

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

**ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA IN VITRO DOS
MONOTERPENOS BETA-CITRONELOL, ALFA-FELANDRENO,
TERPINOLENO E SABINENO**

MARCELLA MALVAZI DE CHRISTO SCHERER

VILA VELHA
JULHO 2017

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

**ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA IN VITRO DOS
MONOTERPENOS BETA-CITRONELOL, ALFA-FELANDRENO,
TERPINOLENO E SABINENO**

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

MARCELLA MALVAZI DE CHRISTO SCHERER

VILA VELHA
JULHO 2017

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

S326a

Scherer, Marcella Malavazi de Christo

Atividades antioxidante e anti-inflamatória *In Vitro* dos monoterpenos beta-citronelol, alfa-felandreno, terpinoleno e sabineno. / Marcella Malavazi de Christo Scherer – 2017.
47f.: il.

Orientador: Marcio Fronza.

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

Inclui bibliografias.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Essências e óleos essenciais. 3. Antioxidantes. I. Fronza, Marcio.
I. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615

MARCELLA MALAVAZI DE CHRISTO SCHERER

**ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA IN VITRO DOS
MONOTERPENOS BETA-CITRONELOL, ALFA-FELANDRENO,
TERPINOLENO E SABINENO**

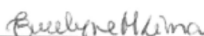
Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha como pré-requisito do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, para obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 19 de julho de 2017,

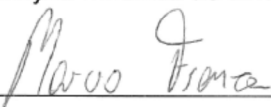
Banca examinadora:



Prof. Dr. Rodrigo Rezende Kitagawa - UFES



Profa. Dra. Ewelyne Miranda de Lima - UVV



Prof. Dr. Marcio Fronza - UVV
(Orientador)

Dedico esta dissertação aos meus pais Arcemar e Lourdes, meu marido Rodrigo Scherer, meu filho Lucas e toda a minha família, que tanto me apoiaram e incentivaram o meu crescimento profissional, e não mediram esforços para que eu chegasse até essa etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e superando todas as dificuldades.

Agradeço ao meu Pai Arcemar e minha Mãe Lourdes por estarem sempre ao meu lado, me dando força, confiando, incentivando e acreditando em mim, sem vocês eu não conseguiria concluir o Mestrado com êxito, agradeço pelas inúmeras vezes que ficaram com o Lucas quando eu tinha aula, experimentos até mais tarde.

Agradeço de coração ao meu marido Rodrigo que foi e sempre será um marido maravilhoso, atencioso que me ajudou muito, entendeu minha ausência, pois eu me dividia em ser esposa, mãe, dona de casa, fisioterapeuta e estudante, tudo junto e ao mesmo tempo.

Agradeço ao meu irmão Tiago pelos ensinamentos na vida pessoal e na vida acadêmica.

Ao meu orientador e amigo Professor Doutor Marcio Fronza, pelos ensinamentos, pela disponibilidade até de madrugada pelo WhastApp, pela paciência, pela confiança em mim depositada para realizar os experimentos e ensina-los aos novos alunos, por me motivar no momento que os experimentos não tinham o resultado que eu esperava. Só tenho a agradecer a excelente orientação e o conhecimento passado.

A minha amiga Mirian de Almeida Silva Cutini que foi um anjinho enviado por Deus. Deixo aqui registrado como sou grata a seus ensinamentos, apoio, carinho, atenção, palavras de incentivo e conselhos. Você me ajudou e contribuiu para meu crescimento. Sempre vou lembrar de você com carinho.

Agradeço a minha amiga Nayana Macedo pelo carinho e atenção de sempre.

A minha amiga Maria Carolina Peisino, pela parceria total na cultura celular, pela troca de conhecimentos, pelo apoio, carinho, atenção e incentivo, pelas muitas risadas, pela frase que vai ficar para sempre “*Vamos deixar as placas quarando!*”.

Minha Flor Mariana Moreira, você foi essencial na troca de conhecimento nos métodos antioxidantes, nos preparos das soluções, no convívio no laboratório, sempre muito proativa, educada e atenciosa. E obrigada pelo Café Cremoso.

A minha amiga e hoje professora Ewelyne Lima, pela atenção e dedicação, e sempre com um sorriso e uma palavra amiga.

Aos colegas dos Laboratórios de Cultura Celular, Produtos Naturais, Lab. 29, Lab. 30, Laboratório do Prof. Levy e a Ana Claudia.

A todos os professores que foram tão importantes na minha vida acadêmica e no desenvolvimento desta dissertação.

À Universidade Vila Velha (UVV) e todos os professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) e Biopráticas; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMARIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
1.INTRODUÇÃO	05
2.OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral.....	13
2.2 Objetivos Específicos.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Reagentes Químicos e Bioquímicos.....	14
3.2 Linhagem Celular.....	14
3.3 Atividade Antioxidante – Métodos Químicos.....	15
3.3.1 Sequestro do radical NO.....	15
3.3.2 Determinação do sequestro do radical livre ABTS.....	15
3.3.3 FRAP (<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>)	16
3.3.4 Determinação do sequestro do radical livre DPPH.....	16
3.4 Viabilidade celular <i>in vitro</i> – MTT.....	16
3.5 Atividade Antioxidante e Anti-Inflamatória <i>in vitro</i>	17
3.5.1 Produção de oxido nítrico <i>in vitro</i>	17
3.5.2 Redução do ânion superóxido.....	17
3.5.3 Inibição do dano oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) ..	18
3.6 Determinação TNF- α <i>in vitro</i>	18
3.7 Determinação da atividade do fator nuclear kappa B.....	19
3.8 Análise Estatística.....	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5 CONCLUSÃO	30
6 REFERENCIAS	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- % - Porcentagem
- °C – Grau Celsius
- µg - Micrograma
- µL – Microlitro
- µM – Micromolar
- ABTS - Ácido 2,2'- azinobis (3-etilbenzenotiazolina- 6-sulfônico)
- AINES - Anti-inflamatórios não esteroidais
- COX – Ciclooxigenases
- COX1 – Ciclooxigenase 1
- COX2 – Ciclooxigenase 2
- DMEM - Meio eagle modificado por dulbecco
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- ELISA - Ensaio Imunoenzimático (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*)
- ERNs – Espécies reativas de nitrogênio
- FRAP - *Ferric Reducing Antioxidant Power*
- g – Grama
- H – Hora
- H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
- IL - Interleucina
- iNOs - Óxido nítrico sintase induzível
- KOH - Hidróxido de potássio
- L-NMMA - Acetato de NG-metil-L-arginina
- LPS - Lipopolissacarídeo
- M - Molar
- mM - Milimolar
- min – Minutos
- mL - Mililitro
- MTT - (brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
- nm - Nanômetro
- NBT - Cloreto de nitroazul tetrazólico
- NFκB - Fator de transcrição nuclear kappa B
- NK - Células natural killer

NO - Óxido nítrico
NOS – Óxido nítrico sintase
e-NOS – Óxido nítrico endotelial
i-NOS – Óxido nítrico induzível
n-NOS – Óxido nítrico neuronal
NPS - Nitroprussiato de sódio
O₂⁻ - Ânion superóxido
PAF - Fator de ativação plaquetária
PBS – *Phosphate buffered saline*
TGF-β - Fator de crescimento transformador beta
TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa
TPCK - Np-Tosil-L-fenilalanina clorometilcetona
TPTZ - 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina
UVV – Universidade Vila Velha

RESUMO

SCHERER, Marcella Malavazi de Christo, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, julho de 2017. **Atividades Antioxidante e Anti-Inflamatória *In Vitro* dos Monoterpenos Beta-Citronelol, Alfa-Felandreno, Terpinoleno e Sabineno.** Orientador: Prof. Dr. Marcio Fronza.

Considerando que os óleos essenciais possuem um amplo estudo de seus aspectos e potencialidades terapêuticas, o objetivo do presente estudo foi investigar o potencial bioativo em relação ao efeito antioxidante e anti-inflamatório *in vitro* dos monoterpenos: beta-citronelol, alfa-felandreno, terpinoleno e sabineno. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). A atividade antioxidante dos monoterpenos foi determinada pelos métodos químicos de análise indireta do sequestro do radical nitrito (NO) pelo método de Griess, determinação do sequestro do radical livre 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) e pelo FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). Em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS (lipopolissacarídeo), as atividades antioxidante e anti-inflamatória foram avaliadas pelo efeito inibitório dos monoterpenos na produção de óxido nítrico e do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Além disso, determinou-se a influência dos monoterpenos sobre a produção da citocina pró-inflamatória TNF- α e do fator nuclear kappa b (NF-kB). Os monoterpenos testados não exibiram efeitos citotóxicos *in vitro* até a concentração de 200 μ M. Os monoterpenos terpinoleno e alfa-felandreno apresentaram atividade antioxidante nos métodos químicos do FRAP (IR_{50} 1325,7 \pm 18,4; 1619,6 \pm 8,7, respectivamente), ABTS (IR_{50} 497,4 \pm 14,5; 367,7 \pm 1,6, respectivamente), e do sequestro do radical NO (IR_{50} 409,4 \pm 1,6; 216,9 \pm 5,7, respectivamente). Todos os monoterpenos apresentaram efeitos dose-dependentes demonstrando capacidade redutora da produção do ânion superóxido, especialmente nas concentrações de 10, 100 e 200 μ M. O beta-citronelol foi o monoterpeno que apresentou os melhores resultados, atingindo a inibição da produção do ânion superóxido em 80,9 \pm 0,5% na concentração de 200 μ M, sendo superior ao controle positivo L-NMMA que inibiu 42,8 \pm 2,8% na concentração de 500 μ M. Os monoterpenos sabineno, terpinoleno e alfa-felandreno nas concentrações de 10 μ M (50,8 \pm 3,5%; 58,2 \pm 2,8%; 70,2 \pm 1,1%), 100 μ M (62,8 \pm 1,1; 82,1 \pm 3,5%; 70,6 \pm 4,3%) e 200 μ M (91,3 \pm 2,8%; 82,6 \pm 3,5%; 87,6 \pm 2,1%), respectivamente, apresentaram bons resultados, semelhantes e até mesmo superiores ao L-NMMA. O beta-citronelol apresentou efeito inibitórios sobre a produção da citocina pró-inflamatória TNF- α na concentração de 100 μ M. O terpinoleno, alfa-felandreno e sabineno demonstraram inibição da ativação do NF-kB, em 7,3%, 14,8% e 17,1%, respectivamente, na concentração de 50 μ M. O presente trabalho sugere que os monoterpenos avaliados apresentam atividade antioxidante e potencial anti-inflamatório ao inibir os mediadores do processo. O resultado obtido nesta pesquisa nos leva a procura contínua por novos produtos naturais contra a inflamação, como os monoterpenos.

Palavras-chaves: Óleos essenciais. Monoterpenos. Resposta inflamatória. Antioxidantes. Estresse Oxidativo. NF-kB. TNF- α .

ABSTRACT

SCHERER, Marcella Malavazi de Christo, M.Sc, University of Vila Velha – ES, July, 2017. **Antioxidant and *In Vitro* Anti-Inflammatory Activities of Monoterpenes Beta-Citronellol, Alpha-Felandreno, Terpinolene and Sabineno.** Advisor: Dr. Marcio Fronza.

