de NO foi avaliado em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS [99-101]. Em resumo, as células RAW 264.7 foram plaqueadas utilizando DMEM com teor elevado de glicose na concentração de 2×10^5 células/mL em placas de 96 poços e cultivadas overnight para aderência e até atingir um nível de confluência de aproximadamente 80%. Após, o meio foi substituído por DMEM isento de vermelho de fenol seguido pela adição de concentrações crescentes (1 - 100 μ M) das amostras seguida da adição de LPS (1 μ g/mL) e incubadas por 20 h. Foi utilizado o L-NMMA na concentração de 500 μ M como controle positivo. Após a incubação foi retirado o sobrenadante e a produção de NO foi avaliada espectrofotometricamente através da determinação de nitrito, um produto oxidado do NO. A concentração de nitrito foi determinada através da reação de Griess [89] pela adição de 100 μ L do sobrenadante com 180 μ L do reagente de Griess (contendo volumes iguais de sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico a 5% e 0,1% de N- (1-naftil) etilenodiamina). A absorvância foi medida num leitor de microplacas (Mults-Mode Microplate Reader, Filter Max F5, Molecular Devices Spectra, USA) a 540 nm contra uma curva de calibração com padrões de nitrito de sódio. Em paralelo, sob as mesmas condições experimentais, foi examinada a viabilidade celular pelo ensaio SRB.

2.10. Quantificação de citocinas

A quantificação das citocinas inflamatórias TNF- α e IL1- α e a citocina anti-inflamatória IL-10 foi realizada com o sobrenadante das células de macrófagos RAW 264.7 ativados com LPS. Foi utilizado a dexametasona na concentração de 10 μ M como controle positivo. As concentrações das citocinas foram determinadas através de kits de Ensaio de Imuno-absorção enzimática (ELISA) utilizando anticorpos específicos e padrões de citocinas conforme as instruções do fabricante (eBioscience, San Diego, California, USA). As densidades ópticas foram medidas a 450 nm num leitor de microplacas (Leitor de Microplacas Mults-Mode, Filter Max F5, Molecular Devices Spectra, EUA). A produção das citocinas foram expressos em pg, com sensibilidade > 10 pg/mL.

2.11. Determinação da atividade do fator nuclear kappa B

A determinação da atividade do fator nuclear kappa B foi realizado para avaliar a capacidade dos terpenos em inibir o NF-kB utilizando a expressão de luciferase conforme previamente descrito por Kondratyuk e colaboradores [102], Homhual e colaboradores [103] e Morais e colaboradores [104]. Resumidamente, as células renais embrionárias humanas 293 transfectadas com a adição do gene do NF-kB-luciferase foram semeadas numa placa estéril de 96 poços na concentração de 2×10^5 células/ mL e incubadas durante 48 h. As células foram mantidas em meio de cultura (DMEM) (Invitrogen Co.; Carlsbad, CA, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 100 UI/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina e 2 mM de glutamina. Após a incubação, concentrações crescentes (1-100 μ M) dos terpenos foram adicionados na placa, seguido pela adição de TNF- α (2 ng/mL) e incubados por 6 h. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e o ensaio da luciferase foi realizado utilizando o kit de ensaio Luc da Promega seguindo as instruções do fabricante. Foi utilizado uma curva de TPCK (0,001-2,5 mM) como controle positivo ($IC_{50} = 3,8$ nM). A atividade da luciferase foi monitorada através de um leitor de luminescência com microplacas (Mults-Mode, Filter Max F5, Molecular Devices Spectra, EUA). Os resultados foram expressos como percentagem da atividade inibidora de NF-kB.

2.12. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, USA). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). As comparações estatísticas foram realizadas utilizando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de teste de Tukey. Foram considerados valores significativos quando se obteve $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente foi realizado um *screening* com os 33 terpenos, avaliando a viabilidade e seu efeito inibitório sobre a produção de óxido nítrico em macrófagos na concentração de 50 μM . Conforme observado na tabela 1, todos os terpenos analisados apresentaram alto percentual de viabilidade celular em macrófagos RAW 264.7. Exceto o eucaliptol, α -felandreno, (-) e (+) Borneol, canfeno e terpineol todos apresentaram atividade inibitória, em diferentes intensidades, na produção de NO em cultura de macrófagos estimulados com LPS, na concentração testada.

Tabela 1. Efeitos dos terpenos na concentração de 50 μ M na viabilidade celular e percentual de inibição da produção de NO em macrófagos RAW 264.7

Terpeno	% Inibição do NO	% Viabilidade
α -bisabolol	1,9 \pm 9,6	99,2 \pm 12,9
(+)-Borneol	-	110,7 \pm 0,9
(-)-Borneol	-	111,8 \pm 6,6
Canfeno	-	115,9 \pm 3,0
Cânfora	7,2 \pm 5,9	113,2 \pm 7,0
β -cariofileno	22,8 \pm 3,8	107,5 \pm 2,1
Carvacrol	22,0 \pm 0,6	100,1 \pm 1,9
L-Carveol	14,6 \pm 2,2	103,9 \pm 2,2
(+)- carvona	5,9 \pm 4,1	110,1 \pm 1,8
L-carvona	22,2 \pm 5,6	103,8 \pm 1,2
m-cimeno	14,2 \pm 2,5	100,9 \pm 1,4
p-cimeno	36,0 \pm 11,2	82,8 \pm 11,0
Citral	38,7 \pm 9,3	106,4 \pm 0,4
(+)-Citronelol	18,1 \pm 2,0	104,0 \pm 4,4
β -Citronelol	26,2 \pm 8,8	98,4 \pm 2,6
Eucaliptol	-	108,6 \pm 5,1
Eugenol	15,1 \pm 8,4	104,6 \pm 5,3
α -felandreno	-	100,7 \pm 3,0
Geraniol	16,1 \pm 2,8	102,7 \pm 3,6
Guaieno	38,7 \pm 9,3	102,0 \pm 5,4
α -humuleno	5,1 \pm 5,2	109,7 \pm 2,8
Limoneno	13,6 \pm 19,5	93,4 \pm 3,5
Linalol	29,7 \pm 16,0	90,9 \pm 14,7
Mirceno	12,9 \pm 0,9	95,6 \pm 6,0
Ocimeno	53,4 \pm 12,5	92,1 \pm 17,4
α -pineno	3,1 \pm 5,2	110,4 \pm 6,6
β -pineno	8,9 \pm 1,8	107,5 \pm 1,4
Sabineno	16,2 \pm 7,6	97,5 \pm 4,6
γ -terpineno	7,2 \pm 5,9	113,6 \pm 3,6
Terpineol	-	108,1 \pm 3,1
Terpinoleno	22,8 \pm 3,8	101,5 \pm 3,3
Timol	8,1 \pm 5,9	117,3 \pm 5,5
Valenceno	21,9 \pm 2,7	102,2 \pm 1,9

Legenda: os valores são expressos em percentual de inibição e percentual de viabilidade celular. (-) representa que não houve inibição da atividade do NO.

Com base nos ensaios preliminares e após uma criteriosa revisão da literatura dos compostos analisados com atividades mais promissoras para atividade anti-inflamatória foram selecionados os monoterpênicos, L-carveol, L-carvona, m-cimeno e os sesquiterpênicos, valenceno e guaieno (Figura 1).

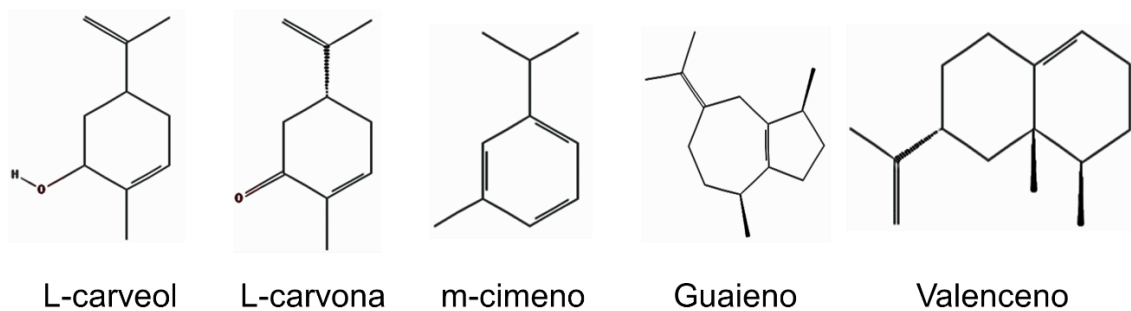


Figura 1. Representação da estrutura química dos monoterpenos, L-carveol, L-carvona, m-cimeno e dos sesquiterpenos, valenceno e guaieno

A viabilidade celular *in vitro* dos terpenos selecionados foi novamente analisada em diferentes concentrações e em diferentes linhagens celulares: fibroblastos 3T3, macrófagos RAW 264,7, carcinoma pancreático humano (MIA PaCa-2), células de hepatoma de camundongos (Hepa-1c1c7), e células renais embrionárias humanas 293 pelos métodos MTT e SRB. Os resultados demonstraram que todas as amostras não foram citotóxicas em nenhuma das linhagens celulares, nas concentrações testadas de 1 a 200 μM (dados não mostrados). Portanto, após delinear a faixa de concentração na qual não se observou atividade citotóxica procedeu-se os ensaios *in vitro*, sempre respeitando concentrações iguais ou inferiores a 200 μM .

Durante a inflamação são produzidas espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como o radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), ácido hipocloroso (HOCl) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) como peroxinitrito (ONOO), e óxido nítrico [105]. Espécies reativas (ERs) apresentam efeitos benéficos quando ocorrem em concentrações baixas ou moderadas, mas a superprodução de ERs, conhecida como estresse oxidativo, pode causar danos significativos que podem contribuir para o desenvolvimento de várias condições degenerativas, como danos aos lipídios celulares, proteínas ou DNA que inibem sua integridade funcional [106].

A ativação de macrófagos por estímulos tais como o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) induz a produção de ERs que é um importante fator para a progressão de muitas doenças inflamatórias. Neste estudo, investigamos o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio produzido por macrófagos após a estimulação com LPS. Somente os monoterpenos, L-carveol e m-cimeno foram

inibidores significativos da produção do ânion superóxido, obtendo redução significativa de $71,3 \pm 11,5\%$ e $59,6 \pm 21,4\%$; $52,7 \pm 21,5\%$ e $55,7 \pm 21,2\%$ nas concentrações de 10 e 100 μM , respectivamente (Figura 2). Os resultados obtidos foram semelhantes ao ácido gálico na concentração de 50 μM que apresentou inibição de aproximadamente 62,5%, usado como um padrão positivo devido ao seu potencial antioxidante [107,108].

O efeito protetor da citotoxicidade gerada pelo peróxido de hidrogênio nas amostras não foi observado em nenhuma das concentrações testadas (10, 50 e 100 μM) (resultados não demonstrados). Tais resultados indicam que os monoterpenos (L-carveol e m-cimeno) apresentam potencial redução do estresse oxidativo ao reduzir o ânion superóxido que é o precursor dos radicais livres no organismo. Já os sesquiterpenos não apresentaram influência sobre o estresse oxidativo.

Rozza e colaboradores [109] avaliou o mentol (monoterpeno) em ratos wistar, e observou que na dose de 50 mg/ Kg há uma diminuição da atividade da SOD, além de induzir uma atividade imunomoduladora e anti-inflamatória ao diminuir os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 e aumentar os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10.

Em outro estudo foi observado as atividades biológicas dos óleos essenciais de algumas espécies de Citrus, onde o composto majoritário era o Limoneno (55,4% a 91,7%), das 14 espécies analisadas, somente o óleo de *Citrus natsudaïdai* Hayata (*Natsudaïdai*) inibiu o superóxido de forma dose dependente, com IV_{50} de 97,8 $\mu\text{l/mL}$ (IV_{50} representa o volume de óleos essenciais que é necessário para 50% de inibição do seu alvo) [110]. O óleo do Cravo da Índia (*Eugenia aromatica* ou *Eugenia caryophyllata*, Fam. *Myrtaceae*), onde o composto majoritário é o Eugenol, inibiu $57,0 \pm 0,4\%$ do radical ânion superóxido e $22,9 \pm 2,3\%$ de redução do peróxido de hidrogênio [111].

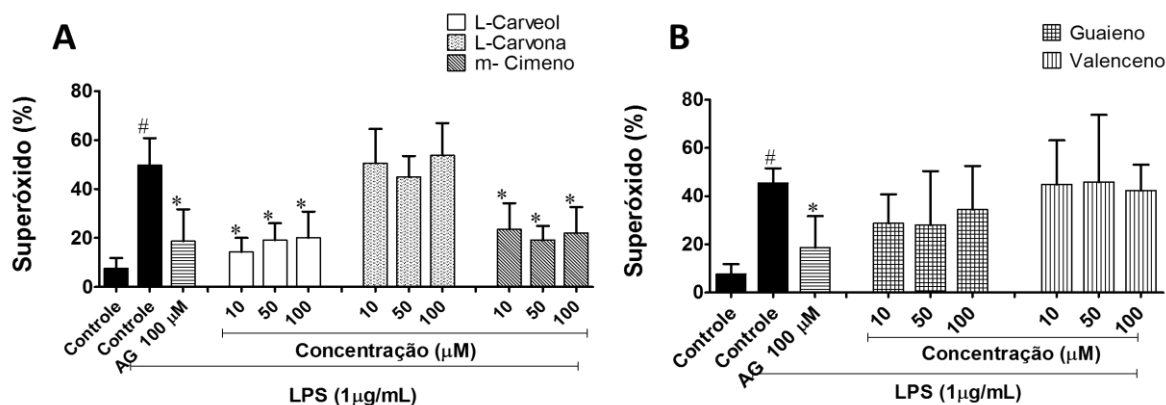


Figura 2. Efeito dos terpenos sobre a produção de ânion superóxido *in vitro*. Macrófagos RAW 264.7 foram expostos com os terpenos (10, 50 e 100 µM) por 2 h seguido da adição ou não de LPS (1 µg/mL). Ácido gálico (AG) 100 µM foi usado como controle positivo. A produção do ânion superóxido foi determinada após 24 h utilizando o reagente colorimétrico. (A) Monoterpenos: L-carveol, L-carvona e m-cimeno e (B) Sesquiterpenos: guaieno e valenceno. Os resultados foram expressos como média ± DP de três experimentos independentes. * Significativo quando $p < 0,05$ comparado com o controle +LPS. # controle *versus* controle + LPS.