Considering that the essential oils have an extensive study of their aspects and therapeutic potential, the objective of the present study was to investigate the bioactive potential in relation to the antioxidant and anti-inflammatory effect *in vitro*. of monoterpenes: beta-citronellol, alpha-phellandrene, terpinolene and sabinene. Cell viability was assessed by the MTT method (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide). The antioxidant activity of the monoterpenes was evaluated by chemical methods of indirect determination of nitrite radical sequestration (NO) by the Griess method, and by determination of free radical sequestration 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) and FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). Antioxidant and anti-inflammatory activities were studied in RAW 264.7 macrophages stimulated with LPS (lipopolysaccharide) evaluating the inhibitory effect of monoterpenes on the production of nitric oxide and the superoxide radical (O_2^{\bullet}). In addition, the influence of monoterpenes on the production of the pro-inflammatory cytokine TNF- α and the nuclear factor kappa b (NF- κ B) was determined. The monoterpenes tested did not exhibit *in vitro* cytotoxic effects up to 200 μ M concentration. The monoterpenes terpinolene and alpha-phellandrene exhibited antioxidant activity in the FRAP assay (IR_{50} 1325.7 \pm 18.4, 1619.6 \pm 8.7, respectively), ABTS (IR_{50} 497.4 \pm 14.5, 367.7 \pm 1.6, respectively), and NO scavenging radical (IR_{50} 409.4 \pm 1.6, 216.9 \pm 5.7, respectively). All monoterpenes exhibited dose-dependent effects demonstrating the ability to reduce superoxide anion production, especially at concentrations of 10, 100 and 200 μ M. Beta-citronellol was the monoterpene that presented the best results, reaching inhibition of 80.9 \pm 0.5% in the concentration of 200 μ M of superoxide anion production, being superior to the positive control L-NMMA that inhibited 42.8 \pm 2.8% at the concentration of 500 μ M. The monoterpenes sabinene, terpinolene and alpha-phellandrene at concentrations of 10 μ M (50.8 \pm 3.5%, 58.2 \pm 2.8%, 70.2 \pm 1.1%), 100 μ M (62.8 \pm 91.3 \pm 2.8%, 82.6 \pm 3.5%, 87.6 \pm 2, 1%), respectively, also exhibited good results, like L-NMMA. Beta-citronellol presented inhibitory effects on the production of proinflammatory cytokine TNF- α at the concentration of 100 μ M. Terpinolene, alpha-felandrene and sabinene demonstrated inhibition of NF- κ B activation, at 7.3%, 14.8% and 17.1%, respectively, at the concentration of 50 μ M. The present work suggests that the evaluated monoterpenes present antioxidant activity and anti-inflammatory potential by inhibiting the pro-inflammatory mediators. Therefore, the obtained results in this study encourage us to the continuous search for new natural compounds, specially the monoterpenes, to be used against inflammatory diseases.

Keywords: Essential oils. Monoterpenes. Inflammatory response. Antioxidants. Oxidative stress. NF- κ B. TNF- α .

1. INTRODUÇÃO

Os anti-inflamatórios, especialmente os não-esteroides (AINEs), são considerados o grupo mais importante de medicamentos disponíveis utilizados para o tratamento e alívio de sintomas de uma série de doenças inflamatórias, tais como artrite reumatoide, febre reumática, osteoartrite, artrite psorítica, lúpus eritematoso sistêmico, entre outras (AKKOL et al., 2012). No entanto, a maioria dos AINEs exibem efeitos adversos graves, em especial no que diz respeito a complicações gastrintestinais. Neste sentido, o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças inflamatórias, especialmente crônicas, continua sendo alvo de grande interesse para a indústria farmacêutica (AKKOL et al., 2012).

A contínua busca por novos compostos com propriedades anti-inflamatórias tornou-se uma questão importante na pesquisa científica especialmente com referência ao uso de substâncias naturais e à redução de efeitos colaterais indesejáveis, justificam a importância de buscar novos fármacos alternativos (DE CÁSSIA DA SILVEIRA SÁ R, ANDRADE NL, DE SOUSA, 2014). Os óleos essenciais, em especial os seus compostos isolados como os terpenos, tem demonstrado uma excelente atividade anti-inflamatória com baixa incidência de efeitos adversos (DE CÁSSIA DA SILVEIRA SÁ R, ANDRADE NL, DE SOUSA, 2013).

A inflamação é uma resposta biológica complexa e natural do organismo a um agente agressor, cuja principal função é destruir e impedir a proliferação dos microrganismos, além de reparar os tecidos danificados (DE CÁSSIA DA SILVEIRA SÁ R, ANDRADE NL, DE SOUSA, 2013). Pode ser classificada como aguda ou crônica e envolve uma cascata de eventos bioquímicos. Independente do fator desencadeante, a ativação dos mediadores químicos envolvidos no processo inflamatório resulta na vasodilatação local, aumento da permeabilidade vascular e do fluxo sanguíneo (nutrição e oxigenação celular), resultando em uma perda de fluído e de proteínas para o tecido por intermédio de diversas substâncias formadas durante o processo inflamatório (MOTTA et al., 2013). O aumento da permeabilidade celular gera redução da velocidade de circulação e contração endotelial, permitindo a abertura de junções intercelulares, provocando o extravasamento plasmático e de células leucocitárias, porém, danos mais graves podem promover a necrose tecidual e extravasamento excessivo de proteínas e células sanguíneas, gerando o edema (GREAVES et al., 2013).

As principais células envolvidas na fase aguda da inflamação são os neutrófilos, enquanto que, na fase crônica, monócitos/macrófagos e algumas linhagens de linfócitos migram para o sítio inflamatório (STANKOV, 2012). Na inflamação aguda ocorre a produção, ativação e liberação de diversos mediadores químicos como a histamina, serotonina, bradicinina, metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), fator de ativação plaquetária (PAF), óxido nítrico, neuropeptídeos e citocinas (BEHM et al., 2012). A inflamação crônica, por sua vez, refere-se a uma mudança progressiva no tipo de células presentes no local da reação inflamatória e caracteriza-se pela destruição e posterior cicatrização do tecido lesionado (GREAVES et al., 2013).

Através da hidrólise da fosfolipase A₂, o ácido araquidônico é produzido e metabolizado posteriormente por duas vias: a via das cicloxigenases (COX) produzindo as prostaglandinas e tromboxanos, e a via das lipoxigenases produzindo os leucotrienos (BEHM et al., 2012). A produção de tromboxano A₂ resulta em uma vasoconstrição reflexa e ativação plaquetária, impedindo assim a perda excessiva de sangue, e que conseqüentemente a inflamação se espalhe para outros tecidos causando uma inflamação; a produção de prostaglandinas além de induzir a vasodilatação, também promove a permeabilidade vascular; já os leucotrienos possuem como uma de suas principais funções, o aumento da adesão celular (GREAVES et al., 2013).

O fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB) encontra-se no citoplasma com o inibidor kappa B formando um complexo inativo, porém é altamente ativo em locais de inflamação em diversas patologias e pode induzir a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, isoforma indutível óxido nítrico sintase (iNOS) e cicloxigenase-2 (COX-2) (PARK, HONG, 2016). Dentre as diversas respostas e atividades fisiológicas controladas pelo NF-kB, a ação sobre os processos inflamatórios e imunes, apoptose, diferenciação celular e ativação da proliferação de células tumorais, estão entre os mais bem estudados e entendidos. O NF-kB é um fator de transcrição central da resposta inflamatória em células imunocompetentes (tanto as periféricas como macrófagos, quanto no sistema nervoso central, como as células da glia) (HOESEL, SCHMID, 2013).

A síntese do óxido nítrico resulta da oxidação de um nitrogênio guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina. Esta reação é catalisada pela enzima NO-sintase (NOS) (DUSSE et al, 2003). Até o momento, foram isoladas três isoformas de NOS: NOS neuronal constitutiva (n-NOS), NOS endotelial constitutivo (e-NOS) e NOS

induzível (i-NOS), que é induzida durante a inflamação. (HAN et. al, 2017). A NOS constitutiva, depende de íons cálcio (Ca^{++}) e de calmodulina, que está envolvida na sinalização celular (DUSSE et al, 2003). A isoforma constitutiva compreende a NOS neuronal, presente nos neurônios, e a NOS endotelial, presente nas células endoteliais vasculares, plaquetas (DUSSE et al, 2003). A i-NOS é induzida nos macrófagos e outras células por lipopolissacarídeos bacterianos e/ou citocinas (HAN et. al, 2017). O NO é um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares, e tem sido alvo de estudos nas últimas décadas pela quantidade de processos biológicos que está envolvido (DUSSE et al, 2003).

As principais espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e cloro, compreendem o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito (ONOO^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HClO), (GUTTERIDGE JM, HALLIWELL B., 2010).

Assim em processos infecciosos, células como macrófagos são ativas e secretam simultaneamente NO e intermediários reativos de oxigênio, como o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$), que reagem e resultam na formação do peroxinitrito (ONOO^-) um poderoso oxidante de proteínas (DUSSE et al, 2003).

O estresse oxidativo provoca uma alteração dos lipídios conhecida como peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, que promove inativação enzimática e ativação excessiva de genes pró-inflamatórios TNF (fator de necrose tumoral), interleucinas (IL), NF-kB (fator nuclear kappa b), TGF- β (fator de crescimento transformador beta), além de danos oxidativos no DNA que aumenta o risco de câncer (GUTTERIDGE JM, HALLIWELL B., 2010; FERRARI et al, 2009).

As citocinas são consideradas mediadores de grande importância para conduzir a resposta inflamatória, permitindo que o processo de cicatrização e a resolução do processo inflamatório sejam possíveis. As citocinas pró-inflamatórias induzem a produção de (NO) através do estímulo da enzima (i-NOS), além de induzirem a migração de outras citocinas para o local (ACHOUI et al., 2010). O aumento da expressão de diversas citocinas, tais como o fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina (IL) -1 β e IL-6, facilitam a migração de leucócitos para o local da inflamação. A produção destas citocinas pró-inflamatórias pode ser induzida por lipopolissarídeos (LPS), que estão localizadas na parede celular de bactérias Gram-negativas, capazes de ativar macrófagos que libertam mediadores inflamatórios, incluindo (NO), o qual exerce funções regulatórias a fim de restaurar a homeostase do tecido (SILVEIRA E SÁ et al., 2014).

TNF- α e IL-1 são consideradas as principais citocinas pró-inflamatórias. O TNF- α , é produzido por macrófagos, linfócitos T e células Natural Killer (NK) e tem como principais funções estimular a produção de outras citocinas e moléculas de adesão, além do estímulo da produção de i-NOS (OLIVEIRA et al., 2011a; BRENNER et al., 2015). Já a IL-1 é produzida por macrófagos, monócitos, células endoteliais e fibroblastos sendo subdividida em IL-1 α e IL-1 β . A IL-1 α , está associada a membrana da célula e age através do contato celular, enquanto a IL-1 β para ser ativada necessita ser primeiramente metabolizada pela caspase-1 (CRUVINEL et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011a).

Mesmo com a eficácia clínica comprovada dos AINES disponíveis no mercado, os efeitos colaterais dos mesmos como: a intolerância gástrica, toxicidade renal agravamento das doenças cardiovasculares, os AINES representam um grande obstáculo na terapêutica (AKKOL, 2012). Neste sentido encontrar substâncias naturais eficazes e com baixa toxicidade, levam os pesquisadores a uma busca constante por novas alternativas farmacológicas com ação anti-inflamatória (BRITO et al., 2013a).

A utilização de óleos essenciais na medicina popular para o tratamento, prevenção e cura de algumas doenças ocorre há diversos anos. Atualmente são mundialmente utilizados em indústrias alimentícias e farmacêuticas, perfumarias, fabricação de cosméticos, inseticidas, dentre outros (LÓPEZ, PASCUAL-VILLALOBOS, 2010; BRITO et al., 2013a; LAWAL et al., 2013). As propriedades farmacológicas atribuídas aos óleos essenciais são diversas e algumas são preconizadas por apresentarem vantagens importantes, quando comparadas a outros medicamentos, como por exemplo, a sua volatilidade, que os torna ideal para uso em nebulizações, banhos de imersão ou simplesmente em inalações (ASBAHANI et al., 2015).

Os óleos essenciais são normalmente misturas complexas e singulares de compostos voláteis aromáticos resultantes do metabolismo secundário das plantas (MILLEZI et al., 2013).