O NO, um importante ERN, foi avaliado utilizando reagente de Griess com o sobrenadante da cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS. Como mostrado na Figura 2, o tratamento com LPS estimulou significativamente a produção de NO, enquanto que tratamentos com monoterpenos ou sesquiterpenos e L-NMMA (inibidor de NO utilizado como controle positivo) inibiram significativamente a produção deste radical.

A inibição apresentada na concentração de 100 µM pelos monoterpenos foi de $34,1 \pm 8,0\%$, $42,9 \pm 14,7\%$ e $36,8 \pm 6,5\%$ para L-carvona, L-carveol e m-cimeno, respectivamente. Entretanto, os sesquiterpenos guaieno e valenceno, apresentaram inibição de $52,3 \pm 24,5\%$ e $31,6 \pm 9,7\%$, respectivamente (Figura 3).

Convém destacar que o guaieno foi a substância que apresentou maior inibição do NO, apresentando inibição semelhante ao do L-NMMA ($58,1 \pm 15,9\%$) que é um inibidor da iNOS e conseqüentemente da produção do NO. O L-NMMA no estudo realizado por Pan e colaboradores [112] obteve inibição de 45,7 - 68,1% na concentração de 1 mM, valor semelhante ao obtido neste estudo com a concentração de 0,5 mM (500 µM).

Em um estudo realizado por Mendes e colaboradores [86] foi analisado o potencial anti-inflamatório de compostos isolados de *Pittosporum undulatum*, cujo os principais componentes são os sesquiterpenos do tipo guaieno, em cultura de macrófagos RAW 264.7, observou-se que esses compostos isolados apresentaram inibição de aproximadamente 80% na concentração de 50 µg/mL, tendo inibição

superior ao da indometacina (padrão positivo) na mesma concentração (aproximadamente 60% e IC₅₀ de 18,2 µM), estes resultados apresentaram inibição superior ao observado com o composto isolado de forma pura, uma razão para esse aumento na inibição pode estar relacionada à presença de hidroxila, posição da dupla ligação ou pela presença de aglicona nas moléculas analisadas [86].

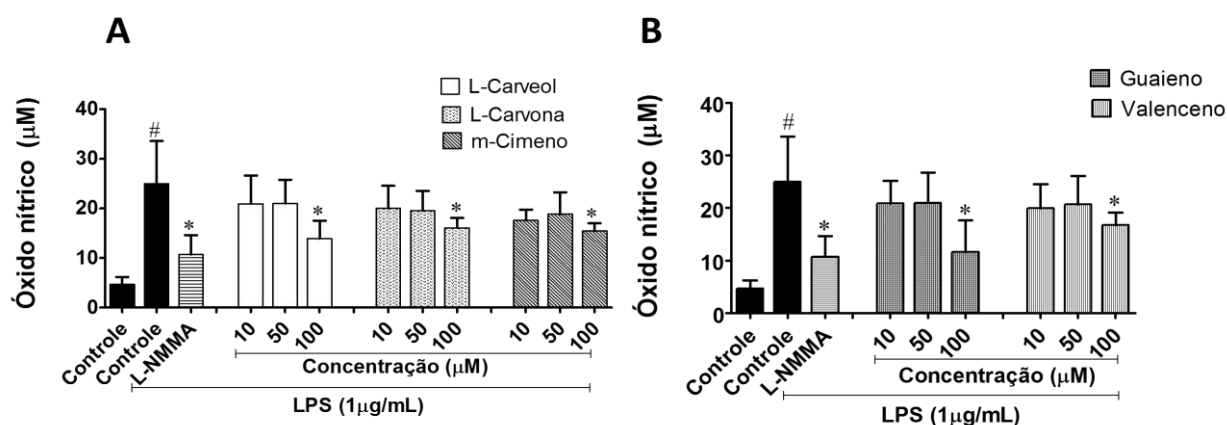


Figura 3. Redução dos terpenos sobre a produção de óxido nítrico (NO) *in vitro*. Os macrófagos RAW 264.7 foram expostos com ou sem os terpenos e após 2 h, foram estimulados com LPS. (A) Monoterpenos: L-carveol, L-carvona e m-cimeno e (B) Sesquiterpenos: guaieno e valenceno foram medidos 24 h mais tarde utilizando o reagente de Griess tal como descrito na seção de materiais e métodos. L-NMMA 500 µM foi usado como controle positivo. Os resultados foram expressos como média ± DP de três experiências independentes. * Significativo quando p < 0,05 comparado com o controle com células induzidas por LPS. # controle versus controle + LPS.

Para a avaliação do sequestro do radical NO foi utilizado o método com nitroprussiato de sódio que é um potente vasodilatador composto por Fe²⁺ complexado com óxido nítrico e cinco ânions de cianeto, que libera de forma espontânea o NO [88,113]. Todos os terpenos analisados não apresentaram atividade sequestrante sobre o radical NO (dados não apresentados).

Portanto, os resultados experimentais obtidos indicam que a inibição sobre a produção do óxido nítrico provavelmente ocorre a nível enzimático uma vez que nenhuma das amostras foram capazes de sequestrar o radical NO entretanto, inibiram significativamente a sua produção na cultura de macrófagos.

As citocinas são importantes mediadores do processo inflamatório. Por esta razão, os efeitos dos terpenos foram investigados em citocinas produzidas por macrófagos após estimulação com LPS. Em geral, o tratamento com L-carveol, L-carvona, m-cimeno e valenceno apresentaram efeitos inibidores significativos na produção de IL-1α e TNF-α em macrófagos após estimulação com LPS (Figuras 4A,

B e Fig. 5A, B). A concentração da citocina anti-inflamatória, IL-10 (Fig. 4C e Fig. 5C), apresentou-se aumentada em todas as concentrações testadas de todos os terpenos. A dexametasona na concentração de 10 μ M, utilizada como padrão positivo, apresentou redução de $47,5 \pm 10,9\%$ e $99,3 \pm 1,2\%$ nos níveis de TNF- α e IL-1 α , respectivamente, e não apresentou aumento significativo na produção da citocina anti-inflamatória, IL-10.

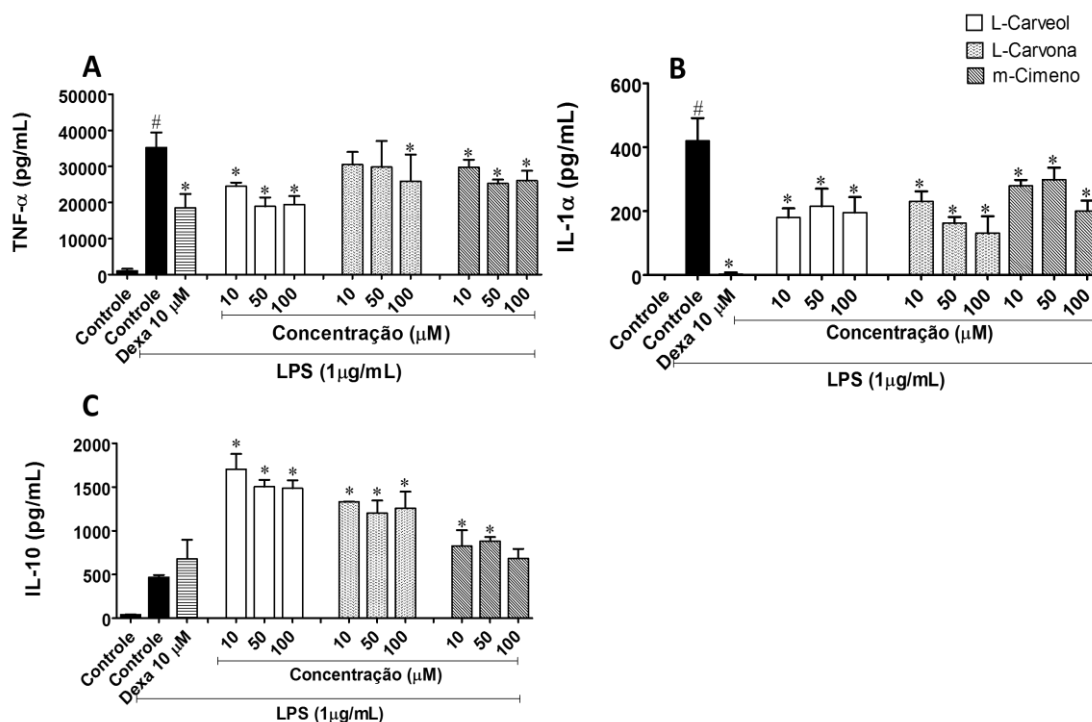


Figura 4. Os monoterpenos reduzem a concentração das citocinas pró e anti-inflamatória (TNF- α , IL-1 α e IL-10) *in vitro*. Macrófagos RAW 264.7 foram expostos com os terpenos e após 2 h receberam ou não estímulo com LPS. (A) TNF- α (B) IL-1 α e (C) IL-10. Os níveis das citocinas foram medidos 24 h mais tarde utilizando kits por ELISA como descrito na seção de material e métodos. Os resultados foram expressos como média \pm DP de três experiências independentes. * Significativo quando $p < 0,05$ comparado com o controle com células induzidas por LPS. # controle *versus* controle + LPS.

Dos monoterpenos aqui avaliados, o L-carveol foi o que apresentou maior inibição na produção de TNF- α , obtendo inibição de $46,3 \pm 7,0\%$ e $44,8 \pm 6,5\%$ nas concentrações de 50 e 100 μ M, resultados semelhantes aos obtidos com a dexametasona, que é um glicocorticoide amplamente utilizado na terapia de diferentes processos inflamatórios.

Ao que se refere a produção da IL-1, a L-carvona apresentou inibição de $45,4 \pm 7,4 \%$, $61,7 \pm 4,6\%$ e $69,1 \pm 12,7\%$, o L-carveol inibiu $57,5 \pm 6,8\%$, $49,2 \pm 13,1\%$ e $53,7 \pm 11,3\%$ e o m-cimeno $34,0 \pm 4,5\%$, $29,5 \pm 9,0\%$ e $52,5 \pm 7,5\%$ nas

concentrações de 10, 50 e 100 μM , respectivamente, apresentando inibição inferior a dexametasona.

Em relação aos resultados obtidos sobre a produção da citocina IL-10, todos os monoterpenos apresentaram aumento superior ao da dexametasona. Destacando-se o L-carveol e a L-carvona obtendo aumento da produção da IL-10 de $262,2 \pm 64,8\%$ e $183,3 \pm 0,8\%$ na concentração de 10 μM contra 44,8% de aumento produzido pela dexametasona na mesma concentração.

Em um estudo realizado por Zhong e colaboradores [114], foi observado que o p-cimeno reduz significativamente os níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6 em aproximadamente 50%, 85% e 59%, respectivamente, na dose de 214,32 $\mu\text{g/mL}$, em contraste, a citocina anti-inflamatória IL-10 não apresentou alteração quando tratada com p-cimeno.

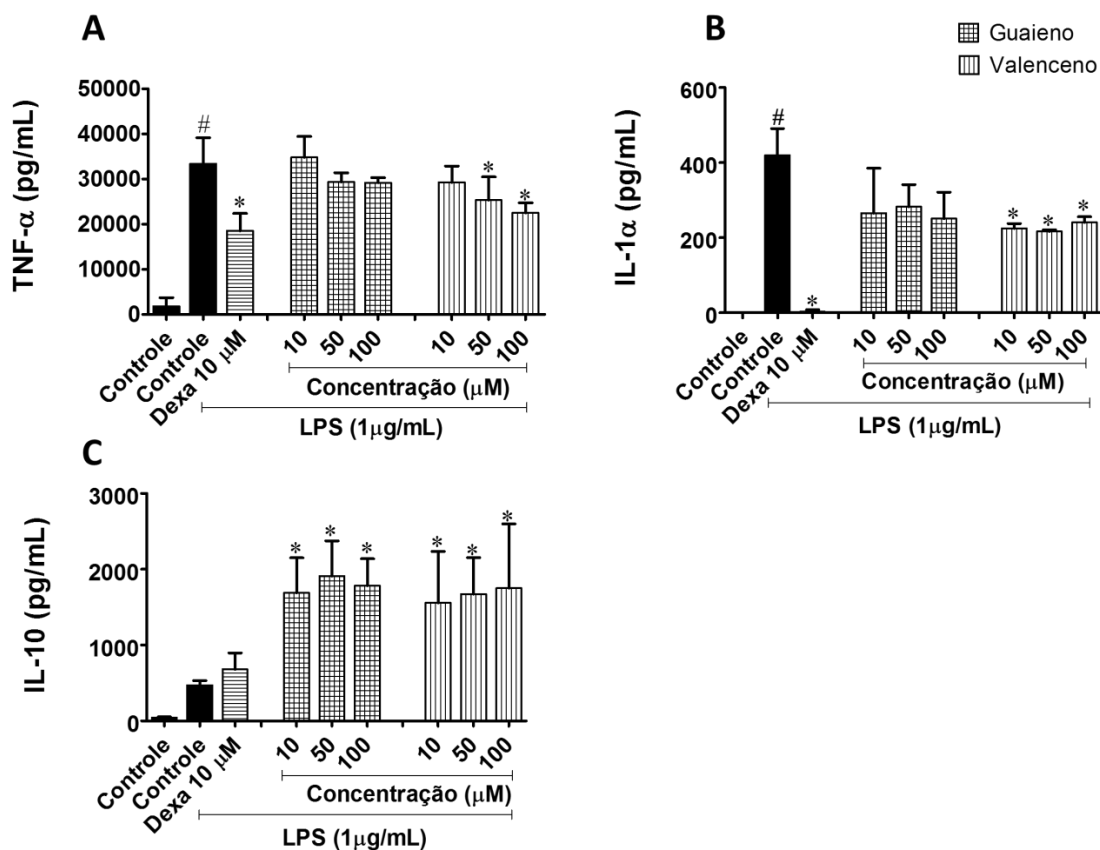


Figura 5. Os sesquiterpenos reduzem a concentração das citocinas pró e anti-inflamatória (TNF- α , IL-1 α e IL-10) *in vitro*. Os macrófagos RAW 264.7 foram expostos com os terpenos e após 2 h receberam ou não estímulo com LPS. (A) TNF- α (B) IL-1 α e (C) IL-10. Os níveis das citocinas foram medidos 24 h mais tarde utilizando kits por ELISA como descrito na seção de material e métodos. Os resultados foram expressos como média \pm DP de três experiências independentes. * Significativo quando $p < 0,05$ comparado com o controle com células induzidas por LPS. # controle *versus* controle + LPS.