Extraídos a partir de diversos órgãos da planta, como frutos, flores, folhas, cascas, rizomas e sementes (REHMANA et al., 2016), os óleos essenciais são produzidos majoritariamente em células secretoras, bolsas, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares (PINTO-ZEVALLOS, ZARBIN, 2013

Os óleos essenciais apresentam inúmeras potencialidades terapêuticas, e são diversas as atividades biológicas que lhes são atribuídas, tais como: atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, fungicida, antiparasitária, analgésica, cicatrizante, antiviral, sendo as atividades anti-inflamatória e antioxidante de grande interesse principalmente para a indústria alimentar, cosmética e farmacêutica (MIGUEL, 2010; RAJKUMAR, JEBANESAN., 2010; WANNES et al., 2010).

Na procura contínua por novos produtos naturais contra a inflamação, os óleos essenciais e seus componentes isolados, como os monoterpenos, são cada vez mais relatados na literatura pela sua ação anti-inflamatória (DEGENHARDT, KÖLLNER, GERSHENZON, 2009). Considerando que os monoterpenos são comuns em muitas espécies de plantas e são utilizados em preparações cosméticas e farmacêuticas, assim como na indústria alimentar, é importante avaliar o potencial farmacológico de monoterpenos com a atividade anti-inflamatória (DE CÁSSIA DA SILVEIRA E SÁ, ANDRADE, DE SOUSA, 2013).

Entre os terpenos comumente presentes nos óleos essenciais, destacam-se os monoterpenos beta-citronelol, alfa-felandreno, terpinoleno e o sabineno.

O beta-citronelol (3,7-Dimetil-6-octen-1-ol) ($C_{10}H_{20}O$) possui peso molecular de 156,27 g/mol, classificado como um monoterpeno, formado por duas unidades isoprênicas, com cadeia acíclica e função álcool como mostrado na Figura 1 (BAKKALI et. al., 2008).

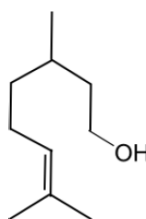


Figura 1: Estrutura química do beta-citronelol

Fonte: Sigma Aldrich.

O beta-citronelol pode ser encontrado nos óleos essenciais de diversas plantas como a *Cymbopogon citratus* (uma planta com propriedades anti-hipertensivas) (VASCONCELOS et al., 2016). Como composto isolado, em experimentos utilizando animais de laboratório, o citronelol mostrou atividade antinociceptiva e anti-

inflamatória *in vivo* e *in vitro* em roedores (BRITO et al., 2012; Brito et al., 2013b), atividade antifúngica *in vitro* (PERREIRA et al., 2015) e efeitos antiespasmódicos em preparações de íleo isolados de roedores (SADRAEI et al., 2013). O beta-citronelol também apresentou efeitos inibidores na contratilidade de anéis traqueais isolados de ratos, apresentando efeitos miorreaxantes e antiespasmódicos (VASCONCELOS et al., 2016).

O alfa-felandreno (2-Metil-5- (1-metiletil) -1,3-ciclo-hexadieno) (C₁₀H₁₆), possui peso molecular de 136,23 g/mol e é classificado como um monoterpene cíclico conforme mostra a Figura 2 (LIN et al., 2014).

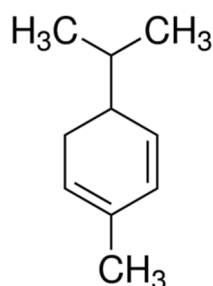


Figura 2: Estrutura química do alfa-felandreno

Fonte: LIMA et al., 2012.

O alfa-felandreno está presente em concentrações variadas, entre alguns espécimes de plantas que apresentam ações analgésicas (LIMA et al., 2012). Embora existam poucos relatos a respeito de α -felandreno, ele é um composto natural encontrado no óleo essencial de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolius* (AFFONSO et al., 2012; LIN et al., 2014). A aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolius*) é amplamente utilizada no Brasil na medicina popular para o tratamento de doenças inflamatórias, em especial para o reumatismo. O extrato da casca é utilizado como anti-inflamatório para promover a cicatrização de feridas e as frutas são utilizadas para combater resfriados e infecções bacterianas (AFFONSO et al., 2012).

A literatura atual apresenta poucos estudos que descrevem a atividade biológica do alfa-felandreno isolado. LIN et al. (2015a) investigaram os efeitos do alfa-felandreno sobre a morfologia celular, viabilidade, distribuição do ciclo celular e apoptose em células de leucemia de camundongos (WEHI-3). Os autores observaram que o alfa-felandreno é capaz de induzir aprisionamento do ciclo celular e apoptose em WEHI-3 células. Em estudo posterior, utilizando a mesma linhagem de células

tumorais de leucemia, WEHI-3, foi demonstrado que o alfa-felandreno também é capaz de induzir a morte celular através da lesão do DNA (LIN et al. 2015b).

O terpinoleno (4-Isopropilideno-1-metilciclo-hexeno) (C₁₀H₁₆) (Figura 3), é um monoterpeno isômero do alfa-felandreno, de peso molecular 136,23 g/mol e é classificado como um monoterpeno. (OKUMURA et al., 2012).

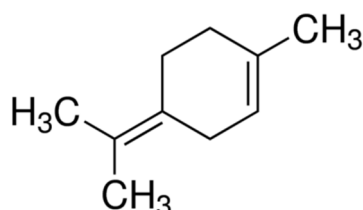


Figura 3: Estrutura química do Terpinoleno.

Fonte: OKUMURA *et al.*, 2012

O terpinoleno é um monoterpeno natural presente em óleos essenciais de plantas aromáticas, possuindo também um largo espectro de atividades biológicas (AYDIN, TÜRKEZ, TAŞDEMİR, 2013), tais como anticancerígeno (HARADA et al., 2012), antioxidante, antifúngico (AYDIN, TÜRKEZ, e TAŞDEMİR, 2013) e larvicida (CONTI et al., 2012).

O terpinoleno constitui os óleos essenciais de plantas, tais como *Melaleuca alternifolia*, *Melaleuca trichostachya*, *Manila elemi*, *Nectranda caiophora*, e *Dacrydium colensoi* (AYDIN E, TÜRKEZ H, TAŞDEMİR S., 2013).

O alfa-terpinoleno ainda é encontrado em várias plantas medicinais como na Myrtle (*Myrtus communis* L.) (ALIPOUR, DASHTI, HOSSEINZADEH, 2014). Vários estudos demonstram as propriedades anti-inflamatórias do óleo essencial de *Myrtus communis* L em modelos animais (ROSSI et al, 2009; HOSSEINZADEH, KOLESHDEL e GHORBANI, 2011; MAXIA et al, 2011). Hosseinzadeh, Koleshdel e Ghorbani, 2011, avaliaram o efeito anti-inflamatório a partir do extrato aquoso e etanólico da *Myrtus communis*. As propriedades anti-inflamatórias e antiproliferativas do extrato etanólico da *Myrtus communis* L, também tem evidenciado um importante papel no tratamento de lesões de acne *in vitro* (ALIPOUR, DASHTI, HOSSEINZADEH, 2014).

O sabineno, também é um monoterpeno isômero (4-metileno-1- (1-metiletil) biciclo [3.1.0] hexano) (C₁₀H₁₆) de peso molecular 136,23 g/mol. É classificado como um monoterpeno bicíclico natural, como mostra a Figura 4 (OZCAN et al., 2010).

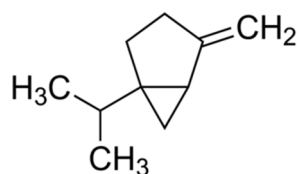


Figura 4: Estrutura química do Sabineno.

Fonte: Sigma Aldrich

Em um estudo fitoquímico do óleo essencial de *Oenanthe crocata L.*, as análises da composição revelaram a presença de hidrocarbonetos monoterpênicos, sendo os principais o *trans*- β -ocimene, sabineno e o *cis*- β -ocimene (BICCHI et al., 2009). Tanto o óleo essencial quanto o sabineno demonstraram atividade anti-inflamatória através da inibição da produção de óxido nítrico em cultura de macrófagos estimulados com lipopolissarídeos e interferon gama (VALENTE et al., 2013).

Estando presente no óleo essencial de *Angelica koreana*, e correspondendo a 31,85% do total de compostos identificados (ROH e SHIN, 2014). O composto isolado sabineno, apresentou atividade antifúngica e quando associado ao fármaco itraconazol para o tratamento de infecções causadas por *Aspergillus* e *Tricophyton*, atenuou os efeitos colaterais da medicação quando utilizada por via oral (WU, SUN e CHANG, 2013; ROH e SHIN, 2014).

Até a presente data, poucos estudos descrevem a atividade biológica dos monoterpênicos beta-citronelol, sabineno, terpinoleno e alfa-felandreno isoladamente. Neste contexto, justifica-se a proposta de investigar detalhadamente os efeitos anti-inflamatórios na tentativa de elucidar o mecanismo de ação dos mesmos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar o potencial bioativo dos monoterpenos beta-citronelol, alfa-felandreno, terpinoleno e sabineno em relação aos efeitos antioxidante e anti-inflamatório em macrófagos estimulados por lipopolissacarídeos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade antioxidante dos monoterpenos beta-citronelol, alfa-felandreno, terpinoleno e sabineno, por ensaios químicos de determinação indireta do sequestro do radical nitrito (NO) pelo método de Griess, determinação do sequestro do radical livre 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) e pelo FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).
- Determinar a atividade citotóxica *in vitro* em cultura de células (fibroblastos L929, hepatoma de camundongos [Hepa 1c1c7], macrófagos RAW 264.7 e carcinoma pancreático humano [MIA PaCa-2]) do beta-citronelol, alfa-felandreno, terpinoleno e sabineno.
- Avaliar a influência dos monoterpenos sobre a produção de óxido nítrico, ânion superóxido em cultura de macrófagos e efeito protetor ao dano oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio em cultura de fibroblastos.
- Investigar os efeitos dos monoterpenos sobre a produção de TNF- α em cultura de macrófagos estimulados por lipopolissarídeos.
- Determinar os efeitos dos monoterpenos sobre a atividade do fator de transcrição NFKB.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Reagentes químicos e bioquímicos

Os monoterpenos (\pm) -Citronelol, Terpinoleno, α -Felandreno e Sabineno (. com alto teor de pureza acima de 98%), Lipopolissacarídeo (LPS), acetato de NG-metil-L-arginina (L-NMMA), cloreto de nitroazul de tetrazólio (NBT), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido gálico, Np-Tosil-L-fenilalanina clorometilcetona (TPCK), 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolína-6- ácido sulfônico) (ABTS), 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) humano, foram adquiridos da Sigma Aldrich® Chemical Co, St. Luís, MO, EUA, e armazenados de acordo com as recomendações do fabricante. Kits de ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção da citocina TNF- α foram adquiridos da eBioscience, San Diego, Califórnia, EUA. Nitroprussiato de sódio dihidratado (NPS) foi adquirido da Neon Comercial Ltda, Suzano, São Paulo, Brasil. Todos os demais reagentes utilizados apresentavam grau analítico e foram obtidos a partir de várias fontes comerciais.

3.2. Linhagens celulares

Foram utilizadas as células de fibroblastos L929 (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) (retrovírus) foram gentilmente cedidas pela Prof. Dra. Tamara P. Kondratyuk (Universidade do Hawái 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 μ g/mL de estreptomicina (Sigma Aldrich® Chemical Co, St. Luís, MO, EUA), a 37°C, numa atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 .

3.3 Atividade antioxidante - métodos químicos

3.3.1 Sequestro do radical NO

A atividade antioxidante 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 et al (1991) com modificações. A solução de 75 μ L de NPS 1,25 mM (diluída em água) foi adicionada ao mesmo volume, a diferentes concentrações da amostra (48 μ g/mL a 4000 μ g/mL) dissolvida em etanol e incubadas à 37°C durante 10 min. A concentração de nitrito nas amostras foi determinada através da reação de Griess (GREEN *et al.*, 1982), após a adição de 75 μ L da amostra e 75 μ L NPS, foi adicionado 150 μ L (sendo 75 μ L de NEED e 75 μ L da Sulfa) de reagente de Griess (1% sulfanilamida em 5% ácido fosfórico e 0,1% de dicloridrato de N-1- naftiletlenodiamina em água). A densidade óptica foi medida a 540 nm utilizando 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.

3.3.2 Determinação do sequestro do radical livre ABTS

A atividade antioxidante dos monoterpenos também foi determinada pelo método do sequestro do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfônico) (ABTS) de acordo com Re et al (1999) modificado. A solução de ABTS foi adicionada a diferentes concentrações da amostra (51,2 μ g/mL a 4000 μ g/mL) diluída em etanol, e reagiu no escuro por 6 minutos. A densidade óptica foi medida a 734 nm utilizando leitor de microplacas (Leitor de Microplacas Multi-Mode, Filter Max F5, Molecular Devices Spectra, EUA). Os resultados foram expressos em IR₅₀ (concentração que reduz 50% dos radicais livres) que foi calculado através da equação da reta obtida na curva de calibração final μ g/mL vs inibição %).

3.3.3 FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

O ensaio de determinação do poder de redução do íon ferro, FRAP (do Inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power*) é baseado na produção do íon Fe^{2+} (forma ferrosa) a partir da redução do íon Fe^{3+} (forma férrica) presente no complexo 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) (BENZIE e STRAIN 1999; ANTOLOVICH et al., 2002.). A solução do FRAP foi adicionada a diferentes concentrações da amostra (128 $\mu\text{g/mL}$ a 4000 $\mu\text{g/mL}$) diluída em etanol, reagiu por 10 minutos, em seguida realizada leitura da densidade óptica em 585 nm utilizando leitor de microplacas (Leitor de Microplacas Multi-Mode, Filter Max F5, Molecular Devices Spectra, EUA). Os resultados foram expressos em IR_{50} , que foi calculado através da equação da reta obtida na curva de calibração (concentração final $\mu\text{g/mL}$ vs inibição %)

3.3.4 Determinação do sequestro do radical livre DPPH

A atividade antioxidante dos monoterpenos foi avaliada utilizando o método proposto por Scherer e Godoy (2009). A ação antioxidante dos extratos foi expressa pelo Índice de Atividade Antioxidante (IAA) que é calculado pela equação: $\text{IAA} = \text{concentração final de DPPH } (\mu\text{g/mL}) / \text{IR}_{50} (\mu\text{g/mL})$.

3.4 Viabilidade celular *in vitro* – MTT

A viabilidade celular dos monoterpenos foi avaliada pelo método colorimétrico do MTT (MOSMANN, 1983) com modificações. Em resumo, as células de fibroblastos L929, 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 monoterpenos (1 – 200 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 incubado a 37°C por 2h, os cristais de formazana formados foram dissolvidos com 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO). A densidade óptica foi medida a 595 nm, usando leitor de microplacas (Multi-Mode Microplate Reader, Filter Max F5, Molecular Devices Spectra, USA). Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.5 Atividade Antioxidante e Anti-Inflamatória *in vitro*

3.5.1 Produção de óxido nítrico *in vitro*

Os efeitos inibitórios dos monoterpenos sobre a produção de óxido nítrico foi avaliado em cultura de macrófagos estimulados por LPS. Os macrófagos foram plaqueados na concentração de 8×10^4 células/mL em placas de 96 poços e incubados 24h (5% de CO₂ a 37°C) até atingir a 70-80% de confluência. No segundo dia do experimento o meio DMEM foi substituído por DMEM sem vermelho de fenol, as células foram expostas a diferentes concentrações dos monoterpenos (1 – 200 µM), foi adicionado em todos os poços (menos no controle negativo) LPS (1 µg/ml), L-NMMA (500 µM) e Indometacina (10 µM) foram utilizadas como controle positivo. Decorridas 20 h de incubação, 100 µL do sobrenadante foram transferidos para outra placa e realizado a quantificação de nitrito pela adição de 180 µL da solução de Griess (contendo volumes iguais de 1% sulfanilamida em ácido fosfórico 5% e 0,1 % de dicloridrato de N-1- naftiletilenodiamina em água). A concentração de nitrito foi determinada através da reação de Griess (GREEN et al., 1982). A densidade óptica foi medida a 540 nm, usando leitor de microplacas (Multi-Mode Microplate Reader, Filter Max F5, Molecular Devices Spectra, USA).

3.5.2 Redução da produção do ânion superóxido

O ensaio do superóxido foi usado para determinar o efeito inibitório dos monoterpenos sobre a produção do radical superóxido (O₂^{•-}) em cultura de macrófagos RAW 264.7 ativados por LPS (CHOI et al 2006; STURROCK et al, 2006; PINHO, 2011). Em resumo os macrófagos RAW 264.7 foram plaqueados na concentração de 8×10^4 células/mL em placas de 96 poços e cultivados por 24 h. As células foram então, pré-tratadas com concentrações crescentes (1 – 200 µM) das amostras e estimuladas com LPS na concentração de 1 µg/mL, o padrão positivo L-NMMA (500 µM) e Indometacina (10 µM) e incubadas por 20 h. (5% de CO₂ a 37°C). Após a incubação, removeu-se o sobrenadante e adicionou-se 50 µL de cloreto de nitroazul de tetrazólio (NBT) (1 mg/mL) em todos os poços, e incubadas por 2 h. Após as 2 h 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 120 µL hidróxido de potássio (KOH) 2M agindo por 5

minutos no agitador de placas e após essa etapa foram adicionados 140 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) agindo por 5 minutos no agitador de placas. A densidade óptica foi realizada a 630 nm (PINHO et. al, 2011), usando leitor de microplacas (Multi-Mode Microplate Reader, Filter Max F5, Molecular Devices Spectra, USA). Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos em percentagem de produção do ânion superóxido em relação ao grupo controle estimulado por LPS. Os resultados foram expressos em percentagem de produção do ânion superóxido em relação ao grupo controle estimulado por LPS.

3.5.3 Inibição do dano oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

O efeito protetor dos monoterpenos contra o dano oxidativo e toxicidade do peróxido de hidrogênio em fibroblastos L929 foi avaliado pelo ensaio do peróxido de hidrogênio modificado (ANNAN e HOUGHTON, 2008 e ADETUTU et al, 2011). As células foram plaqueadas na concentração de 7×10^4 células/mL em placas de 96 poços e cultivadas *overnight* (5% de CO₂ a 37°C). Após incubação adicionou-se H₂O₂ 500 µM, seguida de adição de concentrações crescentes (1 – 200 µM) das amostras e as células foram incubadas novamente por 24 h (5% de CO₂ a 37°C). Utilizou-se o ácido gálico na concentração de 80 µM como controle positivo. Após o período de incubação a viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico do MTT.

3.6 Determinação de TNF α *in vitro*

Macrófagos (RAW 264.7) foram cultivados em placas de 96 poços para cultura de células e incubados até atingir a 70-80% de confluência. As células foram expostas a diferentes concentrações das amostras (10, 50 e 100µM), 60 min antes da adição do LPS (1 µg/mL). Decorridas 24 h, o sobrenadante celular foi utilizado para quantificação da citocina TNF-α, empregando o ensaio imunoenzimático (ELISA – do inglês *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), seguindo instruções do fabricante (eBioscience®). A concentração de TNF-α para cada amostra foi determinada pela equação da reta e comparando-se as absorbâncias das concentrações conhecidas da curva padrão TNF-α com as absorbâncias obtidas nas amostras.

3.7 Determinação da atividade do fator nuclear kappa B

A determinação da atividade do fator nuclear kappa B foi realizado para avaliar a capacidade dos monoterpenos em inibir o NF-kB utilizando a expressão de luciferase (HOMHUAL et al., 2006; MORAIS et al., 2010; KONDRATYUK et al., 2012). 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 µg/mL de estreptomicina e 2 mM de glutamina. Após a incubação, concentrações crescentes (1-100 µM) 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 utilizada uma curva de TPCK (0,001-2,5 mM) como controle positivo ($IC_{50} = 3,8$ mM). A atividade da luciferase foi monitorada através de leitor de luminescência com microplacas (Mults-Mode, Filter Max F5, Molecular Devices Spectra, EUA). Os resultados foram expressos como porcentagem da atividade inibidora de NF-kB.

3.8. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad (San Diego, CA, EUA 176). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e/ou desvio padrão (DP). Variações estatísticas entre os grupos foram determinadas utilizando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os efeitos citotóxicos *in vitro* dos monoterpenos beta-citronelol, alfa-felandreno, terpinoleno e sabineno foram avaliados em diferentes linhagens celulares, destacando-se as células de fibroblastos L929, hepatoma de camundongos (Hepa 1c1c7), macrófagos RAW 264.7 e carcinoma pancreático humano (MIA PaCa-2) empregando o método colorimétrico do MTT. Os resultados demonstraram que todos os monoterpenos testados em diferentes concentrações não apresentaram efeitos citotóxicos significativos em nenhuma das linhagens celulares até a concentração máxima testada de 200 μ M, conforme pode ser observado nas figuras 5, 6, 7 e 8.

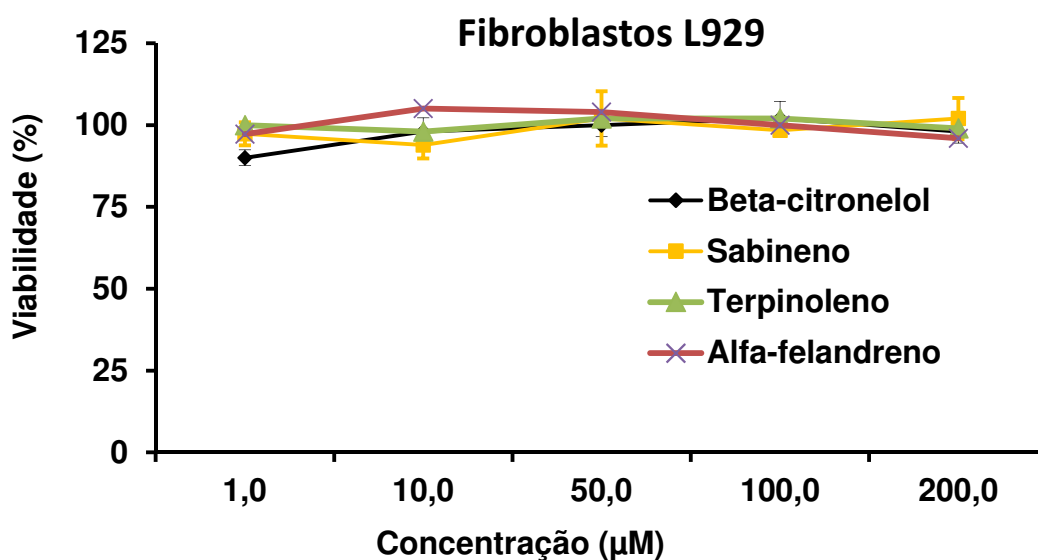


Figura 5: Efeitos dos monoterpenos (beta-citronelol, sabineno, terpinoleno e alfa-felandreno) nas concentrações de 1 a 200 μ M sobre a viabilidade de fibroblastos L929 após 24 h de exposição avaliado pelo ensaio colorimétrico do MTT. Os resultados são expressos em porcentagem média \pm D.P. de células viáveis comparada ao grupo controle de três experimentos independentes.