Dentre os sesquiterpenos avaliados, destaca-se o valenceno que apresentou inibição dos níveis de IL-1 de $46,8 \pm 3,0\%$, $48,8 \pm 1,0\%$ e $43,1 \pm 3,6\%$, nas concentrações de 10, 50 e 100 μM , resultados inferiores ao da dexametasona. Em um estudo realizado por Yang e colaboradores [84], o valenceno nas concentrações testadas de 10, 50 e 100 μM não apresentou influência sobre a produção de TNF- α , convergindo com os nossos resultados, onde nas concentrações testadas, demonstrou inibição de $17,0 \pm 10,1\%$ a $36,2 \pm 6,4\%$. O valenceno também apresentou aumento da produção de IL-10 de $231,1 \pm 144,3\%$ a $272,2 \pm 180,1\%$ de forma dose dependente. O guaieno apresentou influencia apenas sobre a produção da IL-10, apresentando um aumento de $259,0 \pm 98,3\%$, $306,2 \pm 98,8\%$ e $278,9 \pm 76,0\%$ nas concentrações de 10, 50 e 100 μM , respectivamente, valores superiores ao da dexametasona.

Em resumo, os resultados demonstrados nas figuras 3 e 4 indicam que os monoterpenos apresentam inibição de IL-1 superior a apresentada pelos sesquiterpenos, porém curiosamente, no que diz respeito à citocina anti-inflamatória, IL-10 os sesquiterpenos apresentam influencia superior à dos monoterpenos. Já a influência sobre sua produção de TNF- α independe da classe a qual esses terpenos se enquadram.

O fator de transcrição NF- κB desempenha um papel importante no processo da inflamação em células imunes, especialmente em macrófagos. O cimeno, guaieno e valenceno demonstraram inibição da ativação do NF- κB em 17,9%, 18,4% e 22,1%, respectivamente, na concentração de 100 μM (Tabela 2).

Tabela 2. Representação do efeito de diferentes concentrações de terpenos sobre a atividade do fator de transcrição nuclear kappa B em cultura de células renais embrionárias humanas 293.

Terpeno	% inibição do NF-κB	
	50 μM	100 μM
L-Carveol	-	-
L-Carvona	-	12,6 ± 5,29
m-Cimeno	16,9 ± 3,90	17,9 ± 0,33
Valenceno	16,8 ± 5,60	22,1 ± 1,29
Guaieno	10,9 ± 3,34	18,4 ± 5,78
TPCK (833,3 μM)	37,6 ± 5,45	

Legenda: os valores são expressos em percentual de inibição. (-) representa que não houve inibição da atividade do NF-κB.

Outros compostos, com atividade anti-inflamatória promissora também demonstraram inibir a produção de mediadores inflamatórios como as citocinas pró-inflamatórias e NO, tendo seus efeitos mediados pela expressão do fator de transcrição NF-κB [115-120].

Assim, os resultados obtidos neste estudo indicam que os terpenos apresentam potencial anti-inflamatório ao inibir diretamente a produção dos mediadores inflamatórios, como o óxido nítrico, citocinas pró-inflamatórias e radicais livres, responsáveis pela ativação do NF-κB, reduzindo possivelmente a produção de enzimas como a COX-2 e iNOS, e o estresse oxidativo que prolongam a inflamação.

4. CONCLUSÃO

A presente investigação sugere que os terpenos apresentam grande potencial anti-inflamatório ao inibir principalmente os mediadores do processo inflamatório (óxido nítrico, citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-1 α , e radicais livres) responsáveis pelo prolongamento da inflamação. Os monoterpenos apresentam maior influência sobre as citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-1 α e na produção de ânion superóxido, já os efeitos anti-inflamatórios dos sesquiterpenos são predominantemente devido ao aumento de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10. Os resultados obtidos neste estudo enfatizam a importância biológica dos terpenos e instigam a contínua busca por novos fármacos no controle do processo inflamatório agudo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

5. REFERENCIAS

- [1] *Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE.* Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 beta generation. *Clin Exp Immunol* 2007; 147: 227 - 235.
- [2] *Zhang K, Song F, Lu X, Chen W, Huang C, Li L, Liang D, Cao S, Dai H.* MicroRNA-322 inhibits inflammatory cytokine expression and promotes cell proliferation in LPS-stimulated murine macrophages by targeting NF- κ B1 (p50). *Bioscience Reports*. 2017;37(1):BSR20160239.
- [3] *Lima RR, Costa AMR, Souza RD, Gomes-Leal W.* Inflamação em doenças neurodegenerativas. *Rev. Para. Med.* 2007; 21(2):29-34.
- [4] *Cruvinel WDM, Mesquita Júnior D, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWS. D, Silva NPD, Andrade LEC.* Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Rev. Bras. Reumatol.* 2010;50(4):434-447.
- [5] *Behm B, Babilas P, Landthaler M, Schreml S.* Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2012; 26:812-820.
- [6] *Motta EVS, Pinto NCC, Duque APN, Mendes RF, Bellozi PMQ, Scio E.* Atividades antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória das folhas de *Mucuna pruriens* (L.) DC. *Rev. Bras. Plantas Med.* 2013; 15(2): 264-272.
- [7] *Medzhitov R.* Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 2008;454(7203):428-435.
- [8] *Guerra AS, Malta DJ, Laranjeira LP, Maia MB, Colaço NC, de Behm MDOC, Galdino SL, Pitta IDAR, Gonçalves-Silva T.* Anti-inflammatory and antinociceptive activities of indole-imidazolidine derivatives. *Int. Immunopharmacol.* 2011; 11(11):1816-22.
- [9] *Kumar H, Kawai T, Akira S.* Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *Int. Rev. Immunol* . 2011;30(1):16-34.
- [10] *Cao X.* Self-regulation and cross-regulation of pattern-recognition receptor signalling in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2015;16(1):35-50.
- [11] *Couto D, Zipfel C.* Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nat. Rev. Immunol.* 2016;16(9):537-552.
- [12] *Liston A, Masters S.* Homeostasis-altering molecular processes as mechanisms of inflammasome activation. *Nat. Rev. Immunol.* 2017;17(3):208-214.
- [13] *Boller T, Felix G.* A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annu. Rev. Plant Biol* . 2009;60(1):379-406.

- [14] *Choi H, Klessig D.* DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. *BMC Plant Biol.* 2016;16(1):232.
- [15] *Vajjhala P, Ve T, Bentham A, Stacey K, Kobe B.* The molecular mechanisms of signaling by cooperative assembly formation in innate immunity pathways. *Mol Immunol.* 2017.
- [16] *Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J.* Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature.* 2006; 440(7081):237-41.
- [17] *Idzko M, Hammad H, van Nimwegen M, Kool M, Willart MA, Muskens F, Hoogsteden HC, Luttmann W, Ferrari D, Di Virgilio F, Virchow JC Jr, Lambrecht BN.* Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. *Nat Med.* 2007;13(8):913-9.
- [18] *Tang D, Kang R, Coyne C, Zeh H, Lotze M.* PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev.* 2012;249(1):158-175.
- [19] *Zanoni I, Tan Y, Di Gioia M, Broggi A, Ruan J, Shi J, Donado CA, Shao F, Wu H, Springstead JR, Kagan JC.* An endogenous caspase-11 ligand elicits interleukin-1 release from living dendritic cells. *Science.* 2016;352(6290):1232-1236.
- [20] *Pandey S, Kawai T, Akira S.* Microbial Sensing by Toll-Like Receptors and Intracellular Nucleic Acid Sensors. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;7(1):a016246.
- [21] *Raetz CR.* Biochemistry of endotoxins. *Annu Rev Biochem.* 1990; 59:129-70.
- [22] *Raetz CR, Whitfield C.* Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem.* 2002; 71:635-700.
- [23] *Brandenburg K, David A, Howe J, Koch MH, Andrä J, Garidel P.* Temperature dependence of the binding of endotoxins to the polycationic peptides polymyxin B and its nonapeptide. *Biophys J.* 2005;88(3):1845-58.
- [24] *Lu Y, Yeh W, Ohashi P.* LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine.* 2008;42(2):145-151.
- [25] *Cai L, Wang Z, Meyer J, Ji A, Van Der Westhuyzen D.* Macrophage SR-BI regulates LPS-induced pro-inflammatory signaling in mice and isolated macrophages. *J Lipid Res.* 2012; 53(8):1472-1481.
- [26] *Piantadosi C, Suliman H.* Redox regulation of mitochondrial biogenesis. *Free Rad Biol Med.* 2012;53(11):2043-2053.
- [27] *Kawai T, Akira S.* The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010;11(5):373-84
- [28] *West A, Brodsky I, Rahner C, Woo D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Walsh MC, Choi Y, Shadel GS, Ghosh S.* TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature.* 2011;472(7344):476-480.

- [29] McGarry T, Biniiecka M, Gao W, Cluxton D, Canavan M, Wade S, Wade S, Gallagher L, Orr C, Veale DJ, Fearon U. Resolution of TLR2-induced inflammation through manipulation of metabolic pathways in Rheumatoid Arthritis. *Sci. Rep.* 2017; 7:43165.
- [30] Mosser D, Edwards J. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8(12):958-969.
- [31] Epelman S, Lavine K, Randolph G. Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Immunity.* 2014;41(1):21-35.
- [32] Gordon S, Martinez-Pomares L. Physiological roles of macrophages. *Pflügers Archiv - Eur J Physiol.* 2017.
- [33] Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008; 16: 585-601.
- [34] Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13(3):159-75.
- [35] Baker R, Hayden M, Ghosh S. NF- κ B, Inflammation, and Metabolic Disease. *Cell Metabolism.* 2011;13(1):11-22.
- [36] Lawrence T. The Nuclear Factor NF- B Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(6):a001651-a001651.
- [37] Perkins ND. The Rel/NF-kappa B family: friend and foe. *Trends Biochem Sci.* 2000; 25(9):434-40.
- [38] Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola, LR, Salomão R. Citocinas e Dor. *Rev Bras Anestesiologia*, v.61, n.2, p. 255-265, 2011.
- [39] Dusse L, Vieira L, Carvalho M. Revisão sobre óxido nítrico. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 2003;39(4).
- [40] Deutschman CS, Tracey KJ. Sepsis: current dogma and new perspectives. *Immunity* 2014; 40: 463 - 475.
- [41] Rock K, Latz E, Ontiveros F, Kono H. The Sterile Inflammatory Response. *Annu Rev Immunol.* 2010; 28(1):321-342.
- [42] Ong C, Lirk P, Tan C, Seymour R. An Evidence-Based Update on Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Clin Med Res.* 2007;5(1):19-34.
- [43] Lima D, Ballico L, Rocha Lapa F, Gonçalves H, de Souza L, Iacomini M, Werner MFDP, Baggio CH, Pereira IT, Da Silva LM, Facundo VA, Santos ARS. Evaluation of the antinociceptive, anti-inflammatory and gastric antiulcer activities of the essential oil from *Piper aleyreanum* C.DC in rodents. *J Ethnopharmacol.* 2012;142(1):274-282.

- [44] *Fernandes P, Zardo R, Figueiredo G, Silva B, Pinto A.* Anti-inflammatory properties of convolutamydine A and two structural analogues. *Life Sci.* 2014;116(1):16-24.
- [45] *Hou X, Tong Q, Wang W, Shi C, Xiong W, Chen J, Liu X, Fang JG.* Suppression of Inflammatory Responses by Dihydromyricetin, a Flavonoid from *Ampelopsis grossedentata*, via Inhibiting the Activation of NF- κ B and MAPK Signaling Pathways. *J Nat Prod.* 2015;78(7):1689-1696.
- [46] *Arulselvan P, Fard M, Tan W, Gothai S, Fakurazi S, Norhaizan ME, Kumar SS.* Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:1-15.
- [47] *Yadav V, Prasad S, Sung B, Aggarwal B.* The role of chalcones in suppression of NF- κ B-mediated inflammation and cancer. *Int Immunopharmacol.* 2011;11(3):295-309.
- [48] *Yoon W, Moon J, Song G, Lee Y, Han M, Lee JS, Ihm BS, Lee WJ, Lee NH, Hyun CG.* Artemisia fukudo essential oil attenuates LPS-induced inflammation by suppressing NF- κ B and MAPK activation in RAW 264.7 macrophages. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(5):1222-1229.
- [49] *Bhandari P.* Crocus sativus L. (saffron) for cancer chemoprevention: A mini review. *J Tradit Complement Med.* 2015; 5(2):81-87
- [50] *Zhang L, Sa F, Chong C, Wang Y, Zhou Z, Chang RC, Chan SW, Hoi PM, Yuen Lee SM.* Schisantherin A protects against 6-OHDA-induced dopaminergic neuron damage in zebrafish and cytotoxicity in SH-SY5Y cells through the ROS/NO and AKT/GSK3 β pathways. *J Ethnopharmacol.* 2015;170:8-15.
- [51] *Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M.* Biological effects of essential oils—a review. *Food chem toxicol.* 2008; 46(2): 446-475.
- [52] *Asbahani AE, Miladi K, Badri W, Sala M, Addi EHA, Casabianca H, Mousadik AE, Hartmann D, Jilale A, Renaud FNR, Elaissari A.* Essential oils: From extraction to encapsulation. *Int J Pharm.* 2015; 483(1-2):220-243.
- [53] *López MD, Pascual-Villalobos MJ.* Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. *Ind Crops Prod.* 2010; 31:284-288.
- [54] *Lawal OA, Ogunwande IA.* Essential oil from the medicinal plants of Africa. *Med Plant Res Africa.* 2013; 203-224.
- [55] *Brito A, Rodrigues S, Brito R, Xavier-Filho L.* Aromaterapia: da gênese a atualidade. *Rev Bras Plant Med.* 2013;15(4):789-793.
- [56] *Raut J, Karuppayil S.* A status review on the medicinal properties of essential oils. *Ind Crops Prod.* 2014;62:250-264.
- [57] *Swamy M, Sinniah U.* Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.): Botany, agrotechnology and biotechnological aspects. *Ind Crops Prod.* 2016;87:161-176.