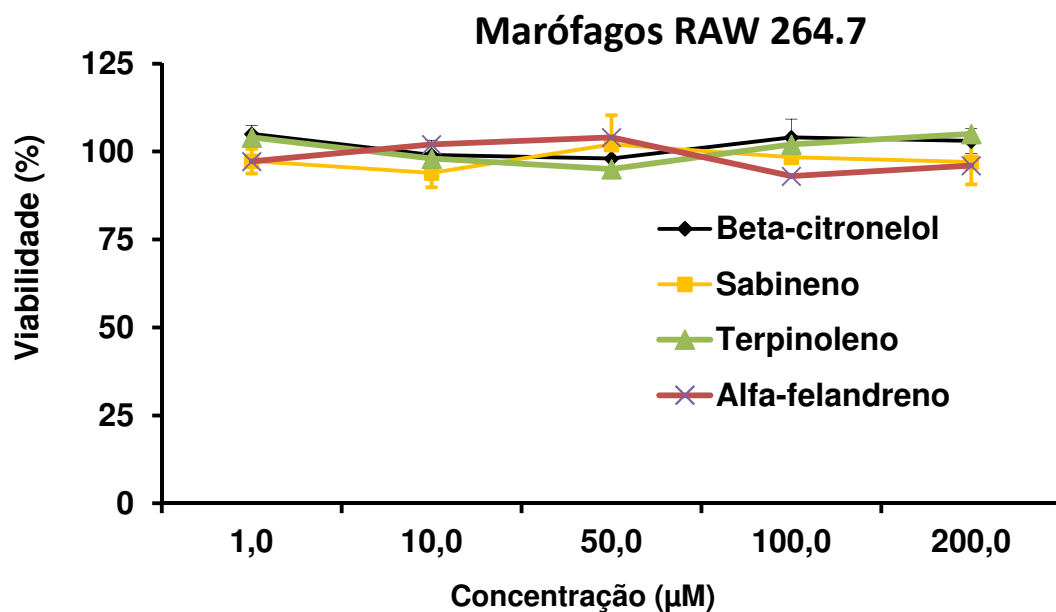


Figura 6: Efeitos dos monoterpenos (beta-citronelol, sabineno, terpinoleno e alfa-felandreno) nas concentrações de 1 a 200 µM sobre a viabilidade de macrófagos RAW 264.7 após 24 h de exposição avaliado pelo ensaio colorimétrico do MTT. Os resultados são expressos em porcentagem média ± D.P. de células viáveis comparada ao grupo controle de três experimentos independentes.

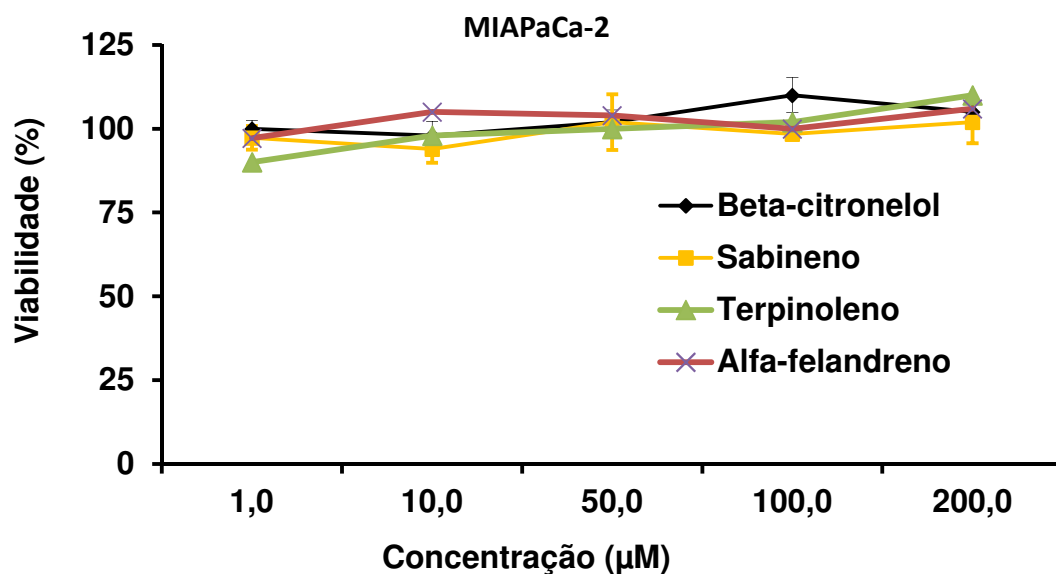


Figura 7: Efeitos dos monoterpenos (beta-citronelol, sabineno, terpinoleno e alfa-felandreno) nas concentrações de 1 a 200 µM sobre a viabilidade de macrófagos MIAPaCa-2 após 24 h de exposição avaliado pelo ensaio colorimétrico do MTT. Os resultados são expressos em porcentagem média ± D.P. de células viáveis comparada ao grupo controle de três experimentos independentes.

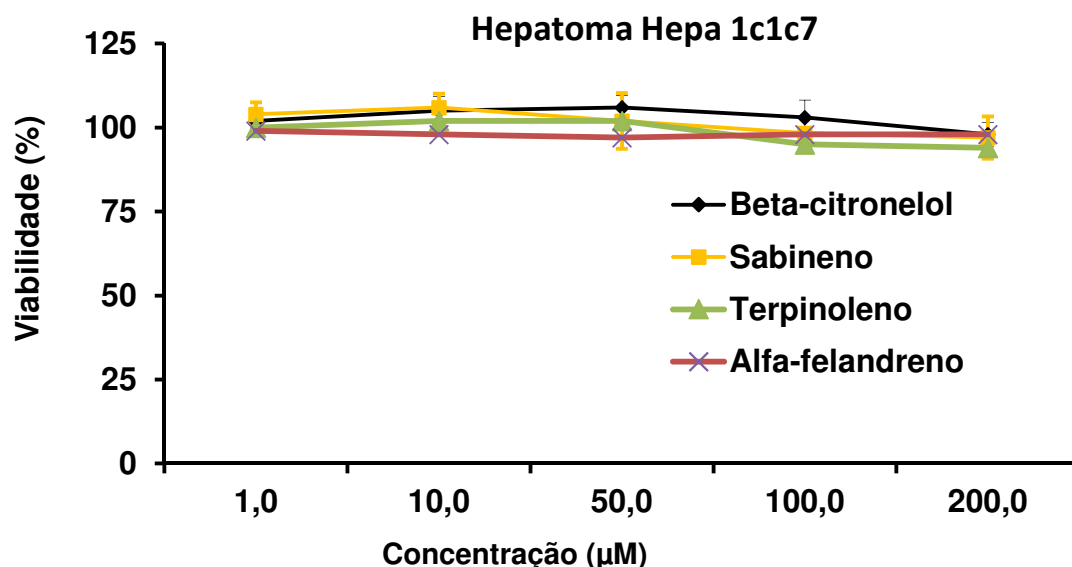


Figura 8: Efeitos dos monoterpenos (beta-citronelol, sabineno, terpinoleno e alfa-felandreno) nas concentrações de 1 a 200 μM sobre a viabilidade de células de hepatoma Hepa 1c1c7 após 24 h de exposição avaliado pelo ensaio colorimétrico do MTT. Os resultados são expressos em porcentagem média \pm D.P. de células viáveis comparada ao grupo controle de três experimentos independentes.

Barros et al (2016), descrevem em seu trabalho que o terpinoleno (6,1%) e o sabineno (5,9%) presentes no óleo essencial de *Lantana câmara* não apresentaram efeitos citotóxicos significativos até a concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ para linhagem Fibroblastos NCTC929, confirmando assim os dados obtidos no presente estudo. Os efeitos citotóxicos do alfa felandreno nas concentrações de 0,16 a 1,25 $\mu\text{L/mL}$ foram avaliados em diferentes linhagens celulares, macrófagos (RAW 264,7), queratinócitos (HaCat) e hepatócitos (Hep G2) e os resultados demonstraram que o alfa felandreno apresentou ligeira citotoxicidade nas linhagens testadas (CABRAL et al., 2015).

Na cultura de macrófagos e queratinócitos o sabineno foi menos tóxico, afetando a viabilidade celular apenas a 1,25 $\mu\text{L/mL}$, os resultados obtidos em queratinócitos o sabineno demonstrou um perfil de segurança em 0,32 $\mu\text{L/mL}$, demonstrando citotoxicidade para as concentrações de 0,64 e 1,25 $\mu\text{L/mL}$ (Valente et al., 2013). O alfa-felandreno apresentou citotoxicidade de leve a moderada (AHMED et al, 2010).

Levando em consideração os resultados de citotoxicidade/viabilidade celular, demonstrando que os monoterpenos analisados em concentrações inferiores a 200 μM não apresentaram efeitos citotóxicos significativos, os demais ensaios foram realizados em concentrações inferiores a concentração máxima testada de 200 μM .

Evidências indicam que os radicais livres participam do processo inflamatório produzindo espécies reativas de oxigênio, como ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HClO), óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) (GUTTERIDGE JM e HALLIWELL B., 2010). As espécies reativas possuem efeitos benéficos para as células quando ocorrem em concentrações baixas a moderadas, mas a sua superprodução, ou seja, o estresse oxidativo, pode levar a danos celulares significativos (VALKO et al, 2007). Neste contexto, compostos com efeitos antioxidantes tendem a contribuir para a melhora do quadro inflamatório. Os monoterpenos terpinoleno e, em especial o alfa-felandreno apresentaram resultados de atividade antioxidante nos métodos químicos do FRAP, ABTS e do sequestro do radical NO (Tabela 1). Por outro lado, o beta-citronelol não apresentou atividade antioxidante em nenhum dos ensaios utilizados até a concentração máxima testada (4000 $\mu\text{g/mL}$). No método do sequestro do radical DPPH, nenhum dos monoterpenos estudados apresentaram efeitos antioxidante (dados não mostrados).

Tabela 1. Atividade antioxidante dos monoterpenos (beta-citronelol, sabineno, terpinoleno e alfa-felandreno) avaliado quimicamente pelos testes do ABTS, FRAP e NO. Os resultados são expressos como IR_{50} μM e representam a médias \pm D.P. de três experimentos independentes.

Amostras	ABTS	FRAP	NO
Beta citronelol	-	-	-
Sabineno	-	1939,7 \pm 18,7 ^a	529,3 \pm 4,2 ^a
Terpinoleno	497,4 \pm 14,5 ^a	1325,7 \pm 18,4 ^b	409,4 \pm 1,6 ^b
Alfa felandreno	367,7 \pm 1,6 ^b	1619,6 \pm 8,7 ^{a,b}	216,9 \pm 5,7 ^c
Gallic acid	nd	nd	223,2 \pm 4,3 ^c
Quercetina	2,6 \pm 0,3 ^c	15,7 \pm 0,4 ^c	nd

- representa que não houve atividade até a máxima concentração testada de 4000 $\mu\text{g/mL}$. nd: não testado. Diferentes letras na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$).

Bourgou et al. (2012), relataram que o terpinoleno mostrou atividade antioxidante usando 2',7' -dicloro-floresteína diacetato (DCFH-DA) em células normais de pele humana de fibroblasto (WS1). Estudos recentes também demonstraram que o terpinoleno apresentou propriedades antioxidantes pelo ensaio de ácido 2,2-difenil-

1-icilidrazilo (DPPH). Turkez et al. (2015), observaram que o terpinoleno em concentrações abaixo de 150 mg/L não provocou alterações nos níveis de estresse oxidativo total, enquanto um tratamento com 150 e 200 mg/L causaram aumentos significativos dos níveis de estresse oxidativo total em células sanguíneas humanas cultivadas em comparação ao grupo controle, entretanto as concentrações de 10, 25, 50 e 75 mg/mL exibiram um aumento da capacidade total oxidante.

Cabral et al. (2015), no estudo do óleo essencial de *Ridolfi segegetum* (L.), onde os seus principais compostos são alfa-felandreno (53 – 63%), o terpinoleno (11,9 – 8,6%), beta-felandreno (5,5 – 6%) e o dillapiol (1,9 – 8%), demonstraram alta capacidade antioxidante nas concentrações testadas (0,05 – 0,20 µg/mL) e atribuíram os efeitos antioxidantes ao alfa felandreno testado isoladamente nas mesmas concentrações.

Embora os ensaios químicos nos forneçam dados preliminares importantes, estes são considerados relativamente simples para determinação da capacidade antioxidante, uma vez que não são representativos das condições celulares do nosso organismo (ALVES et al., 2010). Assim, tendo em vista que antioxidantes assumem papel importante na medicina preventiva se faz necessário que as informações sejam obtidas a partir de sistemas biológicos. Neste contexto, empregando o modelo experimental em cultura de macrófagos estimulados com LPS, os monoterpenos foram ensaiados para avaliar sua capacidade de inibir a produção do radical superóxido, óxido nítrico e reduzir a morte celular causado pelo dano oxidativo produzido pelo peróxido de hidrogênio.

Nesse estudo, investigamos o ânion superóxido (em cultura de macrófagos) e o peróxido de hidrogênio (em cultura de fibroblastos) estimulados por LPS. Todos os monoterpenos apresentaram efeitos dose-dependentes demonstrando capacidade redutora da produção do ânion superóxido, especialmente nas concentrações de 10, 100 e 200 µM (Figura 9). O beta-citronelol foi o monoterpeno que apresentou os melhores resultados, atingindo a inibição da produção do ânion superóxido em $80,9 \pm 0,5\%$ na concentração de 200 µM, inclusive superior ao controle positivo L-NMMA inibiu $42,8 \pm 2,8\%$ na concentração de 500 µM. Os monoterpenos sabineno, terpinoleno e alfa-felandreno na concentração de 1 µM mantiveram a mesma produção de O_2^- do controle negativo, não apresentando atividade estabilizadora própria de um agente antioxidante, entretanto nas concentrações de 10 µM ($50,8 \pm 3,5\%$; $58,2 \pm 2,8\%$; $70,2 \pm 1,1\%$), 100 µM ($62,8 \pm 1,1$; $82,1 \pm 3,5\%$; $70,6 \pm 4,3\%$) e 200

μM ($91,3 \pm 2,8\%$; $82,6 \pm 3,5\%$; $87,6 \pm 2,1\%$), respectivamente apresentaram efeitos significativos com resultados semelhantes e até mesmo superiores ao L-NMMA.

Apesar dos evidentes efeitos antioxidantes dos monoterpenos apresentados, eles não apresentaram efeito protetor contra o dano celular induzido por H_2O_2 nas concentrações analisadas (1, 10, 50, 100 μM) (dados não mostrados).

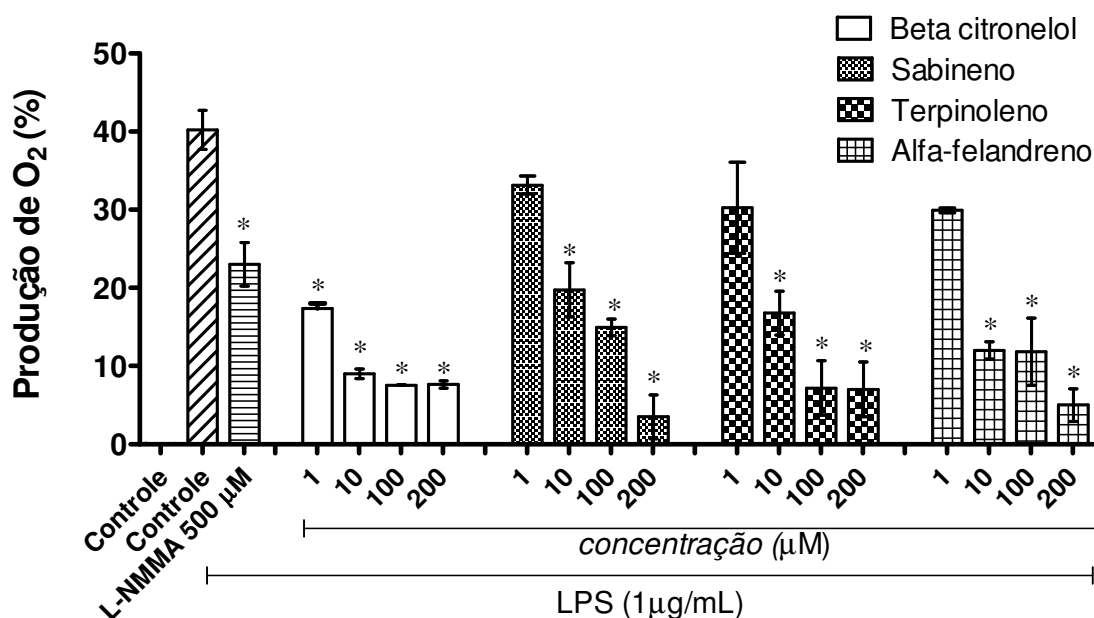


Figura 9: Efeito dos monoterpenos nas concentrações de 1, 10, 100 e 200 μM sobre a concentração do radical ânion superóxido (O_2^-) em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) após 24 h de tratamento. Significância estatística para $p < 0,05$. * controle LPS comparado ao tratamento.

Gülçin et al. (2012), estudaram o óleo do Cravo da Índia (*Eugenia aromatica* ou *Eugenia caryophyllata*, Fam. *Myrtaceae*), onde o composto majoritário o eugenol, o qual inibiu $57,0 \pm 0,4\%$ radical ânion superóxido e $22,9 \pm 2,3\%$ na redução do peróxido de hidrogênio. Em outro estudo Baik et al. (2008), observaram as atividades biológicas dos óleos essenciais de algumas espécies de Citrus, onde o Limoneno estava em maior expressão (55,4% a 91,7%), das 14 espécies analisadas, somente o óleo de *Citrus natsudaidai* Hayata (*Natsudaidai*) 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). No estudo de Pinho e colaboradores 2011, observaram que o LPS aumentou a geração de superóxido, especialmente nas células do grupo controle.

Compostos que sejam capazes de sequestrar o radical NO podem desempenhar um papel importante citoprotetor, agindo nos processos de citotoxicidade induzida por espécies reativas de nitrogênio (ERNs), atuando na modulação de processos inflamatórios, diminuindo o estresse oxidativo (MAIA et al, 2010).

Todos os monoterpenos analisados exibiram capacidade de inibir a produção de NO em cultura de macrófagos de forma dose dependente. A inibição apresentada nas concentrações de 100 μM e 200 μM pelo monoterpeno terpinoleno foi de $40,9 \pm 1,5\%$ e $41,3 \pm 1,5\%$, respectivamente. O alfa-felandreno nas mesmas concentrações exibiu um efeito inibitório de $54,7 \pm 0,9\%$ e $63,8 \pm 1,1\%$, respectivamente. O L-NMMA, que é um inibidor da i-NOS, analisado na concentração de 500 μM inibiu $61,0 \pm 2,9\%$ a produção de NO (Figura 10).

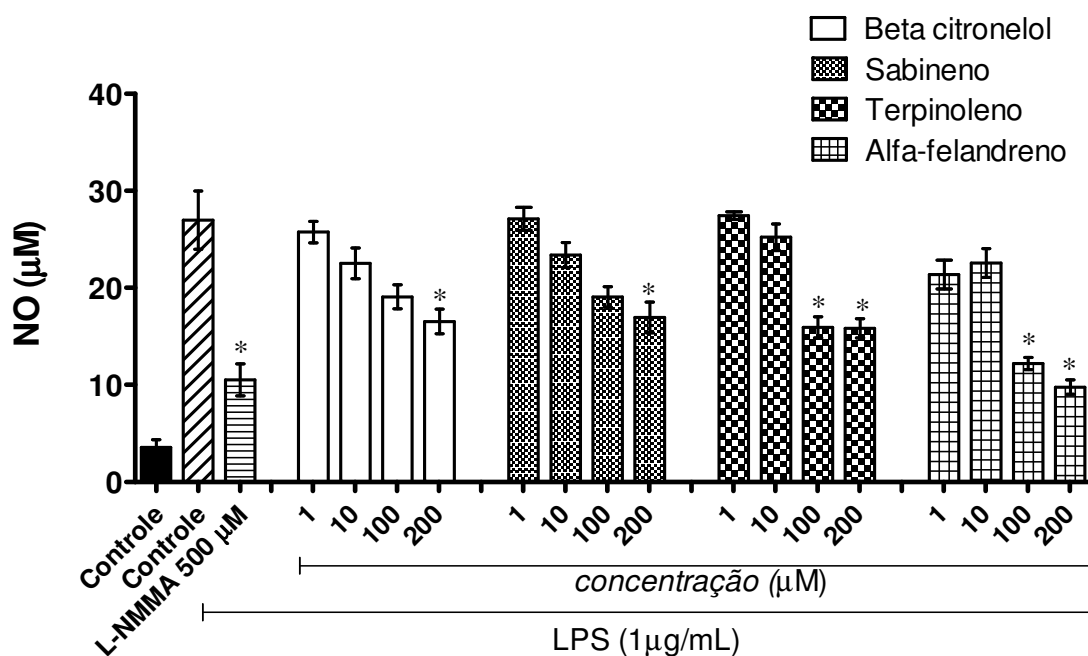


Figura 10: Efeito dos monoterpenos nas concentrações de 50, 100 e 200 μM na produção de NO em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS 1 $\mu\text{g/mL}$ (24 h). Significância estatística para $p < 0,05$. * controle LPS comparado ao tratamento.

No estudo realizado por Cabral et al. (2015), observou-se que o efeito do óleo essencial *Ridolfia segetum* (L.) sobre a produção de NO após a estimulação de macrófagos com LPS na presença do óleo, a produção de óxido nítrico induzida por LPS foi significativamente reduzida com as quatro concentrações testadas (0,16; 0,32; 0,64 e 1,25 $\mu\text{L/mL}$), e apenas a maior concentração testada (1,25 $\mu\text{L/mL}$), reduziu significativamente a produção de óxido nítrico. Na pesquisa de Valente et al. (2013),

o efeito do óleo *Oenanthе crocata* L. e do sabineno na produção de NO foi analisado medindo a acumulação de nitritos no meio de cultura. Incubação de macrófagos com LPS e IFN- γ , por 24 h, resultou em um aumento significativo na produção de nitrito até $211,1 \pm 13,3\%$ ($p < 0,001$), acima do controle (100%). Na presença de $0,32 \mu\text{L/mL}$ de óleo, a produção de nitrito foi reduzida para $130,7 \pm 9,0\%$, acima do controle ($p < 0,001$), sem afetar a viabilidade celular. O efeito do sabineno avaliado sozinho foi semelhante ao do óleo essencial, a produção de NO foi reduzida para $135,6 \pm 3,16\%$, acima do controle, assim, este composto pode ser responsável pela atividade anti-inflamatória do óleo.

As citocinas são mediadores necessários para conduzir a resposta inflamatória aos locais de infecção e lesão (OLIVEIRA et. al., 2011). O aumento da expressão de da citocina TNF- α (fator de necrose tumoral), induz mediadores lipídicos da inflamação, e facilita na migração de leucócitos para o local da inflamação, induz a diferenciação celular e apoptose. A produção desta citocina pró-inflamatória pode ser induzida por LPS (SILVEIRA E SÁ et al., 2014).

Em geral, o tratamento com os monoterpenos sabineno, terpinoleno e alfa felandreno não apresentaram efeitos inibitórios na produção de TNF- α em macrófagos estimulados com LPS. Apenas o beta citronelol, na maior concentração testada (100 μ M) exibiu efeitos significativos sobre a produção desta importante citocina inflamatória (Figura 11).