- [58] *Silva J, Almeida J, Quintans J, Gopalsamy R, Shanmugam S, Serafini MR, Oliveira MR, Silva BA, Martins AO, Castro FF, Menezes IR, Coutinho HD, Oliveira RC, Thangaraj P, Araújo AA, Quintans-Júnior LJ.* Enhancement of orofacial antinociceptive effect of carvacrol, a monoterpene present in oregano and thyme oils, by β -cyclodextrin inclusion complex in mice. *Med Plant Res Africa* 2016;84:454-461.
- [59] *Zore G, Thakre A, Jadhav S, Karuppayil S.* Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomed.* 2011;18(13):1181-1190.
- [60] *Peixoto-Neves D, Silva-Alves K, Gomes M, Lima F, Lahlou S, Magalhães Magalhães PJ, Ceccatto VM, Coelho-de-Souza AN, Leal-Cardoso JH.* Vasorelaxant effects of the monoterpene phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. *Fund Clin Pharmacol.* 2010;24(3):341-350.
- [61] *Paduch R, Kandefer-Szerszeń M, Trytek M, Fiedurek J.* Terpenes: substances useful in human healthcare. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2007;55(5):315-27.
- [62] *Murakami A, Tanaka T, Lee JY, Surh YJ, Kim HW, Kawabata K, Nakamura Y, Jiawajinda S, Ohigashi H.* Zerumbone, a sesquiterpene in subtropical ginger, suppresses skin tumor initiation and promotion stages in ICR mice. *Int J Cancer.* 2004;110(4):481-90.
- [63] *Han Y.* Ginkgo terpene component has an anti-inflammatory effect on *Candida albicans*-caused arthritic inflammation. *Int Immunopharmacol.* 2005;5(6):1049-56.
- [64] *Chang HJ, Kim HJ, Chun HS.* Quantitative structure-activity relationship (QSAR) for neuroprotective activity of terpenoids. *Life Sci.* 2007;80(9):835-41.
- [65] *Batista P, Werner M, Oliveira E, Burgos L, Pereira P, Brum LF, Santos AR.* Evidence for the involvement of ionotropic glutamatergic receptors on the antinociceptive effect of (-)-linalool in mice. *Neurosci Lett.* 2008;440(3):299-303.
- [66] *Kirby J, Keasling J.* Biosynthesis of Plant Isoprenoids: Perspectives for Microbial Engineering. *Ann Rev Plant Biol.* 2009;60(1):335-355.
- [67] *Garcia R, Alves ESS, Santos MP, Aquije GMFV, Fernandes AAR, dos Santos RB, Ventura JA, Fernandes PMB.* Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives. *Braz J Microbiol.* 2008;39(1):163–168
- [68] *Adorjan B, Buchbauer G.* Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour Fragr J.* 2010;25:407–26.
- [69] *Sobral M, Xavier A, Lima T, de Sousa D.* Antitumor Activity of Monoterpenes Found in Essential Oils. *Sci World J.* 2014;2014:1-35.
- [70] *Guimarães A, Quintans J, Quintans-Júnior L.* Monoterpenes with Analgesic Activity-A Systematic Review. *Phytother Res.* 2013;27(1):1-15.
- [71] *de Cássia da Silveira e Sá R, Andrade L, de Sousa D.* A Review on Anti-Inflammatory Activity of Monoterpenes. *Molecules.* 2013;18(1):1227-1254.

- [72] *Bartikova H, Hanusova V, Skalova L, Ambroz M, Bousova I.* Antioxidant, pro-oxidant and other biological activities of sesquiterpenes. *Curr Top Med Chem.* 2014;14(22):2478-94.
- [73] *Arumugam P, Priya N, Subathra M, Ramesh A.* Anti-inflammatory activity of four solvent fractions of ethanol extract of *Mentha spicata* L. investigated on acute and chronic inflammation induced rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2008;26(1):92-95.
- [74] *Hussain AI, Anwar F, Nigam PS, Ashraf M, Gilani AH.* Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. *J Sci Food Agric.* 2010; 90:1827–1836.
- [75] *de Sousa DP, de Farias Nobrega FF, de Almeida RN.* Influence of the chirality of (R)-(2)-and (S)-(+)-carvone in the central nervous system: a comparative study. *Chirality.* 2007;19: 264–268.
- [76] *Goncalves JC, Oliveira Fde S, Benedito RB, de Sousa DP, de Almeida RN, de Araújo DAM.* Antinociceptive activity of (-)-carvone: evidence of association with decreased peripheral nerve excitability. *Biol Pharmaceut Bull.* 2008;31:1017–1020.
- [77] *Patel P, Thakkar V.* L-Carvone Induces p53, Caspase 3 Mediated Apoptosis and Inhibits the Migration of Breast Cancer Cell Lines. *Nutr Cancer.* 2014;66(3):453-462.
- [78] *Echeverrigaray S, Zacaria J, Beltrão R.* Nematicidal Activity of Monoterpenoids Against the Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita*. *Phytopathol.* 2010;100(2):199-203.
- [79] *Omolo MO, Okinyo D, Ndiege IO, Lwande W, Hassanali A.* Repellency of essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*. *Phytochem.* 2004; 65(20):2797-802.
- [80] *Crowell P, Kennan W, Haag J, Ahmad S, Vedejs E, Gould M.* Chemoprevention of mammary carcinogenesis by hydroxylated derivatives of d-limonene. *Carcinogenesis.* 1992;13(7):1261-1264.
- [81] *Lozon Y, Sultan A, Lansdell S, Prytkova T, Sadek B, Yang KH, Howarth FC, Millar NS, Oz M.* Inhibition of human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors by cyclic monoterpene carveol. *Eur J Pharmacol.* 2016;776:44-51.
- [82] *Ultee A, Slump RA, Steging G, Smid EJ.* Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *J Food Prot.* 2000;63(5):620-4.
- [83] *Frohwitter J, Heider S, Peters-Wendisch P, Beekwilder J, Wendisch V.* Production of the sesquiterpene (+)-valencene by metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol.* 2014;191:205-213.
- [84] *Yang I, Lee D, Shin H.* Inhibitory Effect of Valencene on the Development of Atopic Dermatitis-Like Skin Lesions in NC/Nga Mice. *J Evi-Based Complementary Altern Med.* 2016;2016:1-11.

- [85] *Ambrož M, Boušová I, Skarka A, Hanušová V, Králová V, Matoušková P, Szotáková B, Skálová L.* The Influence of Sesquiterpenes from *Myrica rubra* on the Antiproliferative and Pro-Oxidative Effects of Doxorubicin and Its Accumulation in Cancer Cells. *Molecules*. 2015;20(8):15343-15358.
- [86] *Mendes S, Mansoor T, Rodrigues A, Armas J, Ferreira M.* Anti-inflammatory guaiane-type sesquiterpenes from the fruits of *Pittosporum undulatum*. *Phytochem*. 2013;95:308-314.
- [87] *Silva-Filho S, Wiirzler L, Cavalcante H, Uchida N, de Souza Silva-Comar F, Cardia GFE, Silva EL, Aguiar RP, Bersani-Amado CA, Cuman RKN.* Effect of patchouli (*Pogostemon cablin*) essential oil on in vitro and in vivo leukocytes behavior in acute inflammatory response. *Biomed Pharmacoth*. 2016;84:1697-1704.
- [88] *Bates JN, Baker MT, Guerra R Jr, Harrison DG.* Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. *Biochem Pharmacol*. 1991;11;42.
- [89] *Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analy. Biochem*. 1982;126(1), 131-138.
- [90] *Mosmann T.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. 1983;65, 55-63.
- [91] *Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR.* New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst*. 1990; 4;82(13):1107-12.
- [92] *Vichai V, Kirtikara K.* Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc*. 2006; 1(3):1112-6.
- [93] *Houghton P, Fang R, Techatanawat I, Steventon G, Hylands PJ, Lee CC.* The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods*. 2007;42(4):377-87.
- [94] *Choi HS, Kim JW, Cha YN, Kim C.* A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. *J Immunoassay Immunochem*. 2006;27(1):31-44.
- [95] *Sturrock A, Cahill B, Norman K, Huecksteadt TP, Hill K, Sanders K, Karwande SV, Stringham JC, Bull DA, Gleich M, Kennedy TP, Hoidal JR.* Transforming growth factor-beta1 induces Nox4 NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species-dependent proliferation in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006; 290(4):L661-L673.
- [96] *Pinho BR, Sousa C, Valentão P, Andrade PB.* Is nitric oxide decrease observed with naphthoquinones in LPS stimulated RAW 264.7 macrophages a beneficial property? *PLoS One*. 2011;6(8):e24098