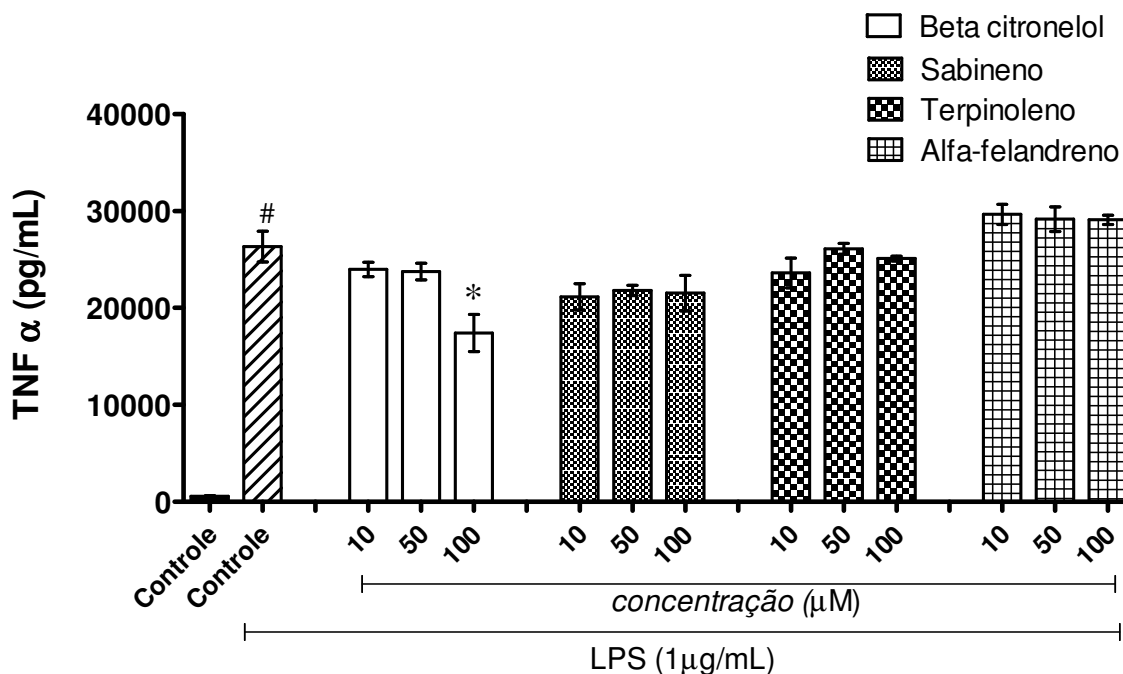


Figura 11. Efeito dos monoterpenos nas concentrações de 10, 50 e 100 μ M sobre a produção de TNF- α em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS μ g/mL (24 h). Significância estatística para $p < 0,05$. * controle LPS comparado ao tratamento. # controle comparado ao controle + LPS.

O fator de transcrição NF- κ B é um fator central da resposta inflamatória em células imunocompetentes (tanto as periféricas como macrófagos, quanto no sistema nervoso central, como as células da glia) (HOESEL e SCHMID, 2013). Dentre as diversas respostas e atividades fisiológicas controladas pelo NF- κ B são, regular a transcrição e a expressão de múltiplos genes, e está intimamente relacionado com ativação celular, proliferação celular, resposta imune e processo de reação inflamatória (ZHANG et al., 2017).

Nossos resultados evidenciaram que o terpinoleno, alfa-felandreno e sabineno demonstraram capacidade de inibir a ativação do NF- κ B, em 7,3%, 14,8% e 17,1%, respectivamente, na concentração de 50 μ M (Tabela 2).

Tabela 2. Representação do efeito dos monoterpenos (beta-citronelol, sabineno, terpinoleno e alfa-felandreno) na concentração de 50 µM sobre a atividade do fator de transcrição nuclear kappa B em cultura de células renais embrionárias humanas 293

Terpenos	% inibição do NF-κB	
	% inibição do NF-κB	% Sobrevivência
Beta-citronelol	-	100,5
Sabineno	17,1 ± 2,5	97,4
Terpinoleno	7,3 ± 3,6	96,3
Alfa felandreno	14,8 ± 3,3	101,7
TPCK (833,3 µM)	26,9 ± 2,1	98,9

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

Compostos com atividade anti-inflamatória promissora, demonstraram inibir a produção de mediadores inflamatórios (citocinas pró-inflamatórias), e tiveram seus efeitos mediados pela expressão do fator de transcrição NF-κB (ZHONG et al., 2013 e JUNG et al., 2013).

5.CONCLUSÃO

O presente estudo sugere que os monoterpenos avaliados apresentam atividade antioxidante e potencial anti-inflamatório ao inibir a produção de importantes mediadores do processo inflamatório como o óxido nítrico e o TNF- α e inibir a ativação do fator de transcrição NF-kB. Além disso, os monoterpenos apresentaram importantes efeitos antioxidantes com atividade sequestrante de radicais livres que participam do processo inflamatório e de seu prolongamento, bem como, de efeitos protetores aos danos oxidativos celulares. Apesar das lacunas a serem preenchidas em nosso estudo, para melhor compreensão e elucidação dos efeitos biológicos dos monoterpenos estudados, os resultados obtidos nesta pesquisa nos motivam a contínua busca por novos produtos naturais com atividade anti-inflamatória, com destaque para os monoterpenos, que apesar de pouco estudados isoladamente, demonstraram apresentar uma promissora atividade anti-inflamatória.

6. REFERENCIAS

Achoui M, Applenton D, Abdulla MA, Awang K, Mohd MA, Mustafa MR. 2010. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory activity of 17- O-Acetylacuminolide through the Inhibition of Cytokines, NF-kB Translocation and IKKb Activity. PloS One, 5(12), e 15105.

Adetutu A, Morgan WA, Corcoran O. 2011. Antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation activity of crude extracts of *Bridelia ferruginea* leaf, a woundhealing plant of Nigeria. J Ethnopharmacol., 133(1),116-119.

Affonso Cristiano RG, Fernandes Rozeverter M, Oliveira Janylla MG de, Martins Maria do Carmo de Carvalho e, Lima Sidney G de, Sousa Júnior Gustavo R de, Fernandes Maria Zenaide de Lima C. Moreno, Zanini Surama F. 2012. Effects of the essential oil from fruits of *Schinus terebinthifolius Raddi* (Anacardiaceae) on reproductive functions in male rats. Journal of the Brazilian Chemical Society, 23(1), 180-185.

Ahmed AL, Bassem SE, Mohamed YH, Gamila MW. 2010. Cytotoxic essential oil from *Annona senegalensis* Pers. leaves. Pharmacognosy Res., 2(4), 211-214

Akkol Ek, Das S, Sarker SD, Nahar L. 2012. The treatment of inflammation, pain, and fever using medicinal plants. Adv. Pharmacol Sci. 2012:476985.

ALVES, Clayton Q. et al. 2010 Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. Quím. Nova, 33(10), 2202-2210.

Alipour G, Dashti S, Hosseinzadeh H. 2014. Review of pharmacological effects of *Myrtus communis* L. and its active constituents. Phytother Res., 28(8), 1125-1136.

Annan K, Houghton PJ. 2008. Antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation of aqueous extracts of *Ficus asperifolia* Miq. and *Gossypium arboreum* L., wound-healing plants of Ghana. J Ethnopharmacol.; 119(1):141-144.

Antolovich M, Prenzler P, Patsalides E, McDonald S, Robards K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. Analyst 127: 183-198.

Aoki T, Narumiya S. 2012. Prostaglandins and chronic inflammation. Trends Pharmacol Sci., 33, 304-311.

Asbahani AE, Miladi K, Badri W, Sala M, Addi EHA, Casabianca H, Mousadik AE, Hartmann D, Jilale A, Renaud FNR, Elaissari A. 2015. Essential oils: From extraction to encapsulation. Int. J. Pharm., 483(1-2), 220-243.

Aydin E, Türkez H, Taşdemir S. 2013. Anticancer and antioxidant properties of terpinolene in rat brain cells. Arh Hig Rada Toksikol., 64(3), 415-424.

Baik JS, Kim SS, Lee JA, Oh TH, Kim JY, Lee NH, Hyun CG. 2008. Chemical composition and biological activities of essential oils extracted from Korean endemic citrus species. J Microbiol Biotechnol., 18(1):74-79.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils—a review. Food Chem. Toxicol., 46(2), 446-475.

Barros LM, Duarte AE, Morais-Braga MF, Waczuk EP, Vega C, Leite NF, de Menezes IR, Coutinho HD, Rocha JB, Kamdem JP. 2016. Chemical Characterization and Trypanocidal, Leishmanicidal and Cytotoxicity Potential of *Lantana camara L.* (*Verbenaceae*) Essential Oil. Molecules. 10;21(2).

Bates JN, Baker MT, Guerra R Jr, Harrison DG. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. 1991. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. Biochem Pharmacol. 11;42.

Behm B, Babilas P, Landthaler M, Schreml S. 2012. Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol., 26(7),812-820.

Benzie IF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Anal Biochem. 15;239(1):70-76.

Bicchi C, Rubiolo P, Ballero M, Sana C, Matteodo M, Esposito F, Zinzula L, Tramontano E, 2009. HIV-1-inhibiting activity of the essential Oil of *Ridolfia segetum* and *Oenanthe crocata*. Planta Med. 75, 1331–1335.

- Bolzani VS, Soares CP, Pezzuto JM. 2010. 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.*24(18):1758-1765.
- Bourgou S, Pichette A, Lavoie S, Marzouk B, Legault J (2012) Terpenoids isolated from Tunisian *Nigella sativa* L. essential oil with antioxidant activity and the ability to inhibit nitric oxide production. *Flavour Frag J* 27:69–74
- Brenner D, Blaser H, Mak TW. 2015. Regulations of tumour necrosis factor signaling: live or let die. *Nat. Rev. Immunol.* 15(6), 362-374.
- Brito AMG, Rodrigues SA, Brito RG, Xavier-Filho L. 2013a. Aromaterapia: da gênese a atualidade. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 15(4), 789-793.
- Brito RG, Guimarães AG, Quintans JS, Santos MR, De Sousa DP, Badaue-Passos D Jr, de Lucca W Jr, Brito FA, Barreto EO, Oliveira AP, Quintans LJ Jr. 2012. Citronellol, a monoterpene alcohol, reduces nociceptive and inflammatory activities in rodents. *J Nat Med.*, 66(4), 637-644.
- Brito RG, Santos PL, Prado DS, Santana MT, Araújo AA, Bonjardim LR, Santos MR, de Lucca Júnior W, Oliveira AP, Quintans-Júnior LJ. 2013b. Citronellol reduces orofacial nociceptive behaviour in mice - evidence of involvement of retrosplenial cortex and periaqueductal grey areas. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 112(4),215-221.
- Cabral C, Poças J, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Cruz MT, Salgueiro L. 2015. *Ridolfia segetum* (L.) Moris (Apiaceae) from Portugal: A source of safe antioxidant and anti-inflammatory essential oil. *Industrial Crops and Products*, V 65, 56–61
- Choi HS, Kim JW, Cha YN, Kim C. 2006. A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. *J Immunoassay Immunochem.* 27(1):31-44.
- Conti B, Benelli G, Flamini G, Cioni PL, Profeti R, Ceccarini L, Macchia M, Canale A. 2012. Larvicidal and repellent activity of *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae) essential oil

against the mosquito *Aedes albopictus* Skuse (*Diptera: Culicidae*). Parasitol Res., 110, 2013-2021.

Cruvinel W de M, Mesquita D Jr, Araújo JA, Catelan TT, de Souza AW, da Silva NP, Andrade LE. 2010. Immune System – part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. Rev. Bras. Reumatol. 50(4), 434-461.

Cruz-Machado, S. S. 2010. Lipopolissacarídeo (Lps): Ativador e Regulador da Transcrição Gênica Via Fator de Transcrição Nfkb. Rev. da Biologia, 4, 40-43.

De Barros N, De Assis AVR, Mendes MF. 2014. Extração do óleo de manjeriço usando fluido supercrítico: análise experimental e matemática. Ciência Rural. 44(8), 1499-1505.

De Cássia da Silveira e Sá R, Andrade LN, de Sousa DP. 2013. A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. Molecules. 18(1), 1227-1254.

De Cássia da Silveira e Sá R, Andrade LN, de Sousa DP. 2014. A review on anti-inflammatory activity of phenylpropanoids found in essential oils. Molecules.19(2):1459-80.

Degenhardt J, Köllner TG, Gershenzon J.2009. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. Phytochemistry. 70(15-16), 1621-1637.

Dusse L, Vieira L, Carvalho M. 2003. Revisão sobre óxido nítrico. J. Bras. Patol. Med. Lab., 39(4).

Ferrari CKB, França EL, Honório-França AC. 2009. Nitric oxide, health and disease. J. Appl. Biomed., 7:163-173.

Greaves NS, Ashcroft KA, Baguneid M, Bayat A. 2013. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing, 72(3), 206-217.

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids., 126(1), 131-138.

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

Gutteridge JM, Halliwell B. 2010. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. Biochem Biophys Res Commun. ,19;393(4):561-564

Jung SH, Kim SJ, Jun BG, Lee KT, Hong SP, Oh MS, Jang DS, Choi JH.2013. α -Cyperone, isolated from the rhizomes of *Cyperus rotundus*, inhibits LPS-induced COX-2 expression and PGE2 production through the negative regulation of NF κ B signalling in RAW 264.7 cells. J Ethnopharmacol. 147(1):208-214

Han, T, Tang, Y, Li, J, Xue, B, Gong, L, Li, J, Yu, X, Liu, C. 2017. Nitric oxide donor protects against acetic acid-induced gastric ulcer in rats via S-nitrosylation of TRPV1 on vagus nerve. Scientific Reports, 7, 2063.

Harada T, Harada E, Sakamoto R, Ashitani T, Fujita K, Kuroda K. 2012. Regio- and Substrate-Specific Oxidative Metabolism of Terpinolene by Cytochrome P450 Monooxygenases in *Cupressus lusitanica* Cultured Cells. Am. J. Plant. Sci., 3, 268-275.

Hoesel B, Schmid JA. 2013. The Complexity of Nf-Kb Signaling in Inflammation and Cancer. Mol Cancer. 12:86.

Homhual S, Zhang HJ, Bunyapraphatsara N, Kondratyuk TP, Santarsiero BD, Mesecar AD, Herunsalee A, Chaukul W, Pezzuto JM, Fong HH. 2006. Bruguiesulfurol, a new sulfur compound from *Bruguiera gymnorrhiza*. Planta Med. 72(3):255-260.

Hosseinzadeh H, Khoshdel M, Ghorbani M. 2011. Antinociceptive, anti-inflammatory effects and acute toxicity of aqueous and ethanolic extracts of *Myrtus communis* L. Aerial parts in mice. J. Acupunct. Meridian. Stud., 4(4) 242-247.

Kondratyuk TP, Park EJ, Yu R, van Breemen RB, Asolkar RN, Murphy BT, Fenical W, Pezzuto JM. 2012. Novel marine phenazines as potential cancer chemopreventive and anti-inflammatory agents. *Mar Drugs*.10(2):451-464.

Lawal OA, Ogunwande IA. 2013. Essential oil from the medicinal plants of Africa. *Medicinal Plant Research Africa*, 203-224.

Lima DF, Brandão MS, Moura JB, Leitão JM, Carvalho FA, Miúra LM, Leite JR, Sousa DP, Almeida FR. 2012. Antinociceptive activity of the monoterpene α -phellandrene in rodents: possible mechanisms of action. *J Pharm Pharmacol.*, 64(2), 283-292.

Lin JJ, Hsu SC, Lu KW, Ma YS, Wu CC, Lu HF, Chen JC, Lin JG, Wu PP, Chung JG. 2015a. Alpha-phellandrene-induced apoptosis in mice leukemia WEHI-3 cells in vitro. *Environ Toxicol.* 31(11):1640-1651.

Lin JJ, Wu CC, Hsu SC, Weng SW, Ma YS, Huang YP, Lin JG, Chung JG. 2015b. Alpha-phellandrene-induced DNA damage and affect DNA repair protein expression in WEHI-3 murine leukemia cells in vitro. *Environ Toxicol.* 30(11), 1322-30.

Lin JJ, Yu CC, Lu KW, Chang SJ, Yu FS, Liao CL, Lin JG, Chung JG. 2014. α -Phellandrene Alters Expression of Genes Associated with DNA Damage, Cell Cycle, and Apoptosis in Murine Leukemia WEHI-3 Cells. *Anticancer Res.* 34(8), 4161-4180.

López MD, Pascual-Villalobos MJ. 2010. Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. *Industrial Crops and Products*, 31, 284-288.

Maia Robinson M., Moura Carlos W. N., Bispo Vanderson S., Santos João L. A., Santana Rafael S., Matos Humberto R. 2010. Avaliação do sequestro do óxido nítrico (NO) pelo extrato metanólico da alga *Bryothamnion triquetrum*. *Rev. bras. farmacogn.*, 20 (4): 489-493.

Maxia A, Frau MA, Falconieri D, Karchuli MS, Kasture S. 2011. Essential oil of *Myrtus communis* inhibits inflammation in rats by reducing serum IL-6 and TNF-alpha. *Nat Prod Commun.*, 6(10) 1545-1548.

Miguel MG. 2010. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, 15 (12), 9252–9287.

Millezi AF, Baptista NN, Caixeta DS, Rossoni DF, Cardoso MG, Piccoli RH. 2013. Caracterização e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. *Rev. Bras. Plantas Med.*, Botucatu. 15(3), 373-379.

Morais MC, Luqman S, Kondratyuk TP, Petronio MS, Regasini LO, Silva DH, Bolzani VS, Soares CP, Pezzuto JM. 2010. 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*, 24(18):1758-65.

Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. 65(1-2): 55-63.

Motta EVS, Pinto NCC, Duque APN, Mendes R F, Bellozi PMQ. Scio, E. 2013. Atividade antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória das folhas de *Mucunapruriens* (L.) DC. *Rev. Bras. Plantas Med.*, Botucatu. 15(2), 264-272.

Okumura N, Yoshida H, Nishimura Y, Kitagishi Y, Matsuda S. 2012. Terpinolene, a component of herbal sage, downregulates AKT1 expression in K562 cells. *Oncol Lett.*, 3(2), 321-324.

Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. 2011a. Citocinas e Dor. *Rev. Bras. Anesthesiol.*, 61(2), 255-265.

Oliveira MMM, Brugnera DF, Cardoso MG, Guimarães LGL, Piccoli RH. 2011b. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. *Rev. Bras. Plantas Med.*, Botucatu. 13(1), 8-16.

Ozcan B, Esen M, Sangun MK, Coleri A, Caliskan M. 2010. Effective antibacterial and antioxidant properties of methanolic extract of *Laurus nobilis* seed oil. *J Environ Biol*. 31(5),637-641.

Park MH, Hong JT. 2016. Roles of NF- κ B in Cancer and Inflammatory Diseases and Their Therapeutic Approaches. *Cells*. 5(2).

Pereira F de O, Mendes JM, Lima IO, Mota KS, Oliveira WA, Lima Ede O. 2015. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. *Pharm Biol*. 53(2), 228-234.

Pinho BR, Sousa C, Valentão P, Andrade PB. 2011. Is nitric oxide decrease observed with naphthoquinones in LPS stimulated RAW 264.7 macrophages a beneficial property? *PLoS One*.6(8): e24098.

Pinto-Zevallos DM, Zarbin PHG. 2013. A Química na agricultura: perspectivas para o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis. *Química Nova*, 36(10) 1509-1513.

Rajkumar S, Jebanesan A. 2010. Chemical composition and larvicidal activity of leaf essential oil from *Clausenadentata* (Willd) *M. Roam*. (Rutaceae) against the *chikungunya* vector, *Aedes aegypti* Linn. (Diptera: Culicidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 13 (2), 107-109.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 26(9-10),1231-1237

Rehmana, Rafia; Hanifa, Muhammad Asif; Mushtaqb, Zahid; Al-Sadic, Abdullah Mohammed. 2016. Biosynthesis of essential oils in aromatic plants: A review. *Food Reviews International*., 32(2), 117-160.

Roh J, Shin S. 2014. Antifungal and Antioxidant Activities of the Essential Oil from *Angelica koreana* Nakai. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med*. 2014, Article ID 398503, 7 pages.

Rossi A, Di Paola R, Mazzon E, Genovese T, Caminiti R, Bramanti P, Pergola C, Koeberle A, Werz O, Sautebin L, Cuzzocrea S. 2009. *Myrtucommulone* from *Myrtus communis* exhibits potent anti-inflammatory effectiveness in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 329(1), 76-86.

Sadraei H, Asghari G, Emami S. 2013. Inhibitory effect of *Rosa damascena* Mill flower essential oil, geraniol and citronellol on rat ileum contraction. *Res. Pharm. Sci.*, 8(1), 17-23.

Scherer R. & Godoy HL. 2009. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chem* 112:654-658.

She Y, Zheng Q, Xiao X, Wu X, Feng Y. 2016. An analysis on the suppression of NO and PGE2 by diphenylheptane A and its effect on glycerophospholipids of lipopolysaccharide-induced RAW264.7 cells with UPLC/ESI-QTOF-MS. *Anal. Bioanal. Chem.*, 408(12), 3185-3201.

Sigma Aldrich. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w530597?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 11 de abril de 2016.

Silveira e Sá R, Andrade L Oliveira R, Sousa D. 2014. A review on anti-inflammatory activity of phenylpropanoids found in essential oils. *Molecules*, 19 (2), 1459–1480.

Stankov VS. 2012. Definition of Inflammation, Causes of Inflammation and Possible Anti-inflammatory Strategies. *The Open Inflamm. J.*, 5, 1-9.

Sturrock A, Cahill B, Norman K, Huecksteadt TP, Hill K, Sanders K, Karwande SV, Stringham JC, Bull DA, Gleich M, Kennedy TP, Hoidal JR. 2006. 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*. 290(4): L661-L673.

Turkez, H. , Aydın, E, Geyikoglu, F, Cetin, D. 2015. Genotoxic and oxidative damage potentials in human lymphocytes after exposure to terpinolene in vitro. *Cytotechnology*, 67(3): 409–418.

Valente J, Zuzarte M, Gonçalves MJ, Lopes MC, Cavaleiro C, Salgueiro L, Cruz MT. 2013. Antifungal, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Oenanthe crocata* L. essential oil. *Food Chem. Toxicol.*, 62,349-354.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.*, 39(1):44-84.

Vasconcelos TB, Ribeiro-Filho HV, Lucetti LT, Magalhães PJ. 2016. β -Citronellol, na alcoholic monoterpene with inhibitory properties on the contractility of rat trachea. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 49(2), e4800.

Zhang K, Song F, Lu X, Chen W, Huang C, Li L, Liang D, Cao S, Dai H. 2017. MicroRNA-322 inhibits inflammatory cytokine expression and promotes cell proliferation in LPS-stimulated murine macrophages by targeting NF- κ B1 (p50). *Bioscience Reports.*;37(1): BSR20160239.

Zhong W, Chi G, Jiang L, Soromou LW, Chen N, Huo M, Guo W, Deng X, Feng H. 2013. p-Cymene modulates in vitro and in vivo cytokine production by inhibiting MAPK and NF- κ B activation. *Inflammation.*;36(3):529-537

Wannes, W.A.; Mhamdi B.; Sriti, J.; Ben, J.M.; Ouchikh, O.; Hamdaoui, G.; Kchouk, M.E.; Marzouk, B. 2010. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis var. italica L.*) leaf, stem and flower. *Food Chem. Toxicol.*, 48(5), 1362-1370.

Wu LC, Sun PL, Chang YT. 2013. Extensive deep dermatophytosis cause by *Trichophyton rubrum* in a patient with liver cirrhosis and chronic renal failure. *Mycopathologia.* 176(5-6), 457-462.