- [97] *Annan K, Houghton PJ*. Antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation of aqueous extracts of *Ficus asperifolia* Miq. and *Gossypium arboreum* L., wound-healing plants of Ghana. *J Ethnopharmacol*. 2008; 119(1):141-4.
- [98] *Adetutu A, Morgan WA, Corcoran O*. Antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation activity of crude extracts of *Bridelia ferruginea* leaf, a wound-healing plant of Nigeria. *J Ethnopharmacol*. 2011;133(1):116-9.
- [99] *Min HY, Kim MS, Jang DS, Park EJ, Seo EK, Lee SK*. Suppression of lipopolysaccharide-stimulated inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression by a novel humulene derivative in macrophage cells. *Int Immunopharmacol*. 2009; 9(7-8):844-9.
- [100] *Cheenpracha S, Park E-J, Rostama B, Pezzuto JM, Chang LC*. Inhibition of Nitric Oxide (NO) Production in Lipopolysaccharide (LPS)-Activated Murine Macrophage RAW 264.7 Cells by the Norsesiterpene Peroxide, Epimuquibilin A. *Marine Drugs*. 2010;8(3):429-437.
- [101] *Park E.-J, Shen L, Sun D, Pezzuto JM*. Inhibitory Effect of a Callophycin A Derivative on iNOS Expression via Inhibition of Akt in Lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 Cells. *J Nat Prod*. 2014;77(3):527–535.
- [102] *Kondratyuk TP, Park EJ, Yu R, Van Breemen RB, Asolkar RN, Murphy BT, Fenical W, Pezzuto JM*. Novel marine phenazines as potential cancer chemopreventive and anti-inflammatory agents. *Mar Drugs*. 2012;10:451-464.
- [103] *Homhual S, Zhang HJ, Bunyapraphatsara N, Kondratyuk TP, Santarsiero BD, Mesecar AD, Herunsalee A, Chaukul W, Pezzuto JM, Fong HH*. Bruguiesulfurol, a new sulfur compound from *Bruguiera gymnorrhiza*. *Planta Med*. 2006;72(3):255-60.
- [104] *Morais MC, Luqman S, Kondratyuk TP, Petronio MS, Regasini LO, Silva DH, Bolzani VS, Soares CP, Pezzuto JM*. Suppression of TNF- α induced NF κ B activity by gallic acid and its semi-synthetic esters: possible role in cancer chemoprevention. *Nat Prod Res*. 2010; 24(18):1758-65.
- [105] *Barreiros A, David J, David J*. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quím Nov*. 2006;29(1):113-123.
- [106] *Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M.T., Mazur M., Telser J*. *Int j biochem cell biol*. 2007; 39:44-84.
- [107] *Abdelwahed A, Bouhlel I, Skandrani I, Valenti K, Kadri M, Guiraud P, Steiman R, Mariotte AM, Ghedira K, Laporte F, Dijoux-Franca MG, Chekir-Ghedira L*. Study of antimutagenic and antioxidant activities of gallic acid and 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus*. Confirmation by microarray expression profiling. *Chem Biol Interact*. 2007;165(1):1-13.
- [108] *de Oliveira L, Thomé G, Lopes T, Reichert K, de Oliveira J, da Silva Pereira A, Baldissareli J, da Costa Krewer C, Morsch VM, Chitolina Schetinger MR, Spanevello RM*. Effects of gallic acid on delta – aminolevulinic dehydratase activity and in the

biochemical, histological and oxidative stress parameters in the liver and kidney of diabetic rats. *Biomed Pharmacoth.* 2016;84:1291-1299.

[109] *Rozza AL, Meira de Faria F, Souza Brito AR, Pellizzon CH.* The gastroprotective effect of menthol: involvement of anti-apoptotic, antioxidant and anti-inflammatory activities. *PLoS One.* 2014 Jan 21;9(1):e86686.

[110] *Baik JS, Kim SS, Lee JA, Oh TH, Kim JY, Lee NH, Hyun CG.* Chemical composition and biological activities of essential oils extracted from Korean endemic citrus species. *J Microbiol Biotechnol.* 2008;18(1):74-9.

[111] *Gülçin I, Elmastaş M, Aboul-Enein HY.* Antioxidant activity of clove oil – A powerful antioxidant source, *Arabian J Chem.* 2012; 5(4): 489-499.

[112] *Pan LL, Zhang QY, Luo XL, Xiong J, Xu P, Liu SY, Hu JF, Liu XH.* (7R,8S)-9-acetyl-dehydrodiconiferyl alcohol inhibits inflammation and migration in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Phytomed.* 2016;23(5):541-9.

[113] *Hottinger DG, Beebe DS, Kozhimannil T, Prielipp RC, Belani KG.* Sodium nitroprusside in 2014: A clinical concepts review. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol.* 2014;30(4):462-71.

[114] *Zhong W, Chi G, Jiang L, Soromou LW, Chen N, Huo M, Guo W, Deng X, Feng H.* p-Cymene modulates in vitro and in vivo cytokine production by inhibiting MAPK and NF- κ B activation. *Inflammation.* 2013;36(3):529-37.

[115] *Jeong HJ, Koo HN, Na HJ, Kim MS, Hong SH, Eom JW, Kim KS, Shin TY, Kim HM.* Inhibition of TNF- α and IL-6 production by Aucubin through blockade of NF- κ B activation RBL-2H3 mast cells. *Cytokine.* 2002;18(5):252-9.

[116] *Lo AH, Liang YC, Lin-Shiau SY, Ho CT, Lin JK.* Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor- κ B in mouse macrophages. *Carcinogenesis.* 2002;23:983 – 991.

[117] *Koo HJ, Song YS, Kim HJ, Lee YH, Hong SM, Kim SJ, Kim BC, Jin C, Lim CJ, Park EH.* Antiinflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia. *Eur J Pharmacol.* 2004; 495(2-3):201-8.

[118] *Bai SK, Lee SJ, Na HJ, Ha KS, Han JA, Lee H, Kwon YG, Chung CK, Kim YM.* Beta-caroteno inibe a expressão gênica Macrófagos estimulados com lipopolissacarídeos por supressão de NF- κ B à base de redox ativação. *Exp Mol Med.* 2005; 37 (4): 323-34.

[119] *De Stefano D, Maiuri MC, Simeon V, Grassia G, Soscia A, Cinelli MP, Carnuccio R.* Lycopene, quercetin and tyrosol prevent macrophage activation induced by gliadin and IFN- γ . *Eur J Pharmacol.* 2007;566(1-3):192-9.

[120] *Low P, Clark AM, Chou TC, Chang TC, Reynolds M, Ralph SJ.* Immunomodulatory activity of *Melaleuca alternifolia* concentrate (MAC): inhibition of LPS-induced NF- κ B activation and cytokine production in myeloid cell lines. *Int Immunopharmacol.* 2015;26(1):257-64.